



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Ненад Јоксимовић

**АЦИЛПИРУВАТИ КАО ПРЕКУРСОРИ У СИНТЕЗИ
НЕКИХ БИОЛОШКИ АКТИВНИХ ЈЕДИЊЕЊА**

Докторска дисертација

Ментор: др Зорица Бугарчић, редовни професор

Крагујевац, 2020.

<i>I. Аутор</i>	
Име и презиме:	Ненад Јоксимовић
Датум и место рођења:	06.05.1991., Пећ
Садашње запослење:	Истраживач-сарадник
Наслов:	Ацилпирувати као прекурсори у синтези неких биолошки активних једињења
<i>II. Докторска дисертација</i>	
Број страница:	199
Број слика:	73
Број схема:	52
Број табела:	19
Број библиографских података:	245
Установа и место где је рад израђен:	Природно-математички факултет, Крагујевац
Научна област (УДК):	Хемија(54) – Органска хемија(547)
Ментор:	Проф. др Зорица Бугарчић
<i>III. Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме:	29.08.2018. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:	Наставно-научно веће Природно-математичког факултета: Веће за природно-математичке науке Универзитета у Крагујевцу:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:	<ol style="list-style-type: none"> 1. др Зорица Бугарчић, редовни професор Институт за хемију, Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Органска хемија 2. др Ненад Јанковић, научни сарадник Институт за хемију, Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу Научна област: Хемија 3. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Микробиологија и имунологија

	<p>4. др Зоран Ратковић, ванредни професор Институт за хемију, Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Органска хемија</p> <p>5. др Милан Вранеш, ванредни професор Природно-математички факултет у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду Ужа научна област: Аналитичка хемија</p>
<p>Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:</p>	<p>1. др Ненад Јанковић, научни сарадник Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу Научна област: Хемија</p> <p>2. др Мирјана Попсавин, редовни професор Природно-математички факултет у Новом Саду, Универзитет у Новом Саду Ужа научна област: Органска хемија</p> <p>3. др Зоран Ратковић, ванредни професор Институт за хемију, Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Органска хемија</p> <p>4. др Дејан Баскић, ванредни професор Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Микробиологија и имунологија</p> <p>5. др Марија Живковић, доцент Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу Ужа научна област: Органска хемија</p>
<p>Датум одбране дисертације:</p>	<p>2020. године</p>

ЗАХВАЛНИЦА

Ова докторска дисертација је урађена у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и део је пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Пројекат бр. 172011), чији је руководилац др Зорице Бугарчић, редовни професор, која је и предложила тему за овај рад.

Искрено се захваљујем ментору, проф. Зорици Бугарчић, на позиву да postanем део њене истраживачке групе, на идејама, саветима и указаној помоћи и подрици током писања свих научних радова, а напослетку и ове докторске дисертације.

Захваљујем се члановима комисије проф. др Мирајни Попсавин, доц. др Марији Здравковић, проф. др Зорану Ратковићу, проф. др Дејану Баскићу и др Ненаду Јанковићу на помоћи, сугестијама и критикама приликом израде ове докторске дисертације. Додатно бих се захвалио проф. др Дејану Баскићу на сарадњи и заједничким резултатима који су део ове докторске дисертације.

Захваљујем се свим колегама са института за хемију, а посебно бих издвојио своју дугогодишњу пријатељицу и колегиницу Јелену Петронијевић којој дугујем велику захвалност на указаној помоћи, бризи и подрици у сваком тренутку.

Највећу захвалност дугујем својој породици на одмереној пажњи, на финансиској подрици, што су били ту кад су ми најпотребнији и на љубави коју су ми пружали свих ових година.

САДРЖАЈ

СКРАЋЕНИЦЕ

СПИСАК СЛИКА

СПИСАК СХЕМА

СПИСАК ТАБЕЛА

ИЗВОД

SUMMARY

1. ОПШТИ ДЕО

1.1	Значај и особине ацилпирувата	1
1.2	Синтеза ацилпирувата.....	2
1.2.1	Клајзенова кондензација.....	2
1.2.2	Синтеза ацилпирувата из 5-ацил(ароил)-4-пирон-2-карбоксилата.....	3
1.2.3	С-ациловање винил-етара са метилхлороксоацетатом.....	4
1.2.4	Злато(III) катализована хидратација неких алкина.....	5
1.2.5	Синтеза из диазопирувата.....	5
1.3	Примена ацилпирувата у синтези биолошки активних једињења	7
1.3.1	Синтеза 2,4-дикето карбоксиних киселина	8
1.3.2	Синтеза деривата пиразола.....	20
1.3.3	Синтеза једињења која садрже изоксазолов прстен	37
1.3.4	Синтеза пиролидинона.....	47
1.3.5	Синтеза хиноксалинона и 1,4-бензоксазин-2-она.....	55
1.3.6	Синтеза комплекса метала.....	58

2. НАШИ РАДОВИ

2.1	Увод.....	60
2.2	Синтеза ацилпирувата 2А-И	62
2.3	Синтеза комплекса бакра(II) и испитивање биолошке активности.....	63
2.3.1	Синтеза и карактеризација једињења 3А-Д	63
2.3.1.1	Кристална структура једињења 3А	64
2.3.1.2	Карактеризација комплекса бакра помоћу електронске парамагнетне резонанце (ЕПР).....	66

2.3.2	Биолошки потенцијал једињења 3А-Д	67
2.3.2.1	Антиоксидативна активност једињења 3А-Д	68
2.3.2.2	Антимикробна активност једињења 3А-Д	70
2.3.2.3	Антитуморска активност једињења 3А-Д	72
2.3.2.4	Механизам антитуморског деловања једињења 3Г и 3Д	74
2.3.3	Интеракције једињења 3Г и 3Д са деоксирибонуклеинском киселином (ДНК).....	76
2.3.4	Интеракције 3Г и 3Д са серум албумином.....	78
2.4	Синтеза комплекса паладијума(II) и испитивање биолошке активности.....	80
2.4.1	Синтеза и карактеризација једињења 4А-Ђ	80
2.4.1.1	Кристална структура једињења 4Б	81
2.4.2	Биолошка испитивања једињења 4А-Ђ	83
2.4.2.1	Антитуморска активност једињења 4А-Ђ	83
2.4.2.2	Механизам антитуморског деловања једињења 4В , 4Г и 4Д	85
2.4.2.3	Интеракције једињења 4В , 4Г и 4Д са цисплатином.....	87
2.4.3	Интеракције једињења 4В са деоксирибонуклеинском киселином.....	88
2.4.3.1	Флуориметријска титрација ЕБ-ДНК комплексом 4В	88
2.4.3.2	Мерења вискозности раствора ДНК у присуству 4В	89
2.4.4	Интеракције 4В са серум албумином.....	90
2.4.5	Докинг студија једињења 4В	92
2.5	Синтеза пиролидинона и испитивање њихове биолошке активности...	94
2.5.1	Синтеза и карактеризација пиролидинона 5А-Х	94
2.5.1.1	Кристална и молекулска структура једињења 5Б	95
2.5.2	Биолошка испитивања једињења 5А-Х	96
2.5.2.1	Антиоксидативна активност једињења 5А-Х	96
2.5.2.2	Антимикробна активност једињења 5А-Х	99
2.5.2.3	Антитуморска активност једињења 5А-М	102
2.5.2.4.	Механизми цитотоксичне активности једињења 5И , 5Ј , 5Љ и 5М	104
2.5.3	Интеракције 5Ј и 5М са деоксирибонуклеинском киселином.....	108
2.5.3.1	Флуориметријска титрација ЕБ-ДНК једињењима 5Ј и 5М	108

2.5.3.2	Мерења вискозности раствора ДНК у присуству 5Л и 5М	109
2.5.4	Интеракције 5Л и 5М са серум албумином.....	110
2.5.5	Докинг студија једињења 5Л , 5Љ и 5М	111
3.	ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	
3.1	Опште напомене.....	115
3.2	Синтеза ацилпирувата (2А-И).....	118
3.3	Синтеза Cu(II) комплекса (3А-Д).....	121
3.4	Синтеза Pd(II) комплекса (4А-Ђ).....	123
3.5	Синтеза 1,5-диарил-4-(2-тиенилкарбонил)-3-хидрокси-3-пиролин-2-она (5А-Х)	126
4.	ЗАКЉУЧАК	139
5.	ЛИТЕРАТУРА	141
6.	БИОГРАФИЈА	156
7.	ПРИЛОГ	

СКРАЋЕНИЦЕ

293T	- хумана ћелијска линија изведена из НЕК 293 ћелијске линије
5-LO	- 5-липооксигеназа
A549	- ћелијска линија карцинома плућа
Ac	- ацетил група
AIDS	- синдром стечене имунодефицијенције
Ar	- арил група
ASK1	- апоптоза која регулишу киназу 1
Vcap-37	- хумани рак дојке
Bu	- бутил група
BSA	- серум албумин
CAN	- церијумамонијумнитрат
CC ₅₀	- 50% цитотоксична концентрација
CI	- комбинациони индекс
COX-1	- циклооксигеназа-1
COX-2	- циклооксигеназа-2
DCM	- дихлорметан
DIPEA	- <i>N,N</i> -диизопропилетиламин
DPPH	- 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикал
DU145	- хумани рак простате

EC ₅₀	- концентрација која uzrokuje 50% maksimalnog ucinaka u nekom bioloskom testu
Et	- etil grupa
F10	- ћелија тумора коже
FAAH	- хидролазе амида масних киселина
FLAP	- 5-LO-активирајући протеини
GI ₅₀	- концентрација за 50% максималне инхибиције ћелијске пролиферације
HBTU	- <i>O</i> -(бензотриазол-1-ил) - <i>N,N,N',N'</i> -тетраметилуронијум хексафлуорофосфат
hCA	- хумана анхидраза
HEK293	- хумани карцином бубрега
HeLa	- ћелијска линија рака глића материце
HepG2	- хумани карцином јетре
HIV	- вирус хумане имунодефицијенције
HOBT	- хидроксибензотриазол
Hsp90	- протеин топлотног шока 90
HT29	- хумани карцином дебелог црева
IC ₅₀	- половина максималне инхибиторне концентрације
Pr	- пропил група
K562	- хумана леукемија
LS174	- карцином дебелог црева

MBC	-	минимална бактерицидна концентрација
MCF-7	-	ћелијска линија рака дојке
MDA-MB-231	-	ћелијска линија рака дојке
Me	-	метил група
MGC-803	-	хумани карцином желуца
MIC	-	минимална инхибиторна концентрација
MRC-5	-	нормалне ћелијске линије хуманих феталних фибробласта плућа
MTT	-	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид
NADH	-	никотинамид аденин динуклеотид
NS5B -	-	неструктурни протеин 5B
Ph	-	фенил група
RNase H	-	рибонуклеаза H
sEH	-	растворљива епоксидна хидролаза
SGC-7901	-	хумани карцином желуца
THF	-	тетрахидрофуран
TyrRS	-	тирозил-tPНК синтетаза
VP35	-	вирални протеин 35

СПИСАК СЛИКА

Слика 1. *Структура кето и енолног облика ацилпирувата*

Слика 2. *Примена ацилпирувата у синтези*

Слика 3. *Структуре једињења 21а и 21б*

Слика 4. *Структура једињења 23'*

Слика 5. *Структура једињења 25а*

Слика 6. *Структуре једињења 27а-27г*

Слика 7. *Структуре једињења 28 и 29*

Слика 8. *Структуре једињења 31а, 31б и 33а*

Слика 9. *Структура једињења 31а'*

Слика 10. *Структура једињења 35а*

Слика 11. *Структуре једињења 34а и 34б*

Слика 12. *Структура једињења 39а*

Слика 13. *Структуре једињења 41а, 41б и 41в*

Слика 14. *Структуре једињења 43а, 43б и 43в*

Слика 15. *Структура једињења 45а*

Слика 16. *Структуре једињења 47а и 47б*

Слика 17. *Структуре једињења 49а и 49б*

Слика 18. *Структура једињења 53а*

Слика 19. *Структура једињења 55а*

Слика 20. *Структуре једињења 59а, 59б и 59в*

Слика 21. *Структуре једињења 67а, 67б и 67в*

Слика 22. *Структура једињења 71а*

Слика 23. *Структура једињења 75a*

Слика 24. *Структура једињења 79a*

Слика 25. *Структура једињења 83a*

Слика 26. *Структуре једињења 89a и 89b*

Слика 27. *Структуре једињења 92a и 92b*

Слика 28. *Структуре једињења 95a и 95b*

Слика 29. *Структура једињења 99a*

Слика 30. *Структура једињења 104a*

Слика 31. *Структура једињења 108a*

Слика 32. *Структуре једињења 115a, 115b и 115c*

Слика 33. *Структура једињења 123a*

Слика 34. *Структуре једињења 128a и 128b*

Слика 35. *Структуре једињења 130a и 130b*

Слика 36. *Структура једињења 133a*

Слика 37. *Структуре једињења 135a, 135b, 135c и 135d*

Слика 38. *Структура једињења 137a*

Слика 39. *Структуре једињења 139a и 139b*

Слика 40. *Структуре једињења 141a и 141b*

Слика 41. *Структура једињења 143a*

Слика 42. *Структура једињења 145a*

Слика 43. *Структура једињења 147a*

Слика 44. *Структура једињења 149a*

Слика 45. *Кристална структура једињења 3A*

Слика 46. *Комплексни молекули 3A распоређени у различите димере повезане водоничним везама*

Слика 47. ЕПР спектари једињења **3А-Д** на температури од 77 К

Слика 48. Графички приказ цитотоксичне активности (IC_{50} у μM) једињења **3А-Д** на HeLa, LS174 и A549 ћелијским линијама

Слика 49. Анализа проточне цитометрије са Annexin V/7-AAD бојењем

Слика 50. Анализа проточне цитометрије ћелијског циклуса

Слика 51. Интеракције једињења **3Г** и **3Д** са ДНК

Слика 52. Интеракције једињења **3Г** и **3Д** са BSA

Слика 53. ORTEP приказ молекуларне структуре једињења **4Б** са нумерисаним атомима Н и термалним елипсоидима са вероватноћом од 30%

Слика 54. MERCURY приказ кристалног паковања једињења **4Б**

Слика 55. Анализа проточне цитометрије са Annexin V-FITC/7-AAD бојењем

Слика 56. Анализа ћелијског циклуса

Слика 57. Графикони индекса комбинације који представљају комбиноване ефекте Pd комплекса и цисплатине на HeLa ћелијама

Слика 58. Интеракције једињења **4В** са ДНК

Слика 59. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК (0,01 mM) у пуферу (50 mM NaCl и 5 mM Tris-HCl на pH 7,4) у присуству растућих концентрација комплекса **4В** (R)

Слика 60. Интеракције једињења **4В** са BSA

Слика 61. а) Молекуларни докинг једињења **4В** са ДНК, б) дводимензионални приказ интеракција

Слика 62. а) Молекулски докинг једињења **4В** са BSA, б) дводимензионални приказ интеракција

Слика 63. Кристална структура и шема нумерисања атома једињења **5Б**

Слика 64. Упоредне криве зависности дозе од одговора MTT и SRB теста након 48h третмана HeLa, MDA-MB 231 и MRC-5 са једињењима **5И**, **5Ј**, **5Љ** и **5М**

Слика 65. Анализа проточне цитометрије Annexin V-FITC/7-AAD бојења

Слика 66. Квантификација аутофагије

Слика 67. Утицај инхибиције аутофагије на апоптозу

Слика 68. Анализа ћелијског циклуса

Слика 69. Интеракције једињења **5Л** и **5М** са ДНК

Слика 70. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК (0,01 mM) у пуферу (50 mM NaCl и 5 mM Tris-HCl на pH 7,4) у присуству растућих концентрација једињења **5М** и **5Л** (R)

Слика 71. Интеракције једињења **5Л** и **5М** са BSA

Слика 72. Молекулски докинг једињења **5Л(А)**, **5Љ(Б)** и **5М(В)** са ДНК и дводимензионални приказ интеракција

Слика 73. Молекулски докинг једињења **5Л(А)**, **5Љ(Б)** и **5М(В)** са BSA и дводимензионални приказ интеракција

СПИСАК СХЕМА

Схема 1. Синтеза ацилпирувата реакцијом Клајзенове кондензације између метил кетона и диалкил оксалата

Схема 2. Синтеза C-3 супституисаних ацилпирувата

Схема 3. Синтеза ацилпирувата који садрже изоксазолов прстен

Схема 4. Синтеза ацилпирувата који садрже пиразолов прстен

Схема 5. Синтеза ацилпирувата C-ациловањем винил-етра са метилхлороксоацетатом

Схема 6. Злато(III) катализована хидратација алкина

Схема 7. Синтеза ацилпирувата из диазопирувата

Схема 8. Хидролиза ацилпирувата

Схема 9. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето карбоксилних киселина **21**

Схема 10. Процедура за синтезу 2,4-дикето карбоксилне киселине **23**

Схема 11. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **25**

Схема 12. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **27**

Схема 13. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **31** и **33**

Схема 14. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **35**

Схема 15. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **37** и **39**

Схема 16. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **41**

Схема 17. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **43**

Схема 18. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **45**

Схема 19. Општа процедура за синтезу деривата пиразола **47**

Схема 20. Општа процедура за синтезу деривата 4-фенилазо-1H-пиразола **49**

Схема 21. Општа процедура за синтезу деривата метронидазол-пиразола **53**

- Схема 22.** *Опита процедура за синтезу деривата пиразола* 55
- Схема 23.** *Опита процедура за синтезу пиразол-оксадиазол коњугата* 59
- Схема 24.** *Опита процедура за синтезу деривата пиразол-5-карбоксамида* 67
- Схема 25.** *Опита процедура за синтезу деривата кумарин-сулфонамида који садрже пиразолов прстен* 71
- Схема 26.** *Опита процедура за синтезу деривата диарилпиразола* 75
- Схема 27.** *Опита процедура за синтезу фeroценил-пиразола* 79
- Схема 28.** *Опита процедура за синтезу супституисаних бензенсулфонамид-1,5-диарилпиразола* 83
- Схема 29.** *Опита процедура за синтезу пиразола који садрже дисупституисане деривате урее* 89
- Схема 30.** *Опита процедура за синтезу деривата диарилпиразол-бензенсулфонамида* 92
- Схема 31.** *Опита процедура за синтезу деривата изоксазола* 95
- Схема 32.** *Опита процедура за синтезу деривата изоксазола* 99
- Схема 33.** *Опита процедура за синтезу 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола* 104
- Схема 34.** *Опита процедура за синтезу 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола* 108
- Схема 35.** *Опита процедура за синтезу 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола* 115
- Схема 36.** *Опита процедура за синтезу изоксазола* 123
- Схема 37.** *Опита процедура за синтезу 4-алкинилизоксазола* 128
- Схема 38.** *Опита процедура за синтезу деривата пиролидинона* 130
- Схема 39.** *Опита процедура за синтезу деривата 3-амино-пиролидинона 133 и пироло[3,4] пиразола* 134
- Схема 40.** *Опита процедура за синтезу 3-хидроксипиролидинона* 135
- Схема 41.** *Опита процедура за синтезу 3-хидроксипиролидинона* 137

Схема 42. *Опита процедура за синтезу деривата бензотиазол-2-ил-3-хидрокси-5-фенил-1, 5-дихидро-пирол-2-она* **139**

Схема 43. *Опита процедура за синтезу деривата 3-хидрокси-пиролидинона* **141**

Схема 44. *Опита процедура за синтезу хиноксалинона и бензоксазин-2-она* **145**

Схема 45. *Опита процедура за синтезу бензоксазин-2-она* **145**

Схема 46. *Опита процедура за синтезу бензоксазин-2-она* **147**

Схема 47. *Опита процедура за синтезу Mg комплекса* **149**

Схема 48. *Синтеза и хемијске трансформације ацилтирувата*

Схема 49. *Синтеза ацилтирувата* **2А-И**

Схема 50. *Синтеза нових комплекса бакра(II)* **3А-Д**

Схема 51. *Синтеза нових комплекса паладијума(II)* **4А-Ђ**

Схема 52. *Синтеза 1,5-диарил-4-(2-тиенилкарбонил)-3-хидрокси-3-пиrolин-2-она* **(5А-Х)**

СПИСАК ТАБЕЛА

Табела 1. ЕПР подаци за једињења **3А-Д**

Табела 2. Потенцијал уклањања DPPH и супероксидног анјон радикала једињења **2А-Д** и **3А-Д**

Табела 3. Редуциона моћ једињења **2А-Д** и **3А-Д**

Табела 4. Антимикробна активност једињења **3А-Д**

Табела 5. Цитотоксична активност (вредности IC_{50}) једињења **3А-Д** на ћелијским линијама хуманог карцинома и ћелијској линији фибробласта плућа људског фетуса (MRC-5)

Табела 6. Индекс селективности једињења **3А-Д**

Табела 7. Константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуорисценције (k_q), Стерн-Волмерова константа (K_{SV}) и коефицијент корелације (R) за једињења **3Г** и **3Д**

Табела 8. Везивни параметри (K_a и n) и коефицијент корелације (R) за интеракцију **3Г** и **3Д** са BSA

Табела 9. *In vitro* инхибиторска активност (IC_{50}) (μM) једињења **4А-Ђ** на хуманим ћелијским линијама карцинома (HeLa и MDA-MB 231) и хуманим фибробластима (MRC-5) након 24 и 48 h третмана

Табела 10. Константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуорисценције (k_q), Стерн-Волмерова константа (K_{SV}) и коефицијент корелације (R) за једињење **4В**

Табела 11. Везивни параметри (K_a и n) и коефицијент корелације (R) за интеракцију једињења **4В** са BSA

Табела 12. Докинг параметри једињења **4В**

Табела 13. Потенцијал уклањања DPPH радикала једињења **5А-Х**

Табела 14. Редуциона моћ једињења **5А-Х**

Табела 15. Антибактеријска активност једињења **5А-Х**

Табела 16. Антифунгална активност једињења **5А-Х**

Табела 17. Константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуорисценције (k_q), Стерн-Волмерова константа (K_{SV}) и коефицијент корелације (R) једињења **5Л** и **5М**

Табела 18. Везивни параметри (K_a и n) и коефицијент корелације (R) за интеракцију **5Л** и **5М** са *BSA*

Табела 19. Докинг параметри за једињења **5Л**, **5Љ** и **5М**

ИЗВОД

У овој дисертацији синтетисана је серија ацилпирувата у високим приносима реакцијом Клајзенове кондензације. Ацилпирувати су затим коришћени као прекурсори за синтезу три нове класе једињења под претпоставком да ће показати боља биолошка својства од самих ацилпирувата. Синтетисана је серија од двадесет и пет нових 1,5-диарил-4-(2-тиенилкарбонил)-3-хидрокси-3-пиролин-2-они. Поред тога, било је веома интересантно испитати како координација за неке јоне прелазних метала утиче на активност органских молекула као што су ацилпирувати. Због тога је синтетисано једанаест нових метало-органских комплекса са ацилпируватима као лигандима који садрже Cu^{2+} или Pd^{2+} као централни јон метала. Сва ново-синтетисана једињења су окарактерисана спектроскопском анализом (UV-Vis, IR, ^1H и ^{13}C NMR), масеном спектрометријом и елементалном анализом. Рендгенска структурна анализа је такође урађена где је то било могуће.

