

Inhibitori ciklooksigenaze 2 (COX-2)

Magić, Dina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:328359>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij kemije

Dina Magić

Inhibitori ciklooksigenaze-2 (COX-2)

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2022.

Sažetak

Ciklooksigenaza-2 (engl. *Cyclooxygenase-2*, COX-2) je enzim koji se pojavljuje u bolnim i upaljenim tkivima, dok je u zdravim tkivima uglavnom neaktivan. To je enzim koji katalizira nastanak prostanoida (prostaglandina, tromboksana i prostaciklina), spojeva koji povećavaju upalnu reakciju u organizmu. Kako bi se bol i upala umanjile koriste se različiti inhibitori ovog enzima. Među prvima su se razvili neselektivni inhibitori koji su osim COX-2 inhibirali i rad vrlo sličnog enzima, ciklooksigenaze-1 (engl. *Cyclooxygenase-1*, COX-1). Kasnija istraživanja su se usredotočila na pronalazak selektivnih inhibitora koji će inhibirati samo rad COX-2. Međutim, takvi su inhibitori pokazali velik broj neželjenih nuspojava. Novija istraživanja se usmjeravaju na pronalazak adekvatnih inhibitora prirodnog porijekla jer oni izazivaju značajno manji broj nuspojava. Također, neki od inhibitora COX-2 pokazali su značajna antikancerogena svojstva zbog čega se ispituju u kombinacijama s raznim kemoterapeuticima.

Ključne riječi: ciklooksigenaza-2, prostanoide, inhibitori, NSAID, toksičnost

Abstract

Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an enzyme that occurs in painful and inflamed tissues, while it is mostly inactive in healthy tissues. It is an enzyme that catalyses the production of prostanoids (prostaglandins, thromboxanes and prostacyclins), compounds that increase the body's inflammatory response. Various inhibitors of this enzyme are used to reduce pain and inflammation. First developed inhibitors were non-selective inhibitors that, in addition to COX-2, inhibited the work of a very similar enzyme, cyclooxygenase-1 (COX-1). Subsequent research has focused on finding selective inhibitors that will only inhibit COX-2 activity. However, such inhibitors have shown a large number of unwanted side effects. Recent research focus on finding adequate inhibitors of natural origin because they have significantly reduced side effects. Also, some of the COX-2 inhibitors have shown significant anticancer properties which is why they are being tested in combination with various chemotherapeutics.

Key words: cyclooxygenase-2, prostanoids, inhibitors, NSAID, toxicity

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. CIKLOOKSIGENAZA-2 (COX-2)	2
2.1.1. Struktura enzima COX-2.....	2
2.1.1.1. Strukturne razlike između izoenzima COX-1 i COX-2	4
2.1.2. Mehanizam djelovanja COX-2.....	6
2.1.2.1. Prostanoidi	7
2.1.2.2. Uloga COX-2 u upali.....	8
2.2. INHIBITORI COX-2	9
2.2.1. Neselektivni inhibitori COX-2	10
2.2.1.1. Salicilati	11
2.2.1.2. Derivati propionske kiseline	12
2.2.1.3. Antranilna kiselina.....	14
2.2.1.4. Derivati octene kiseline	14
2.2.1.5. Derivati enolne kiseline	16
2.2.2. Selektivni inhibitor COX-2	17
2.2.2.1. Celekoksib	18
2.2.2.2. Meloksikam	19
2.2.2.3. Etodolak.....	20
2.2.2.4. Ostali selektivni inhibitori	21
2.2.3. Štetni učinci selektivnih i neselektivnih inhibitora	23
2.2.3.1. Mitohondrijski oksidativni stres	23
2.2.3.2. Oštećenja probavnog sustava.....	24
2.2.3.3. Kardiovaskularne bolesti	25
2.2.4. Prirodni inhibitori COX-2	26
2.2.4.1. Alkaloidi	28
2.2.4.2. Flavonoidi.....	29
2.2.5. Inhibitori s kumarinskom jezgrom	30
2.3. POVEZNICA COX-2 S RAKOM.....	32
2.3.1. Rak prostate.....	34
2.3.2. Rak dojke.....	35
2.2.3. Kombiniranje inhibitora COX-2 i kemoterapeutika u liječenju raka	36

3. ZAKLJUČAK.....	38
4. LITERATURNÁ VRELA.....	39

1. UVOD

Ciklooksigenaza-2 (engl. *Cyclooxygenase-2*, COX-2) je ključni enzim koji katalizira prva dva koraka nastanka prostanoida koje dijelimo na tromboksane, prostaglandine i prostacikline. Ovaj enzim često se naziva i prostaglandin-endoperoksid sintaza 2 (engl. *Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2*, PTGS2). COX-2 je jedan od tri poznata izoenzima ciklooksigenaze koji uključuju ciklooksigenazu-1 (engl. *Cyclooxygenase-1*, COX-1), ciklooksigenazu-2 i novo otkrivenu ciklooksigenazu-3 (engl. *Cyclooxygenase-3*, COX-3) [1].

COX-1 i COX-2 su genetski neovisni proteini te su najtemeljitiije proučene oksigenaze sisavaca. Geni za oba enzima kod ljudi se nalaze na različitim kromosomima te pokazuju različita svojstva. COX-1 se konstitutivno eksprimira u mnogim tkivima, a prostaglandini (engl. *Prostaglandin*, PG) koje proizvodi posreduju u funkcijama kao što su: zaštita želučane sluznice, regulacija bubrežnog protoka krvi i agregacija trombocita. Nasuprot tome, COX-2 nije aktivan u većini normalnih, zdravih tkiva, ali njegovu ekspresiju brzo induciraju podražaji poput protuupalnih citokina, lipopolisaharida, mitogena i onkogena, čimbenika rasta te hormona. Ovi podražaji rezultiraju povećanom sintezom PG-a u upaljenim i neoplastičnim tkivima. Dokazano je i da je COX-2 uključen u patološke procese poput upale i različitih vrsta raka [2].

Inhibitori COX-2 su svrstani u podrazred nesteroidnih protuupalnih lijekova (engl. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug*, NSAID), a djeluju tako što inhibiraju enzime i time reduciraju sintezu prostanoida koji su odgovorni za napredovanje upalnog odgovora. NSAID-i svojim protuupalnim i analgetskim djelovanjem predstavljaju izbor za liječenje različitih upalnih i bolnih stanja u svakodnevnom životu, a neki od inhibitora su pokazali i antikancerogena svojstva. Prvi sintetizirani NSAID-i bili su neselektivni, odnosno pokazivali su jednaku inhibicijsku moć za oba izoenzima. Također, ti su lijekovi pokazali i neželjene nuspojave zbog čega se farmakologija okrenula prema sintezi selektivnih inhibitora koji će djelovati samo na COX-2. Selektivni inhibitori pokazali su nešto učinkovitije djelovanje koje je i dalje popraćeno neželjenim efektima. Upravo zbog toga se u novijim istraživanjima sve više pažnja usmjerava na selektivne inhibitore prirodnog porijekla koji su pokazali najniži stupanj toksičnosti.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. CIKLOOKSIGENAZA-2 (COX-2)

Ciklooksigenaza-2 je enzim koji je odgovoran za stvaranje prostanoida koji se javljaju za vrijeme upale. Strukturno gledano COX-2 je homodimer koji je sastavljen od dvije monomerne jedinice. Ovaj enzim ima dvojaku katalitičku ulogu: prevođenje arahidonske kiseline u prostanoida i redukcija prostanoida u prostaglandine. COX-2 je uglavnom povezan s imunološkim stanicama (leukocitima i makrofagima), kao i s fibroblastima, hondrocitima, endotelnim stanicama, a posebno s upalnim mjestima u tijelu. Međutim, COX-2 je konstitutivno izražen i u brojnim tkivima što uključuje: mozak, crijeva, pluća, timus i bubrege. Ekspresiju COX-2 mogu potaknuti: upalni citokini, faktori rasta, promotori tumora, hipoksija, ionizirajuće zračenje te karcinom [3].

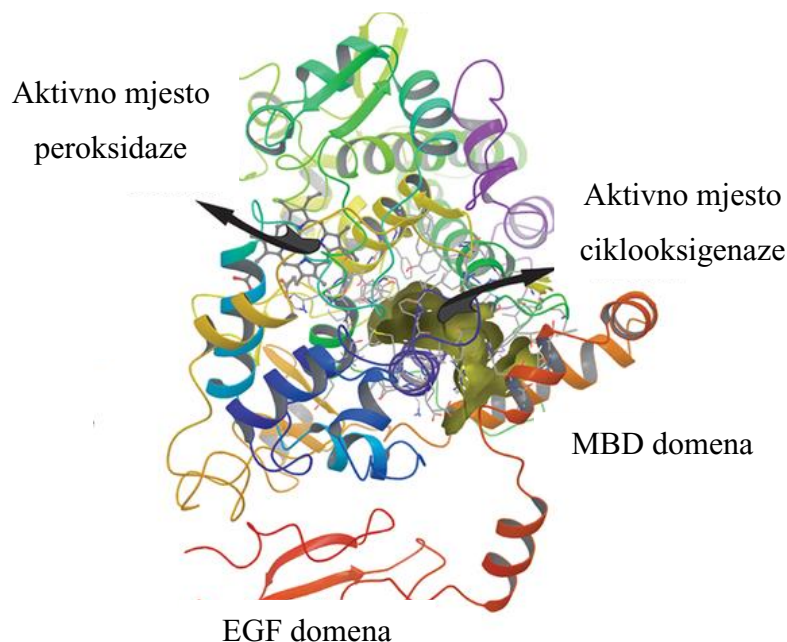
Prekomjerna ekspresija COX-2 u tumorskom tkivu sugerira da je ovaj enzim uključen u onkogenezu. Povećavanje ekspresije COX-2 omogućuje stanicama raka da izbjegnu apoptozu i imunološki odgovor čime potiče invaziju stanica raka. Mehanizam kojim COX-2 sudjeluje u onkogenezi nije u potpunosti razjašnjen, ali je jasno kako on posreduje u interakcijama između stanica raka i njihove okoline kako bi stvorio optimalne uvjete za njihov opstanak, rast i proliferaciju [3].

2.1.1. Struktura enzima COX-2

COX-2 je dvofunkcionalni homodimer vezan za staničnu membranu. Nalazi se na površini endoplazmatskog retikuluma te na vanjskoj strani jezgrine ovojnice. Dio proteina COX-2 lokaliziran je i na plazmatskim membranama u kaveolama. Kaveole su ulegnuća stanične membrane koja nastaju kao posljedica povezivanja s glavnim strukturnim proteinom, kaveolinom. Kaveolin je membranski protein koji se sastoji od tri acilne skupine i hidrofobne domene preko koje se veže sa staničnom membranom. Kaveole se nalaze u različitim tkivima te imaju raznoliku funkciju što uključuje: endocitozu, kalcijevu signalizaciju, regulaciju različitih signalnih putova, transcitozu i potocitozu [4].

Neaktivna struktura COX-2 uključuje sekvencijski niz od 604 aminokiseline. Kako bi enzim postao aktivan polipeptidni lanac se skraćuje i dobiva se niz od 587 aminokiselina. Jedan monomer enzima se sastoji od tri strukturne domene: *N*-terminalne domene epidermalnog faktora rasta (engl. *Epidermal Growth Factor*, EGF), domene za vezanje

metila (engl. *Methyl-CpG-Binding Domain*, MBD) i C-terminalne katalitičke domene. Zajedno, sve ove domene tvore 25 α -uzvojnica, sedam 3_{10} heliksa, četiri β -lista te pet disulfidnih veza koje doprinose vezanju dva pojedinačna monomera kako bi se dobio konačni izgled enzima [5]. Strukturni prikaz enzima dan je na Slici 1.



Slika 1. Prikaz strukture enzima COX-2 [6].

EGF domene karakteristične su za nekoliko vrsta membranskih proteina. Gotovo su uvijek ove domene povezane s N-terminalnim dijelom polipeptidnog lanca što im omogućava da se nalaze na ekstracelularnoj strani. EGF i katalitičke domene zajedno stvaraju šupljinu u dimeru u koju se smještaju dvije MBD domene. EGF domena čini većinski strukturni dio enzima [7].

MBD ljudske ciklooksigenaze se sastoji od četiri kratka α -heliksa kojeg čine aminokiseline sekvencijskog niza 59-111. Tri heliksa leže, otprilike, u istoj ravnini dok je četvrti heliks rotiran „prema gore“ kako bi mogao ući u katalitičku domenu enzima. Hidrofobni i aromatski aminokiselinski ostatci strše iz ovih heliksa kako bi se stvorila hidrofobna površina koja stupa u interakciju s lipidnim dvoslojem membrane [7].

Sekundarna se struktura katalitičke domene, kod većine ciklooksigenaza, sastoji isključivo od α -uzvojnica. Budući da su ciklooksigenaze dvofunkcionalni enzimi, katalitičke domene moraju razlikovati dvije vrste reakcija: 1) bis-oksigenazu koja je ovisna o hemu uz

pretvorbu arahidonske kiseline u prostaglandine G_2 (engl. *Prostaglandin* G_2 , PGG_2) i 2) redoks reakciju u kojoj dolazi do redukcije prostaglandina G_2 pomoću peroksidaze (engl. *Peroxidase*, POX).

POX aktivno mjesto se nalazi u velikom rascjepu na suprotnoj strani od MBD-a. Unutar aktivnog mjesta vezan je hem koji je koordiniran dvjema histidinskim aminokiselinama, His-207 i His-388. Aktivnost peroksidaze ovisna je o hemu koji stvara radikal na Tyr-385 čime se aktivira aktivno mjesto ciklooksigenaze. Ukoliko dođe do mutacija na trima aminokiselinama (Gln-203, His-207 ili His-388), dolazi do smanjene aktivnosti peroksidaze. Smanjena aktivnost peroksidaze rezultira time da se i ciklooksigenazna aktivnost smanjuje [8].

Ciklooksigenaza se sastoji od dva monomera. Monomeri ciklooksigenaza sadrže hidrofobni kanal dužine 25 Å koji se prostire od domene za vezanje membrane pa do jezgre katalitičke domene. Kanal ima izgled slova L. MBD tvori ulaz u prvu polovicu kanala čime se omogućuje arahidonatu i kisiku da uđu u kanal izravno iz lipidnog dvosloja. Nekoliko aminokiselina čini gornju polovicu kanala čime se kanal jedinstveno povezuje s katalitičkom domenom ciklooksigenaze. Ukupno dvadeset i četiri aminokiselinska ostatka tvore hidrofobno aktivno mjesto ciklooksigenaze. Samo su tri aminokiselinska ostatka polarna. Tyr-385 koji se nalazi u radikalskom obliku, odgovoran je za oduzimanje protona arahidonskoj kiselinu kako bi iz njega nastao prostaglandin. Ser-530 i Arg-120 stvaraju mjesto vezanja za većinu ciklooksigenaznih inhibitora [7].