Новосинтетизовани молекули тестирани су на антиоксидативни, антимикуробни и антитуморски потенцијал. DPPH тест пиридинона је показао да ова једињења поседују добру антиоксидативну активност (најнижа IC_{50} вредност износи $166,75 \mu\text{g/ml}$). Овај тест је такође показао да већина ацилпирувата поседује бољу антиоксидативну активност од одговарајућих метало-органских једињења бакра(II).

Испитивања антимикуробне активности су открила да пиридинони показују значајну инхибиторску активност на соју бактерија *Staphylococcus aureus* у прилично ниским концентрацијама (најнижа измерена MIC вредност износи $0,312 \text{ mg/ml}$), док је најосетљивији сој гљивица био *Trichophyton mentagrophytes* са најнижом MIC од $0,625 \text{ mg/ml}$. МИЦ вредности за метало-органска једињења бакра(II) на тестираним микроорганизмима биле су у распону од $0,048$ до $3,125 \text{ mg/ml}$. Најосетљивији сој бактерија био је *Proteus mirabilis*, док је међу гљивицама најосетљивији сој био *Candida albicans*.

Резултати антитуморске активности показали су да све три групе једињења поседују добру цитотоксичну активност. Резултати антитуморске активности пиридинона показали су да ова једињења поседују добру цитотоксичну активност на тестираним ћелијским линијама тумора, нешто бољу на HeLa него на MDA-MB 231

ћелијама. Сва тестирана метало-органска једињења бакра(II) показала су ниже вредности IC₅₀ на LS174 и A549 ћелијским линијама у поређењу са цисплатином. Резултати антитуморског потенцијала метало-органских комплекса паладијума(II) показали су да три једињења поседују прилично добру цитотоксичну активност на HeLa и значајну активност на MDA-MB 231 ћелијама.

Резултати добијени испитивањем интеракција синтетисаних једињења из све три групе са биомакромолекулима, показали су да испитана једињења интерагују са ДНК преко интеркалације, што је додатно потврђено мерењем вискозности одговарајућих раствора ДНК. Испитивање интеракција одабраних молекула из све три групе са серум албумином откривено је да се значајна количина тестираних једињења може транспортовати и дистрибуирати кроз ћелије.

Резултати добијени испитивањем биолошког потенцијала све три групе једињења (пиролидинони, метало-органска једињења бакра(II) и паладијума(II)) показали су да ова једињења имају добар потенцијал за будућу клиничку употребу у лечењу одређених болести.

SUMMARY

In this dissertation a series of acylpyruvates in high yields has been synthesized using the Claisen condensation reaction, which were then used as precursors for the synthesis of three new classes of compounds. Three new classes of compounds were synthesized under the assumption that they would show better biological properties than the acylpyruvates themselves. A series of twenty-five novel and one previously published 1,5-diaryl-4-(2-thienylcarbonyl)-3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones were synthesized. In addition, it was very interesting to examine how coordination for some metal ion affects the activity of organic molecules such as acylpyruvates, and therefore eleven new metal-organic complexes were synthesized with acylpyruvates as ligands containing Cu^{2+} or Pd^{2+} as the central metal ion. All newly synthesized compounds were characterized by spectroscopic analysis (UV-Vis, IR, ^1H and ^{13}C NMR), mass spectrometry and elemental analysis. X-ray structural analysis was also performed where possible.

The newly synthesized molecules were tested for antioxidant, antimicrobial and antitumor potential. The DPPH test showed that most acylpyruvates showed better antioxidant activity than the corresponding metal-organic copper(II) compounds. MIC values for the metal-organic copper(II) compounds on the tested microorganisms were in range from 0.048 to 3.125 mg/ml. The most sensitive bacteria strain was *Proteus mirabilis*, while among the fungi the most sensitive strain was *Candida albicans*. The results of the antitumor activity showed that these compounds showed good cytotoxic activity. All metal-organic copper(II) compounds showed lower IC_{50} values on the LS174 and A549 cell lines compared to cisplatin.

The results of the antitumor potential for palladium(II) metal-organic complexes showed that the three compounds had very good cytotoxic activity on HeLa cells and significant activity on MDA-MB 231 cells. The results obtained by examining the interactions between the palladium compound and cisplatin indicate that these compounds may be useful as adjuvants in therapy for the treatment of tumors, reducing the doses of cisplatin and thus the side effects of this drug.

The DPPH test of the pyrrolidinones showed that these compounds displayed good radical scavenging potential (lowest IC_{50} was 166.75 $\mu\text{g/ml}$). Tests revealed that pyrrolidinones showed significant inhibitory activity on the strain *Staphylococcus aureus* at fairly low concentrations (the lowest measured MIC value was 0.312 mg/ml), while the most sensitive

fungal strain was *Trichophyton mentagrophytes* with the lowest MIC of 0.625 mg/ml. The results of the antitumor activity of pyrrolidinones showed that these compounds showed good cytotoxic effects on the tested tumor cell lines, somewhat stronger on HeLa than on MDA-MB 231 cells.

Results obtained by examining the interactions between DNA and selected molecules from all three groups of compounds showed that these compounds interact with DNA *via* intercalation, which was further confirmed by measuring the viscosity of the corresponding DNA solutions. Examination of the interactions of selected molecules from all three groups with serum albumin revealed that a significant amount of the tested compounds could be transported and distributed through cells.

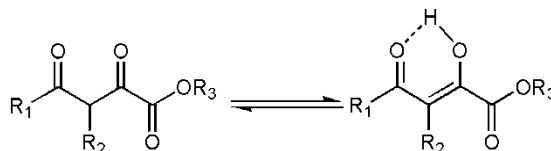
The results obtained by testing the biological potential of all three groups of compounds (metal-organic compounds of copper(II) and palladium(II) and pyrrolidinones) showed that these compounds have good potential for future clinical use for the treatment of certain diseases.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Значај и особине ацилпирувата

Ацилпирувати, чији је најједноставнији и најпознатији члан етил-2-хидрокси-4-оксопент-2-еноат (синтетисан први пут 1926. год.¹), имају велики број веома интересантних и специфичних својстава због структуре свог молекула (присуство две карбонилне групе одвојене једним атомом угљеника). Веома важна особина молекула ацилпирувата је присуство кето-енолне таутомерије. Равнотежа између кето и енолног облика у случају ацилпирувата јако је померана ка енолној форми због формирања интрамолекулске водоничне везе, услед које се јавља резонантна структура шесточланог прстена ових једињења² (Слика 1).

На кето-енолну равнотежу утиче низ фактора, а најбитнији су поларност растварача и присуство и својства супституената (оба терминална као и на метиленској групи). Способност формирања стабилних комплекса са већином метала директна је последица присуства енолног облика код ових молекула.



Слика 1. Структура кето и енолног облика ацилпирувата

Због присуства бројних карбонилних група у молекулу, ацилпирувати су драгоцени супстрати у многим хемијским синтезама. Иако су важни структурни фрагменти великог броја биолошки важних молекула и прекурсори за добијање многих лекова, такође су нашли примену у синтези многих биолошки активних једињења и природних производа.³⁻¹⁰ Такође, комбинација електрофилног карактера и броја координационих места богатих кисеоником са способношћу да формирају стабилне комплексе са већином метала чини молекуле ацилпирувата одличним прекурсорима за синтезу комплекса метала.¹¹

Модификације метиленске групе у молекулу ацилпирувата, које укључују и увођење супституента, генерално не утичу на активност ових једињења у даљим реакцијама. Према томе могуће је чак увести неке супституенте у молекулу ацилпирувата, што отвара много других могућности за њихову примену.⁶

1.2. Синтеза ацилпирувата

До данас нема много објављених процедура за синтезу једињења овог типа. У литератури постоје две методе које се најчешће користе за добијање ацилпирувата, прва је преко реакције Клајзенове кондензације^{12,13} и друга из 2,6-дисупституисаних 4-пирона¹⁴. Поред ових, постоји још неколико метода за синтезу ове групе једињења.¹⁵⁻¹⁷

1.2.1. Клајзенова кондензација

Једна од најчешће коришћених реакција за синтезу ацилпирувата је реакција Клајзенове кондензације. Најприступачнији начин добијања молекула ацилпирувата је реакција између метил кетона **1** и диалкил оксалата **2** у присуству јаке базе (база може бити натријум-метоксид, натријум-етоксид, натријум или калијум-*terc*-бутоксид, NaN или сл.)^{12,18-20} у одговарајућем растварачу. У првом кораку ове реакције добија се со ацилпирувата **3** која закишељавањем даје жељени производ **4** (Схема 1).

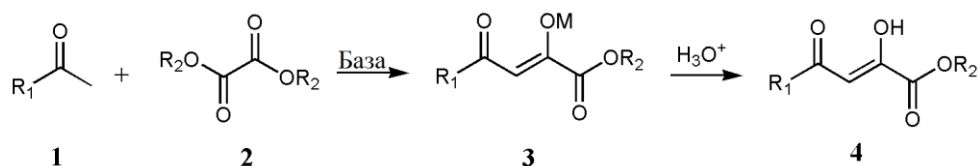


Схема 1. Синтеза ацилпирувата реакцијом Клајзенове кондензације између метил кетона и диалкил оксалата

Поред метил кетона, неки други кетони дужег низа²¹ **5**, (Схема 2А) или неки циклични кетони²² **7** (Схема 2Б) могу се користити за синтезу ацилпирувата, али овај тип реакције има нешто захтевније реакционе услове.¹⁰ Ова реакција се користи за добијање С-3 супституисаних ацилпирувата (**6** и **8**).

Веома је важно нагласити да услови реакције, као што су избор базе, подешавање температуре и одабир растварача јако утичу на приносе ове реакције.

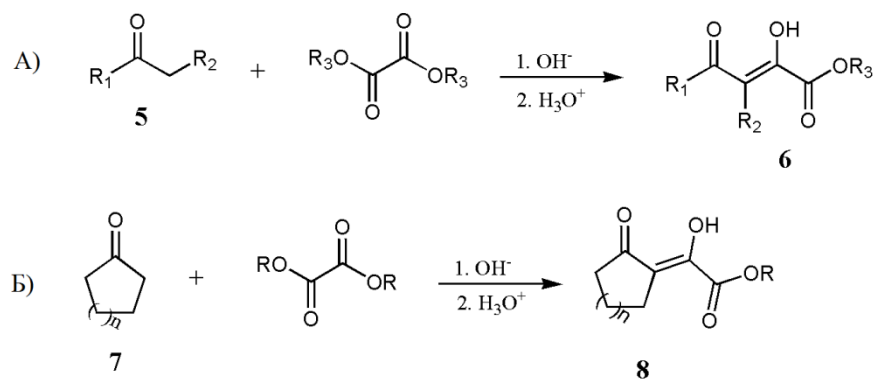


Схема 2. Синтеза C-3 супституисаних ацилпирувата

1.2.2. Синтеза ацилпирувата из 5-ацил(ароил)-4-пирон-2-карбоксилата

У литератури постоје два начина који описују употребу 2,6-дисупституисаних 4-пирона за синтезу ацилпирувата. Први је у реакцији између 5-ацил(ароил)-4-пирон-2-карбоксилата и хидроксиламина²³ (Схема 3), док други начин подразумева реакцију 5-ацил(ароил)-4-пирон-2-карбоксилата са арил-хидразином¹⁴ (Схема 4).

У првом кораку синтезе ацилпирувата из естра 5-ароил-4-пирон-2-карбоксилне киселине **9** долази до трансформације ових естара при чему долази до отварања пиронског прстена, дајући као производе ацилпирувате који садрже изоксазолов прстен **10**.^{24,25}

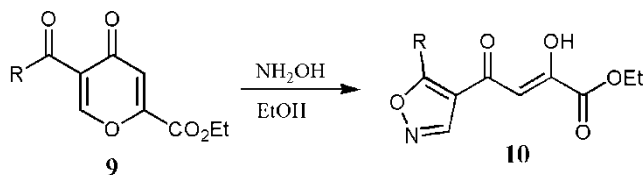


Схема 3. Синтеза ацилпирувата који садрже изоксазолов прстен

Примећено је да ако се реакција одиграва у присуству хидроксиламин хидрохлорида, у етанолу као растварачу на 25°C, настаје смеша производа. Ако се реакција одвија у присуству хидроксиламина, на 0–20°C у току 2h, добија се само очекивани производ али у нижим приносима. Бољи приноси, до три пута већи, могу се постићи ако се реакција одиграва у смеши растварача EtOH–THF, на -20°C и трајањем реакције до 30 дана.

Као што је приказано на Схеми 4, у другом реакционом путу за синтезу ацилпирувата са арил-хидразином¹⁴, реакција се може реализовати два метода (Метода А и Б). Крајњи производ ове реакције је различито супституисан ацилпируват на пиразоловом прстену (**11** и **12**),.

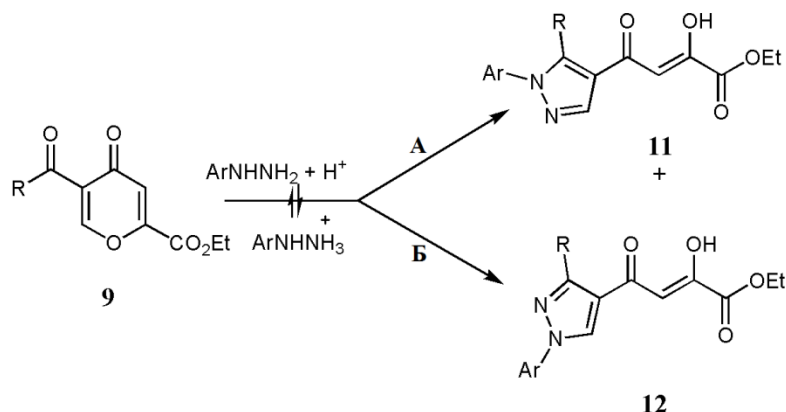


Схема 4. Синтеза ацилпирувата који садрже пиразолов прстен

Различито супституисани ацилпирувати настају услед нуклеофилне адиције арил-хидразина на већини електрофилних С-6 положаја пиронског прстена.²⁴ Селективност места напада арил-хидразина последица је бројних фактора као што је кисела или базна средина^{26,27}, температура, катализатори²⁷ као и природа електрофила^{26,27}. Селективност се може објаснити и теоријом тврдо-меке киселине, пошто је познато да постоји равнотежа између арил-хидразина и његових соли^{28,29}, а тај процес се одређује средњом киселостју и може да утиче на реактивност арил-хидразина²⁸⁻³⁰. Важно је приметити да ова реакција даје производе у високим приносима.

1.2.3. С-ациловање винил-етара са метилхлороксоацетатом

Као што је приказано на Схеми 5, неки ацилпирувати се могу синтетисати С-ациловањем винил-етара **13** са метил-хлороксоацетатом. У првој фази реакције добију се О-етил супституисани ацилпирувати **14**, док се у другој фази хидролизом супституисаног ацилпирувата добија жељени производ **15**.¹⁵

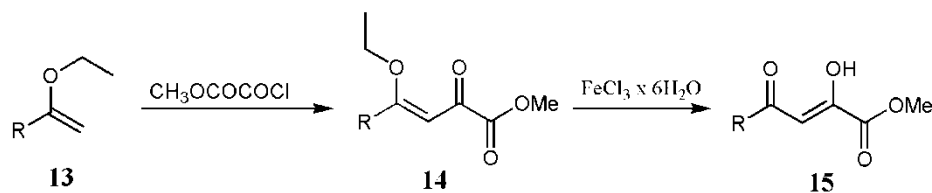


Схема 5. Синтеза ацилпирувата *S*-ациловањем винил-етара са метилхлороксоацетатом

Овај синтетички корак адиције-елиминације³¹ одиграва се у присуству пиридина на 0°C, при чему се добијају *O*-етил супституисани ацилпирувати у релативно добрим приносима. Други корак који се односи на селективну хидролизу супституисаног ацилпирувата доста је изазованији. Ова селективна хидролиза може се извршити помоћу фери-хлорид хексахидрата ($\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$), као средства за селективно раскидање енол-етара у присуству естарске функционалне групе, у дихлорметану или дихлоретану као растварачу. Због слабе растворљивости $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ у дихлорометану или дихлороетану овај реагенс има каталитичку улогу, предходећи реакцију хидролизе грађењем комплекса са металом.³²

1.2.4. Злато(III) катализована хидратација неких алкина

На основу чињенице да је неколико студија описало примену Au(III) ³³ и Au(I) ³⁴ као катализатора за адицију воде на неке алкине, Y. Liu и сарадници су описали синтетички пут за добијање ацилпирувата¹⁶ преко злато(III) катализоване хидратације алкина.

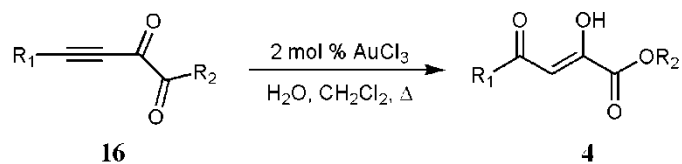


Схема 6. Злато(III) катализована хидратација алкина

Као што се може видети на Схеми 6, AuCl_3 катализованом адицијом воде на високо реактивне алкине **16** могу се добити ацилпирувати **4** у високим приносима (до 88%). Поред високих приноса, предност ове реакције су благи реакциони услови.

1.2.5. Синтеза из диазопирувата

Поред већ поменутих, постоји још један реакциони пут за добијање ацилпирувата. Као што је приказано на Схеми 7, ацилпирувати, и то у високим приносима могу се

добити калај(II)-хлорид катализованом реакцијом између алдехида **17** и етил-дiazопирувата¹⁷ **18**.