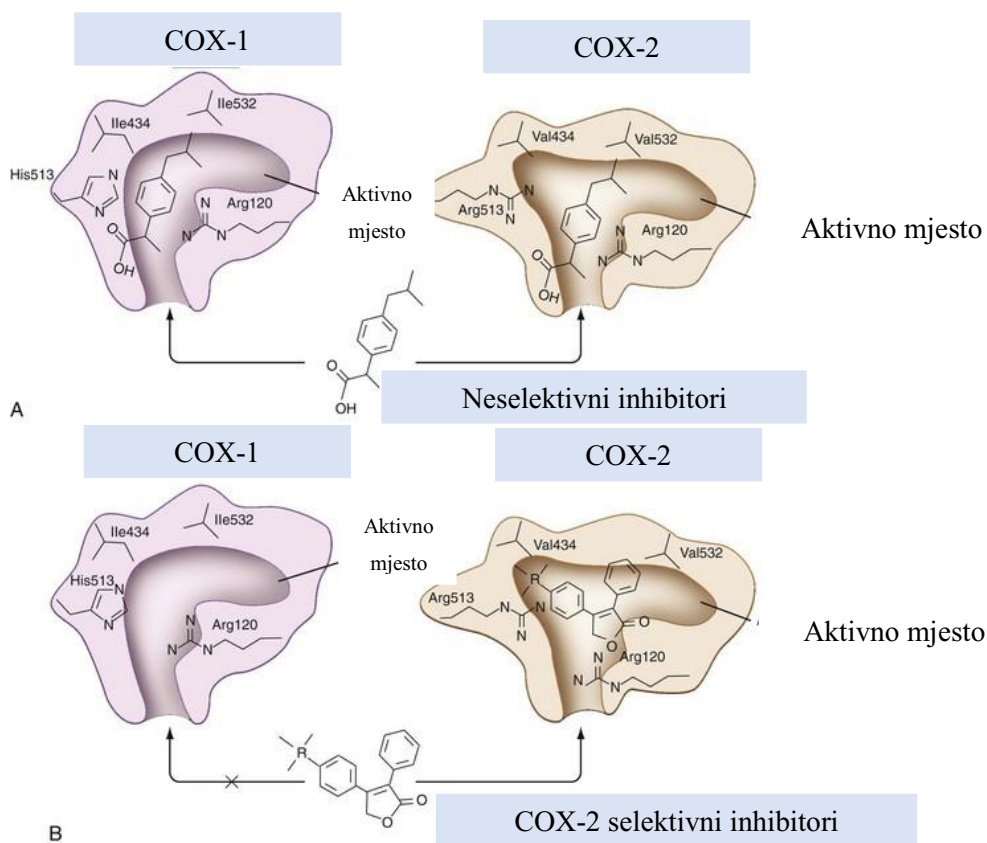
2.1.1.1. Strukturne razlike između izoenzima COX-1 i COX-2

COX-1 je enzim koji se konstitutivno izražava u većini stanica čija je uloga proizvodnja prostanoida za različite fiziološke potrebe kao što su: zaštita sluznice želuca, regulacija izlučivanja kiseline, regulacija homeostaze te održavanje bubrežne funkcije. S druge strane, COX-2 je enzim koji se inducira kao odgovor na različita upalna stanja. Upalni citokini, mitogeni, endotoksini i tumorski promotori aktiviraju COX-2 pri čemu se sintetiziraju prostanoidi tijekom upale ili raka. Oba se izoenzima uglavnom nalaze u endoplazmatskom retikulumu stanica [9].

Strukturna razlika između COX-1 i COX-2 je mala. COX-1 se sastoji od 576 aminokiselina od kojih je 61 % aminokiselina sekvencijski potpuno identično, a 84 % aminokiselina je slično s COX-2. Njihove molarne mase su približno slične i iznose 70 kDa/monomer te oba enzima imaju i ciklooksigenaznu i peroksidaznu katalitičku funkciju.

Aktivna mjesta enzima nalaze se na kraju hidrofobnog kanala [10]. Oba enzima imaju tri oligosaharida koji omogućavaju savitljivost proteina čime se, u konačnici, postiže konačna funkcionalna konformacija enzima. COX-2 ima dodatni kruti oligosaharid koji je odgovoran za degradaciju i inhibiciju samog enzima [11].

Temeljna razlika između ova dva izoenzima je aminokiselina na položaju 523. U COX-1, 523. aminokiselina je izoleucin dok je u COX-2 valin što je prikazano na Slici 2. Razlika između ove dvije aminokiseline je samo u metilnoj skupini.



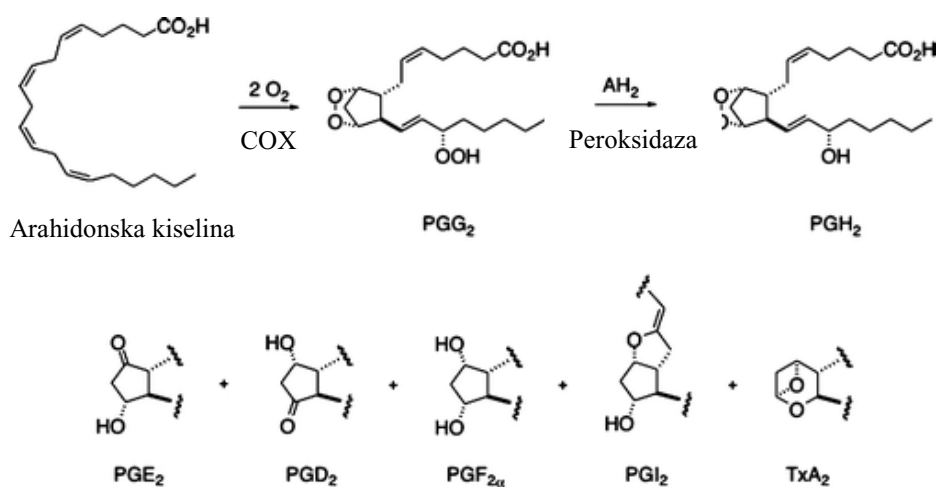
Slika 2. Strukturna razlika između COX-1 i COX-2 [12].

Metilna skupina valina stvara dodatni prostor (bočni džep) u strukturi COX-2, čime i sam volumen COX-2 postaje veći od COX-1. Ova strukturna razlika omogućava znanstvenicima kreiranje selektivnih inhibitora koji se vežu preko svoje sulfamidne skupine za bočni džep enzima tvoreći kovalentnu vezu. Osim razlike u položaju 532, javljaju se i razlike kod aminokiseline na položajima 513 te 434 [12].

2.1.2. Mehanizam djelovanja COX-2

Arahidonska kiselina (engl. *Arachidonic Acid*, AA) je jedan od najbitnijih metaboličkih prethodnika brojnih upalnih puteva [13]. Strukturno gledano, to je masna kiselina koja se sastoji od 20 ugljikovih atoma uz četiri nezasićene veze. Budući da je AA vrlo reaktivna i osjetljiva na oksidaciju ona se ne nalazi slobodna u stanicama, već se nalazi pohranjena u membranskim fosfolipidima kao: fosfatidilkolin, fosfatidilanolamin ili fosfatidilinozitol [14].

AA je supstrat za fosfolipazu A₂ (engl. *Phospholipase A₂*, PLA₂) koja se aktivira brojnim vanjskim te unutarnjim faktorima [14]. Aktivacija ovog enzima za posljedicu ima cijepanje AA iz fosfolipidne membrane čime sada kiselina postaje dostupna za tri glavna upalna puta koja uključuju: citokrom P-450 monooksigenazu, lipooksigenazu te ciklooksigenazu. Put ciklooksigenaze se smatra jednim od najopsežnije proučenih upalnih puteva kod sisavaca. AA može se dobiti i iz drugih, esterificiranih arahidonata, djelovanjem enzima esteraze [15]. Cjelokupna shema reakcije prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Strukturni prikaz reaktanta (AA) i produkata ciklooksigenaze-2 [16].

Put ciklooksigenaze započinje stvaranjem prostaglandina G₂ (engl. *Prostaglandin G₂*, PGG₂) iz AA. Ciklooksigenazna biosinteza prostaglandina započinje specifičnom oksigenacijom AA s 11-*R* konfiguracijom u 15-*S* konfiguraciju u obliku PGG₂. Nastali produkt se potom reducira za dva vodikova atoma što dovodi do oksidacije željeza u hemu koji je odgovoran za formiranje radikalnog Tyr-385 pri čemu nastaje prostaglandin H₂ (engl. *Prostaglandin H₂*, PGH₂) [17].

PGH₂ se potom može prevesti u druge upalne prostanoide, odnosno prostaglandine, tromboksane i prostacikline. Tromboksani A₂ (engl. *Thromboxane A₂*, TXA₂) nastaju djelovanjem tromboksan-sintaze dok prostaciklini I₂ (engl. *Prostaglandin I₂*, PGI₂) nastaju djelovanjem prostaciklin-sintaze. Tri vrste prostaglandina mogu nastati iz PGH₂, a to su: prostaglandin E₂ (engl. *Prostaglandin E₂*, PGE₂), prostaglandin D₂ (engl. *Prostaglandin D₂*, PGD₂) i prostaglandin F_{2α} (engl. *Prostaglandin F_{2α}*, PGF_{2α}). PGE₂ i PGD₂ nastaju djelovanjem specifičnih izomeraza, dok je za nastanak PGF_{2α} odgovorna reduktaza [17].

2.1.2.1. Prostanoidi

Kemijski gledano, prostanoidi su bioaktivne lipidne molekule koje su uključene u mnoge fiziološke i patološke procese. Prostanoidi se dijele na: prostaglandine, tromboksane te prostacikline. Prostaglandini su tvari slične hormonima koje posreduju autokrinu i parakrinu signalizaciju na kratkim udaljenostima. Tromboksani se ubrajaju u eikozanoidne lipide. Prostaciklini se ubrajaju u skupinu eikozanoida [18].

Uloga sintetiziranih prostanoida ovisi o tkivu u kojem se oni nalaze. Tako PGD₂, PGE₂ i PGI₂ imaju vazodilatacijsku funkciju u kardiovaskularnom sustavu, dok TXA₂ u istom sustavu djeluje vazokonstriksijski. TXA₂ ima značajnu ulogu u agregiranju trombocita, dok PGI₂ pokazuje antikoagulacijska svojstva. U dišnom sustavu TXA₂ i PGF_{2α} djeluju kao bronhokonstriktori, dok PGI₂ i PGE₂ djeluju kao bronhodilatatori. PGE₂, PGF_{2α} i PGI₂ imaju funkciju zaštite sluznice želuca. PGE₂ i PGI₂ odgovorni su za protok krvi u bubrezima te diurezu u oštećenim bubrezima [19].

Prostanoidi također posreduju u odgovoru tijela na ozljedu ili upalu. PGE₂ je najvažniji prostaglandin koji uzrokuje tipične simptome upale. Proširenje malih krvnih žila pokreće razvoj crvenila i vrućice, a povećanje vaskularne propusnosti uzrokuje karakteristično oticanje tkiva. Prostaglandini su važni u regulaciji i stvaranju upalnog odgovora, ali su također važni u regulaciji agregacije trombocita, izazivanju boli i vrućice, regulaciji krvotoka i mnogim drugim procesima. Jednom inducirani COX-2 može uzrokovati prekomjernu proizvodnju prostaglandina, zajedno s drugim produktima koji izazivaju bol, senzibiliziraju živčane stanice, povećavaju propusnost krvnih žila i time utiru put upalnim stanjima [20].

2.1.2.2. Uloga COX-2 u upali

COX-1 je enzim koji igra značajnu ulogu u razvoju i napredovanju upale [21]. Metabolički produkti povezani s COX-1 služe za pokretanje upalne faze, dok će ekspresija COX-2 biti odgovorna za održavanje upalnog odgovora. Aid i sur. (2008) su proveli istraživanje na miševima s ciljem da ispituju ovisnost modulacije neuroinflamatornog odgovora i obje ciklooksigenaze. U istraživanju su sudjelovali miševi s nedostatkom COX-2 (kako bi se ispitao utjecaj COX-1 u stvaranju upalnog odgovora) i miševi divljeg tipa koji su prethodnih 6 tjedana primali dozu od 5 µg celekoksiba. Miševima se ubrizgavao lipopolisaharid. Nakon 24 sata od ubrizgavanja, kod miševa koji su bili tretirani NSAID-om zabilježen je porast oštećenja neurona. Istraživanje je pokazalo da inhibicija COX-2 može smanjiti upalni odgovor [20].

Iako je inhibicija COX-2 nužna za smanjenje upalnog odgovora, uočeno je kako inhibicija ovog enzima može poboljšati, ali i pogoršati upalno stanje. Halter (2001) je uvidio da ireverzibilna inhibicija COX-2 uzrokuje pogoršanje čira na želucu što ukazuje na njegovu važnost u zaštiti želučane sluznice [22]. Slično, u istraživanju kojeg su proveli Wallace i sur. (1999) radi procjene uzroka upalnog odgovora u modelima miša otkriveno je da inhibicija oba izoenzima ciklooksigenaze može spriječiti upalu. Na temelju ovih studija moglo se zaključiti da oba izoenzima igraju značajnu ulogu u ranoj i kasnoj fazi upalnog odgovora, ovisno o upalnom podražaju i stupnju izraženosti u tkivu [23].

Noriega i sur. (2020) su proveli istraživanje u kojemu su miševima davali pet doza deksetoprofena u svrhu ispitivanja utjecaja na prostaglandine. Rezultati istraživanja temelje se na kemijskom modelu visceralne (utrobne) boli, a radi se o tzv, testu grčenja – octenom kiselinom izazvano bolno abdominalno grčenje. Ovaj test se inače koristi u procjeni učinka analgetika i protuupalnih lijekova. Iz rezultata istraživanja je zaključeno da je inhibicija COX-2 pokazala pad za 75 % u proizvodnji prostaglandina, dok je inhibicija COX-1 u miševima divljeg tipa dovela do smanjenja ukupne proizvodnje prostaglandina za samo 25 %. Iz studije se može zaključiti da su oba izoenzima uključena u proizvodnju prostaglandina, ali inhibicija COX-2 može dovesti do povlačenja akutnog upalnog odgovora. Međutim, u određenim patološkim stanjima razina PGE₂ povećava se više od 10 puta od normalne koncentracije, što dovodi do ozbiljnih komplikacija [24].

2.2. INHIBITORI COX-2

Razvoj inhibitora COX-2 svoj je početak doživio krajem 19. stoljeća. Od toga vremena je farmakološki fokus usmjeren na dizajniranje novih, za upotrebu sigurnih i učinkovitih inhibitora. Inhibitori COX-2 nazivaju se i nesteroidnim protuupalnim lijekovima, odnosno NSAID, ili nesteroidnim antireumaticima (engl. *Non-Steroidal Anti-Rheumatic*, NSAR). Njihova primjena značajno olakšava neugodne tegobe povezane s upalnim i bolnim stanjima [25].

NSAID-i se uglavnom koriste za liječenje onih pacijenata koji pate od: kronične boli, groznice, osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, postoperativne boli, menstrualnih grčeva, a intenzivno se koriste i kao analgetici te antipiretici. NSAID-i su vrlo popularni i u sportskoj medicini. Također, ova je skupina lijekova pronašla i svoju primjenu kod pacijenata oboljelih od raka [25].

Ova skupina lijekova obuhvaća velik broj spojeva sa strukturnom i funkcionalnom raznolikošću. NSAID-i su uglavnom slabe organske kiseline koje se sastoje od dva kiselina dijela (karboksilne kiseline, enola) koja su pričvršćena na planarnu aromatsku funkcionalnu skupinu. Lijekovi se prenose krvotokom na način da su slobodni (nevezani) ili vezani na sastojke krvi (najviše za proteine). Više od 90 % NSAID-a vezano je za proteine plazme što znači da je 10 % lijeka slobodno u krvotoku. Udio slobodnog lijeka u krvotoku određuje koncentraciju lijeka na mjestu djelovanja, a sukladno s tim i njegove učinke [26].

Ovi lijekovi obično pokazuju dobru bioraspoloživost nakon oralne, potkožne ili intramuskularne primjene, zbog njihove umjerene do visoke topljivosti u lipidima. Metabolizam jetre uklanja NSAID-e iz tijela na način da ih prepoznaje kao neaktivne metabolite koji se potom izlučuju putem urina ili žuči [26].

NSAID-i se mogu klasificirati na temelju svojih kemijskih karakteristika, selektivnosti za inhibiciju enzima te na temelju poluživota u plazmi. Što se tiče funkcionalne raznolikost, selektivnost za specifičnu izoformu ciklooksigenaze čini osnovu diferencijacije. Sposobnost inhibicije se često izražava preko IC_{50} (engl. *Half Maximal Inhibitory Concentration*) vrijednosti. To je koncentracija NSAID-a koja uzrokuje 50-postotnu inhibiciju danoga parametra, odnosno 50-postotnu inhibiciju aktivnosti enzima u sustavu *in vitro*. Inhibitorski omjer temelji se na omjeru $COX-1 IC_{50} / COX-2 IC_{50}$. Ako je omjer 1, onda su oba izoenzima jednako inhibirana ispitivanim NSAID-om. Ukoliko je vrijednost manja od 1, to znači da je NSAID selektivniji za COX-1, dok za vrijednost veću od 1 vrijedi obrnuto, odnosno NSAID pokazuje veću selektivnost prema COX-2 [27]. Na temelju IC_{50}

vrijednosti određuje se inhibitorski omjer koji omogućuje klasifikaciju NSAID-a u četiri glavne skupine, što je prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Kategorije selektivnosti inhibitora ciklooksigenaza [28].

Kategorija	Selektivnost	Reprezentativni inhibitori
Kategorija 1	Jednaka selektivnost za oba izoenzima (neselektivni inhibitori)	Ibuprofen, indometacin, aspirin, naproksen
Kategorija 2	Slabo selektivni za COX-2	Meloksikam, celekoksib, etodolak, nimesulid
Kategorija 3	Jako selektivni za COX-2	NS-398
Kategorija 4	Loša selektivnost za oba izoenzima	Nabumeton, natrijev salicilat, sulfasazalin

Još jedna od mogućih klasifikacija NSAID-a je na temelju njihovog poluživota u plazmi, $t_{1/2}$. Kratkodjelujući inhibitori imaju poluživot u plazmi manji od 6 sati (npr. aspirin, ibuprofen, diklofenek, ...) dok dugodjelujući imaju poluživot veći od 10 sati (npr. naproksen, celekoksib, ...). NSAID-i s kratkim poluživotom pokazuju brz početak djelovanja te su zbog toga pogodni za ublažavanje akutne boli, dok su NSAID-i s dužim poluživotom učinkovitiji pri liječenju kroničnih stanja [29].

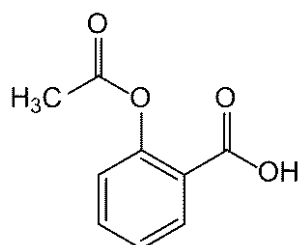
2.2.1. Neselektivni inhibitori COX-2

Neselektivni inhibitori (ili inhibitori prve generacije) su oni koji jednakim učinkom djeluju na oba izoenzima, COX-1 i COX-2. Neselektivni se inhibitori smještaju u aktivna mjesta obje ciklooksigenaze čime se inhibira proizvodnja prostanoida što rezultira smanjenjem upalnog odgovora. Neselektivni NSAID-i su vrlo često propisani lijekovi (od kojih su mnogi dostupni i bez recepta) koji mogu smanjiti bol, upalu te sniziti tjelesnu temperaturu. Postoji nekoliko načina klasifikacije ove skupine inhibitora, ali je najčešća ona prema kemijskom sastavu. Najpoznatiji lijek koji se ubraja u ovu generaciju je aspirin. Neselektivni NSAID-i se povezuju s raznim težim nuspojavama kao što su: toksičnost za

probavni sustav, kardiovaskularni rizici, oštećenje bubrega, toksičnost za jetra, hipertenzija te drugi poremećaji, zbog čega gube na popularnosti [30].

2.2.1.1. Salicilati

U neselektivne inhibitore se ubrajaju salicilati za koje postoje dokazi da svoju primjenu u medicini imaju još od vremena antičke Grčke te starog Egipta. Salicilati su bili prvi identificirani NSAID-i nakon ekstrakcije salicilne kiseline iz kore vrbe [31]. U početku se salicilna kiselina koristila u obliku natrijeve soli, a kasnije je zamijenjena acetiliranim derivatom, acetilsalicilnom kiselinom. Acetilsalicilna kiselina poznata je i po nazivu aspirin, a njegova je strukturna formula prikazana na Slici 4.



Slika 4. Strukturni prikaz aspirina (acetilsalicilne kiseline) [32].

Aspirin je inhibitor koji kompetitivno i nepovratno inhibira aktivnost obje ciklooksigenaze. Lijekovi koji kompetitivno inhibiraju aktivna mjesta ciklooksigenaze imaju dugotrajnije djelovanje, po čemu se vremensko trajanje aspirina razlikuje u odnosu na druge NSAID-e. Ovakva inhibicija je najizraženija u trombocitima jer oni imaju ograničen kapacitet za sintezu proteina, pa tako i enzima ciklooksigenaze, što znači da će enzim u trombocitima ostati inhibiran do kraja života samog trombocita. Aspirin će trajno zaustaviti sintezu TXA₂, čime se inhibira agregacija trombocita [33].

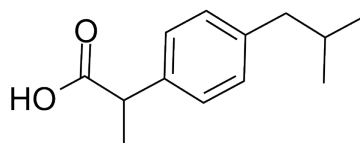
Salicilati imaju sposobnost istiskivanja drugih NSAID-a, poput naproksena i fenilbutazona, čime se povećava koncentracija slobodnih lijekova u plazmi što rezultira i povećanim rizikom od toksičnosti. Ova skupina inhibitora je povezana i s Reyeovim sindromom, potencijalnim pedijatrijskim poremećajem koji izaziva napadaje i komu. Iz ovog razloga je potrebno izbjegavati salicilate kod djece s virusnim bolestima [34].

Aspirin je acetilirani oblik salicilata koji učinkovito inhibira oba izoenzima ciklooksigenaze na način da se pri kovalentnom vezanju transacetiliraju aktivni ostatci serina

u aktivnom mjestu samoga enzima. Osim acetiliranih oblika, u salicilate se ubrajaju i neacetilirani oblici (npr. salsalat, natrijev salicilat, ...) koji ne pokazuju inhibitorna svojstva za ciklooksigenaze već pokazuju inhibicijska svojstva za drugi enzim – I κ B kinazu koja inhibira transkripcijski faktor NF- κ B (engl. *Nuclear Factor Kappa B*, NF- κ B) što je, farmakološki, potpuno različita meta lijeka [35].

2.2.1.2 Derivati propionske kiseline

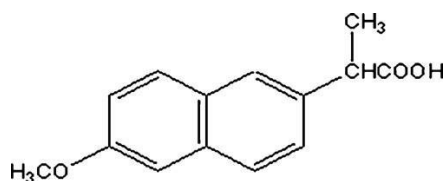
Ibuprofen ((*RS*)-2-(4-(2-metilpropil)fenil)propionska kiselina) je najpoznatiji i najčešće korišteni inhibitor ovog razreda, a njegova struktura je prikazana na Slici 5.



Slika 5. Strukturni prikaz ibuprofena [36].

Značajna karakteristika ovog lijeka je da se brzo apsorbira u gornjem traktu probavnog sustava dok se maksimalni učinak postiže u vremenu 1-2 sata nakon primjene. Ibuprofen se koristi u blago do umjereno bolnim stanjima. Ibuprofen se ubraja u kisele NSAID-e što rezultira njegovim jakim vezanjem za proteine. Učinkovitost ibuprofena dokazana je u liječenju glavobolje i migrene, menstrualne boli i akutne postoperativne boli. Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) izdala je upozorenje za povećan rizik od ozbiljnijih posljedica, kao što su infarkt miokarda te moždani udar koji su povezani s dugotrajnom konzumacijom ovog lijeka [37].

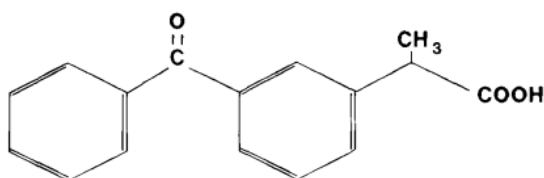
Naproksen ((+)-(*S*)-2-(6-metoksinaftalen-2-il)propionska kiselina) je drugi predstavnik NSAID-a koji su derivati propionske kiseline, a dostupan je bez recepta. Struktura ovog spoja prikazana je na Slici 6.



Slika 6. Strukturni prikaz naproksena [38].

Najčešća primjena ovog lijeka je za liječenje: reumatoidnog artritisa, osteoartritisa, gihta te za smanjenje oticanja i boli u zglobovima i mišićima. Poluživot ovog lijeka iznosi 13 sati. Više od 99 % lijeka veže se za albumin nakon njegove upotrebe što kod starijih osoba može dovesti do smanjene bubrežne funkcije [39]. Konstam i sur. (2001) su proveli istraživanje u kojemu su sudjelovali pacijenti koji su uzimali rofekoksib i oni pacijenti koji su uzimali naproksen ili neki drugi NSAID (diklofenak, ibuprofen ili nabumeton). U istraživanju je sudjelovalo više od 28 000 pacijenata. Krajnji su rezultati pokazali da je rizik za razvoj neželjenih kardiovaskularnih posljedica 1,69 pri usporedbi rofekoksiba s naproksenom te 0,79 kada se uspoređuje rofekoksib s NSAID-ima koji nisu naproksen. Ovim se istraživanjem pokazalo da konzumacija naproksena u većoj mjeri dovodi do razvoja neželjenih kardiovaskularnih događaja u usporedbi s rofekoksibom ili drugim korištenim NSAID-ima [40].

Ketoprofen ((*RS*)2-(3-benzoilfenil)-propionska kiselina) se od drugih derivata propionske kiseline razlikuje po karakteristikama otpuštanja. U vremenskom rasponu 1-2 sata nakon upotrebe se postiže njegova maksimalna učinkovitost što ujedno znači da je njegovo vrijeme poluraspada oko 2 sata [41]. Struktura ovog NSAID-a prikazana je na Slici 7.

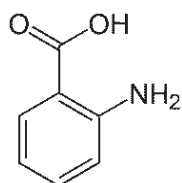


Slika 7. Strukturni prikaz ketoprofena [41].

Ketoprofen ima visoki afinitet vezanja za protein plazme (98-99 %). Lijek se izlučuje putem urina na način da lijek konjugira s glukuronskom kiselinom u jetrima. Ketoprofen je pokazao nuspojave vezane za probavni sustav [41].

2.2.1.3. Antranilna kiselina

Antranilna kiselina (2-aminobenzojeva kiselina) slaba je organska kiselina. Njen maksimalni učinak postiže se oko 2 sata nakon primjene. Struktura je prikazana na Slici 8.

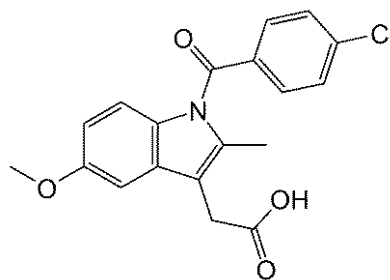


Slika 8. Strukturni prikaz antranilne kiseline [42].

Mehanizam djelovanja ovog lijeka je isti kao i kod ostalih NSAID-a, a temelji se na inhibiciji sinteze prostaglandina. Međutim, antranilna kiselina pokazala je i učinak smanjenja aktivnosti sintetiziranih prostaglandina. Pretpostavlja se da je razlog tome vezanje lijeka na prostaglandinske receptore u stanicama uz njihovo istovremeno blokiranje. Sam učinak antranilne kiseline na prostaglandine ovisi o dozi. Antranilna kiselina pokazala je i pozitivno djelovanje na opuštanje glatkih mišića, a potencijalno će se moći koristiti i za ublažavanja kontrakcija maternice [40].

2.2.1.4. Derivati octene kiseline

Indometacin (1-(4-klorobenzoil)-5-metoksi-2-metil-1-*H*-indol-3-octena kiselina) je prvi puta predstavljen 1963. godine. Struktura indometacina prikazana je na Slici 9.

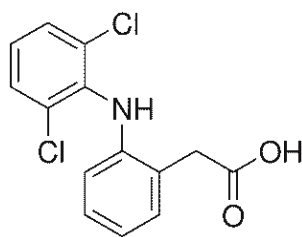


Slika 9. Strukturni prikaz indometacina [43].

Niz godina se naširoko koristio kao protuupalni lijek, ali je razvojem novijih i sigurnijih NSAID-a ovaj lijek pao u drugi plan. Oralno konzumirani indometacin ima izvrsnu bioraspoloživost, koji svoj maksimalni učinak dostiže za 2 sata nakon konzumacije. U prosijeku se u plazmi zadržava oko 5 sati. Konzumacija ovog lijeka je vrlo često popraćena s tegobama probavnog sustava. Osim poteškoća u probavnom sustavu, indometacin je povezan i s nuspojavama koje zahvaćaju središnji živčani sustav, od kojih je najčešća frontalna glavobolja. Ovaj tip glavobolje javlja se kod gotovo polovice pacijenata koji konzumiraju ovaj lijek duže vrijeme. Osim glavobolje, moguće je javljanje i vrtoglavice, ošamućenosti i zbunjenosti [44].

Ketorolak (5-benzoil-2,3-dikidro-1*H*-pirolizin-1-karboksilna kiselina) je NSAID koji jednakom snagom inhibira obje ciklooksigenaze čime se blokira proizvodnja prostanoida. Nakon oralne primjene maksimalan učinak dostiže u roku od 1 sata [45]. U velikoj se mjeri veže za proteine plazme, a poluživot mu je približno 5-6 sati. Otkako je odobren, ketorolak se najviše primjenjuje kao snažno analgetičko svojstvo zbog svojih učinkovitih protuupalnih učinaka. Ketorolak može potaknuti ili pogoršati zatajenje bubrega kod starijih osoba ili osoba s genetskom osnovom za razvoj bubrežnih bolesti [46].

Diklofenak (2-[2-[(2,6-diklorofenil)amino]fenil]octena kiselina) je odobren 1973. godine i od tada je jedan od najčešće propisivanih NSAID-a. Diklofenak pokazuje veću selektivnost prema COX-2 u usporedbi s indometacinom ili naproksenom, ali pokazuje i djelovanje na COX-1 zbog čega se smatra neselektivnim inhibitorom [47]. Strukturni prikaz diklofenaka dan je na Slici 10.