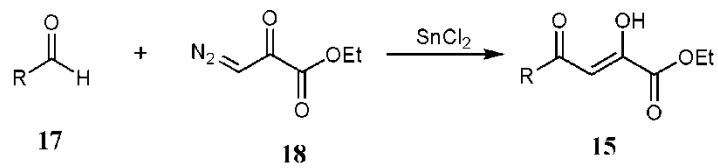
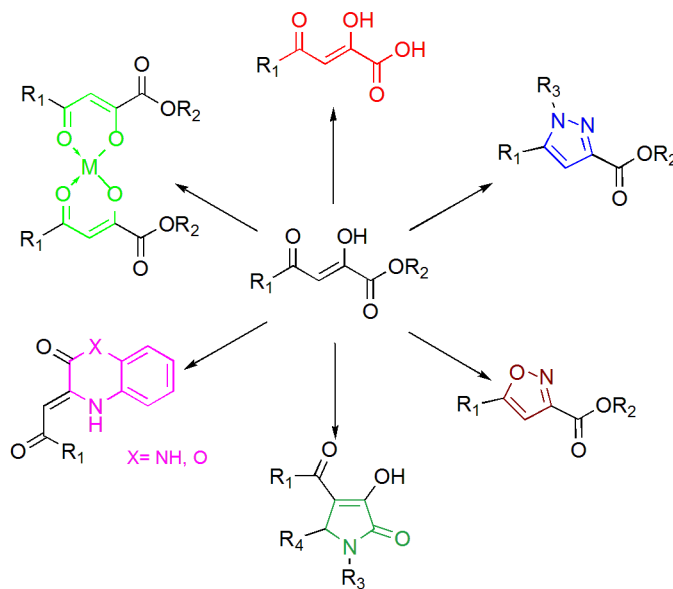


Схема 7. Синтеза ацилпирувата из diaзопирувата

1.3. Примена ацилпирувата у синтези биолошки активних једињења

Једињења као што су ацилпирувати су у центру пажње многих научника због великог броја веома интересантних и специфичних особина повезаних са структуром њихових молекула. Особине као што су појава кето-енолне таутомерје као и присуство већег броја карбонилних група у молекулу кључни су разлози за њихову примену у многим хемијским синтезама. Поред чињенице да су ацилпирувати важни структурни сегменти великог броја биолошки важних молекула и потенцијалних лекова, такође су широко коришћени за синтезу многих биолошки активних молекула и природних производа као што су 2,4-дикето киселине³⁵, пиразоли³⁶, изоксазоли³⁷, пиролидинони³⁸, хиноксалинони⁷, бензоксазин-2-они⁸ и разна друга једињења^{9,10} (Слика 2). Такође комбинација високо електрофилног карактера и координационих места богатих кисеоником повезаних са способношћу да формирају стабилне комплексе са већином метала, услед постојања таквих једињења у енолном облику, чине ацилпирувате одличним полазним супстратима за синтезу комплекса метала.¹¹



Слика 2. Примена ацилпирувата у синтези

1.3.1. Синтеза 2,4-дикето карбоксилних киселина

2,4-Дикето карбоксилне киселине (ДКК), осим што су полазни супстрати за синтезу широког спектра интермедијара и биолошки активних супстанци³⁹⁻⁴¹, су веома корисне јер показују широк спектар биолошких активности. Имајући у виду да је велики број различитих ацилпирувата релативно лако синтетисан реакцијом Клајзенове кондензације, један од главних начина за синтезу деривата 2,4-дикето карбоксилних киселина био би хидролиза претходно поменутих једињења (Схема 8).

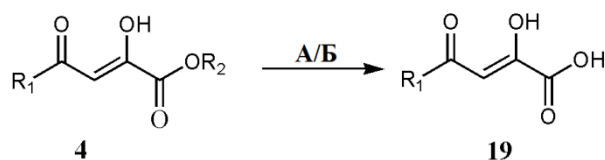


Схема 8. Хидролиза ацилпирувата. Услови реакције: **А** LiOH, THF:MeOH:H₂O = 1:1:1; **Б** 1M HCl, диоксан.

Као што се може видети на Схеми 8, деривати 2,4-дикето карбоксилних киселина **19** могу се добити путем базне³ (А) или киселе (Б) хидролизе ацилпирувата **4**. Чешће се примењује базна хидролиза због предности употребе разблажене базе где су реакције једносмерне а не реверзибилне, а производи се лакше раздвајају.

ДКК, продукти хидролизе ацилпирувата, представљају класу једињења са широким спектром биолошких активности али највећи број испитивања ове класе једињења односи се на њихову потенцијалну употребу у антиретровирусној терапији. Истраживачи широм света уложили су много напора у откривању нових лекова за терапију вируса хумане имунодефицијенције (HIV), а до данас само је једно једињење одобрено за клиничку употребу у HIV/AIDS терапији, тако да су истраживања нових анти-HIV лекова од виталног значаја.

Са том намером су X. Z. Zhao и сарадници⁴³ синтетисали серију дикето карбоксилних киселина **21**, хидролизом одговарајућих ацилпирувата **20** по процедури описаној на Схеми 9. Истраживање које су истраживачи спровели засновано је на чињеници да ДКК, молекули који имају способност да хелатирају двоваленти јон метала унутар каталитичког центра ензима, могу бити нова класа инхибитора HIV-1 интегразе.

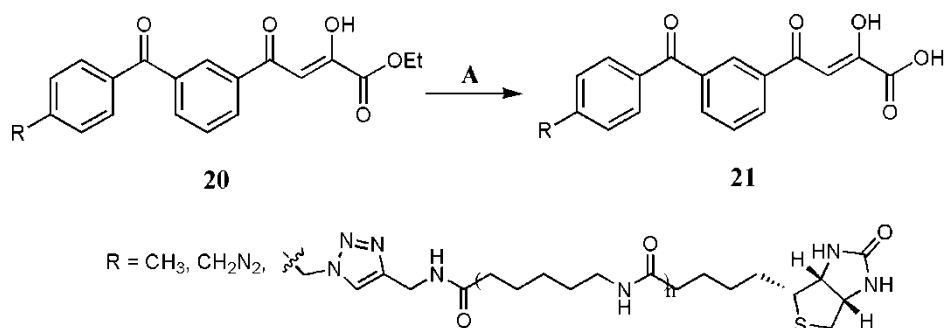
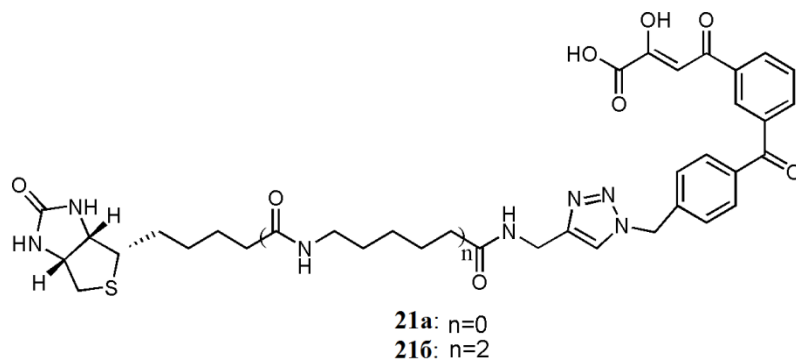


Схема 9. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето карбоксилних киселина **21**. Услови реакције: *A* LiOH/H₂O, THF/H₂O.

Знајући да разлике у структури могу довести до резистенције или појачане активности међу подврстама инхибитора ДКК, аутори су синтетисали одређен број 2,4-дикето карбоксилних киселина **21** које садрже бифенил-кетон у свом молекулу са различитом дужином супституената на -R остатку. Добијени резултати биолошких испитивања довели су до открића једињења **21a** и **21b** (Слика 3) која имају добар потенцијал за лечење ове болести. Најјачи инхибиторски ефекат показало је једињење **21b** које садржи поприлично дугачак ланац на -R, са IC₅₀ од 12,4 μМ.



Слика 3. Структуре једињења **21a** и **21b**

Такође, група истраживача је синтетисала нови инхибитор HIV-1 који у свом молекулу садржи пиридинонско језгро **23**. Као што је описано на Схеми 10, ДКК **23** је добијена хидролизом одговарајућег ацилпирувата **22**.⁴⁴

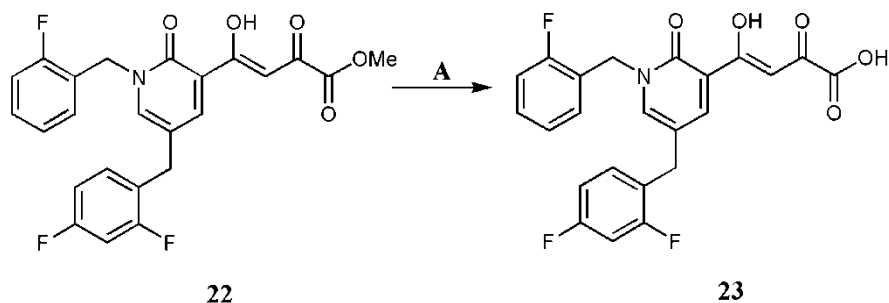
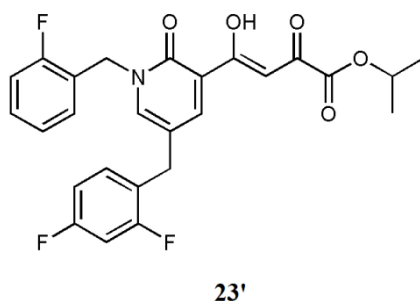


Схема 10. Процедура за синтезу 2,4-дикето карбоксилне киселине **23**. Услови реакције: **A** 1M HCl, диоксан.

Испитивањем фармаколошких својстава истраживачи су открили да једињење **23** поседује значајну анти-HIV-1 активност са IC_{50} вредношћу од 6 nM. Поред тога, једињење **23** је показало добру стабилност у микросомима јетре човека и посебно повољан ефекат код хуманих цитохромних P450 изозима и хумане UDP глукуронозил-трансферазе. Веома интересно откриће до којег су аутори дошли је да пролек једињења **23**, једињење **23'** (Слика 4), показује значајну анти-HIV-1 активност са вредностима IC_{50} од 9 nM, CC_{50} од 135 μ M и терапеутским индексом = 15 000.⁴⁴



Слика 4. Структура једињења **23'**

Слично томе, R. Costi и сарадници⁴⁵ су синтетисали серију пирилил-ДКК **25** хидролизом одговарајућих ацилпирувата **24** путем једноставног и ефикасног приступа паралелних фаза као што је описано на Схеми 11.

Резултати биолошких испитивања показали су да је међу свим аналозима који су тестирани на рекомбинантним ензимима (рибонуклеаза Н (RNase Н) и интеграна) и у тестовима на ћелијама, скоро половина синтетисаних молекула показала инхибицију репликације HIV-а. Једињење **25a** (Слика 5) је било најактивније на RNase Н са IC_{50} од 2,5

μМ. Поред тога, за једињење **25a** је откривено да поседује најснажнију инхибиторску активност интегразе са IC₅₀ од 26 nM.⁴⁵

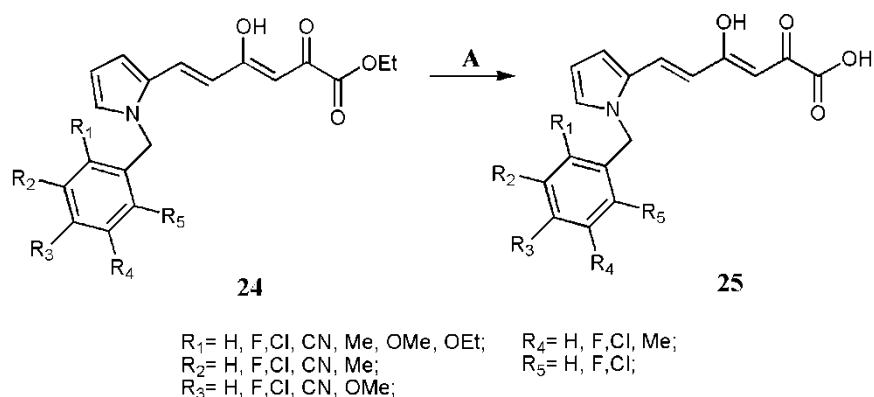
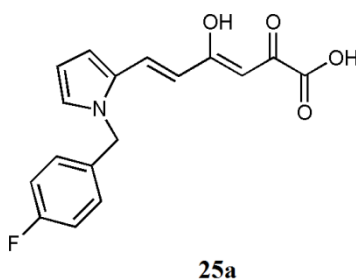


Схема 11. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **25**. Услови реакције: **A** 1M NaOH, THF/MeOH, собна температура.



Слика 5. Структура једињења **25a**

Постоји студија која потврђује да неке ДКК које садрже хинолинонски фрагмент имају прилично добру инхибиторску активност ХИВ-1 интегразе.⁴⁶ ДКК који садрже хинолинонски остатак **27** синтетисани су хидролизом одговарајућих ацилпирувата **26** као што је приказано на Схеми 12.

Студија је открила да су једињења **27a**, **27b**, **27c** и **27d** (Слика 6) инхибирала HIV-1 интегразу са IC₅₀ вредностима испод 100 nM. Такође, хинолинонске ДКК инхибирале су функцију RNase H код HIV-1 реверсне транскриптазе (РТ). Сва четири једињења, **27a-27d** су инхибирала RNase H у микроларној концентрацији са IC₅₀ вредностима у опсегу од 3,3 до 6,8 μМ. Поред тога, једињења **27b**, **27c** и **27d** су такође тестирана на функцију

полимеразе РТ и нађено је да су инактивна (40 μM). Генерално, резултати добијени у овој студији показују да су једињења **27a-27g** најефикаснији инхибитори RNase H.⁴⁶

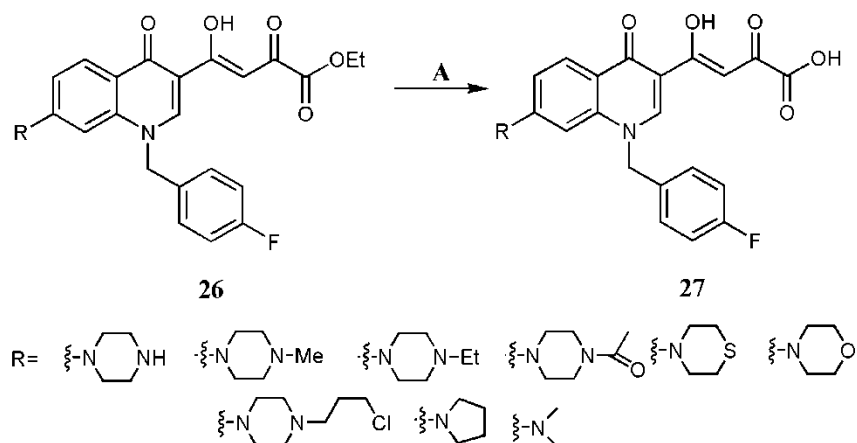
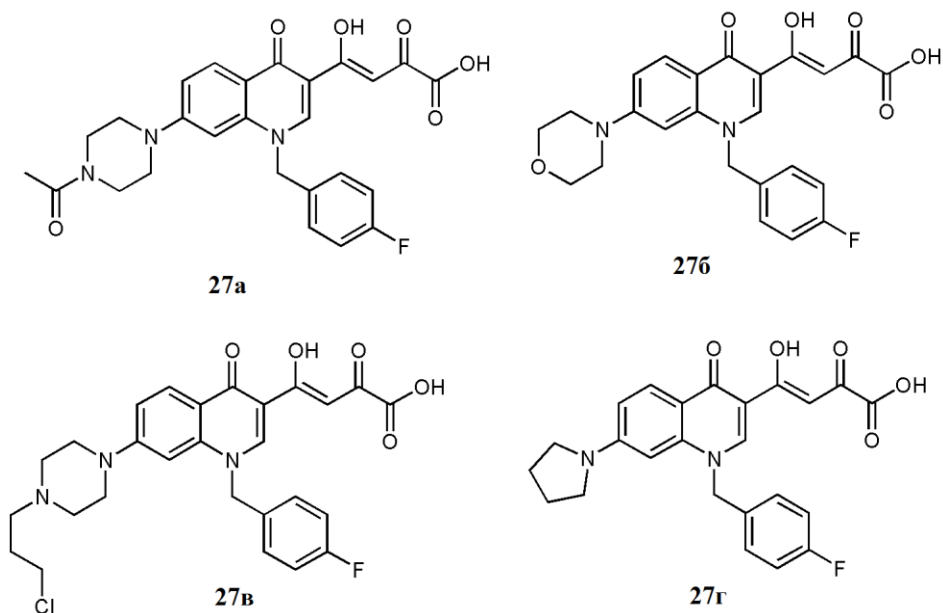
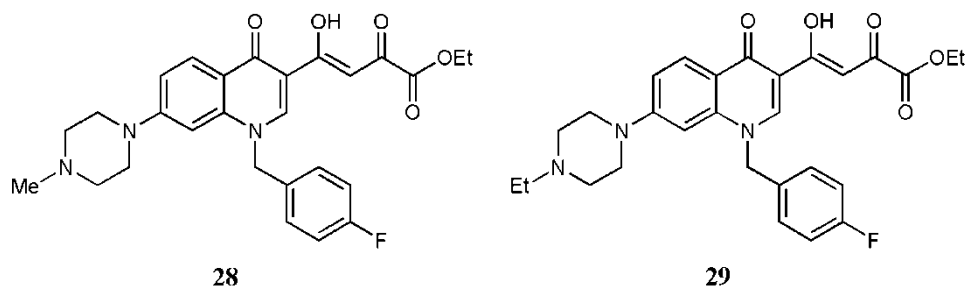


Схема 12. Опита процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **27**. Услови реакције: А 1М NaOH, THF/MeOH, собна температура.



Слика 6. Структуре једињења **27a-27g**

Интересантно је да су 4-метилпиперазин и 4-етилпиперазин, естарски деривати **28** и **29** (Слика 7) били активнији од аналогних киселина тестираних на RNase H са IC₅₀ вредностима од 18,5, односно 26,2 μM .⁴⁶



Слика 7. Структуре једињења 28 и 29

У 2015. години спроведене су бројне студије које су потврдиле примену ацилпирувата као прекурсора за синтезу једињења са великим потенцијалом за антиретровирусну терапију.⁴⁷⁻⁴⁹ О. Sagi и сарадници⁴⁸ су синтетисали серију ДКК који садрже дихидропиримидински **31** или дитиопиримидински фрагмент **33** употребом одговарајућих ацилпирувата **30** и **32** као прекурсора (Схема 13), са циљем да се испита њихова биолошка активност.

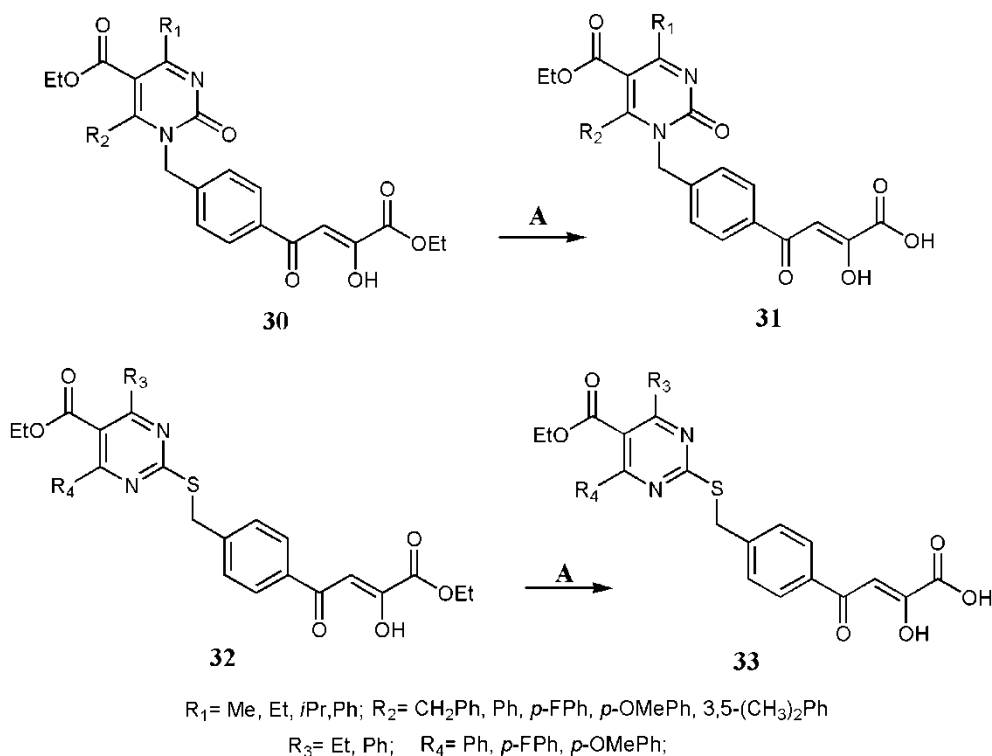
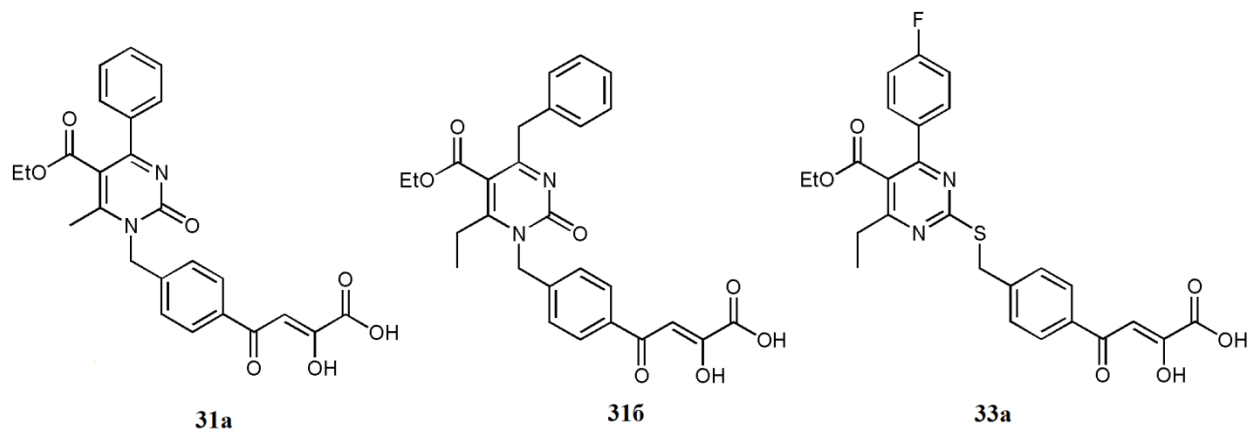


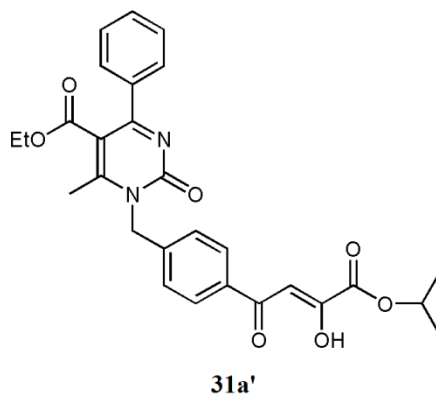
Схема 13. Опита процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **31** и **33**. Услови реакције: **A** 1M LiOH, THF, собна температура.