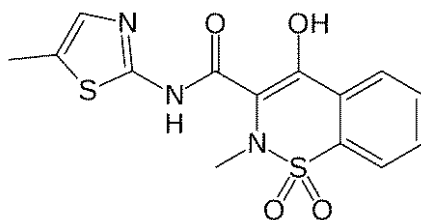


Slika 10. Strukturni prikaz diklofenaka [48].

Nakon primjene, ovaj lijek se vrlo brzo apsorbira, ali vrijeme apsorpcije može varirati ovisno o soli koja se koristi. Maksimalni učinak postiže se unutar 2-3 sata nakon konzumacije. Diklofenak koji je primijenjen kao natrijeva sol može se otkriti u sinovijalnoj tekućini i do 11 sati nakon konzumacije tablete od 50 mg i do 25 sati nakon konzumacije tablete s polaganim otpuštanjem od 100 mg. Natrijeva sol diklofenaka otporna je na otapanje u želučanom okruženju niskog pH, zbog čega se njegovo otpuštanje vrši u dvanaesniku. Kalijeva sol diklofenaka je topljivija u vodi što omogućava njezino brže otapanje i bržu apsorpciju s ciljem oslobađanja aktivnog lijeka u želucu kako bi se postiglo brzo ublažavanje boli [49].

2.2.1.5. Derivati enolne kiseline

Oksikam ili meloksikam (4-hidroksi-2-metil-*N*-(5-metil-2-tiazol)-2*H*-1,2-benzotiazin-3-karboksamid-1,1-dioksid) je najpopularniji i najispitivaniji derivat enolne kiseline. Oksikam je pokazao pozitivan učinak u liječenju osteoartritisa [50]. Strukturni prikaz meloksikama dan je na Slici 11.



Slika 11. Strukturni prikaz meloksikama [51].

Njegov je cilj smanjiti rizik razvoja ozbiljnih probavnih, kardiovaskularnih ili bubrežnih nuspojava koje su povezane s ostalim NSAID-ima. Bijnsdorp i sur. (2007) su proveli istraživanje kojem je cilj bilo ispitati učinkovitost meloksikama u kombinaciji sa zračenjem na proliferaciju, preživljavanje te na radiosenzibilizaciju stanica ljudskog glioma. Gliomi su primarni tumori koji nastaju iz parenhima mozga. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da meloksikam inhibira rast malignih stanica. Koncentracija meloksikama od 750 μM gotovo je potpuno potisnula rast stanica, ali samo neznatno smanjila njihovo preživljavanje. Radiosenzibilirajuće djelovanje meloksikama može se pripisati inhibiciji sinteze PGE_2 , glavnog produkta COX-2 [50].

Osim meloksikama, u ovu skupinu lijekova ubraja se i piroksikam. Piroksikam (4-hidroksi-2-metil-1,1-diokso-*N*-piridin-2-il-1 λ^6 ,2-benzotiazin-2-karboksamid) je NSAID koji suzbija sintezu ciklooksigenaza čime se smanjuje i koncentracija prostanoida u organizmu. Najčešće se primjenjuje za smanjenje boli i upala koje nastaju kao posljedica artritisa. Campione i sur. (2015) su ispitivali utjecaj piroksikama za liječenje aktiničke keratoze. Keratoze su tvorbe koje se pojavljuju kao posljedica prekomjernom izlaganju Suncu na različitim dijelovima tijela, a može prijeći u karcinom kože. Rezultati istraživanja su pokazali kako je piroksikam siguran, učinkovit i dobro podnošljiv lijek koji nije popraćen značajnim brojem nuspojava. Za druge vrste tumora ovaj lijek i dalje nije istražen [52].

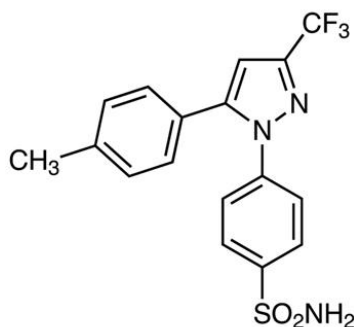
2.2.2. Selektivni inhibitor COX-2

Bol i upala se mogu suzbiti inhibicijom aktivnosti COX-2 pomoću selektivnih inhibitora koji posjeduju posebne strukturne značajke. Selektivni inhibitori se nazivaju i inhibitorima druge generacije. Posljednjih se godina selektivni inhibitori sve više primjenjuju za liječenje i mnogih drugih bolesti kao što su glaukom te mnoge vrste raka. Općenito govoreći, svi selektivni inhibitori imaju krutu strukturu (kao što je benzenski prsten), a na kraju bočnog lanca se nalazi sulfamidna skupina koja se može spojiti s bočnim džepom COX-2 putem kovalentne veze. Ovakva struktura inhibitora omogućuje selektivnost iz razloga što je volumen bočnog džepa COX-1 manji i stoga inhibitor ne može doći do

njegovog aktivnog mjesta. S druge strane, COX-2 ima veći volumen te se inhibitor slobodno smješta u bočni džep čime se postiže inhibitorni učinak na enzim [53].

2.2.2.1. Celekoksib

Celekoksib (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)pirazol-1-il]benzensulfonamid) je prvi sintetizirani, selektivni NSAID koji se koristi najčešće za liječenje: osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, akutne boli, menstrualnih grčeva, itd. Prvi puta je stupio na tržište 1998. godine kada je dobio konačno odobrenje od FDA. Kemijski gledano, celekoksib se ubraja u skupinu organskih spojeva koji se nazivaju fenilpirazoli. Ovi spojevi sadrže kostur fenilpirazola, a sastoji se od pirazola vezanog na fenilnu skupinu [53]. Kemijska struktura ovog spoja prikazana je na Slici 12.



Slika 12. Strukturna formula celekoksiba [54].

Celekoksib se vrlo brzo apsorbira u gastrointestinalnom traktu te se maksimalan učinak lijeka postiže u roku od 3 sata. Veže se za protein u postotku od 97 %, a pretežito je vezan za albumin. Celekoksib se prvenstveno eliminira iz organizma metabolizmom jetre putem kojeg se lijek raspada na metabolite karboksilne kiseline i glukuronida [55].

Za razliku od drugih NSAID-a, celekoksib pokazuje smanjen rizik od toksičnih učinaka na organizam. Hawkey (2001) je proveo istraživanje u kojemu je sudjelovalo 8076 pacijenata. Cilj istraživanja je bio ispitati utjecaj NSAID-a (rofekoksiba, celekoksiba i aspirina) na probavni sustav. Kod pacijenata koji su koristili celekoksib (200 mg dnevno kroz 8 tjedana) javio se manji rizik od ulceracije (oštećenje sluznice želuca i nastanak čira) i krvarenja nego što je zabilježeno za druge NSAID-e [56]. Zhu i Huang (2004) su proveli istraživanje na *in vitro* stanicama raka prostate. Celekoksib je slab inhibitor kadherina-11

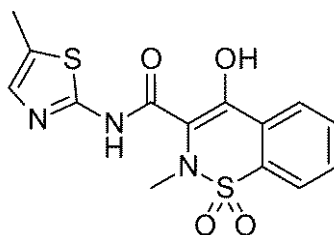
(engl. *Cadherin-11*, CDH-11) te je potrebna koncentracija od najmanje 30 μM da bi ovaj NSAID pokazao vidljiv učinak na rast tumorskih stanica. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da ovaj lijek djeluje antikancerogeno, a razlog tome je taj što se celekoksib veže za CDH-11, za koji se smatra da igra važnu ulogu u napredovanju tumora [57]. Nishimori (2007) je proveo istraživanje na *in vitro* modelu ljudske ugljične anhidraze. Stanicama je tijekom 24 sata davao celekoksib, a nakon toga promatrao njegov učinak na enzime. Dokazalo se da celekoksib inhibira enzime ugljične anhidraze 2 i 3, čime se dodatno pojačava antikancerogeni učinak [58].

Ipak postoje i rizici koji se povezuju s učestalom konzumacijom celekoksiba. Celekoksib može stvoriti povećani rizik od nepoželjnih trombotičkih događaja. Rizik od tromboze javlja se kao posljedica inhibicije COX-2 čime se pojačava vazokonstriksijsko djelovanje TXA₂ što dovodi do povećane agregacije trombocita koja postaje nekontrolirana. Celekoksib nije preporučljivo davati bolesnicima koji pate od problema s bubrezima ili jetrom jer to može dovesti do neželjenih nuspojava [59].

2.2.2.2. Meloksikam

Meloksikam (4-hidroksi-2-metil-*N*-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)-1,1-dioksido-1 λ^6 ,2-benzotiazin-3-karboksamid) je protuupalni analgetik s antipiretičkim djelovanjem. Najčešća upotreba meloksikama je za liječenje osteoartritisa i reumatoidnog artritisa odraslih te juvenilnog reumatoidnog artritisa. Meloksikam se koristi i kako bi se ublažile različite vrste boli, a može se konzumirati oralno, transdermalno ili intravenski [59].

Kemijski gledano, meloksikam se ubraja u klasu organskih spojeva pod nazivom benzotiazini, a to su organski spojevi koji sadrže benzen spojen s tiazinskim prstenom. Tiazinski prsten je šesteročlani prsten koji se sastoji od atoma sumpora, atoma dušika te četiri atoma ugljika. Strukturna formula ovog lijeka prikazana je na Slici 13.



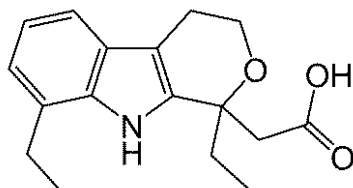
Slika 13. Strukturni prikaz meloksikama [60].

Poluživot meloksikama je otprilike 20 sati, što je duže od većine NSAID-a pa ga čini povoljnom opcijom za one kojima je potrebno doziranje lijeka samo jednom dnevno. Ovaj NSAID postiže maksimalan učinak u roku od 5-6 sati nakon primjene, a ukoliko se lijek uzima na prazan želudac tada se njegov učinak postiže još i brže [61].

Katz (2013) je ispitao djelovanje meloksikama na pacijente koji boluju od reumatoidnog artritisa. U istraživanju su sudjelovali pacijenti koji su u razdoblju od 8 tjedana primali meloksikam. Meloksikam je pokazao sposobnost smanjenja stope sedimentacije eritrocita kod ljudi koji boluju od reumatoidnog artritisa. Budući da meloksikam preferencijalno inhibira COX-2 smatra se kako bi njegovo korištenje moglo dovesti do smanjenog rizika od iritacije i oštećenja probavnog sustava, ali to još nije u potpunosti dokazano. Upotreba meloksikama i dalje nosi rizik od upale želučane sluznice, krvarenja i ulceracije [62]. Postoje indikacije o tome kako dugotrajna upotreba meloksikama može rezultirati bubrežnim ili kardiovaskularnim problemima. Također, poznato je da ovaj lijek može prijeći preko posteljice na dijete stoga se trudnicama ne preporučuje konzumacija ovog lijeka [63].

2.2.2.3. Etodolak

Etodolak (2-(1,8-dietil-4,9-dihidro-3*H*-pirano[3,4-*b*]indol-1-il)octena kiselina) je selektivni NSAID s protuupalnim, analgetskim i antipiretičkim svojstvima koji se koristi za liječenje akutne boli, osteoartritisa te reumatoidnog artritisa. Struktura etodolaka prikazana je na Slici 14.



Slika 14. Strukturni prikaz etodolaka [64].

U početku se smatralo da je etodolak neselektivni inhibitor, ali se kasnije pokazalo kako je 50 puta selektivniji za COX-2 nego što je za COX-1. Terapijski učinci etodolaka postižu se inhibicijom COX-2 čime se prekida sinteza prostaglandina koji rezultiraju vrućicom, boli, oticanjem ili upalom. Kemijski gledano, etodolak se ubraja u klasu indolil-

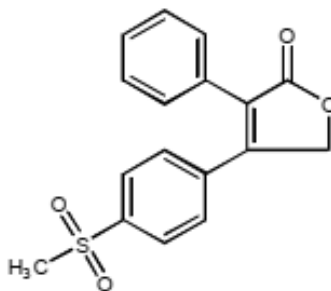
derivata koji se sastoje od karboksikiselinskog lanca koji je povezan s indolskim prstenom [65].

Etodolak se intenzivno metabolizira u jetri dok se putem bubrega eliminira. Na temelju fizikalno-kemijskih svojstava ovog lijeka smatra se kako bi se on mogao izlučivati i putem majčinog mlijeka, no to i dalje nije u potpunosti istraženo [65].

I dalje nije proveden dovoljan broj istraživanja kako bi se sa sigurnošću moglo tvrditi da etodolak ne izaziva teže kardiovaskularne probleme. Liao i sur. (2017) su proveli istraživanje čiji je cilj bilo istražiti poveznicu između upotrebe etodolaka i akutnog pankreatitisa. Ukupno je sudjelovalo 7 577 ispitanika u dobi od 20 ili više godina kojima je dijagnosticiran akutni pankreatitis. Grupa od 27 032 ispitanika bez akutnog pankreatitisa korišteni su kao kontrolna skupina. Razdoblje za provedbu ove studije bilo je od 1998. do 2011. godine. Ispitanici kojima je dijagnosticiran akutni pankreatitis konzumirali su etodolak najmanje jednom u 7 dana, dok kontrolna skupina nije konzumirala ovaj NSAID. Rezultati su pokazali da je koeficijent akutnog pankreatitisa bio 3,78 za ispitanike koji su aktivno konzumirali etodolak u usporedbi s kontrolnom skupinom. Rezultati su pokazali da postoji mogućnost da je aktivna upotreba etodolaka povezana s akutnim artritisom [66].

2.2.2.4.Ostali selektivni inhibitori

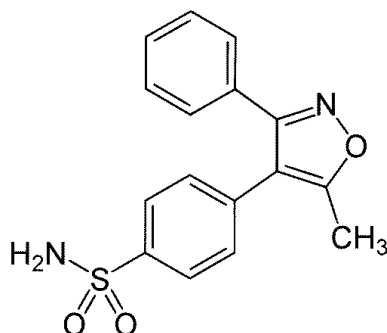
Rofekoksib (4-(4-metilsulfonilfenil)-3-fenil-5*H*-furan-2-on) je selektivni inhibitor COX-2 koji se koristi za liječenje osteoartritisa, reumatoidnog artritisa, akutne boli, migrene te menstrualnih grčeva. Kao i drugi NSAID-i, rofekoksib također pokazuje protuupalno, analgetsko i antipiretičko djelovanje. Kemijski gledano rofekoksib se svrstava u klasu organskih spojeva, stilbena. Poluživot ovog lijeka je oko 17 sati [67]. Strukturni prikaz rofekoksiba prikazan je na Slici 15.



Slika 15. Strukturni prikaz rofekoksiba [67].

Rofekoksib je sintetiziran od strane američke farmaceutske tvrtke Merck & Co. Prvi puta na tržište izlazi 1999. godine, a s njega se povlači već 2004. godine. Razlog povlačenja je prevelika poveznica između konzumacije rofekoksiba i javljanja moždanog ili srčanog udara prilikom dugotrajne konzumacije [68].