Двадесет ДКК синтетисаних Биђинелијевом реакцијом даље је упућено на *in vitro* биолошка испитивања способности да инхибирају HIV-1 интегразу. Резултати су показали да једињења показују IC₅₀ вредности у ниском наномоларном опсегу. Најактивнија једињења била су **31a**, **31b** и **33a** (Слика 8), која су показала да поседују наномоларну инхибиторску активности "strand transfer" (ST) HIV-1 интегразе.⁴⁷



Слика 8. Структуре једињења **31a**, **31b** и **33a**

Интересантно је да ниједна ДКК није показала значајну анти-HIV активност у ћелијама, стога су синтетисани естри (њихови пролекови), што је довело до открића пролека **31a'** (Слика 9) за којег се показало да поседује анти-HIV активност од 0,19 μ M у примарним хуманим лимфоцитима са благом цитотоксичношћу.⁴⁷



Слика 9. Структура једињења **31a'**

Знајући да су бифункционални деривати хинолинонил-ДКК први пут описани као неселективни инхибитори ХИВ-1 интегразе, док је за њихове аминок-супституисане деривате откривено да делују као инхибитори ST, и за које је доказано да поседују

инхибиторску активност RNase H, L. Pescatori и сарадници⁴⁸ синтетисали су нову серију деривата хинолинон-ДКК **35** хидролизом одговарајућих ацилпирувата **34** поступком описаним на Схеми 14.

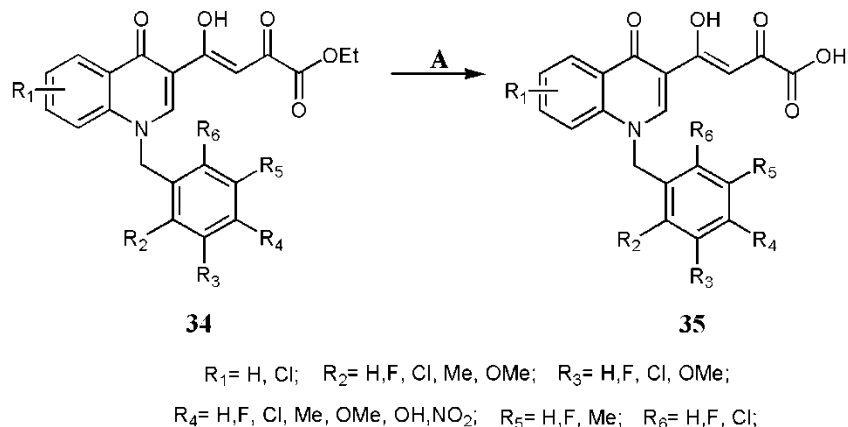
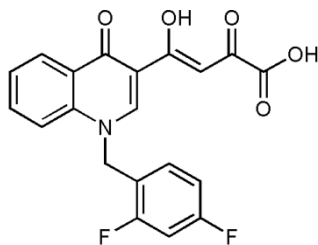


Схема 14. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **35**. Реакциони услови: *A* 1M NaOH, THF/MeOH, собна температура.

Ова једињења су тестирана на одговарајућим ћелијским линијама као анти-HIV-1 агенси, селективно циљајући ST корак интеграције. *In vitro* тест је показао да најбољу активност поседује једињење **35a** (Слика 10) са IC₅₀ вредношћу од 10 nM. Такође, ова једињења су показала значајну инхибицију репликације HIV-1 у акутно инфицираним ћелијама.⁴⁸

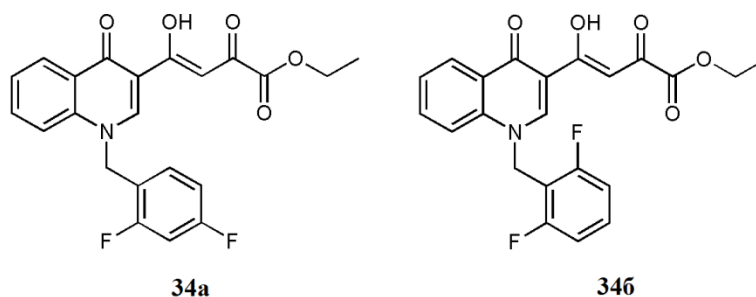


35a

Слика 10. Структура једињења **35a**

Резултати студије су показали да је активност ових молекула на ћелијама била нижа у поређењу са анти-HIV-1 активношћу, што указује на то да су ови киселински деривати мање склони пенетрацији кроз ћелијску мембрану. На крају, студија је показала

да су најактивнија једињења против HIV-инфицираних ћелија заправо синтетисани естарски деривати **34a** и **34b** (Слика 11).⁴⁸



Слика 11. Структуре једињења **34a** и **34b**

G. C. Crucitti⁴⁹ и сарадници синтетисали су серију пиридил-ДКК деривата (**37**, **39**) полазећи од различитих ацилпирувата (**36**, **38**), поступком описаним на Схеми 15.

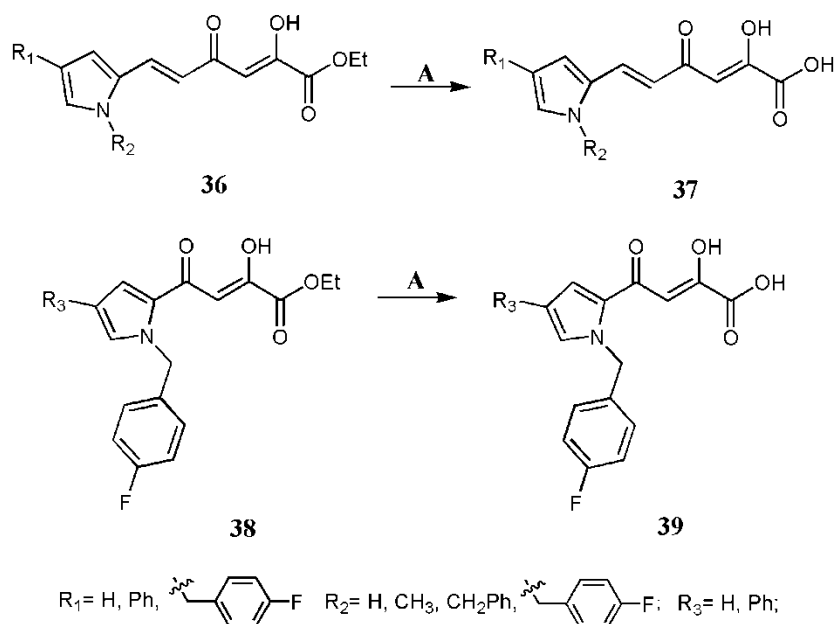
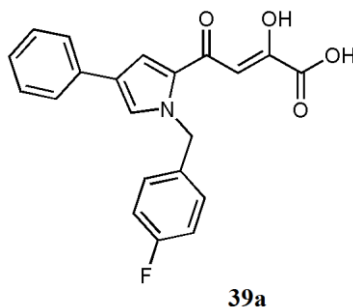


Схема 15. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **37** и **39**. Реакциони услови: *A* 1M NaOH, THF/MeOH, собна температура.

Истраживање је открило да су једињења **37** и **39** показала добру инхибиторску активност HIV-1 интегразе и умерену инхибицију RNase H функције РТ, потврђујући да имају могућност да постану двоструки инхибитори HIV-1 IN/RNase H. Ова истраживања пружају нове податке за даљи напредак у потрази за двоструко ефикаснијим инхибиторима HIV-1.

Резултати биолошких испитивања показали су да седам једињења поседује суб-микромоларну активност са IC_{50} вредности у опсегу од 66 до 19 нМ, док је за два једињења из ове серије утврђено да су скоро неактивна са IC_{50} вредностима 111 и 26 μ М. Најбољу активност је показало једињење **39а** (Слика 12) са IC_{50} вредношћу од 19 нМ.⁴⁹



Слика 12. Структура једињења **39a**

Поред многих истраживања која су показала потенцијалну употребу ДКК у антиретровирусној терапији, постоје одређена сазнања о њиховом антивирусном потенцијалу против вируса хепатитиса Ц. Са том намером, група научника је употребила серију ацилпирувата са различитим арил/хетероарил супституентима да би развили инхибиторе неструктурног протеина 5Б (NS5B - Nonstructural protein 5B) полимеразе вируса хепатитиса Ц.⁵⁰ Знајући да је неструктурни протеин 5Б полимеразе вируса хепатитиса Ц кључна мета за развој лекова, они су синтетисали серију ДКК **41** хидролизом одговарајућих ацилпирувата **40** по процедури описаној на Схеми 16.

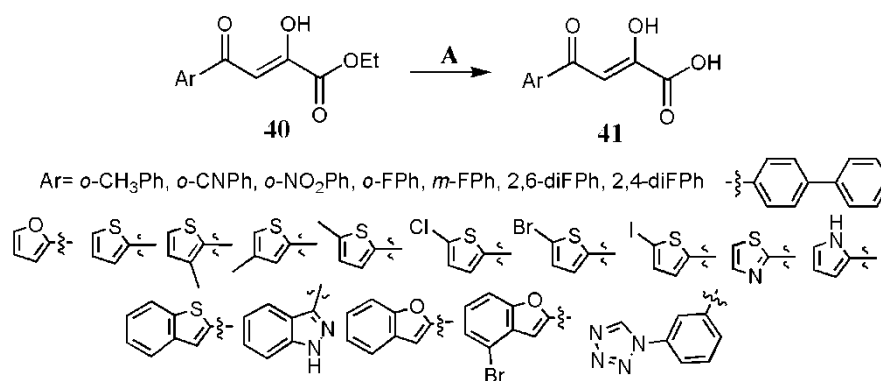
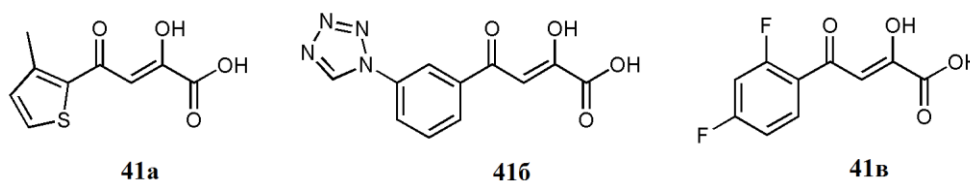


Схема 16. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **41**. Реакциони услови: **A** 1M NaOH, THF/MeOH, собна температура.

Резултати испитивања зависности биолошке активности од структуре једињења довели су открића једињења **41a** (Слика 13) са 3-метилтиофен-2-ил остатком и IC_{50} од 7,5 μ M. Ова испитивања су такође показала да је замена тиофенског прстена фенил прстеном додатно побољшала инхибиторску активност, као што је случај код једињења **41b** и **41v** (Слика 13) са IC_{50} вредностима од 5,2, односно 2,4 μ M. Да сумирамо, ДКК са 2,4-дифлуорофенилним прстеном (једињење **41v**) се показала као најснажнији инхибитор NS5B полимеразе.⁵⁰



Слика 13. Структуре једињења **41a**, **41b** и **41v**

Постоје докази да ДКК добијене синтезом из одговарајућих ацилпирувата поседују добре антибактеријске и антифунгалне активности. На пример А. М. Kashid и сарадници⁵¹ су синтетисали различито супституисане бензилиндол-ДКК **43** хидролизом одговарајућих ацилпирувата **42** као што је описано на Схеми 17.

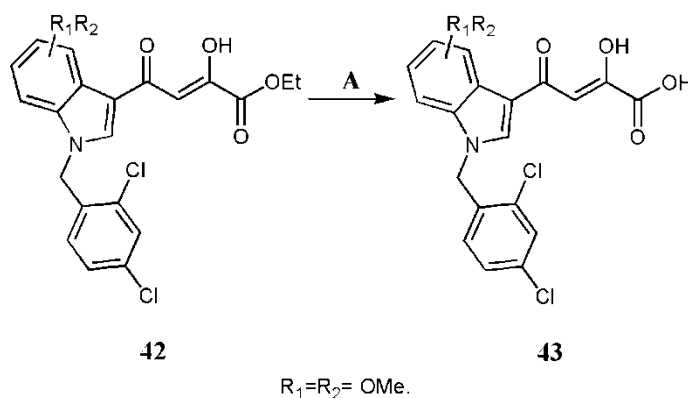
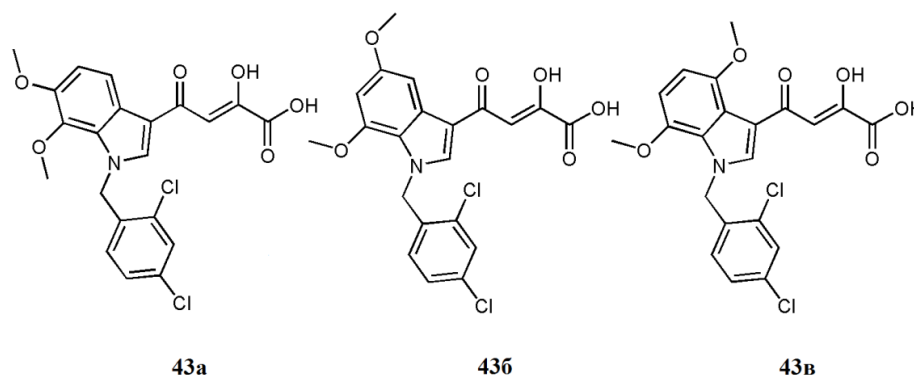


Схема 17. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **43**. Реакциони услови: А 2M NaOH, MeOH, собна температура.

Резултати биолошких испитивања су показали да ДКК **43a** и **43v** (Слика 14) поседују одличну активност на сојевима *Aspergillus niger* и *Penicillium notatum*, док је за остале ДКК установљено да поседују активност упоредиву са кетоконазолом. За ДКК **43b** (Слика 14) установљено је да поседује одличну активност у поређењу са кетоконазолом на

сојевима *Candida albicans* и *Penicillium notatum*, и да показује добру антибактеријску активност у поређењу са ципрофлоксацином на соју *Bacillus subtilis*.



Слика 14. Структуре једињења **43a**, **43b** и **43c**

Још једна студија је потврдила да се неке дикето киселине могу користити као антибактеријска средства. У тој студији, М. М. Masood и сарадници⁵² синтетисали су серију ДКК **45** хидролизом одговарајућих ацилпирувата **44** по процедури описаној на Схеми 18.

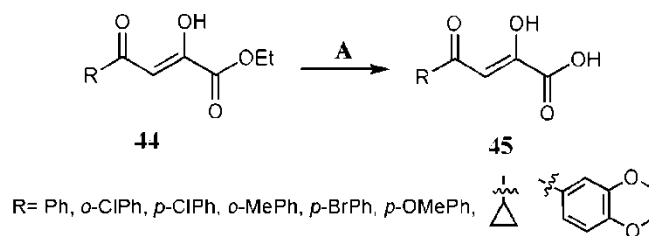
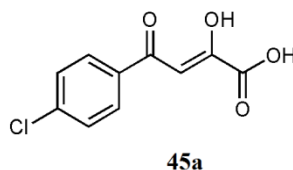


Схема 18. Општа процедура за синтезу 2,4-дикето киселина **45**. Реакциони услови: А 2М LiOH, THF/MeOH, собна температура.

Резултати испитивања антибактеријске активности показали су да сва испитивана једињења имају добар антибактеријски ефекат на сојевима бактерија *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Међу њима, једињење **45a** (Слика 15) показало је најбољу активност, инхибирајући сој *Escherichia coli* са МИС вредношћу од 9,9 µg/ml.



Слика 15. Структура једињења **45a**

1.3.2. Синтеза деривата пиразола

Пиразол је петочлани хетероциклически са молекулском формулом $C_3H_4N_2$, који садржи три атома угљеника и два атома азота у суседним положајима. Лекови на бази пиразола класификовани су као алкалоиди због састава и јединствених фармаколошких ефеката на људе.

Међутим, бројне студије су показале да пиразоли поседују већи број различитих биолошких активности као што су антимикуробна, антиинфламаторна, антиконвулзивна, антиканцерогена, антивирусна, неуропротективна и многе друге.⁵³ Први природни производ на бази пиразола, 1-пиразолил-аланин, изолован је 1959. године из семена лубенице.^{54,55} Имајући у виду да је циклокондензација 1,3-дикарбонилних једињења са дериватима хидразина једноставан и брз приступ за добијање полисупституисаних пиразола⁵⁶, ацилпирувати имају значајну улогу у синтези ових деривата.

Неке студије су показале да су молекули као што су ацилпирувати нашли примену у синтези неких антимикуробних лекова на бази пиразола. Са том наменом А. Radwan и сарадници⁵⁷ су синтетисали серију деривата пиразола **47** региоселективном циклизацијом арилхидразина са различито супституисаним ацилпируватима **46** као прекурсорима, по процедури описаној на Схеми 19.

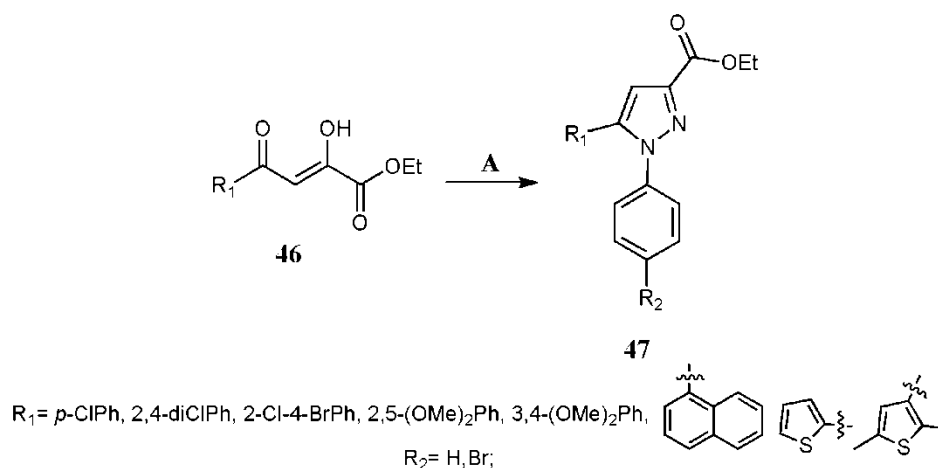
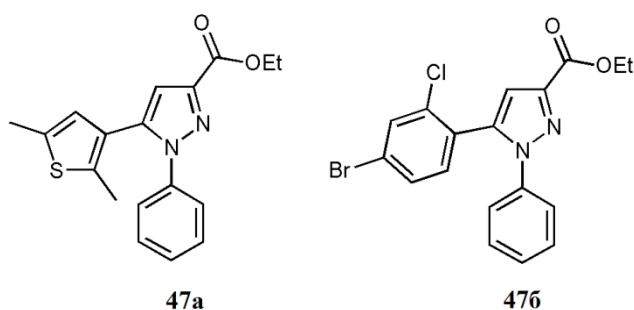


Схема 19. Опита процедура за синтезу деривата пиразола **47**. Реакциони услови: **A** арилхидразин, EtOH, рефлукс.