Valdekoksib (4-(5-metil-3-fenil-1,2-oksazol-4-il)benzensulfonamid) je kemijski gledano benzensulfonamid, organski spoj koji sadrži skupinu sulfonamida koji je preko sumpora povezan s benzenskim prstenom. Strukturni prikaz ovog spoja dan je na Slici 16.



Slika 16. Strukturni prikaz valdekoksiba [69].

Valdekoksib se koristi najviše za liječenje osteoartritisa i akutne boli te posjeduje protuupalna, analgetska i antipiretička svojstva. Međutim 2005. godine uklonjen je s američkog i kanadskog tržišta. Razlog uklanjanja bila je zabrinutost zbog povećanog rizika od srčanog ili moždanog udara koji se povezuju s dugotrajnom upotrebom ovog NSAID-a. Zhang i sur. (2006) su proveli veliku metaanalizu čiji je temeljni cilj bio procijeniti rizik od razvoja štetnih bubrežnih događaja s konzumacijom NSAID-a (rofekoksib, celekoksib, valdekoksib, parecoksib). Proučavali su 114 istraživanja u kojemu je ukupno sudjelovalo 116 094 pacijenata. U istraživanjima je zabilježeno ukupno 6 394 slučaja s bubrežnim oštećenjima. Analiza je dokazala kako je konzumacija ovog lijeka povezana s povišenjem rizika za razvoj bubrežnih oštećenja. Također, analiza navodi kako je veća vjerojatnost nastanka bubrežnog oštećenja povezana s dugotrajnom konzumacijom valdekoksiba u većim dozama [70].

2.2.3. Štetni učinci selektivnih i neselektivnih inhibitora

Početkom 21. stoljeća počeli su se pojavljivati dokazi koji NSAID-e povezuju sa štetnim učincima koji pogađaju kardiovaskularni sustav. Arfe i sur. (2016) su proveli istraživanje čiji je cilj bio istražiti vezu između kardiovaskularnih događaja i NSAID-a. U ispitivanju su sudjelovale odrasle osobe starije od 18 godina koje su započele liječenje NSAID-om u razdoblju od 2000. do 2010. godine. Ispitivao se utjecaj 23 neselektivna inhibitora COX-2 i 4 selektivna inhibitora COX-2. U istraživanju su se promatrali pacijenti iz pet različitih europskih zemalja, a ukupno je sudjelovalo 8 246 403 ispitanika. U 92 163 slučaja došlo je do zatajenja srca. Rizik od zatajenja srca povećao se za one pacijente koji su koristili 7 neselektivnih inhibitora COX-2 (diklofenak, ibuprofen, indometacin, ketorolak, naproksen, nimesulid i piroksikam) te kod 2 selektivna inhibitora (etorikoksib i rofekoksib) [71].

Osim štetnog djelovanja na kardiovaskularni sustav, učestala upotreba ovih lijekova povezana je i s nefrotoksičnosti i zatajenjem bubrega zajedno s drugim kratkoročnim učincima na sustave koji su zaduženi za održavanje ravnoteže vode i elektrolita. Breitner i sur. (2009) su proveli istraživanje čiji je cilj bio ispitati može li se upotrebom NSAID-a spriječiti Alzheimerova bolest. NSAID-i koji su se koristili u ovom istraživanju bili su: ibuprofen, naproksen, indometacin, etodolak, piroksikam, i sulindak. U ispitivanju je sudjelovalo 2 736 pacijenta koji su prijavili incidente demencije, a stariji su od 65 godina. Tijekom 12 godina se pratio utjecaj NSAID-a na demenciju i Alzheimerovu bolest. Kod 476 osoba se razvila demencija dok se kod 356 pacijenata javila Alzheimerova bolest čime su postignuti suprotni rezultati od onih kojima su se nadali [72].

Točan mehanizam kojim ova skupina lijekova djeluje štetno i dalje nije poznat no temeljna pretpostavka je ta da toksičnost nastaje kao posljedica istovremene inhibicije obje ciklooksigenaze. Pretpostavlja se kako inhibicija COX-1 rezultira štetnim učincima na organizam, dok je inhibicija COX-2 poželjna kako bi se smanjio upalni odgovor. Upravo iz tog razloga se novija istraživanja temelje na onim inhibitorima koji će biti selektivni samo za COX-2 [72].

2.2.3.1. Mitohondrijski oksidativni stres

Bez obzira na kliničku važnost NSAID-a činjenica je da su oni citotoksični spojevi.

Ovi lijekovi mogu aktivirati mitohondrijski oksidativni stres (engl. *Mitochondrial Oxidative Stress*, MOS), citopatološko stanje koje je okarakterizirano teškim oštećenjima mitohondrija koja nastaju kao posljedica aktivacije štetnih lančanih reakcija slobodnih radikala. Respiratorni lanac (engl. *Mitochondrial Respiratory Chain*, ECT-1) je glavni cilj NSAID-a. Inhibicijom ECT-1 kompleksa dolazi do istjecanja elektrona iz respiratornog lanca [73]. Odbjegli elektroni uzrokuju djelomičnu pretvorbu molekularnog kisika u superoksidni oblik – superoksid radikal anion ($O_2^{\bullet-}$), jedan od reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Superoksid radikal anioni su membranski nepropusni te ih mitohondrijska superoksid-dismutaza prevodi u vodikov peroksid (H_2O_2). Membrana je propusna za vodikov peroksid stoga dio molekula uspijeva izaći van prije neutralizacije što rezultira oštećenjima DNA, proteina, lipida i ugljikohidrata, čineći ih funkcionalno neaktivnima [74].

Prekomjerna koncentracija superoksid radikal aniona u mitohondriju rezultira oštećenjima raznih Fe-S klastera što dovodi do oslobađanja željezovog(II) iona (Fe^{2+}). Željezovi(II) ioni sada reagiraju s vodikovim peroksidom Fentonovom reakcijom čime nastaje hidroksilni radikal (najštetniji ROS). Svi navedeni događaji ometaju staničnu homeostazu i uzrokuju stanje oksidacijskog stresa čime, u konačnici, dolazi do aktivacije apoptoze. Na ovaj način MOS dovodi do upale tkiva [74].

2.2.3.2. Oštećenja probavnog sustava

Oštećenje želučane sluznice jedno je od glavnih ograničenja upotrebe NSAID-a. U početku se smatralo kako je problem u neselektivnim inhibitorima iz razloga što ometaju normalno funkcioniranje COX-1 čime dolazi do oštećenja sluznice. To je bio jedan od razloga zašto se farmaceutska industrija potom okrenula prema sintezi selektivnih inhibitora, pretpostavljajući da će to dovesti do smanjene incidencije oštećenja probavnog sustava [75].

Rogoveanu i sur. (2015) su proveli ispitivanje utjecaja NSAID-a na probavni trakt. Praćeno je 30 pacijenata s aksijalnim ili perifernim osteoartritisom u razdoblju od 2013. do 2015. godine. Svi uključeni pacijenti imali su izvedenu endoskopiju gornjeg dijela probavnog sustava isključujući one pacijente koji su imali povijest gastritisa. Erozivni gastritis javio se kod 8 pacijenata, čir na želucu kod 4 pacijenata i čir na dvanaesniku kod 6 pacijenata. Rezultati istraživanja su pokazali da postoji rizik od razvoja neželjenih probavnih događaja kod pacijenata koji duži vremenski period konzumiraju NSAID-e [76].

Dib i sur. (2014) su proveli istraživanje u kojemu je sudjelovalo 1 213 pacijenata u dobi od 18 do 82 godine koji su se žalili na probleme u gornjem dijelu probavnog sustava

(bol, mučnina, povraćanje, prisutnost krvarenja, ...). Istraživanje je trajalo 3 godine. Pacijenti su bili podijeljeni u dvije grupe – oni koji su se liječili NSAID-ima (diklofenak i nimesulid) i oni koji su se liječili lijekovima koji nisu NSAID-i. Rezultati istraživanja su pokazali da je prisutnost lezija u želucu i dvanaesniku bila češća u skupini koja se liječila NSAID-ima. Također, rizik od probavnog krvarenja je bio 12 puta veći kod onih koji su koristili NSAID-e, a želudac je mjesto u kojem se krvarenje najčešće javljalo [77].

NSAID-i, koji su kemijski gledano slabe kiseline, smanjuju debljinu zaštitnog sloja želučane sluznice. Smanjenjem debljine zaštitnog sloja, sluznica se izlaže agresivnim čimbenicima (npr. želučanoj kiselini) koji oštećuju sluznicu i stvaraju ozljede koje vode u ozbiljna stanja, poput čira i raka [75].

2.2.3.3. Kardiovaskularne bolesti

Salvo i sur. (2000) proveli su analizu djelovanja selektivnih inhibitora. Ovo je ispitivanje uključivalo 8 076 pacijenata s poviješću osteoartritisa ili reumatoidnog artritisa koji su se liječili rofekoksibom ili naproksenom. Pacijenti su se liječili navedenim NSAID-ima u razdoblju od 3 do 12 mjeseci. Istraživanje je pokazalo kako je veza između ovih NSAID-a i rizika od razvitka kardiovaskularne bolesti postojana. Rezultati su pokazali da se infarkt miokarda javlja pet puta češće kod pacijenata koji su se liječili rofekoksibom od onih koji su se liječili naproksenom. [78].

Istraživanje Howes (2007) uključivalo je 2 586 pacijenata koji su se liječili rofekoksibom ili placebo. Cilj ovog istraživanja je bio ispitati utjecaj rofekoksiba na prevenciju nastanka polipa kod onih pacijenata koji imaju povijest raka debelog crijeva. Ovo istraživanje je prvotno bilo planirano u trajanju od 3 godine, ali je ispitivanje prekinuto 2 mjeseca ranije zbog povećanih kardiovaskularnih događaja u skupini koja je primala rofekoksib. Zaključak ovog istraživanja je bio taj da je dugotrajna upotreba rofekoksiba povezana s dvostruko većim rizikom od srčanog ili moždanog udara u odnosu na placebo [79].

Solomon i sur. (2005) su proveli istraživanje čiji je cilj bio ispitati utjecaj inhibicije COX-2 na prevenciju stvaranja kolorektalnog adenoma. U ispitivanju je sudjelovalo 2 457 pacijenata u dobi od 31 do 88 godina koji su bili podijeljeni u tri skupine. Prva je skupina primala 200 mg celekoksiba dva puta dnevno, druga je primala 400 mg celekoksiba dva puta dnevno dok je treća skupina primala placebo. U istraživanju su sudjelovali i oni pacijenti kod kojih postoji genetska predispozicija za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Ispitivanje je

trajalo 3 godine. Dok je istraživanje još bilo u tijeku, počele su se javljati prve posljedice na kardiovaskularni sustav. Istraživanjem je utvrđeno da postoji poveznica između korištenja celekoksiba duži vremenski period s razvojem kardiovaskularnih događaja. Veći broj slučajeva je prijavljen kod one skupine u kojoj se koristila veća doza celekoksiba [80].

Postoji i potvrđena veza između konzumacije NSAID-a s razvojem štetnih kardiovaskularnih događaja kod žena u postmenopauzi. Bavry i sur. (2014) su proveli 15 studija u kojima je sudjelovalo 161 801 žena u dobi od 50 do 79 godina u razdoblju 1993.-1998. U istraživanju je ispitivano 15 NSAID-a koji su bili podijeljeni u tri grupe: selektivni inhibitori COX-2, neselektivni NSAID-i koji imaju povećanu selektivnost za COX-2 te neselektivni NSAID-i s povećanom selektivnošću za COX-1. Kod 12 733 pacijenata su se javili neželjeni događaji. Povećani rizik je primijećen kod onih pacijenata koji su koristili selektivne NSAID-e (rofekoksib i celekoksib) dok su najmanji rizici primijećeni kod pacijenata koji su koristili neselektivne NSAID-e s povećanom selektivnošću za COX-1 [81].

2.2.4. Prirodni inhibitori COX-2

Od davnina se prirodni proizvodi kontinuirano koriste u cilju liječenja raznih tegoba te su mnogi preparati prirodnog porijekla dostupni na tržištu. To uključuje: alkaloid, flavonoide, cinamate, stilbene, ksantine, itd. Prirodni derivati su se pokazali kao učinkoviti inhibitori COX-2. Tako primjerice, apigenin, prirodni flavonoid, pokazuje veliku sposobnost sniženja ekspresije COX-2. Wang i sur. (2014) su proveli ispitivanje na 50 odraslih miševa u svrhu ispitivanja korištenja apigenina kao sredstvo liječenja akutne upale pluća. Miševi su podijeljeni u 5 grupa. Prva grupa je bila kontrolna, druga je primala 20 mg/kg apigenina, treća je primala 10 mg/kg apigenina, četvrta 2 mg/kg, a peta je primala lipopolisaharide. Kod pete grupe je primijećeno povećanje neutrofila u plućnom tkivu dok je kod grupa koje su koristile apigenin njihova koncentracija značajno smanjena. Također, u petoj grupi su otkrivene povećane koncentracije TNF- α . U grupama koje su koristile apigenin koncentracija TNF- α bila je značajno smanjena. Također, u ovim je grupama uočeno i manja ekspresija NF-kB faktora u usporedbi s kontrolnom skupinom [82].

Prirodni inhibitori su pokazali značajno manju toksičnost, u odnosu na NSAID-e prve i druge generacije. Također, prirodni inhibitori su pokazali i najniži rizik od razvijanja različitih neželjenih stanja. Upravo zbog toga se prirodni inhibitori COX-2 sve više istražuju kako bi se razvili što sigurniji i što učinkovitiji lijekovi [82].

Kurkuma (*Curcuma longa* L.) ima ljekovita svojstva zbog sadržaja kurkuminoida ((1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)hepta-1,6-dien-3,5-dion). Dehodar i sur. (2013) su proveli istraživanje na 18 pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa. Svrha ispitivanja je bila usporediti antireumatsko djelovanje kurkumoida (1 200 mg/dan) s fenilbutazonom (300 mg/dan). Nakon dva tjedna liječenja obje su skupine prijavile olakšanje boli i upale. Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je učinak kurkuminoida jednako djelotvoran kao fenilbutazon. Istraživanje je pokazalo i pozitivan inhibitorski učinak kurkuminoida na COX-2 [83].

Hmelj (*Humulus lupulus* L.) je najpoznatiji po tome što služi za poboljšanje okusa piva, ali se on također koristi za smanjenje anksioznosti te u borbi protiv nesanice. Lemay (2004) je pokazao kako ekstrakt hmelja s visokim sadržajem α -kiselina može inhibirati COX-2. Ispitanici su konzumirali ekstrakt hmelja u prahu, ekstrakt smole hmelja ili ibuprofen. Davali su uzorke krvi prije konzumacije i 9 sati nakon prve doze. Hmelj se pokazao vrlo slabim inhibitorom za COX-1, ali se pokazao dobrim inhibitorom za COX-2 s inhibitorskim učinkom prisutnim tijekom 9 sati. Inhibitorski učinak hmelja ekvivalentan je dozi od 400 mg ibuprofena što predstavlja sigurniju alternativu za liječenje upale [84].