Тестирана је антимикуробна активност неких деривата пиразола на грам-позитивним сојевима бактерија (*Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*), грам-негативним сојевима бактерија (*Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) и сојевима гљивица (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* и *Candida tropicalis*). Резултати су показали да је етил-5-(2,5-диметилтиофен-3-ил)-1-фенил-1*H*-пиразол-3-карбоксилат, једињење **47a** (Слика 16), са $MIC_{E. coli} = 0,038 \mu M$ и $MIC_{P. aerug.} = 0,067 \mu M$ показало скоро једнаку активност као и ампицилин ($MIC = 0,033$ и $0,067 \mu M$). Са друге стране, етил-5-(4-бром-2-хлорфенил)-1-фенил-1*H*-пиразол-3-карбоксилат, једињење **47b** (Слика 16), ($MIC = 0,015 \mu M$) се показало као ефикасније од флуконазола ($0,020 \mu M$) на соју гљивица *Candida parapsilosis*.⁵⁷



Слика 16. Структуре једињења **47a** и **47b**

Такође, неке студије су показале да једињења која садрже пиразолов прстен као што су 4-фенилазо-1*H*-пиразол деривати показују добру антибактеријску активност. Серија 4-фенилазо-1*H*-пиразолових деривата **49** синтетисана је користећи С-3 супституисане ацилпирувате **48** као прекурсоре по процедури приказаној на Схеми 20.⁵⁸

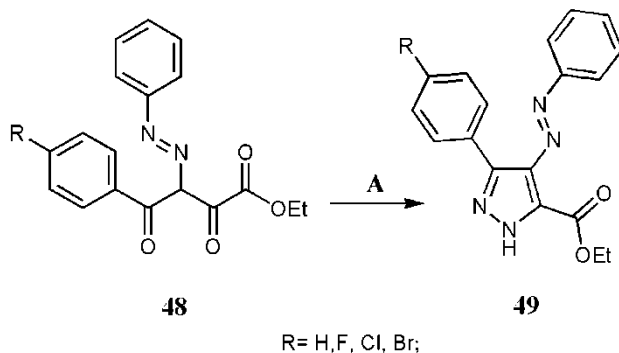
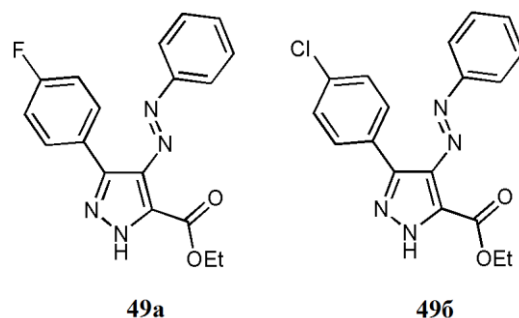


Схема 20. Опита процедура за синтезу деривата 4-фенилазо-1*H*-пиразола **49**. Реакциони услови: *A* хидразин хидрат, $AcOH$, H_2O , собна температура.

Резултати биолошких испитивања показали су да једињења **49a** и **49b** (Слика 17) поседују најбољу активност на соју бактерија *Staphylococcus aureus*, чак бољу од контроле (ампицилин). За једињење **49b** показано је да има једнаке МИС и МВС вредности од 125 µg/ml, али је мање активно од ампицилина. Ниједно од синтетисаних једињења није показало активност на соју бактерија *Escherichia coli*.⁵⁸



Слика 17. Структуре једињења **49a** и **49b**

L.-W. Chen и сарадници⁵⁹ су синтетисали серију деривата метронидазол-пиразола **53** користећи ацилпирувате **50** као прекурсоре (Схема 21), да би испитали биолошки потенцијал синтетисаних молекула. Као што се може видети на Схеми 21, у реакцији ацилпирувата **50** са фенилхидразином добијени су интермедијери **51** који су затим хидролизоване да би се добила интермедијерна једињења **52** која садрже карбоксилну групу. На крају, одговарајући метронидазолни деривати пиразола **53** добијени су у реакцији интермедијера **52** са метронидазолом.

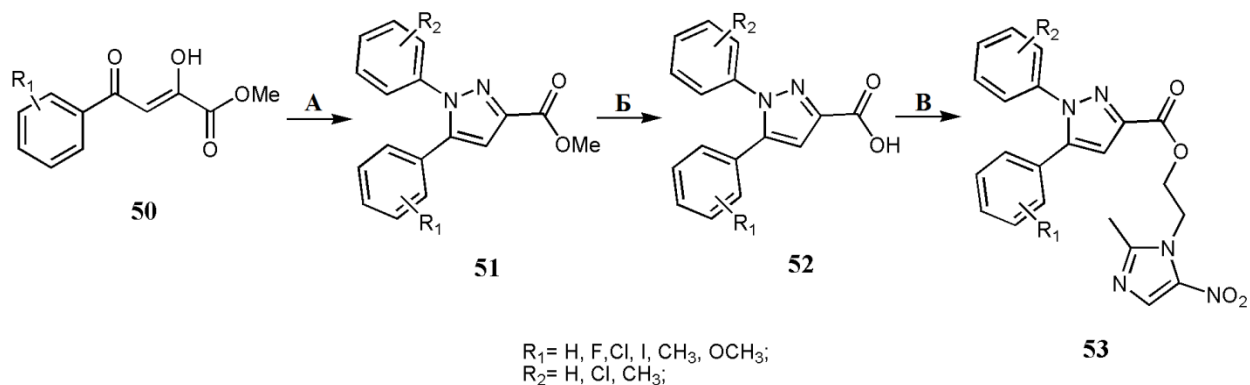
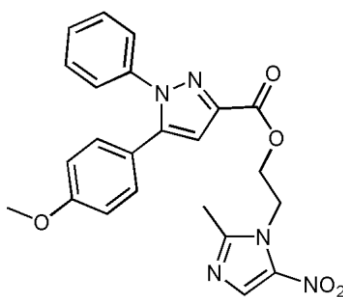


Схема 21. Опишта процедура за синтезу деривата метронидазол-пиразола **53**. Услови реакције: **A** фенилхидразин, HCl, MeOH; **B** KOH, H₂O, MeOH, рефлукс; **B** 1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид, хидроксibenзотриазол, диметил-аминопиридин, CH₂Cl₂, 45°C.

Студија је показала да су једињена пиразола са метронидазолским фрагментом идентификовани као инхибитори тирозил-tPHK синтетазе (TyrRS - Tyrosyl-tRNA synthetase) са ниском цитотоксичношћу, и да поседују значајну антибактеријску активност посебно на грам-негативним сојевима организама. Истражујући антимикуробну и TyrRS инхибиторску активност, аутори су дошли до открића једињења **53a** из ове групе молекула (Слика 18) које поседује најснажнију инхибиторску активност нарочито на грам-негативним сојевима бактеријама као што су *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (са MIC од 1,96 и 0,98 $\mu\text{g/ml}$) и TyrRS инхибиторску активност са $\text{IC}_{50} = 0,92 \mu\text{M}$.⁵⁹

**53a****Слика 18.** Структура једињења **53a**

Осим тога, тест цитотоксичности на хуманим епителним ћелијама показао је да су ова једињења нетоксична на здравим ћелијама. Даљи експерименти механизма деловања, укључујући апоптозу и поремећај мембранског потенцијала, показали су да пиразол **53a** има проапоптотичке ефекте, што очигледно указује да има велики потенцијал да постане нови антибактеријски агенс.⁵⁹

Још једна студија је доказала добар потенцијал пиразолових једињења **55**, добијених из ацилпирувата **54** по процедури описаној на Схеми 22, за антифунгалну употребу.⁶⁰

Међу њима, једињење **55a** (Слика 19) показало је најбољу активност, упоредиву са оном код неких комерцијалних фунгицида као што су тебуконазол, пираклостробин и карбендазим. Примећено је да је при нижим концентрацијама од 0,1 и 1 $\mu\text{g/ml}$ једињења **55a** инхибиторска активност била мања од 50% на свим сојевима гљивица осим на

Fusarium graminearum која је била најосетљивија са приближно 60% инхибиције када је третирана са 0,1 $\mu\text{g/ml}$ једињења **55a** са ($\text{IC}_{50} = 0,08 \mu\text{g/ml}$). Интересантно је да је раст свих патогена осим *Phytophthora sp.*, који је био најмање осетљив (95% инхибиција), при највећој тестираној концентрацији једињења **55a** од 100 $\mu\text{g/ml}$ био потпуно инхибиран ($\text{IC}_{50} = 7,89 \mu\text{g/ml}$).

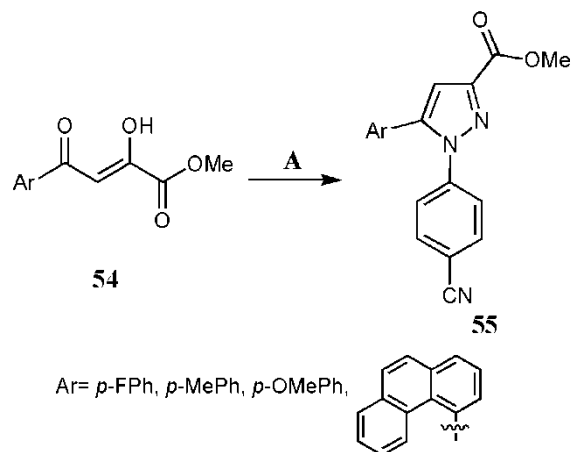
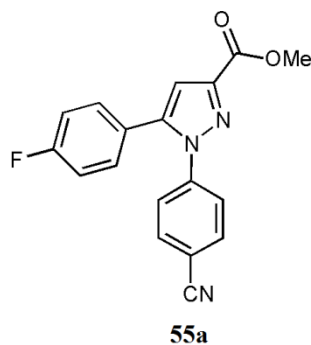


Схема 22. Општа процедура за синтезу деривата пиразола **55**. Услови реакције: 4-цијанофенилхидразин хидрохлорид, MeOH, рефлукс.



Слика 19. Структура једињења **55a**

Неколико скорашњих студија потврдило је да неки деривати пиразола добијени из ацилпирувата имају велики потенцијал за примену у терапији за лечење тумора. А. Камал и сарадници⁶¹ синтетисали су серију коњугата пиразола-оксидазола **59** (Схема 23) и испитивали њихове способности да делују као антипролиферативни агенси на различитим ћелијским линијама карцинома код људи. Као што се може видети са Схеме 23, интермедијери пиразол-5-карбоксилати **57** су добијени циклизацијом ацилпирувата **56** са хидразин дихидрохлоридом која је праћена дехидратацијом, док су у другом кораку

карбоксилати у реакцији са хидразин хидратом дали кључне интермедијере пиразол-5-карбохидраиде **58**. На крају, синтеза пиразол-оксадиазол коњугата **59** остварена је у реакцији интермедијера **58** и 3,4,5-триметоксициметне киселине у присуству $POCl_3$ (Схема 23).

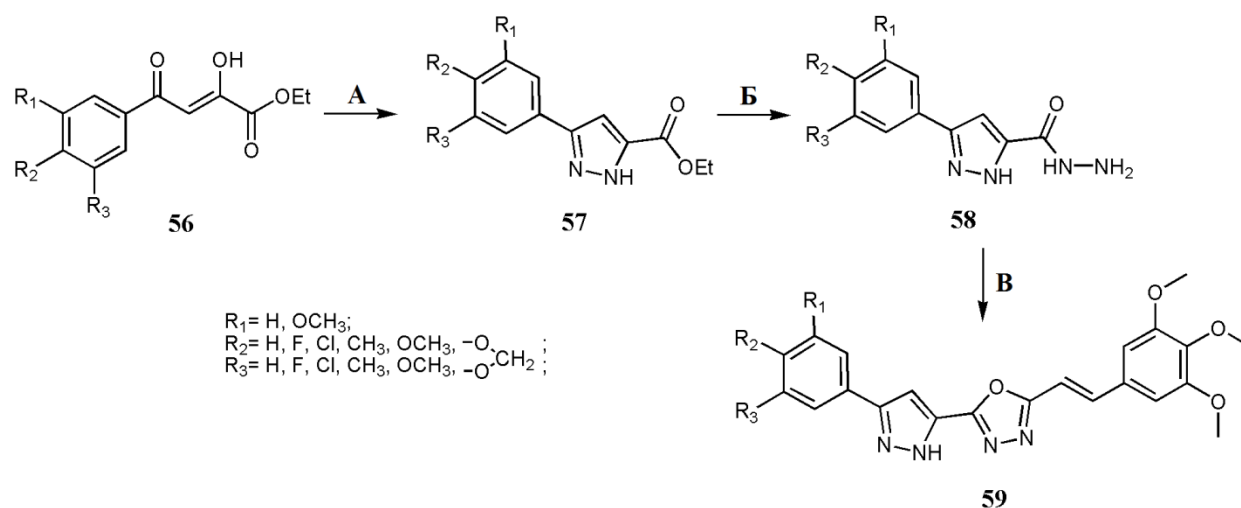
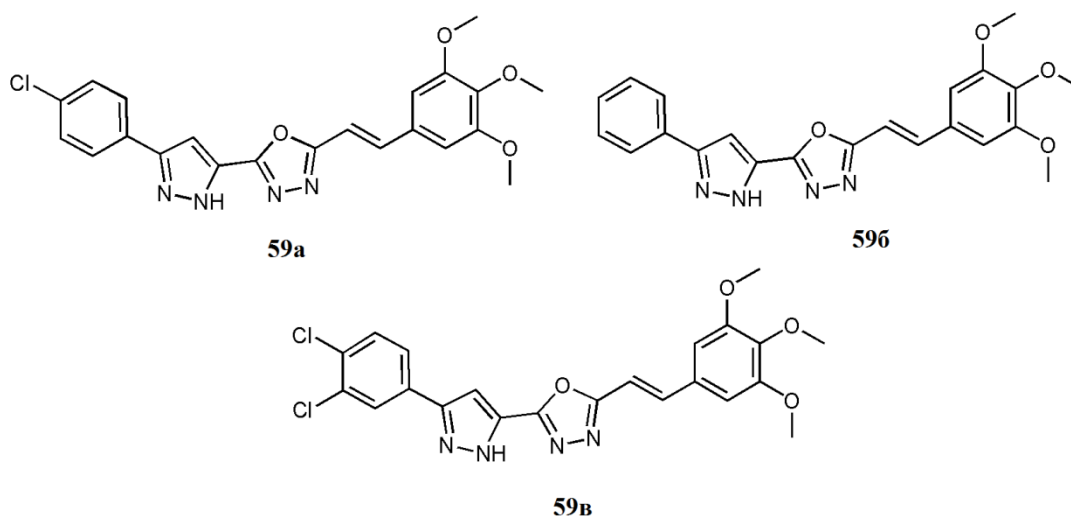


Схема 23. Општа процедура за синтезу пиразол-оксадиазол коњугата **59**. Реакциони услови: **A** хидразин дихидрохлорид/ $EtOH$, рефлукс; **B** $N_2H_4 \cdot H_2O$ –етанол, рефлукс, 3–4 h; **B** 3,4,5-триметоксициметна киселина, $POCl_3$, $110^\circ C$.

Међу испитиваним једињењима, једињења **59a**, **59b** и **59v** (Слика 20) показала су снажну цитотоксичност, инхибирајући полимеризацију тубулина са IC_{50} вредностима од 1,3 μM , односно 3,9 μM и 2,4 μM . На основу резултата истраживачи су закључили да је присуство монохлор или дихлор групе на фенил прстену било неопходно за високу активност ових једињења. Поред тога, примећено је да једињења **59a**, **59b** и **59v** изазивају акумулацију ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса, активацију протеина циклина-Б1 и да спречавају раздвајање хромозома. Поред тога ембриони зебрице третирани једињењем **59a** показују озбиљне развојне дефекте.⁶¹



Слика 20. Структуре једињења 59a, 59b и 59c

Са истом намером, Ј. В. Shi и сарадници⁶² су синтетисали серију нових деривата пиразол-5-карбоксамида по процедури описаној на Схеми 24, користећи етил-2-хидрокси-4-оксо-хепт-2-еноат **60** као прекурсор.

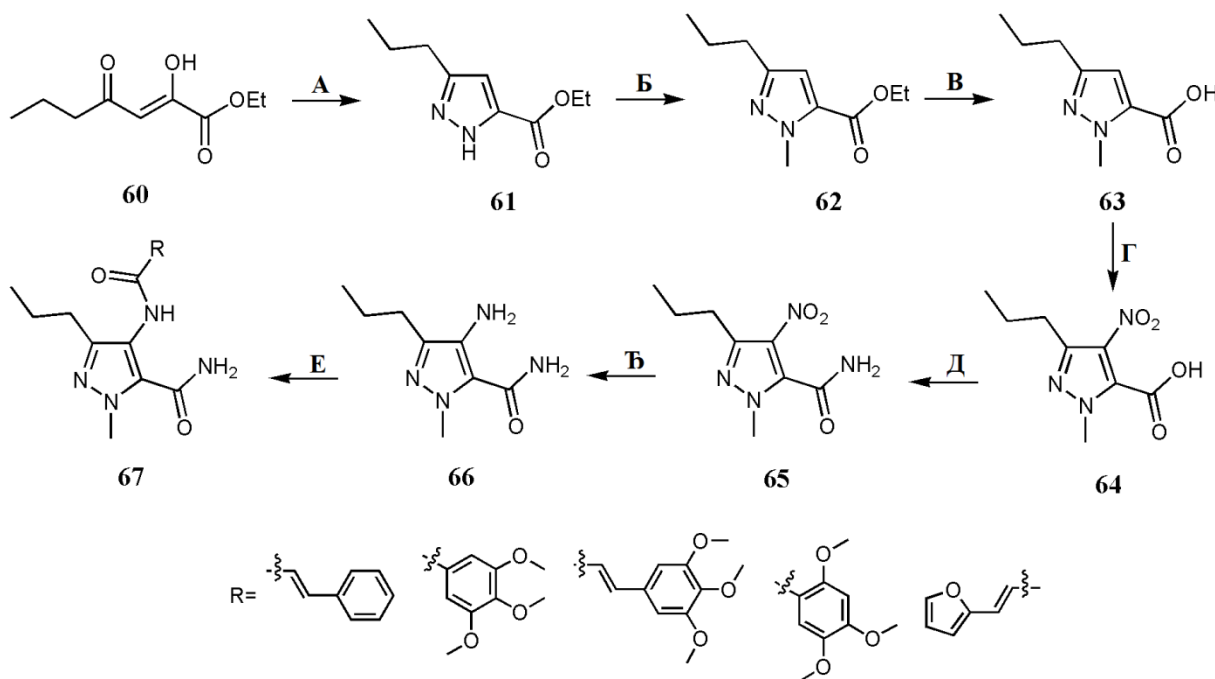
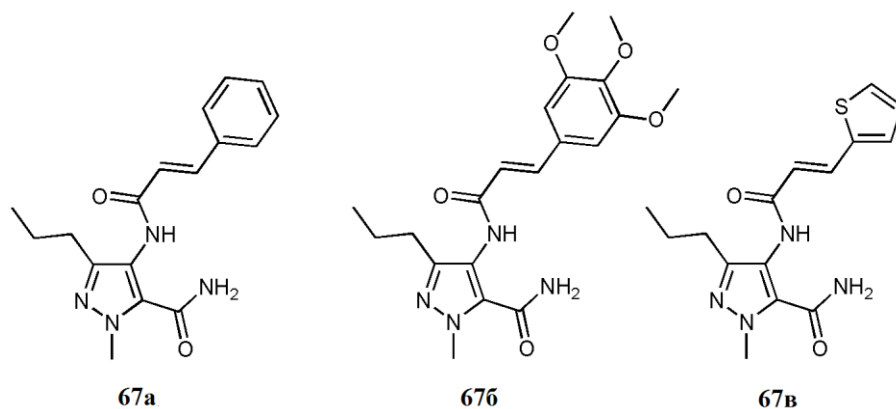


Схема 24. Општа процедура за синтезу деривата пиразол-5-карбоксамида **67**. Реакциони услови: **A** хидразин хидрат, 60-65°C; **B** диметил-сулфат, 80°C; **C** 6M NaOH, 80°C; **D** HNO₃/H₂SO₄, 60°C; **E** SOCl₂, CHCl₃, DMF, рефлукс; **F** NH₃·H₂O, 0°C; **G** калај-дихлорид дихидрат, EtOH, рефлукс; **H** супституисана карбоксилна киселина, (COCl)₂, CH₂Cl₂, DMF, 25°C.

Као што се може видети са Схеме 24, сви пиразол-5-карбоксамиди **67** су синтетисани реакцијом ациловања кључног интермедијера **66**, који је синтетисан из ацилпирувата **60** преко серије хемијских трансформација (циклизација, метиловање, хидролиза, нитровање, амидовање, редукција).

Пиразол-5-карбоксамиди **67** су добијени у реакцији између ацил-хлорида и једињења **66** по процедури описаној на Схеми 24. Код свих једињења је испитивана *in vitro* антипролиферативна активност на ћелијским линијама хуманог карцинома желуца (ћелијске линије MGC-803 и SGC-7901) и рака дојке (Vcap-37). Истраживање је открило да су једињења **67a**, **67b** и **67v** (Слика 21) показала добру инхибиторску активност на ћелијским линијама тумора MGC-803. Међу њима, једињење **67v** је показало најјачу инхибиторску активност на MGC-803 ћелијама тумора и показало је најјачу инхибиторску активност теломеразе са IC₅₀ од 1,02 μM.⁶²



Слика 21. Структуре једињења **67a**, **67b** и **67v**

Са сличним намерама, Х.-У. Лу и сардници⁶³ синтетисали су серију деривата кумарин-сулфонамида који у молекулу садрже пиразолов прстен **71** (Схема 25). Као што је описано на Схеми 25, први интермедијери **69** су синтетисани у реакцији различитих ацилпирувата **68** са 4-хидразинил-бензенсулфонамидом, док су у другом кораку реакције из хидразин монохидрата и једињења **69** добијени кључни интермедијери **70**. Коначно, једињења **71** су добијена реакцијом интермедијера **70** са 4-хлоро-кумарин-3-алдехидом. Имајући у виду да је циклооксигеназа-2 (COX-2) често повишена код малигних тумора и да њен производ, природни простагландин E2, доводи до напредовања и метастазирања

ћелија рака, аутори су тестирали серију деривата кумарин-сулфонамида као инхибитора COX-2.

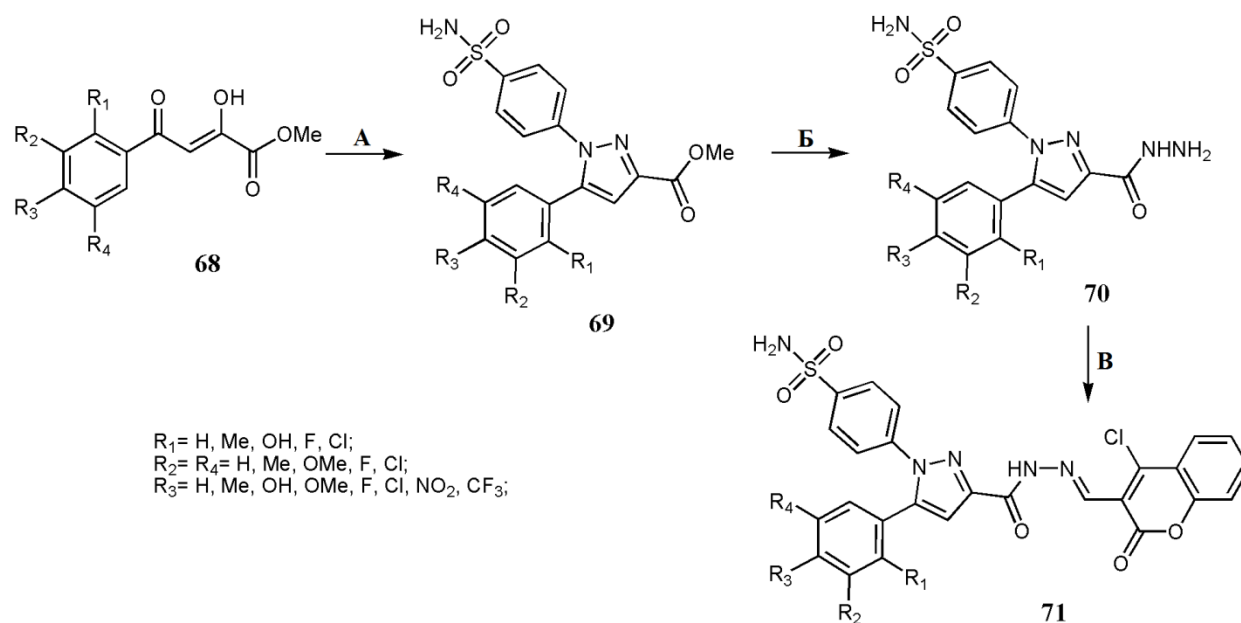
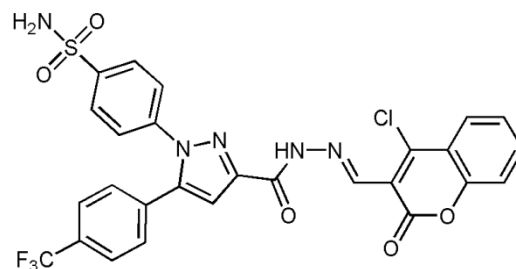


Схема 25. Општа процедура за синтезу деривата кумарин-сулфонамида који садрже пиразолов прстен **71**. Реакциони услови: **A** 4-хидразинил-бензенсулфонамид, MeOH, рефлукс; **B** хидразин хидрат, EtOH, рефлукс; **B** 4-хлоро-кумарин-3-алдехид, POCl₃, DMF, 0-60°C.

Сва једињења су испитивана на *in vitro* антипролиферативну активност на четири ћелијске линије тумора (хумани карцином грлића материце (HeLa), хумани карцином јетре (HepG2), тумора коже (F10), карцинома плућа (A549)) и две нормалне ћелијске линије (хумана епителна ћелијска линија бубрега (293T), ћелијска линија јетре (L02)) са позитивним контролом целекоксибом. Студија је показала да већина тестираних једињења снажно инхибира пролиферацију HeLa и HepG2 ћелија са IC₅₀ вредностима од 0,36 до 16,19 μM за HeLa ћелије, и од 0,85 до 21,19 μM за HepG2 ћелије. Од свих, једињење **71a** (Слика 22) је показало најјачу антитуморску активност на HeLa ћелијама са IC₅₀ од 0,36 μM, чак и бољу у поређењу са позитивном контролом целекоксибом (IC₅₀ = 7,79 μM). Поред тога, примећено је да **71a** поседује слабу токсичност на 293T и L02 ћелијама са IC₅₀ од 234,46 μM, односно 267,28 μM.



71a

Слика 22. Структура једињења 71a

Слично претходној студији, S.-Z. Ren и сарадници⁶⁴ синтетисали су серију деривата диарил-пиразола (Схема 26) како би испитали њихов инхибиторски потенцијал на COX-2. Серије деривата диарилпиразола синтетисане су у три реакциона корака по процедури описаној на Схеми 26. У првом кораку, интермедијер **73** је добијен у реакцији ацилпирувата **72** са супституисаним фенилхидразинима. Затим је извршена редукција метил-естара **73** литијум-алуминијумхидридом до одговарајућих алкохола **74**. Коначно, кондензационом реакцијом естерификације 2-((5-хидрокси-4-оксо-2-фенил-4Н-хромен-7-ил)окси)сирћетне киселине са одговарајућим једињењем **74** у присуству етил-карбодиимид хидрохлорида, 4-миметиламинопиридина и триетиламина добијају се коначни производи **75**.

Испитивајући биолошку активност ових молекула аутори су открили да се антипролиферативне активности добро поклапају са њиховим COX-2 инхибиторским активностима. Осим тога, дошли су до закључка да присуство електрон-донорских група у пара- положају фенил прстена утичу на побољшање антитуморских активности ових једињења. Већина испитиваних једињења показала је одличне инхибиторске ефекте, посебно на HeLa ћелијама. Најјачи инхибиторски ефекат показало је једињење **75a** (Слика 23) на HeLa туморским ћелијама са IC₅₀ од 1,12 μM, много боље од контрола целекоксиба и крисина. Даља истраживања механизма деловања показала су да је једињење **75a** индуковало апоптозу HeLa ћелија путем митохондријске деполаризације заустављајући ћелијски циклус у G1 фази. Добијени резултати сугеришу да је једињење **75a** обећавајући агенс за будућу примену у лечењу неких тумора.⁶⁴

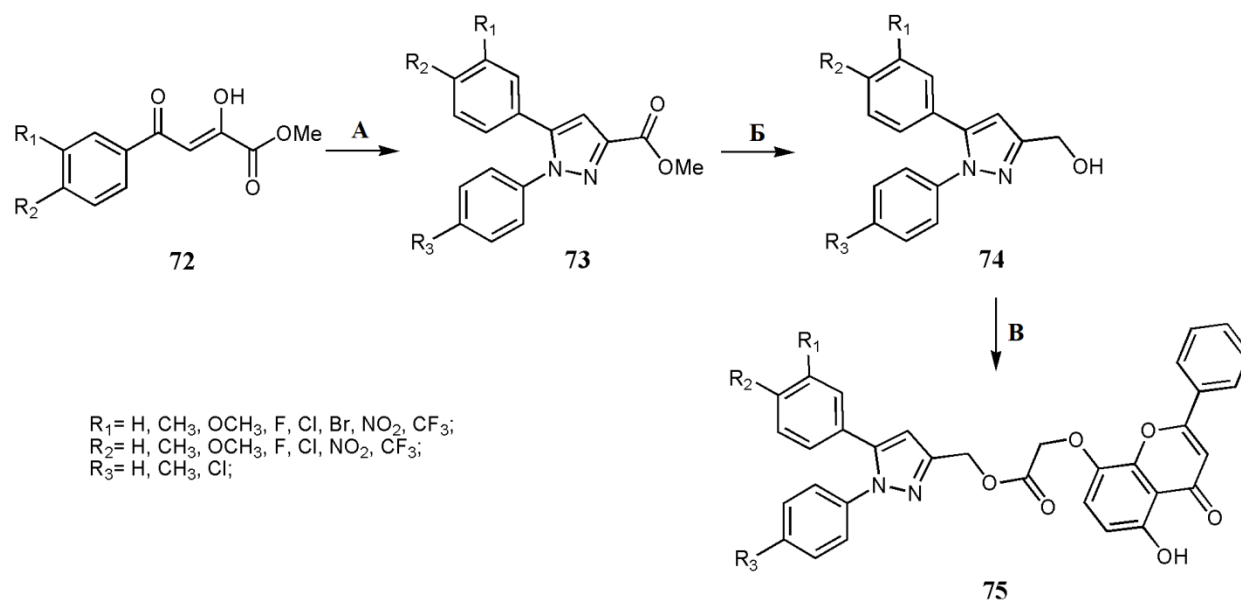
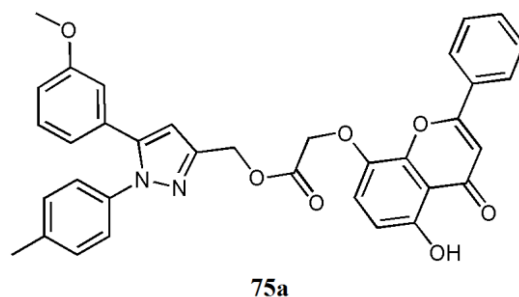
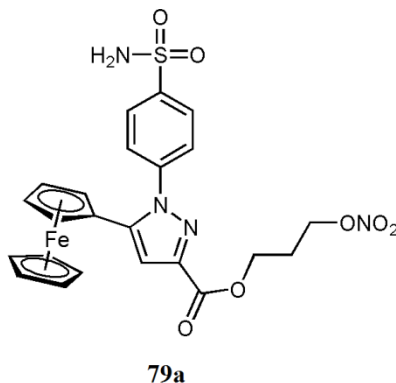


Схема 26. Општа процедура за синтезу деривата диарилпиразола **75**. Услови реакције: **A** фенолхидразин хидрохлорид, MeOH , рефлукс; **B** LiAlH_4 , THF , $0-45^\circ\text{C}$; **B** етилкарбодимид хидрохлорид, 4-диметиламинопиридин, триетиламин, CH_2Cl_2 , собна температура.



Слика 23. Структура једињења **75a**

Такође неки деривати фероценил-пиразола који садрже азот-донорске групе показали су веома добар инхибиторски потенцијал COX-2 .⁶⁶ Као што је приказано на Схеми 27, у реакцији деривата фероцена **76** са 4-сулфонамид-фенилхидразин хидрохлоридом добијени су интермедијери **77** у првом реакционом кораку. Метил-естар **77** је потом хидролизован калијум-хидроксидом у одговарајућу пиразолсулфонамид карбоксилну киселину **78**, која у присуству етилкарбодимид хидрохлорида, 4-диметиламинопиридина и триетиламина даје циљане деривате фероценил-пиразола **79**.



Слика 24. Структура једињења 79a

Х.-У. Лу и сарадници⁶⁶ синтетисали су серију различито супституисаних бензенсулфонамид-1,5-диарилпиразолских деривата **83** који садрже фенилацетохидразид, по процедури описаној на Схеми 28.

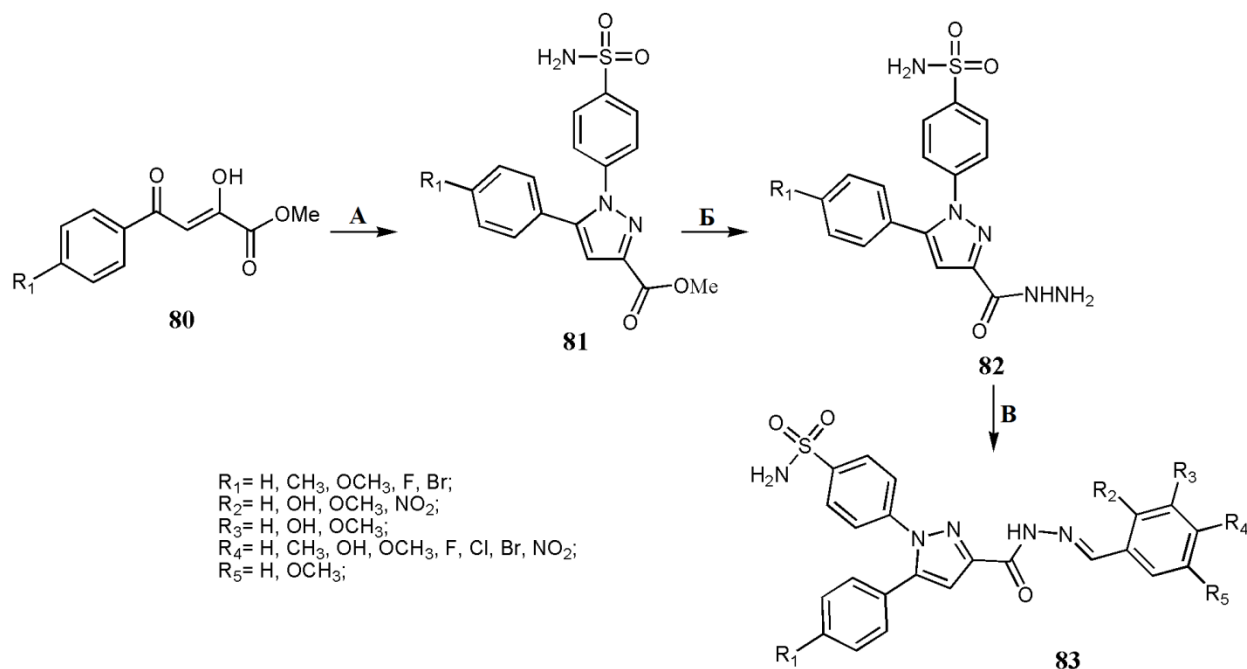
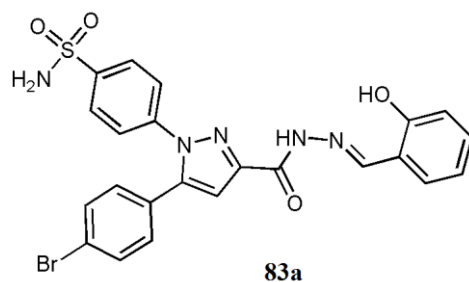


Схема 28. Општа процедура за синтезу супституисаних бензенсулфонамид-1,5-диарилпиразола **83**. Реакциони услови: **A** 4-хидразинилбензенсулфонамид, МеОН, рефлукс; **B** хидразин хидрат, ЕтОН, рефлукс; **B** бензалдехид, ЕтОН, АсОН, собна температура.

У првом кораку, у реакцији циклизације различитих ацилпирувата **80** са 4-хидразинилбензенсулфонамидом добијени су бензенсулфонамид-1,5-диарилпиразоли **81** који садржи 3-карбоксилатни фрагмент. Једињења **81** у даљој реакцији са хидразин

монохидратом дају кључне интермедијере **82**. Циљна једињења **83** добијена су из интермедијера **82** реакцијом са различито супституисаним бензалдехидима. Аутори су синтетисали ове молекуле са циљем да испитају њихов потенцијал као селективних СОХ-2 инхибитора са анти-туморским потенцијалом.

Испитивањем биолошке активности, аутори су открили да ова једињења показују умерене до јаке антипролиферативне активности на ћелијским линијама канцера (HeLa, HepG2, F10 и A549) и прилично добру СОХ-2 инхибиторску активност. Резултати *in vitro* биолошких испитивања открили су да једињење **83a** (Слика 25) поседује прилично добру селективну инхибиторску активност ($IC_{50} = 82,21 \mu\text{M}$ за СОХ-1 и $IC_{50} = 0,37 \mu\text{M}$ за СОХ-2) упоредиву са контролом (целекоксибом) ($40,29 \mu\text{M}$ и $0,15 \mu\text{M}$). Додатно, биолошки тест је показао да једињење **83a** поседује снажну антипролиферативну активност на А549 ћелијама са IC_{50} од $0,78 \mu\text{M}$.⁶⁶



Слика 25. Структура једињења **83a**

Осим ове, још једна студија је показала да неки деривати пиразола, синтетисаних из ацилпирувата, показују двоструку инхибиторску активност. Користећи једињење етил-2-хидрокси-4-фенил-4-оксо-2-бутеноат **84** као полазни реагенс S. Н. Hwang и сарадници⁶⁷ синтетисали су серију пиразола који садрже дисупституисане деривате уреје у свом молекулу, као нове двоструке СОХ-2/sEH (sEH - растворљива епоксидна хидролаза) инхибиторе.

Према Схеми 29, циљана једињења пиразола добијена су из неколико реакционих корака. Прва интермедијерна једињења **85** су припремљена региоселективном циклизацијом 4-метилсулфонилфенилхидразина или 4-амидосулфонилфенилхидразина са етил-2-хидрокси-4-фенил-4-оксо-2-бутеноатом. Ова једињења су у даљој реакцији дала кључне интермедијере **88** низом хемијских трансформација (редукција, стварање азида,

Pd/C катализована хидрогенизација). Коначно, пиразоли **89** који садрже дисупституисану уреу добијени су у реакцији различитих изоцијаната са интермедијерима **88**.

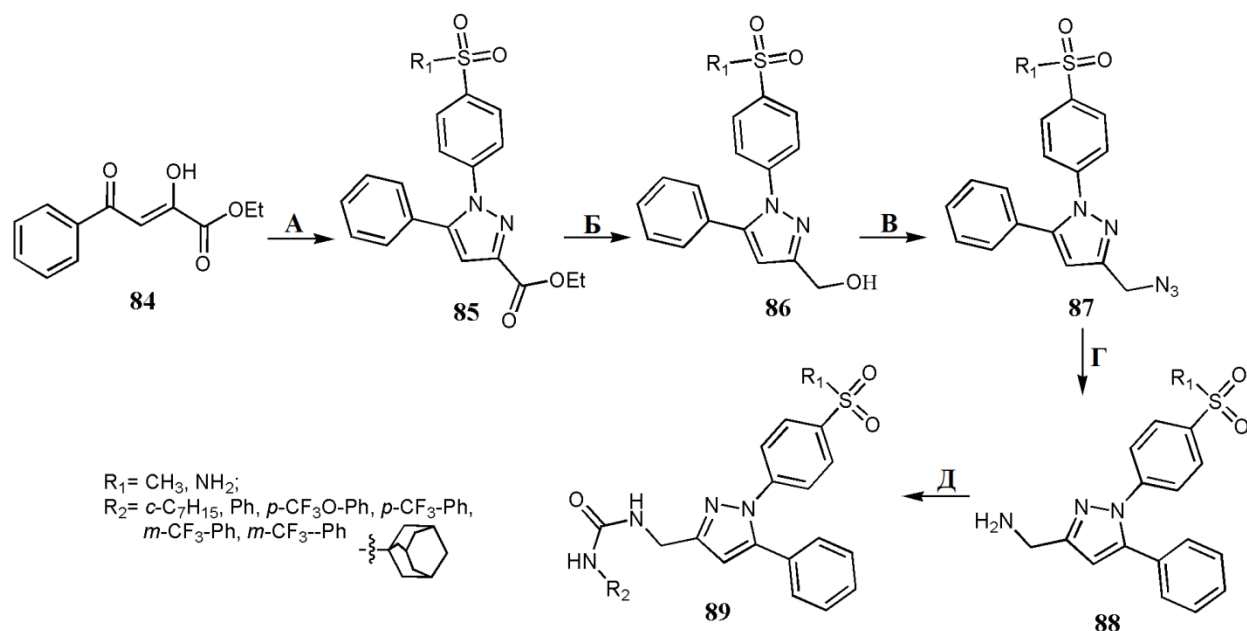
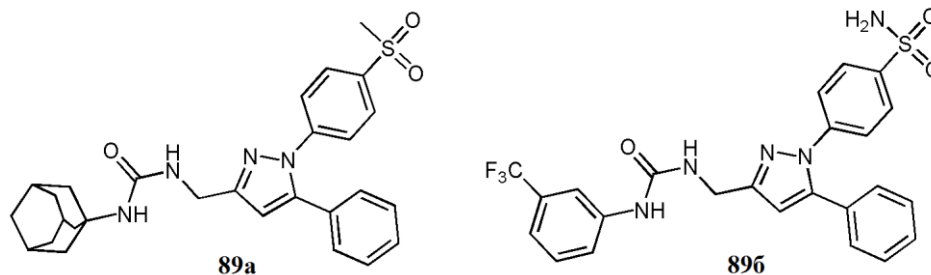


Схема 29. Општа процедура за синтезу пиразола који садрже дисупституисане деривате урее **89**. Реакциони услови: **A** 4-алкилсулфонилфенилхидразин, EtOH, AcOH, рефлукс; **B** LiAlH₄, THF, собна температура; **B** 1. MsCl, Et₃N, 0°C, 2. NaN₃, 1,4-диоксан, вода, 80°C; **Г** Pd/C, H₂, EtOAc; **Д** R₃-NCO, DMF, собна температура.