Zeldin (2001) je proveo osmotjedno istraživanje u kojem su sudjelovali pacijenti oboljeli od osteoartritisa i reumatoidnog artritisa. Pacijenti su tijekom osam tjedana oralno koristili kombinaciju oleanolne kiseline, ekstrakta ružmarina i α -kiselina iz hmelja. Rezultati istraživanja pokazali su do 50 % smanjenje boli kod osoba oboljelih od osteoartritisa dok nije bilo statistički značajnih rezultata kod osoba oboljelih od reumatoidnog artritisa [85].

Smola tamjanovog drveta (*Boswellia serrata* Roxb.) se od davnih vremena koristi za liječenje raznih upalnih bolesti kao što su reumatoidni artritis, osteoartritis i upala kralježaka. Glavni sastojak ove smole su bosvelične kiseline za koje je utvrđeno da inhibiraju nastanak upalnih prostanoida na način da inhibiraju djelovanje ciklooksigenaze. Bosvelične kiseline, za razliku od farmaceutskih kortikosteroida, ne pokazuju značajne nuspojave ili toksičnost [86].

Etzel (1996) je proveo kliničko ispitivanje u kojem su se bosvelične kiseline kombinirale s drugim NSAID-ima kako bi se ispitao učinak na pacijente koji pate od reumatoidnog artritisa. U ispitivanju je sudjelovalo 260 pacijenata. Ovakva je terapija pokazala značajno smanjenje otoka i boli tijekom liječenja. Također, ukočenost se smanjila, a opće zdravlje i dobrobit pacijenata su pokazali poboljšanje. Konačni su rezultati pokazali kako su bosvelične kiseline djelovale pozitivno na smanjenje simptoma reumatoidnog artritisa kod 50-60 % pacijenata koji su bili uključeni u ispitivanje [87].

Đumbir (*Zingiber officinale* Roscoe) je poznat po svojem utjecaju na smanjenje mučnine, ali je on također i učinkovita protuupalna biljka koja se od davnih vremena koristi za liječenje artritisa. Đumbir svoje protuupalno djelovanje postiže inhibicijom COX-2 i putova lipooksigenaze. Srivastava (1992) je proveo ispitivanje na pacijentima koji pate od osteoartritisa i reumatoidnog artritisa. U ispitivanju je sudjelovalo 56 bolesnika (28 s reumatoidnim artritisom, 18 s osteoartritisom i 10 s mišićnom nelagodom). Koristili su oralnu otopinu đumbira u prahu. Među pacijentima s artritisom više od $\frac{3}{4}$ doživjelo je olakšanje boli i otekline. Svi pacijenti s mišićnom nelagodom su doživjeli olakšanje boli. Ni jedan od pacijenata koji je sudjelovao u ovom istraživanju nije prijavio štetne učinke tijekom konzumiranja đumbira što je trajalo u rasponu od 3 do 30 mjeseci [88].

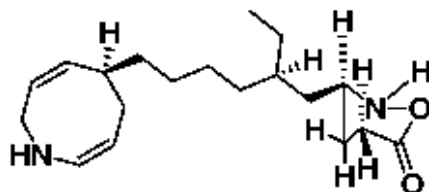
2.2.4.1. Alkaloidi

Chandel i sur. (2017) su opisali kemopreventivni potencijal biljke *Anthocephalus cadamba* Miq., poznate pod imenom „kadam ili kadamb“. Iz lišća ove biljke izolirane su frakcije, jedna od frakcija (etanol) je sadržavala velike koncentracije dihidrokadambina (alkaloid) dok je druga frakcija sadržavala mješavinu drugih (*n*-butanol), različitih alkaloida. Obje frakcije pokazale su dobra eliminacijska svojstva hidroksilnih radikala nastalih Fentonovom reakcijom. Druga frakcija je pokazala i svojstva koja sprječavaju proliferaciju humanih stanica raka induciranjem apoptoze [89].

Kineski jam, *Dioscorea opposita* Turcz. tradicionalno se koristi zbog svog protuupalnog djelovanja. Yang i sur. (2009) proučavali su svojstva ove biljke kao antioksidansa i inhibitora COX-2. Četiri nova spoja (3,5-dihidroksi-4-metoksibenzil, 3,3',5-trihidroksi-2'-metoksibenzil, 10,11-dihidro-dibenz[b,f]oksepin-2,4-diol i 10,11-dihidro-4-metoksi-dibenz[b,f]oksepin-2-ol) izolirani su iz kloroformne frakcije ove biljke, zajedno s drugih 15 već tada poznatih spojeva. Od 19 izoliranih spojeva njih je 7 pokazivalo značajni potencijal za uklanjanje štetnih radikala iz organizma, dok je 5 spojeva pokazalo visoku selektivnost za COX-2. Utvrđeno je da spojevi s ketonskom skupinom imaju izraženiju selektivnost za inhibiciju ovog enzima [90].

Utvrđeno je i da morske alge imaju opsežno antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antivirusno i antitumorsko djelovanje. Makkar i Chakraborty (2017) izolirali su novi alkaloid, 3-(2-etil-6-((3*Z*, 7*Z*)-1,2,5,6-tetrahidroazocin-5-il)heksil)morfolin-6-on, iz crvene morske alge *Gracilaria opuntia* Dur. Ovaj spoj pokazao je značajnu inhibicijsku moć

za COX-2 i lipooksigenazu. S obzirom na selektivnost, ovaj spoj je usporediv s aspirinom, natrij-salicilatom i ibuprofenom [91]. Strukturni prikaz ovoga spoja dan je na Slici 17.



Slika 17. Strukturni prikaz alkaloida

3-(2-etil-6-((3Z,7Z)-1,2,5,6-tetrahidroazocin-5-il)heksil)morfolin-6-ona [92].

Pripravci od obične žutike, *Berberis vulgaris* L., koriste se kao tradicionalni lijek za liječenje raznih upalnih stanja. Ova biljka koristi se za liječenje reume, bolova u leđima i reumatske groznice. Kuo i sur. (2004) su ispitivali utjecaj berberina na aktivnost COX-2. Berberin se ispitivao na stanicama raka kože *in vitro*. Modelima su se dodavale različite koncentracije berberina (1, 10 ili 100 μ M). Berberin je inhibirao COX-2 čime se proizvodnja PGE₂ smanjila. Samim time je pokazano da pripravci od biljke pokazuju protuupalno djelovanje kao posljedicu visoke koncentracije alkaloida berberina [93]. U istraživanju koji su proveli Zou i sur. (2017) se pokazalo da berberin ima mogućnost inhibicije aktivatorskog proteina 1 (engl. *Activating Protein-1*, AP1), transkripcijskog faktora za stvaranje karcinoma posredovanih upalom, što ga čini vrlo pogodnim za opciju liječenja raka posredovanog COX-2 [94].

2.2.4.2. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju skupini polifenolnih spojeva koji su vrlo zastupljeni u biljnom carstvu. Flavonoidi pokazuje svestrane zdravstvene prednosti te su uvelike prisutni u ljudskoj prehrani. Kiraly i sur. (2016) napravili su istraživanje na apigeninu u kojem su ispitivali njegov utjecaj na postojeće tumorske stanice. Istraživanje se vršilo na miševima s razvijenim tumorom. U vremenskom razdoblju od 5 do 10 tjedana, miševi su svakodnevno primali apigenin koncentracije 20 μ M. Istraživanje je dokazalo da apigenin značajno smanjuje umnožavanje tumorskih stanica. Ovaj spoj se pokazao kao vrlo dobar inhibitor

COX-2 koji u organizmu eliminira preostale produkte ovog enzima (PGE₂, EP₁ i EP₂). Eliminacijom ovih produkata se sprječava napredovanje tumora [95].

Chen i sur. (2017) otkrili su da ekstrakt kore Xinhui naranče, dobiven iz *Citrus reticulata* Blanco, sadrži najveće količine polimetoksiliranih spojeva. Ovi spojevi imaju visok potencijal za uklanjanje štetnih radikala, dihidroklorida i dušikova oksida. Polimetoksilirani flavoni prisutni u ekstraktu kore naranče Xinhui su nobiletin i tangeretin, koji značajno inhibiraju ekspresiju COX-2 u upaljenim stanicama [96].

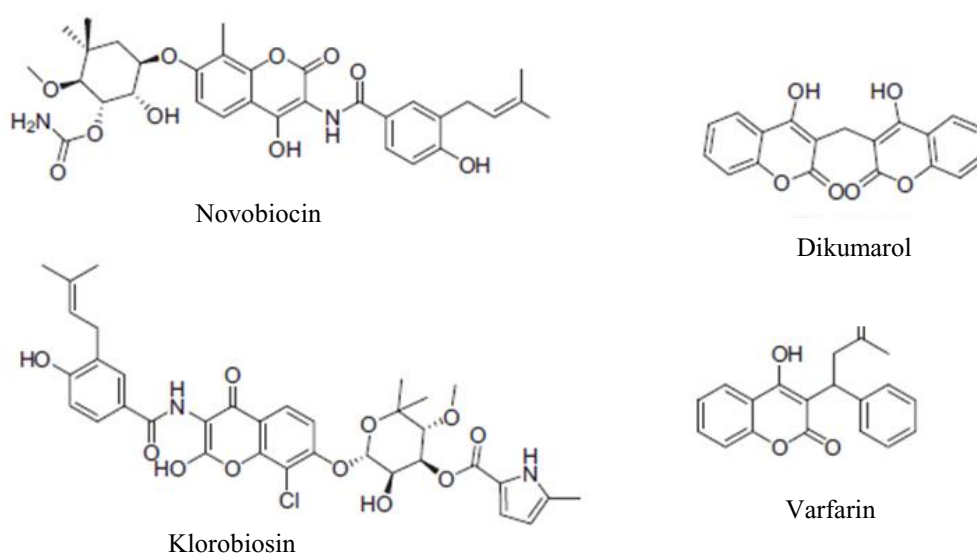
Kamilica se već stoljećima koristi kao ljekovita biljka zbog svog analgetskog i protuupalnog djelovanja. Srivastava i sur. (2009) ispitali su utjecaj prave kamilice, *Matricaria chamomilla* L., na inhibicijski put COX-2. U vodenom ekstraktu kamilice uočene su visoke koncentracije dva spoja: apigenin 7-*O*-glukozida i apigenin 7-*O*-neohesperidoza. Oba su spoja pokazala utjecaj na smanjenje COX-2 mRNA, a samim time i ekspresiju samog proteina. Spojevi nisu utjecali na aktivnost i ekspresiju COX-1. Uočeno je kako oba spoja imaju inhibitorni učinak na COX-2 iz razloga što smanjuju ekspresiju samog gena COX-2, a time se dovodi do izravne inhibicije samog enzima [97].

2.2.5. Inhibitori s kumarinskom jezgrom

Kumarini su još poznati kao benzopiran-2-oni, a to je skupina prirodnih laktona. Kumarini su prvi puta izolirani iz sjemenke tonkovca 1820. godine. To je važna klasa heterocikličkih spojeva koji sadržavaju kisik, a široko su prisutni u prirodi tako da se rutinski koriste kao biljni preparati svakog dana. Do danas je identificirano nešto više od 1 300 kumarina koji su uglavnom izolirani iz biljaka, gljiva i bakterija u kojima su prisutni kao sekundarni metaboliti [98].

Kumarini su spojevi koji su pokazali snažnu inhibiciju COX-2, čime se onemogućava sinteza prostanoida koji su odgovorni za stvaranje i širenje upalnog odgovora. Ovi spojevi su pronašli veliku primjenu u farmaceutskoj industriji jer pokazuju jaka antikoagulacijska svojstva. Osim prirodnih, zadnjih su godina sve popularniji sintetski kumarini na kojima se mogu vršiti različite modifikacije kako bi se sintetizirali što sigurniji lijekovi. Istraživanja kumarina kao potencijalnog inhibitora COX-2 privukli su pažnju mnogih znanstvenika. Jedan od razloga zbog kojeg se ulažu velika sredstva kako bi se pronašli dovoljno adekvatni inhibitori s kumarinskom jezgrom je ta što pokazuju manje štetnih učinaka u odnosu na selektivne inhibitore prve i druge generacije [98].

Napredak u metodama ekstrakcije i pročišćavanja prirodnih spojeva znatno je ubrzao proučavanje ovih prirodnih spojeva. Razni biološki aktivni kumarini, kao primjerice seskviterpenski kumarini i furokumarini, izolirani su iz različitih biljnih materijala te im se utvrdio široki spektar bioaktivnosti. Tuan Anh i sur. (2017) su proveli istraživanje na kumarinima izoliranim iz biljke *Paramignya trimera* Oliv. s ciljem ispitivanja njihovih protuupalnih učinaka. Izolirano je 7 kumarina čiji se utjecaj ispitivao na stanicama mikroglije *in vitro*. Svi izolirani kumarini su pokazali pozitivna svojstva inhibirajući COX-2, a time i proizvodnju PGE₂. Ovim se istraživanjem potvrdilo da je moguće koristiti izolirane kumarine iz biljke u prevenciji i liječenju neuroinflamatornih bolesti [99]. Strukturni prikaz nekih od najčešće korištenih inhibitora s kumarinskom jezgrom prikazani su na Slici 18.



Slika 18. Strukturne formule kumarina na kojima je obavljen najveći broj istraživanja [100].

Kako bi se što bolje manipuliralo pozitivnim učincima kumarina proizvedeni su i sintetski kumarini koji imaju različite skupine na položajima C-3, C-4 ili C-7. Dawood i sur. (2015) sintetizirali su dvije nove serije derivata kumarina koji sadrže tiazolin i tiazolidinon. Pripremljeni su spojevi na bazi tiazola zbog njegovog dokazanog visokog protuupalnog učinka. Različito supstituirani derivati tiazola pokazali su snažna selektivna inhibicijska svojstva prema COX-2, dok su tiazolidinoni pokazali nešto slabiju selektivnost. Cilj istraživanja bio je dobiti bolja i sigurnija protuupalna sredstva, odbacujući nuspojave kao čir na želucu i bubrežnu toksičnost. Veliki dio novosintetiziranih spojeva u ovom istraživanju

pokazalo je u *in vivo* modelima visoko protuupalno djelovanje. Spojevi su pokazali i visoku sigurnost za probavni sustav. Svi ispitani spojevi pokazali su se snažnim selektivnim COX-2 inhibitorima [100].

2.3. POVEZNICA COX-2 S RAKOM

Upala je snažno povezana s razvojem raka te igra ključnu ulogu u razvoju i napredovanju tumora. Kronična upala potiče karcinogenezu izazivanjem proliferacije, angiogeneze i metastaze, uz istodobno smanjivanje imunološkog odgovora te utjecaja kemoterapeutskih sredstava. Tumorske su stanice, fenotipski gledano, slične upalnim stanicama jer sadrže citokine, kemokine i njihove receptore. Trajno izlučivanje upalnih medijatora može dovesti do ozljede tkiva i DNA što dovodi do nakupljanja mutacija u epitelnim stanicama i promicanja njihovog rasta. Mutirane stanice nastavljaju proizvoditi citokine stvarajući tumorsko upalno mikrokruženje u kojem se upalni posrednici nalaze u većim koncentracijama no što se nalaze u normalnim tkivima. U takvom okruženju makrofagi i leukociti izlučuju veliku količinu reaktivnih kisikovih vrsta koje izazivaju oštećenje tkiva te uzrokuju promjene na DNA [101].