Испитивања биолошких активности навели су научнике да посебну пажњу посвете једињењу **89a** (Слика 26), јер је раније доказано да метилсулфонска група даје одличну селективност COX-2 у односу на COX-1 као што је случај код лека рофекоксиба. Међутим, таква једноставна веза између ове две познате фармакофоре није била ефикасна због недостатка COX-2 инхибиције и релативно слабе инхибиције sEH. Даља испитивања довела су ауторе до открића једињења **89b** (Слика 26) које се показало као двоструко јачи инхибитор COX-2 од референтног лека рофекоксиба са IC₅₀ од 2 μM, али инхибиторска способност sEH ни код овог једињења није била побољшана.⁶⁷



Слика 26. Структуре једињења 89a и 89b

Поред ових, неке студије су показале да пиразоли поседују и неке друге инхибиторске активности. Тако на пример, Т. Rogez-Florent и сарадници⁶⁸ синтетисали су серију диарилпиразол-бензенсулфонамидних деривата **92** (Схема 30) и испитивали њихову фармаколошку активност као класе инхибитора хумане анхидразе (hCA). Као што је приказано на Схеми 30, етил-естри диарилпиразола **91** су добијени у првом кораку циклизацијом ацилпирувата **90** са 4-аминосулфонилфенилхидразин хидрохлоридом, који су затим трансформисани у циљна једињења **92** редукцијом са LiAlH_4 .

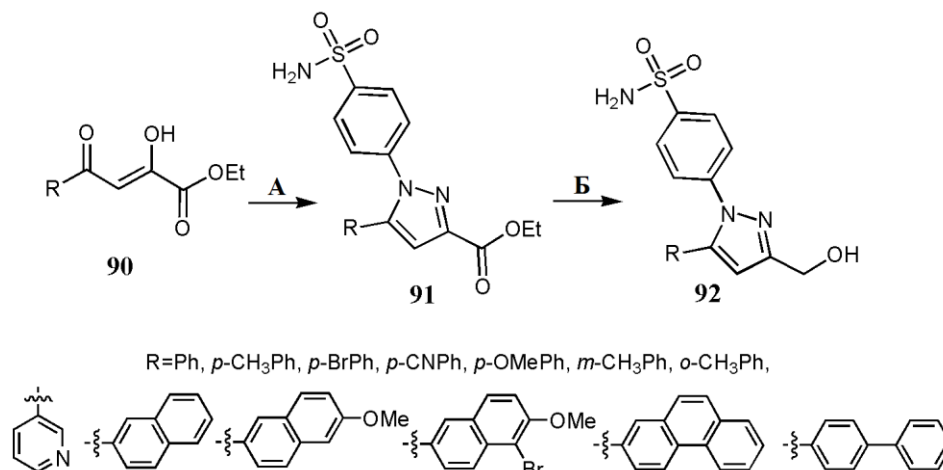
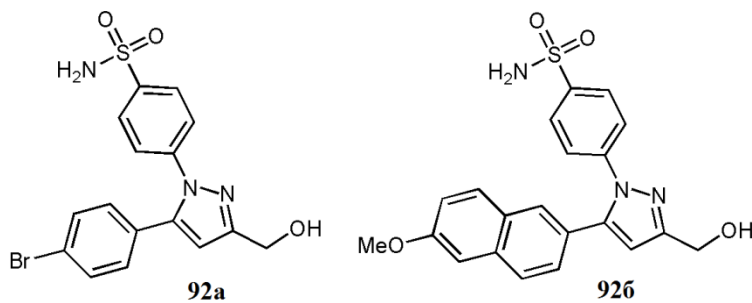


Схема 30. Описа процедура за синтезу деривата диарилпиразол-бензенсулфонамида **92**. Реакциони услови: **A** 4-аминосулфонилфенилхидразин хидрохлорид, EtOH, рефлукс; **B** LiAlH_4 , суви THF, 20°C.

Познато је да се експресија карбонске анхидразе (CA) IX повећава код хипоксије, па је због тога предложена као терапеутска мета јер је повезана са напретком раста тумора и контролом рН. Једињења **92a** и **92b** (Слика 27) су се показала као најмоћнији CA IX инхибитори са K_i вредностима 17, односно 19 nM, и имају добру селективност CA IX у односу на hCA II. Поред тога, *in vitro* је извршен антипролиферативни скрининг на

ћелијама рака дојке (MDA-MB-231) коришћењем доксорубицина као цитотоксичног средства у присуству селектованог СА IX инхибитора. Резултати су показали да је цитотоксична ефикасност доксорубицина у хипоксичном окружењу, изражена у вредности IC_{50} , била увећана за 20% са 1 μ М СА IX инхибитором.



Слика 27. Структуре једињења 92a и 92b

1.3.3. Синтеза једињења која садрже изоксазолов прстен

Изоксазол, изомер оксазола, је петочлани хетероциклически прстен који садржи атоме азота и кисеоника у суседним положајима и сматра се битном фармакофором за откриће многих лекова. Јединствена структура једињења базираним на изоксазолу показују широк спектар потенцијалних примена ових молекула у медицинским, пољопривредним, хемијским и супрамолекулским наукама.⁶⁹ Посебно у медицинској хемији, за једињења на бази изоксазола показано је да се могу лако везати са различитим ензимима у биолошким системима и помоћу тога показати широк спектар биолошких активности као што су антитуморска^{70,71}, антитуберкулозна⁷², антибактеријска^{73,74}, антифунгална⁷⁵, антивирална⁷⁶ и антиинфламаторна⁷⁷. Пошто су једињења која садрже 1,3-дикето фрагмент у свом молекулу главни прекурсорни за добијање изоксазола, ацилпирувати заузимају значајну улогу у синтези ових деривата.

Бројне недавне студије су откриле велики медицински потенцијал изоксазола добијених из ацилпирувата. Пре свега, добијени изоксазоли су тестирани као антиинфламаторни лекови. Имајући у виду да су гихтни артритис и нефролитијаза мокраћне киселине повезани са повишеним нивоом мокраћне киселине у крви⁷⁸, S. Wang и сарадници⁷⁹ синтетисали су серију 5-фенилизоксазол-3-карбоксилних киселина (Схема 31) као потенцијалних инхибитора ксантин-оксидазе. Ово је значајно обзиром да је познато да инхибитори ксантин-оксидазе спречавају производњу мокраћне киселине.⁸⁰

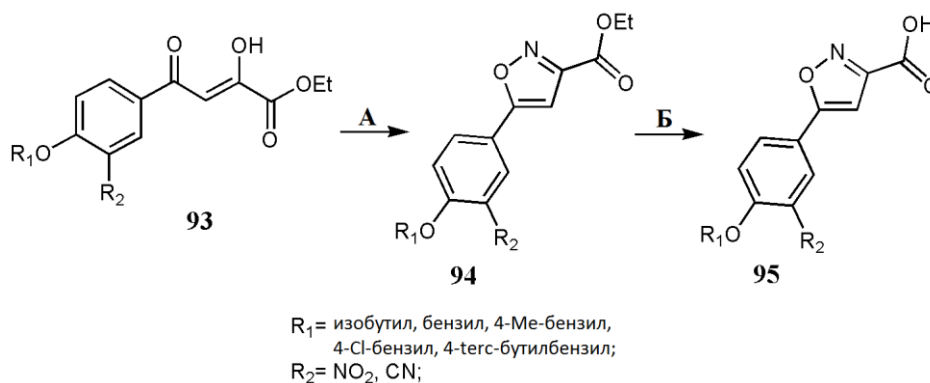
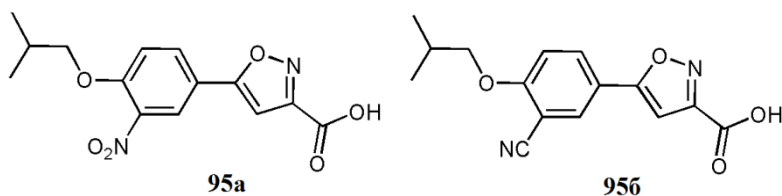


Схема 31. Опишта процедура за синтезу деривата изоксазола **95**. Услови реакције: **A** $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, EtOH , рефлукс; **B** NaOH , THF , 50°C , HCl .

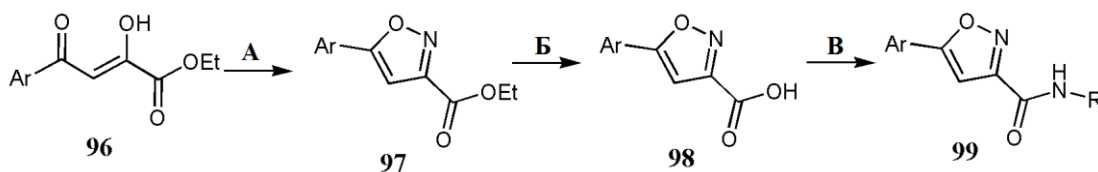
Као што је приказано на Схеми 31, етил-естри изоксазола **94** су добијени циклокондензацијом различито супституисаних ацилпирувата **93** са хидроксиламин хидрохлоридом. Они су затим хидролизоване са натријум-хидроксидом да се добију (након закишељавања) циљани производи **95**. Резултати биолошких испитивања показали су да једињења **95a** и **95b** која у својој структури садрже изобутил супституент (Слика 28) поседују изузетну активност са IC_{50} вредностима од 1,00, односно 0,36 μM . Поред тога, иста група аутора спровела је студију молекулског моделирања једињења **95b** да би стекли увид у начин интеракције са ксантин-оксидазом и обезбедила основу за даље дизајнирање нових непуринских инхибитора ксантин-оксидазе.



Слика 28. Структуре једињења **95a** и **95b**

Пошто је познато да инхибиција хидролазе амида масних киселина (fatty acid amide hydrolase-FAAH) може да доведе до смањења етаноламина полинезасићених масних киселина као што је хидролиза анандамида и према томе повећање нивоа анандамида који су повезани са аналгетским и антиинфламаторним активностима^{81,82}, V. Andrzejak и сарадници⁸³ синтетисали су серију деривата карбоксамида који садрже изоксазолов прстен (Схема 32) као потенцијалне FAAH инхибиторе. У првом кораку реакције 3-карбоксилат-5-арил-изоксазол **97** синтетисан је реакцијом циклизације ацилпирувата са хидроксиламин хидрохлоридом као што је описано на Схеми 32. Једињења **98**, добијена сапонификацијом интермедијарних молекула **97** са натријум-хидроксидом, дају коначне молекуле **99** у реакцији која захтева исте услове као код синтезе пептида (НОВt/НВТУ).

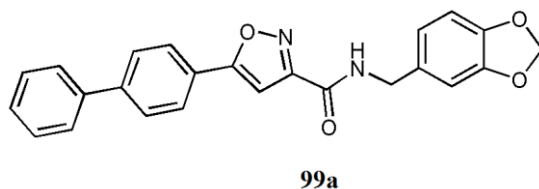
Испитивањем зависности структуре и активности синтетисаних једињења, аутори су открили да повећање дужине ланца доводи и до 200-струког побољшања активности ових једињења (IC_{50} у опсегу од 105 μM до 0,501 μM). Једињење **99a** (Слика 29), које садржи 4-бифенил групу на положају С-5 и (1,3-бензодиоксилил)етил-карбоксамидо супституент на позицији 3 изоксазоловог прстена се показало као најјачи FAAH инхибитор из ове серије молекула са IC_{50} од 0,088 μM .⁸³



Ar = Ph, *p*-BrPh, 2-бифенил, 3-бифенил, 4-бифенил, 2-фенантрил, 2-нафтил, *p*-толил, 4-трифлуорометилфенил;

R = Фенилпропил, 2-(бензо[d]-[1,3]-диоксол-5-ил)-етил, бензил, фенетил, бензо[d]-[1,3]-диоксол-5-ил, 2-(бензо[d]-[1,3]-диоксол-5-ил)-метил;

Схема 32. Општа процедура за синтезу деривата изоксазола **99**. Услови реакције: **A** хидроксиламин хидрохлорид, EtOH, рефлукс; **B** NaOH, EtOH, собна температура; **B** R-NH₂, HBTU, HOBT, *N,N*-диизопропилетиламин, CH₂Cl₂, собна температура.



Слика 29. Структура једињења **99a**

W. Тuo и сарадници⁸⁴ синтетисали су серију 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола користећи различите ацилпирувате као прекурсоре да би испитали њихов инхибиторски потенцијал на FAAH. Као што је приказано на Схеми 33, серија 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола **104** синтетисана је реакцијом која се састоји из четири корака. У првом кораку, реакцијом циклизације ацилпирувати су додатком хидроксиламина хидрохлорида преведени у 5-арил-изоксазол-3-карбоксилате **101**. Даље је извршена сапонификација ових једињења да се добију 5-арил-изоксазол-3-карбоксилат карбоксилне киселине **102**. Ова реакција је праћена амидовањем **102** са 1-адамантанамин хидрохлоридом, при чему се добијају кључни интермедијери **103**. Коначно, Сузукијевом реакцијом тетракис-(трифенилфосфин) паладијума(0) са различитим ароматичним боронским киселинама синтетисани су деривати *N*-(адамантан-1-ил)-5-арил-изоксазол-3-карбоксамиди **104**.

In vitro биолошка испитивања су показала да неколико једињења поседују добру FAAH инхибиторску активност. Студија је показала да једињење **104a** (Слика 30) поседује изузетно моћну FAAH инхибиторску активност са IC₅₀ вредностима од 0,24 μM, а без цитотоксичне активности на ћелијским линијама хуманог карцинома дебелог црева

(НТ29) и хуманог карцинома бубрега (НЕК293). Веома добра биолошка активност вероватно је последица добре липофилности једињења, што указује да једињење **104a** поседује FAAH инхибиторски потенцијал упоредив са једним од најјачих FAAH инхибитора идентификованих до данас.

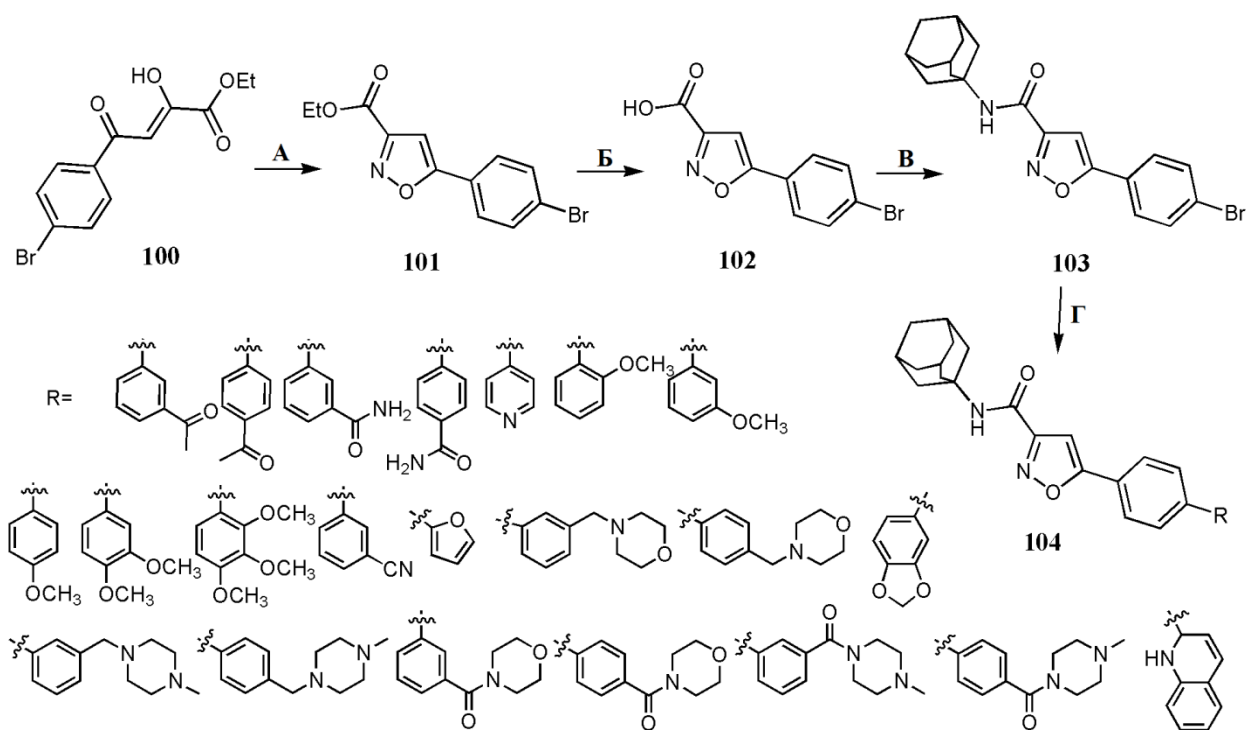
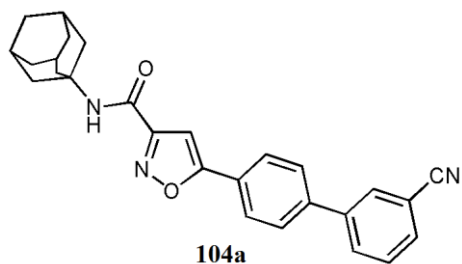


Схема 33. Општа процедура за синтезу 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола **104**. Реакциони услови: **A** хидроксиламин хидрохлорид, EtOH, рефлукс; **B** NaOH, EtOH, собна температура; **B** НВТУ, НОВt, DIEA, 1-адамантанаминам хидрохлорид, DCM, собна температура; естар арил-боронске киселине, калијум-карбонат, тетракис-(трифенилфосфин) паладијум(0), DMF, H₂O, микроталасно зрачење, 100°C.



Слика 30. Структура једињења **104a**

Познато је да се ендоканабиноиди, чији су главни представници анандамид и 2-арахидоноил-глицерол, везују за канабиноидне рецепторе CB1 и CB2. CB1 Рецептор се налази у мозгу и крвним судовима⁸⁵, док се CB2 рецептор углавном налази у имуним ћелијама⁸⁶ и показује имуномодулаторне активности⁸⁷. Имајући у виду претходно и знајући да се анандамид и 2-арахидоноил-глицерол могу брзо елиминисати из ћелије кроз олакшан транспортни механизам и углавном хидролизују помоћу FAAH и моноацилглицерол липазе⁸⁸⁻⁹¹, А. Tourteau и сарадници⁹² синтетисали су серију 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола као селективних антагониста CB2 рецептора користећи различите ацилпирувате као прекурсоре. Као што је описано на Схеми 34, у првом кораку реакције ацилпирувати **105** су циклизовани у етил-изоксазол-3-карбоксилате **106** додатком хидроксиламин хидрохлорида. У другом кораку, изоксазол-3-карбоксилати **106** хидролизовани су у одговарајуће киселине **107**. Коначни производи 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазоли **108** добијени су превођењем у амид, у условима пептидног купловања интермедијерних једињења **107**.

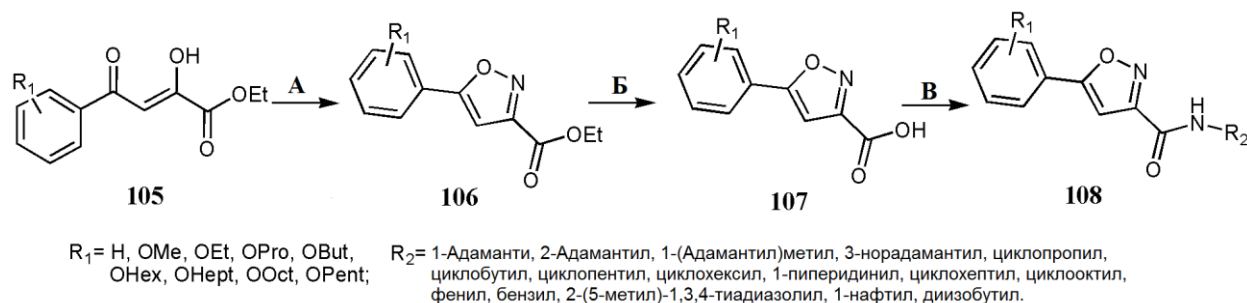
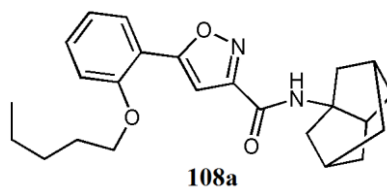


Схема 34. Општа процедура за синтезу 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола **108**. Реакциони услови: **A** хидроксиламин хидрохлорид, EtOH, рефлукс; **B** NaOH, EtOH, собна температура; **C** R-NH₂, HOBT, HBTU, DIEA, CHCl₃, собна температура.