COX-2 je prekomjerno izražen u tumorskim stanicama pri čemu ovaj enzim igra važnu ulogu u tumorogenezi kroz stimulaciju epitelnih stanica, inhibiciju apoptoze, pojačavanjem invazivnosti stanica, posredovanjem u supresiji imuniteta, itd. Jedan od glavnih produkata COX-2 je PGE₂ za koji je dokazano da stimulira angiogenezu što je vrlo važno za preživljavanje tumora. COX-2 može potaknuti nastanak raka pluća, jetre, želuca, kože, vrata maternice, debelog crijeva, itd. Inhibicija aktivnosti COX-2 pokazuje potencijalne učinke na tijek liječenja raka, stoga selektivni inhibitori mogu postati novi i obećavajući kemopreventivni i kemoterapeutske agensi protiv raka [102].

Upotreba protuupalnih sredstava je zbog toga, bilo sama ili u kombinaciji s kemoterapeuticima, neophodna za prevenciju i liječenje raka. Mnoga protuupalna sredstva, što uključuje i NSAID-e, ometaju tumorsko mikrokruženje na način da povećavaju apoptozu i osjetljivost na kemoterapiju. U Tablici 2 su navedeni neki NSAID-i i njihovi preventivni učinci na različite vrste raka.

Tablica 2. Neki NSAID-i i njihovi preventivni učinci na različite vrste raka [103].

NSAID	Preventivni učinak na ...
Aspirin	Rak mokraćnog mjehura Rak dojke Rak jednjaka Rak pluća Rak debelog crijeva
Kolekoksib	Rak mokraćnog mjehura Rak dojke Rak vrata maternice Rak debelog crijeva Rak pluća Rak prostate Neuoroblastom
Deksametazon	Rak dojke Rak rektuma Multipli-mijelom
Ibuprofen	Rak dojke
Piroksikam	Rak debelog crijeva
Sulindak	Rak dojke

NSAID-i uglavnom djeluju na put prostanoidea. Zhang i Cook (2008) su istraživali poveznicu između aspirina i rizika od napredovanja raka dojke. U istraživanju je sudjelovalo 39 876 žena koje su svaki drugi dan primale nisku dozu aspirina i vitamina E u razdoblju od četiri godine. Samo polovica ispitanika u istraživanju potvrdila je potencijalnu uporabu aspirina za smanjenje rizika dok se kod druge polovice ispitanika nije pokazala nikakva korelacija između ovog lijeka i smanjenog rizika od razvoja raka dojke [104].

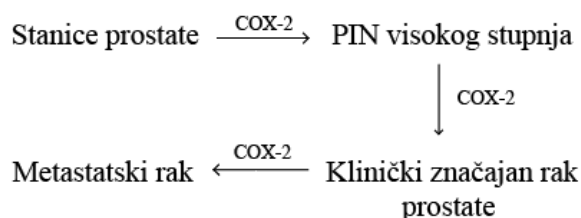
Harris i Alshafie (2000) su pokazali da celekoksib smanjuje rizik od raka dojke te raka debelog crijeva pokazujući značajnu korelaciju između NSAID-a i smanjenja učestalosti raka. Ispitivanje je provedeno na miševima s razvijenim tumorom dojke. Miševi

su podijeljeni u dvije skupine. Prva skupina bila je kontrolna i oni su se hranili normalnom hranom dok je drugoj skupini u hranu pomiješan celekoksib (1 500 mg/kg). U skupini koja je primala celekoksib uočeno je značajno smanjenje veličine tumora u razdoblju liječenja od 6 tjedana. Prosječno je volumen tumora bio smanjen za 32 %. S druge strane, podaci o korelaciji NSAID-a i raka gušterače, prostate, mjehura ili bubrega su kontroverzni i ograničeni [105].

Gill (2005) je proveo kliničko istraživanje koje je pokazalo da se kod pacijenata oboljelih od obiteljske adenomatozne polipoze (engl. *Familial Adenomatous Polyposis*, FAP), koji su koristili selektivni inhibitor celekoksib, pokazuje regresija postojećih adenoma [108]. FAP je nasljedni poremećaj kojim se stvaraju brojni polipi (adenomi) u rektalnom području što dovodi do kolorektalnog karcinoma koji nastupa, najčešće, do četrdesete godine života. Na temelju ovog istraživanja je FDA odobrila celekoksib za upotrebu u liječenju raka. Iako rezultati ovog istraživanja djeluju obećavajuće postoje i rizici od korištenja celekoksiba kao kemopreventivnog sredstva jer može djelovati štetno na probavni i kardiovaskularni sustav. Trenutno se svi ovi lijekovi koriste samo kao pomoćno sredstvo u liječenju, a ne kao monoterapija zbog njihovih toksičnih učinaka [106].

2.3.1. Rak prostate

Rak prostate je glavni rak koji pogađa mušku populacije te je postao jedan od glavnih ubojica muškaraca u svijetu. Ova vrsta raka povezana je s upalom prostate, a COX-2 je visoko eksprimiran u upalnom stanju. Upravo zbog toga se COX-2 pokazao kao jedna od temeljnih meta za liječenje i kemoprevenciju raka prostate [107]. Mehanizam nastanka i razvoja raka prostate prikazan je na Slici 19.



Slika 19. Mehanizam nastanka i razvoja raka prostate [108].

Ekspresija COX-2 direktno je povezana s pojavom raka prostate. Kod raka prostate, mRNA je prekomjerno izražena što dovodi i do prekomjerne ekspresije COX-2. Inhibicijom ekspresije enzima pomoću selektivnih inhibitora moguće je smanjiti učestalost raka prostate. Kohli i sur. (2005) istraživali su utjecaj selektivnih inhibitora, kao što je celekoksib, na rak prostate. Istraživanje se vršilo na stanicama raka prostate *in vitro*. Stanice su bile tretirane celekoksibom tijekom 48 sati. Koncentracije 2,5-5 μM celekoksiba inhibirale su rast stanica raka uz smanjenje koncentracije PGE_2 . Najveća koncentracija celekoksiba dovela je do smanjenja volumena tumora za 52 %. Rezultati su pokazali kako ovi NSAID-i imaju velik potencijal u liječenju raka prostate [109].

2.3.2. Rak dojke

Rak dojke je najčešća vrsta raka koja pogađa žene te rezultira visokom smrtnošću. Tijekom nastanka ove vrste raka eksprimira se visoka razina COX-2 što rezultira i velikom koncentracijom njegovih produkata. COX-2 može inducirati rak dojke putem stimuliranja stanične proliferacije, otpora apoptozi, induciranjem angiogeneze, pojačavanjem staničnih metastaza i potiskivanjem imunološkog odgovora [110].

Dokazano je da je COX-2 izravno povezan s parametrima agresivnog raka dojke, uključujući: veličinu tumora, pozitivne metastaze u limfnim čvorovima i HER_2 -pozitivan status tumora. Uključenost ekspresije COX-2 u raku dojke je prvi put sugeriran iz opažanja da su razine prostaglandina povišene kod oboljelih od raka dojke. Još veće koncentracije prostaglandina utvrđene su kod pacijenata koji imaju metastaze. Khuder i Mutgi (2001) su proveli metaanalize na 6 kohortnih studija i 8 studija kontrole slučaja. Svrha provedbe ove metaanalize bilo je bolje shvatiti poveznicu između raka dojke i uporabe NSAID-a. Sve zajedno su proučavali preko 7 000 slučajeva oboljelih od raka dojke. Procijenili su da je relativan rizik 0,82, odnosno da uporaba NSAID-a može biti povezana s malim smanjenjem rizika od raka dojke. Pokazali su i da se visoka koncentracija enzima javlja kod agresivnih oblika raka s lošim prognostičkim značajkama. Navedeno istraživanje ukazuje i na to da inhibitori COX-2 mogu imati ulogu u prevenciji i liječenju raka dojke [111].

Ženska zdravstvena inicijativa (engl. *The Women's Health Initiative*, WHI) (2003) provela je ispitivanje u kojemu se ispitivao učinak redovne upotrebe aspirina i ibuprofena na rizik od raka dojke. U istraživanju je sudjelovalo 80 741 žena u postmenopauzi koje nisu prijavile povijest raka dojke ili drugih karcinoma. Rezultati su pokazali smanjenu incidenciju nastanka raka dojke za 21 % kod žena koje uzimaju NSAID-e u vremenskom periodu od 5

do 9 godina. Kod žena koje su koristile NSAID-e u razdoblju od 10 ili više godina uočeno je smanjenje od 28 %. Rezultati su pokazali i da je ibuprofen sigurniji za dugotrajnu upotrebu od aspirina [112].

Arun i sur. (2005) proveli su ispitivanje na tumorskim stanicama štakora *in vitro*. Stanice su se uzgajale u odsutnosti ili prisutnosti celekoksiba tijekom 48 sati. Koncentracije celekoksiba bile su od 12,5 do 50 mM. Istraživanje je pokazalo da one stanice koje su bile tretirane celekoksibom pokazuju značajno smanjenje u progresiji raka dojke. Potom su se istraživanja provela i *in vivo* na štakorima koji imaju razvijen tumor dojke. U istraživanju je sudjelovalo njih 30 koji su bili podijeljeni u dvije skupine. Jedna je skupina primala celekoksib putem hrane, a druga je bila kontrolna. U usporedbi s kontrolnom skupinom, štakori koji su primali celekoksib putem hrane imali su značajno smanjenje tumorske incidencije. Kod nekoliko jedinki koje su primale celekoksib je došlo do redukcije tumorskog volumena za 81 %. Ovo istraživanje je pokazalo značajan preventivni učinak u kojem su doze celekoksiba iznosile od 150 do 1 500 ppm-a. Nimesulid, još jedan inhibitor COX-2, je pokazao smanjenu incidenciju raka za 28 % u dozi od 400 ppm [113].

Harris i sur. (2000) proveli su ispitivanja na životinjama kod kojih je rak dojke već bio razvijen. Kod takvih modela je uzimanje celekoksiba u dozi od 1 500 ppm-a dnevno rezultiralo smanjenjem veličine tumora za prosječno 32 % tijekom razdoblja liječenja od 6 tjedana. Kod 90 % životinja se značajno smanjio volumen tumora [105].

2.2.3. Kombiniranje inhibitora COX-2 i kemoterapeutika u liječenju raka

Kako bi se smanjio napredak raka koriste se razne metode i kemoterapeutici. Postoje različiti kemoterapeutici iz širokog spektra izvora, svaki s različitom strukturom i različitim mehanizmima djelovanja, a podijeljeni su prema kemijskoj strukturi, izvoru i napretku istraživanja. Također, rutinska kemoterapija pokazala je mnoge ozbiljne štetne učinke na zdrava tkiva organizma. Upravo zbog toga se ulažu napor i sredstva kako bi se otkrili novi, učinkovitiji načini liječenja raka. Jedan od potencijalnih načina liječenja je kombinacija inhibitora COX-2 s kemoterapeuticima [114].

Abou-Isa i sur. (2001) su ispitivali utjecaj celekoksiba na rak dojke. Ispitivanje se vršilo na miševima koji su najprije primili 15 mg 7,12-dimetilbenz(a)antracena. Deset dana nakon primitka ovog spoja započeta je terapija koja je sadržavala 250, 500, 1 000 ili 1 500 ppm celekoksiba. Primijećeno je da je veća doza celekoksiba rezultirala značajnim smanjenjem volumena tumora, iako se on događao i pri manjim dozama. Kontrolna skupina

je imala volumen tumora od 1,29 cm³ dok su miševi hranjeni celekoksibom imali volumen tumora od 0,42 cm³ (oni koji su se hranili s 250 ppm) do 0,16 cm³ (oni koji su se hranili s 1 500 ppm). Ovo istraživanje je pokazalo da kemopreventivni učinak celekoksiba ovisi o dozi, ali da je učinkovit i pri nižim dozama [115].

Toloczko-Iwaniuk i sur. (2019) su također ispitivali utjecaj celekoksiba. U istraživanju su sudjelovali pacijenti koji boluju od raka debelog crijeva, raka dojke, raka pluća te raka prostate. Pacijenti su tijekom 3 godine primali celekoksib. Ovaj selektivni NSAID pokazao je drastičniju razinu toksičnosti. Najčešće nuspojave celekoksiba u dozi od 400-800 mg/dan tijekom 3 godine bile su: proljev (10,5 % bolesnika), mučnina (6,8 % bolesnika), povraćanje (3,2 % bolesnika), hipertenzija (12,5 % bolesnika). Pojava abnormalnosti rada srca i tromboze javili su se kod 0,1-1 % oboljelih [116].

Rao i sur. (1995) su proučavali učinak NSAID-a na rak debelog crijeva na modelu miša. Miševima su kroz 52 tjedna davali azoksimetan u svrhu razvijanja raka debelog crijeva. Potom su koristili NSAID-e (indometacin, piroksikam, apsirin, ibuprofen i sulindak) kako bi ispitali njihovo djelovanje na razvijeni rak. Rezultati su pokazali da NSAID-i smanjuju volumen nastalog raka. Najbolje rezultate je pokazao sulindak koji je u samo 14 tjedana korištenja pokazao smanjenje volumena tumora do 52 % [117].

Bardia i sur. (2007) su proveli ispitivanje čiji je cilj bio odrediti utjecaj aspirina na rak pluća. Istraživanje je uključivalo 22 507 pacijenata koji su bili podijeljeni u tri kategorije: pušači, nepušači i bivši pušači. Pacijenti su primali kemoterapiju koja je bila kombinirana s aspirinom. Rezultati istraživanja su pokazali kako je upotreba aspirina bila povezana s nižim rizikom od napretka i smrtnosti raka pluća. Prema rezultatima istraživanja upotreba aspirina potencijalno bi mogla spriječiti otprilike u 4,7 % napredak raka, u 3,5 % smrtnost od raka te 7,6 % smrtnost od bolesti srca. Ovakva metoda liječenja bila je učinkovitija za nepušače u odnosu na pušače [118].

3. ZAKLJUČAK

Ciklooksigenaza-2 je vrlo bitan enzim koji kontrolira upalna i bolna područja, imunološke odgovore te progresiju raka. Kako bi se kontrolirala aktivnost enzima koriste se razni tipovi inhibitora. Kao najučinkovitiji inhibitori pokazali su se inhibitori biljnog porijekla jer, za razliku od selektivnih inhibitora, pokazuju nisku razinu toksičnosti.

Biljni izvori su lako dostupni, jeftini, ali i dalje nemaju široku upotrebu kao lijek. Jedan od razloga je taj što su precizne kemijske metode kojima bi se izolirale specifične komponente skupe, a drugi što je mehanizam samog djelovanja ovih spojeva nejasan i dalje. Stoga je potrebno uložiti daljnje napore kako bi se razvile nove kemijske metode kojima bi se uspješno mogao izolirati željni materijal. Uz to, potrebno je vršiti i daljnja istraživanja na samom mehanizmu djelovanja ovih inhibitora jer su u dosadašnjim istraživanjima pokazali velik medicinski potencijal.

Rak je jedan od najčešćih uzročnika smrti kod ljudi. Upravo zbog toga je nužno što bolje istražiti mehanizam kojim se ova bolest povezuje s COX-2. Jasno razumijevanje uloge COX-2 u upali i karcinomu bi omogućio razvoj boljih i snažnijih inhibitora COX-2 čime bi se smrtnost od raka značajno smanjila. Potrebno je provesti i daljnja istraživanja u kojima će se NSAID-i kombinirati u kemoterapiji kako bi se pronašao što prihvatljiviji način liječenja. Postoje i pretpostavke da inhibitori COX-2 igraju ključnu ulogu u sprječavanju nastanka raka, pa su stoga potrebna dodatna istraživanja za razvoj novih inhibitora COX-2 koji će se ispitivati na modelima tumora životinja i u kliničkim ispitivanjima na ljudima.

4. LITERATURNA VRELA

- [1] N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (2002), 13926-13931.
- [2] M. Philip, D. A. Rowley, H. Schreiber, *Semin. Cancer Biol.* **14** (2004), 433-439.
- [3] A. Greenhough, H. J. Smartt, A. E. Moore, *Carcinogenesis* **30** (2009), 377-386.
- [4] M. A. Islam, J. Shin, J. Firdous, T. E. Park, M. Cho, Y. Choi, C. S. Cho, *Biomaterials* **33** (2012), 8867-8880.
- [5] K. Simons, R. Eehalt, *J. Clin. Invest.* **110** (2002), 597-603.
- [6] https://www.researchgate.net/figure/Modelled-structure-of-COX-1-and-COX-2-Comparison-of-modelled-structures-with-their_fig10_280717961 (23. 8. 2022.)
- [7] S. B. Appleby, *Biochem. J.* **302** (1994), 732-727.
- [8] C. Luong, A. Miller, J. Barnett, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **3** (1996) 927-93.
- [9] E. M. Smyth, T. Grosser, M. Wang, Y. Yu, *J. Lipid Res.* **50** (2009), 423-428.
- [10] J. R. Vane, Y. S. Bakhle, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38** (1998), 97-120.
- [11] <https://musculoskeletalkey.com/prostanoid-biology-and-its-therapeutic-targeting/> (23. 8. 2022.)
- [12] D. C. Zeldin, *J. Biol. Chem* **276** (2001), 36059-36062.
- [13] A. Seavanian, E. Kim, *J. Free Radic. Biol. Med.* **1** (1985), 263-271.
- [14] Y. Sugimoto, T. Inazumi, S. Tsuchiya, *J. Biochem.* **157** (2015), 73-80.
- [15] A. Blobaum, L. Marnett, *J. Med. Chem.* **50** (2007), 1425-1441.
- [16] K. Kawahara, H. Hohjoh, S. Tsuchiya, Y. Sugimoto, T. Inazumi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1851** (2015), 414-421.
- [17] A. Zarghi, S. Arfaei, *Pharm. Res.* **10** (2011), 655-683.
- [18] R. M. Breyer, C. K. Bagdassarian, S. A. Myers, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41** (2001), 661-690.
- [19] J. Zhang, E. L. Ding, Y. Song, *J.A.M.A* **296** (2006), 1619-1632.
- [20] S. Aid, R. Langenbach, *J. Neurochem.* **5** (2008), 785-787.
- [21] B. F. McAdam, I. A. Mardini, A. Habib, A. Burke, J. A. Lawson, S. Kapoor, G. A. Fitzgerald, *J. Clin. Invest* **105** (2000), 1473-1482.
- [22] F. Halter, *Gut* **49** (2001), 443-453.
- [23] J. L. Wallace, K. Chapman, *Br. J. Pharmacol.* **5** (1999), 1200-1204.
- [24] V. Noriega, F. Sierralta, N. Aranda, R. Sotomayor-Zarate, J. C. Prieto, P. Poblete, *J. Biosci.* **45** (2020), 1252-1256.

- [25] C. Amici, A. Ciucci, L. Chiappa, C. Castillett, V. Martella, N. Decaro, C. Buonavoglia, A. DiCaro, *Antiviral Res.* **11** (2006), 1021-1030.
- [26] P. Lees, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **27** (2004), 479-490.
- [27] S. Tacconelli, A. Bruno, R. Grande, P. Ballerini, P. Patrignani, *Expert. Opin. Invest. Drugs* **7** (2017), 791-807.
- [28] S. Bindu, S. Mazumder, *Biochem. Pharmacol.* **180** (2020), 756-781.
- [29] P. G. Conaghan, *Rheumatol. Int.* **32** (2012), 1491-1502.
- [30] D. S. James, *J. Am. Osteopath. Assoc.* **99** (1999), 226-231.
- [31] M. R. Montinari, S. Minelli, *Vasc. Pharmacol.* **113** (2019), 1-8.
- [32] https://hr.wikipedia.org/wiki/Acetilsalicilna_kiselina (24. 8. 2022.)
- [33] M. Munir, N. Enany, J. Zhang, *Anesthesiology* **25** (2007), 761-774.
- [34] J. Amatruda, C. Peralta, M. Estrella, H. Sarathy, L. F. Fried, A. B. Newman, R. Katz, *J. Am. Geriatr. Soc.* **69** (2021), 726-734.
- [35] E. Kopp, S. Ghosh, *Science* **256** (1994), 956-959.
- [36] <https://www.medchemexpress.com/Ibuprofen.html> (24. 8. 2022.)
- [37] S. Silver, D. Gano, P. Gerretsen, *J. Pediatr. Child Health* **44** (2008), 567-572.
- [38] <https://www.medchemexpress.com/Ibuprofen.html> (24. 8. 2022.)
- [39] T. Grosser, *Trends Pharmacol. Sci.* **38** (2017), 733-748.
- [40] N. Cimolai, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **6** (2013), 289-305.
- [41] <https://accpjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/j.1875-9114.1986.tb03459.x> (24. 8. 2022.)
- [42] https://hr.upwiki.one/wiki/Anthranilic_acid (24. 8. 2022.)
- [43] <https://bs.wikipedia.org/wiki/Indometacin> (25. 8. 2022.)
- [44] H. Lio, L. Zhao, J. Leung, R. Zhang, *The Lancet* **387** (2016), 2293-2301.
- [45] N. Zhen, C. De-Sheng, *A.J.E.M.* **43** (2021), 12-26.
- [46] A. Nguyen, B. Zuraw, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **126** (2021), 674-680.
- [47] R. Altman, B. Bosch, K. Brune, P. Patrignani, C. Young, *Drugs* **75** (2015), 859-877.
- [48] <https://sh.wikipedia.org/wiki/Diklofenak> (25. 8. 2022.)
- [49] N. M. Davies, *Clin. Pharmacokinet.* **36** (1999), 115-126.
- [50] I. Bijnsdorp, J. van den Berg, G. K. Kupers, L. E. Wedekind, *J. Comp. Neurol.* **85** (2007), 25-31.
- [51] <https://sh.wikipedia.org/wiki/Oksikam> (25. 8. 2022.)
- [52] E. Campione, E. J. Paterno, E. Candi, M. Falconi, *Drug Dev. Res.* **9** (2015), 5843-5850.
- [53] D. Clemett, K. L. Goa, *Drugs* **59** (2000), 957-980.

- [54] <https://www.tcichemicals.com/AT/en/p/C2816> (23. 8. 2022.)
- [55] L. Gong, M. Monica, T. Grosser, C. F. Thorn, *Pharmacogen. Genom.* **4** (2012), 310-318.
- [56] C. J. Hawkey, *Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15** (2001), 801-820.
- [57] J. Zhu, J. W. Huang, *Cancer Res.* **64** (2004), 4309-4318.
- [58] I. Nishimori, *Bioorg. Med. Chem.* **15** (2007), 7229-7236.
- [59] L. Perry, C. Mosler, A. Atkins, M. Minehart, *U. S. Pharm.* **39** (2014), 35-38.
- [60] <https://en.wikipedia.org/wiki/Meloxicam> (22. 8. 2022.)
- [61] K. C. Srivastava, *Med. Hypotheses* **39** (1992), 342-348.
- [62] J. A. Katz, *Pain Med.* **14** (2013), 29-34.
- [63] C. P. Weiner, *Drugs for Pregnant and Lactating Women*, Elsevier, USA , 2019.
- [64] <https://en.wikipedia.org/wiki/Etodolac> (22. 8. 2022.)
- [65] X. Chen, *Nucleic Acids Res.* **30** (2002), 412-415.
- [66] K. Liao, K. Cheng, C. Lin, S. Lai, *Biomed.* **7** (2017), 25-29.
- [67] https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2004/21647_vioxx_lbl.pdf (25. 8. 2022.)
- [68] G. A. Fitzgerald, *Br. J. Med.* **351** (2004), 1709-1711.
- [69] <https://sh.wikipedia.org/wiki/Rofekoksib> (25. 8. 2022.)
- [70] J. Zhang, E. L. Ding, Y. Song, *J.A.M.A* **296** (2006), 1619-1632.
- [71] A. Arfe, L. Scotti, C. Varas-Lorenzo, *B.M.J.* **354** (2016), 672-679.
- [72] J. C. Breitner, S. J. Haneuse, *Neurology* **72** (2009), 1899-1905.
- [73] C. Sandoval-Acuna, C. Lopez-Alarcon, M. Aliaga, H. Speisky, *Chem. Biol. Interact.* **199** (2012), 18-28.
- [74] S. Mazumder, S. Bindu, U. Bandyopadhyay, *Biochem. Pharmacol.* **180** (2020), 33-51.
- [75] N. Bhala, J. Emberson, A. Merhi, *Lancet* **382** (2013), 769-779.
- [76] O. Rogoveanu, C. T. Streba, C. Vere, L. Petescu, R. Traistaru, *J. Med. Life* **8** (2015), 458-461.
- [77] R. A. Dib, D. Chinzon, L. Fontes, A. Teixeira, R. Navarro-Rodriguez, *Scand. J. Gastroent.* **49** (2014), 785-789.
- [78] F. Salvo, S. Antoniazzi, *Expert. Opin. Drug. Saf.* **13** (2014), 573-585.
- [79] L. Howes, *Therap. Clin. Risk Management* **3** (2007), 831-845.
- [80] S. D. Solomon, J. J. McMurray, M. Pfeiffer, J. Wittes, R. Fowler, P. Finn, *Br. J. Med.* **352** (2005), 1071-1080.

- [81] A. A. Bavry, F. Thomas, M. Allison, K. Johnson, B. Howard, M. Hlatky, *Cardiovasc. Res.* **7** (2014), 603-610.
- [82] J. Wang, Y. Liu, L. Xiao, L. Zhu, Q. Wang, T. Yan, *Inflammation Res.* **37** (2014), 2085-2090.
- [83] S. Deodhar, R. Sethi, R. Srimal, *Indian J. of Med. Res.* **138** (2013), 632-634.
- [84] M. Lemay, *Asia Pac. J. of Clin. Nut.* **13** (2004), 598-604.
- [85] D. C. Zeldin, *J. Biol. Chem.* **276** (2001), 36059-36062.
- [86] D. O. Lukaczer, *FASEB J.* **18** (2004), 156-162.
- [87] R. Etzel, *J. Phytomed.* **3** (1996), 91-94.
- [88] K. C. Srivastava, *J. Med. Hypotheses* **39** (1992), 342-348.
- [89] M. Chandel, M. Kumar, U. Sharma, B. Singh, S. Kaur, *Chem. Biodivers.* **14** (2017), 256-262.
- [90] M. Yang, K. Yoon, Y. Chin, J. Park, J. Kim, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (2009), 2689–2694.
- [91] F. Makkar, K. Chakraborty, *Nat. Product Letters* **32** (2017), 1150-1160.
- [92] H. M. Revankar, S. N. Bukhari, G. B. Kumar, H. Qin, *Bioorg. Chem.* **71** (2017), 146-159.
- [93] C. Kuo, C. Chi, T. Liu, *Cancer Letters* **203** (2004), 127-137.
- [94] K. Zou, Z. Li, Y. Zhang, H. Zhang, B. Li, W. Zhu, *Acta. Pharmacol. Sin.* **38** (2017), 157-167.
- [95] A. J. Kiraly, E. Soliman, A. Jenkins, R. T. Van Dross, *Leukot. Essent. Fat. Acids* **104** (2016), 44-53.
- [96] X. M. Chen, A. R. Tait, D. D. Kitts, *Food Chem.* **218** (2017), 15-21.
- [97] J. Srivastava, M. Mandey, S. Gupta, *Life Sci.* **85** (2009), 663-669.
- [98] B. Sandhya, *Eu. J. Med. Chem.* **46** (2011), 4696-4701.
- [99] H. Tuan Anh, D. Kim, W. Ko, T. Minh Ha, N. Xuan Nhiem, O. Hai Yen, *Pharm. Biol.* **55** (2017), 1195-1201.
- [100] D. H. Dawood, R. Z. Batran, T. A. Farghaly, M. A. Khedr, *Arch. Pharmacol.* **348** (2015), 875-888.
- [101] M. Philip, H. Schreiber, D. A. Rowley, *Semin. Cancer Biol.* **14** (2004), 433-439.
- [102] S. Kawanishi, *Int. J. Mol. Sci.* **15** (2017), 568-573.
- [103] S. Zappavigna, A. Cossu, *Int. J. Mol. Sci.* **21** (2020), 236-242.
- [104] S. M. Zhang, N.R. Cook, *Br. J. Cancer* **98** (2008), 989-991.
- [105] R. E. Harris, G. Alshafie, H. Abou-Issa, K. Seibert, *Cancer Res.* **60** (2000), 2101-2103.

- [106] S. Gill, *Semin. Oncol.* **32** (2005), 24-34.
- [107] D. Wang, R. N. Dubois, *Gut* **55** (2006), 115-122.
- [108] N. R. Jana, *Cell. Mol. Life Sci.* **65** (2008), 1295-1301.
- [109] M. Kohli, J. Li, M. Du, D. Hillman, S. Dehm, W. Tan, R. Carlson, M. Campion, L. Wang, H. Zhang, P. Zhang, D. Kilari, *Prostate Cancer Prostatic Dis.* **21** (2018), 411-418.
- [110] G. L. S. Daboes, *Steroid Biochem. Mole. Biol.* **86** (2003), 495-496.
- [111] S. A. Khuder, A. B. Mutgi, *Br. J. Cancer* **84** (2001), 1188-1192.
- [112] R. E. Harris, R. T. Chlebowski, R. D. Jackson, *Cancer Res.* **63** (2003), 6096-6101.
- [113] B. Arun, H. Zhang, N. Q. Mirza, *Breast Cancer Res. Treat.* **69** (2005), 234-239.
- [114] M. Patel, K. Subbaramaiah, B. Du, M. Chang, *Clin. Cancer Res.* **11** (2005), 1999-2007.
- [115] M. Abou-Issa, G. A. Alshafie, K. Seibert, A. T. Koki, J. L. Masferrer, R. E. Harris, *Anticancer Res.* **21** (2001), 3425-3432.
- [116] N. Toloczko-Iwaniuk, D. Dziemianczyk, *Curr. Drug Targets* **20** (2019), 302-315.
- [117] C. Rao, A. Rivenson, B. Simi, F. Zang, *Cancer Res.* **55** (1995), 1464-1472.
- [118] A. Bardia, J. Ebbert, R. Vierkant, P. Limburg, *J. Natl. Cancer. Inst.* **99** (2007), 881-889.