Између свих синтетисаних, једињење **108a** (Слика 31) је показало најбољи афинитет за hCB2 рецептор са K_i вредношћу од 9,0 nM. Једињење **108a** је показало добру *in vivo* антиинфламаторну активност. Ови фармаколошки резултати довели су до открића селективних CB2 агониста са *in vivo* антиинфламаторном активношћу акутног колитиса код мишева. Захваљујући овој студији, 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазолска фармакофора је истакнута као високо ефикасна фармакофора за дизајн нових агониста CB2 рецептора.⁹²

Слика 31. Структура једињења **108a**

Деривати изоксазола показали су велику перспективу за лечење неких инфламаторних обољења као што су астма или хронична опструктивна болест плућа.⁹³ На основу претходно наведеног, недавне студије су описале примену ацилпирувата у синтези неких деривата изоксазола (Схема 25) као снажних инхибитора 5-липоксигеназе (5-lipoxygenase - 5-LO)⁹⁴. 5-LO Инхибитор сетилеутон⁹⁵⁻⁹⁷ и неколико 5-LO-активирајућих протеинских инхибитора (5-LO-activating protein - FLAP) укључени су у различите фазе претклиничких и клиничких студија за лечење астме и хроничне опструктивне болести плућа^{98,99}.

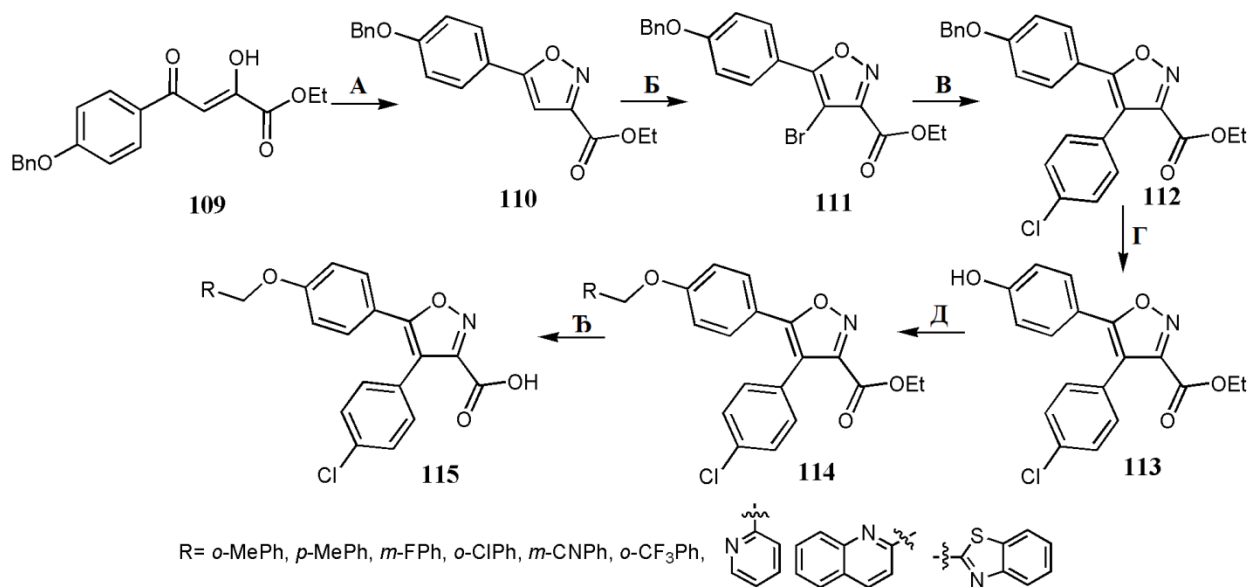
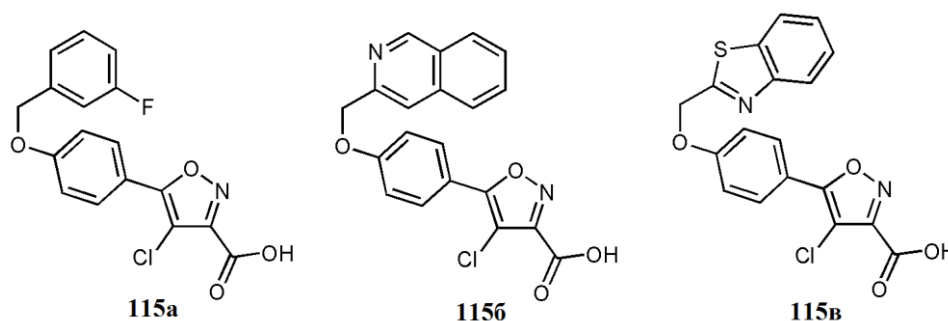


Схема 35. Општа процедура за синтезу 3-карбоксамидо-5-арил-изоксазола **115**. Реакциони услови: **A** хидроксиламин хидрохлорид, EtOH, рефлукс; **B** NBS, CAN, AcCN; **B** 4-хлорфенилборонска киселина, Pd(PPh₃)₂Cl₂, NaHCO₃, H₂O, DMF; **G** Pd/C, H₂, CH₃OH:THF (1:1); **D** одговарајући бензил-халогенид, 2-(хлорметил)пиридин, 2-(хлорметил)хинолин или 2-(хлорметил)бензотиазол, K₂CO₃, KI, MeCN, рефлукс; **B** LiOH, THF, H₂O.

Серија изоксазола, инхибитора 5-LO, синтетисана је по процедури описаној на Схеми 35. Серија изоксазолових естара **110** синтетисана је у реакцији ацилпирувата **109** са хидроксиламином. Бромовање на позицији 4 изоксазоловог прстена **110** урађено је са *N*-бромосукцинимидом у присуству каталитичке количине церијумамоњијумнитрата. Добијено интермедијерно једињење **111** подвргнуто је паладијум-катализованој Сузукијевој реакцији унакрсног спрезања са *p*-хлорофенилборонском киселином да се добије **112**. Хидрогенизација **112**, која је урађена да би се уклонила бензилна група, дала је интермедијер **113**, који је касније коришћен за добијање жељених изоксазола **115** алкиловањем хидроксилне групе фенолних једињења а затим и хидролизом естарске групе.

Једињење **115а** (Слика 32) показало је најснажнију 5-LO инхибиторску активност са IC₅₀ од 0,38 μМ док су друга једињења као што су **115б**, **115в** (Слика 32) била ефикасни инхибитори ћелијске синтезе 5-LO, наизглед делујући на FLAP са једнаком IC₅₀ од 0,24 μМ.⁹⁴



Слика 32. Структуре једињења **115а**, **115б** и **115в**

Поред великог потенцијала ових једињења као нових антиинфламаторних лекова, неке студије су показале да деривати изоксазола, добијени из ацилпирувата, имају добар потенцијал у терапији појединих врста тумора. Стога су Brough и сарадници¹⁰⁰ синтетисали низ мањих серија деривата изоксазола користећи различите ацилпирувате као прекурсоре (Схема 36). Синтетисали су серију ових једињења са циљем да се испита њихова биолошка активност, првенствено као инхибитора протеина топлотног шока 90 (heat shock protein 90 - Hsp90). Hsp90 инхибитори су били у фокусу истраживања многих научника због њихове способности да интерферирају са вишеструким онкогеним

путевима, подижући наде да ће показати широку антитуморску активност и бити мање подложни стеченој отпорности на лекове.¹⁰¹⁻¹⁰³

Сви 4-супституисани аналози изоксазола **123** синтетизовани су из кључних интермедијара **120** који су добијени низом хемијских трансформација (циклизација, амидовање, алкиловање и брмовање) користећи ацилпирувате **116** као почетне реагенсе по поступку описаном на Схеми 36. Даље, кључни интермедијари **120** у реакцији са 4-формилфенилборонском киселином дају једињења **121**, који су затим употребљена за синтезу интермедијера **122** увођењем амино група (морфолинска група). Коначно, деалкиловање интермедијера **122** изведено је са бор-трихлоридом.

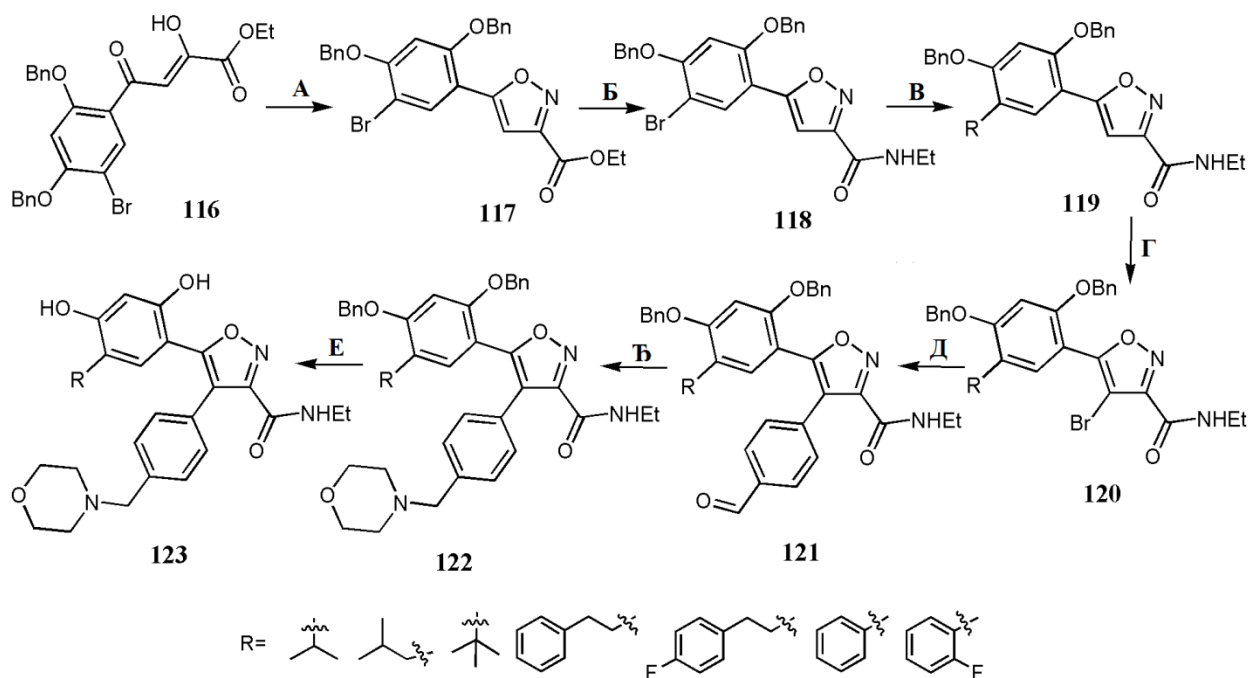
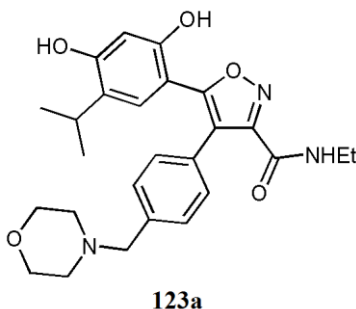


Схема 36. Општа процедура за синтезу изоксазола **123**. Реакциони услови: **A** хидроксиламин хидрохлорид, EtNH₂, рефлукс; **B** EtNH₂, MeOH, рефлукс; **B** супституисана *trans*-2-алил-боронска киселина, DMF, H₂O, Pd(PPh₃)₂Cl₂, NaHCO₃, рефлукс; **G** NBS или NIS, CAN, MeCN, Δ; **D** 4-формилфенилборонска киселина, NaHCO₃, H₂O, DMF, Pd(PPh₃)₂Cl₂; **B** морфолин, NaCNBH₃, AcOH, MeOH; **E** BCl₃, DCM, 0°C.

Студија коју су Vrough и сарадници објавили открила је значајно смањење раста тумора дебелог црева (HCT116) третираног једињењем **123a** (Слика 33). Резултати су показали да ово једињење има изузетну активност на Hsp90 ћелијским линијама тумора са IC₅₀ од 21 nM и да инхибира пролиферацију хуманих ћелија рака у широком опсегу са

просечним GI_{50} од 9 nM. Поред тога, **123a** је показало одличну ефикасност у низу субкутаних и ортотопичних модела ксенографта хуманог тумора, који су обрађивали главне типове тумора и различите онкогене профиле.¹⁰⁰



Слика 33. Структура једињења **123a**

Слично претходној студији, да би открили нове потенцијалне Hsp90 инхибиторе J. Sun и сарадници¹⁰⁴ синтетисали су серију 4-алкинилизоксазола **128**, користећи ацилпирувате **124** као прекурсоре. Естри изоксазола **125** добијени су у реакцији ацилпирувата **124** са хидроксиламин хидрохлоридом. У другом кораку, **125** је преведен у интермедијер **126** у реакцији са етиламином. У присуству каталитичке количине CAN интермедијер **126** је јодован са *N*-јодосукцинимидом да би се добило једињење **127**. Коначно, једињење **127** је подвргнуто Sonogashir-овој реакцији купловања са одговарајућим алкинима, праћено реакцијама са бортрибромидом да би се добили 4-алкинилизоксазоли **128** (Схема 37).

Резултати биолошких испитивања показали су да ова једињења показују умерен до јак афинитет везивања за Hsp90 протеине. Резултати су такође показали да ова једињења инхибирају раст туморских ћелија као што су A549, K562, MCF-7, DU145 и HeLa.

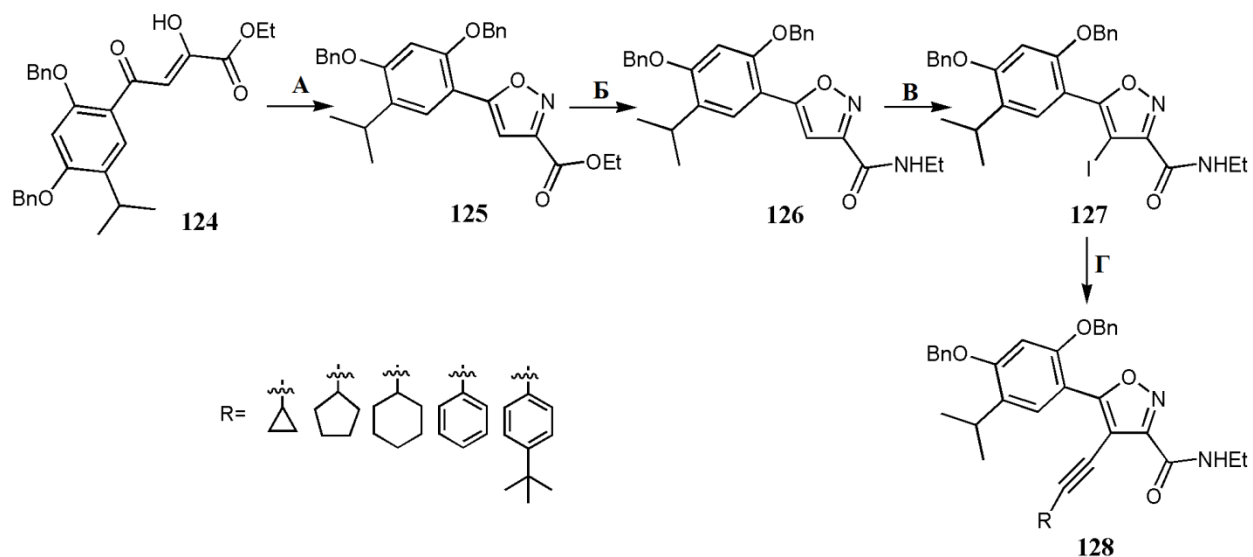
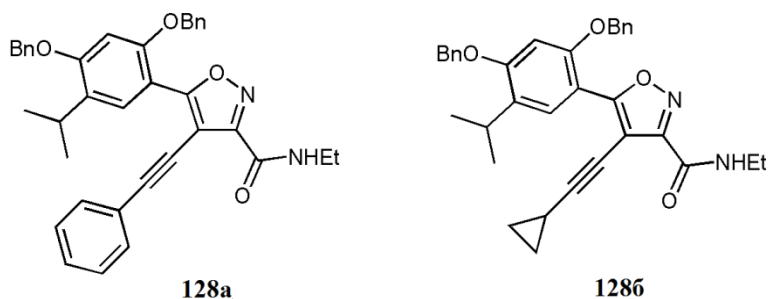


Схема 37. Општа процедура за синтезу 4-алкинилизоксазола **128**. Реакциони услови: **A** хидроксиламин хидрохлорид, EtOH, 25°C; **B** EtNH₂, EtOH, рефлукс; **B** NIS, CAN, MeCN, 80°C; **G** BBr₃, DCM, 0-25°C.

Испитивања антипролиферативних активности на пет ћелијских линија тумора показала су да је MCF-7 била најосетљивија ћелијска линија пошто су добијене вредности IC₅₀ за десет једињења биле у ниском наномоларном опсегу. На A549 ћелијској линији осам од свих тестираних једињења показало је веома добру цитотоксичну активност у ниском наномоларном опсегу, док је нађено да је једињење **128a** (Слика 34) најактивније са IC₅₀ вредностима од 14 nM. На DU145 ћелијској линији једињење **128b** (Слика 34) је показало најбољу ефикасност са IC₅₀ од 21 nM. На крају, на HeLa ћелијској линији тумора седам једињења је показало цитотоксичну активност у наномоларном опсегу од 39 до 75 nM. Резултати ове студије указују да једињења на бази алкинилизоксазола имају добар потенцијал да постану нова класа Hsp90 инхибитора у будућности.



Слика 34. Структуре једињења **128a**, **128b**

1.3.4. Синтеза пиролидинона

Деривати пиролидинона припадају класи биолошки активних једињења. Они се могу добити у реакцији између различитих ацилпирувата са смешом арил(алкил)-амина и алдехида,¹⁰⁵ што значи да се овим поступком може добити велики број ових једињења. Деривати пиролидинона поседују различите типове фармаколошких активности.¹⁰⁶ На пример, нека истраживања су показала да деривати пиролидинона имају добру антимикробну активност.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Осим тога, ови деривати поседују многе друге биолошке активности као што су антиинфламаторна, антивирусна, антифунгална или ноотропна.¹¹¹⁻

113

V. L. Gein и сарадници¹⁰⁷⁻¹¹⁰ објавили су неколико студија које су потврдиле да деривати пиролидинона, добијених из ацилпирувата, имају потенцијал да постану нови антимикробни агенси. Аутори су синтетисали серију деривата пиролидинона **130** користећи различите ацилпирувате **129** и различито супституисане арил-алдехиде и амине као што је приказано на Схеми 38.

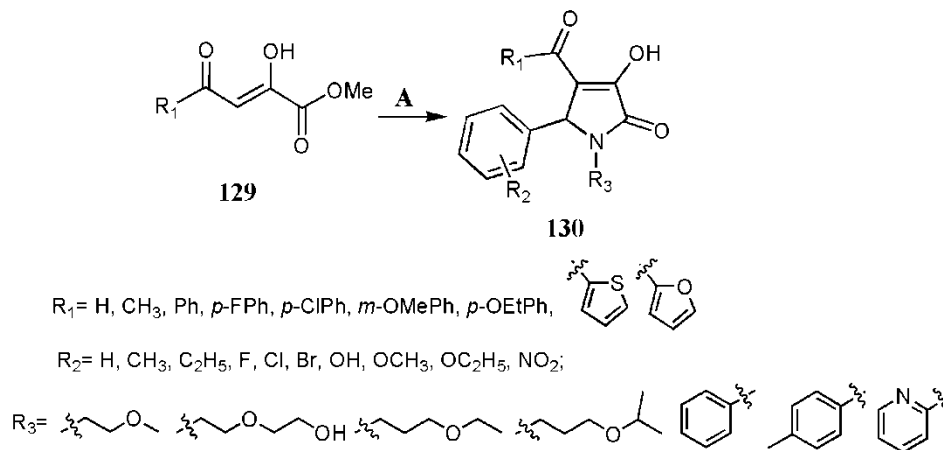
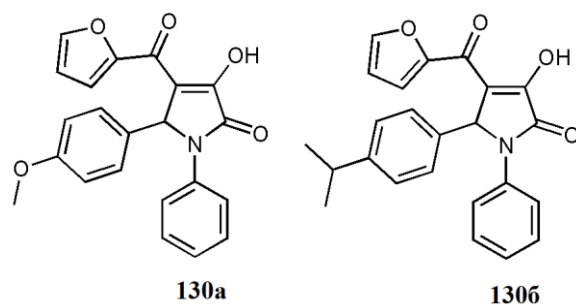


Схема 38. Општа процедура за синтезу деривата пиролидинона **130**. Реакциони услови: *A* ароматични алдехид, амин, глицјална AcOH , рефлукс.

Антимикробна активност испитана је на два соја бактерија (*Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*). Микробиолошка истраживања су показала да синтетисана једињења поседују антибактеријску активност упоредиву са оном код референтних лекова.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Најбољи резултати добијени су за једињења **130a** и **130b** (Слика 35) са вредностима MIC од 15,3 $\mu\text{g/ml}$ на оба тестирана соја.¹⁰⁷

Слика 35. Структуре једињења **130a** и **130b**

V. L. Gein и сарадници¹¹⁴ су користећи трокомпонентну реакцију између ацилпирувата **131**, 4-изопропилбензалдехида и 2-аминотиазола синтетисали серију деривата 3-хидроксипиролидинона **132** по процедури описаној на Схеми 39.

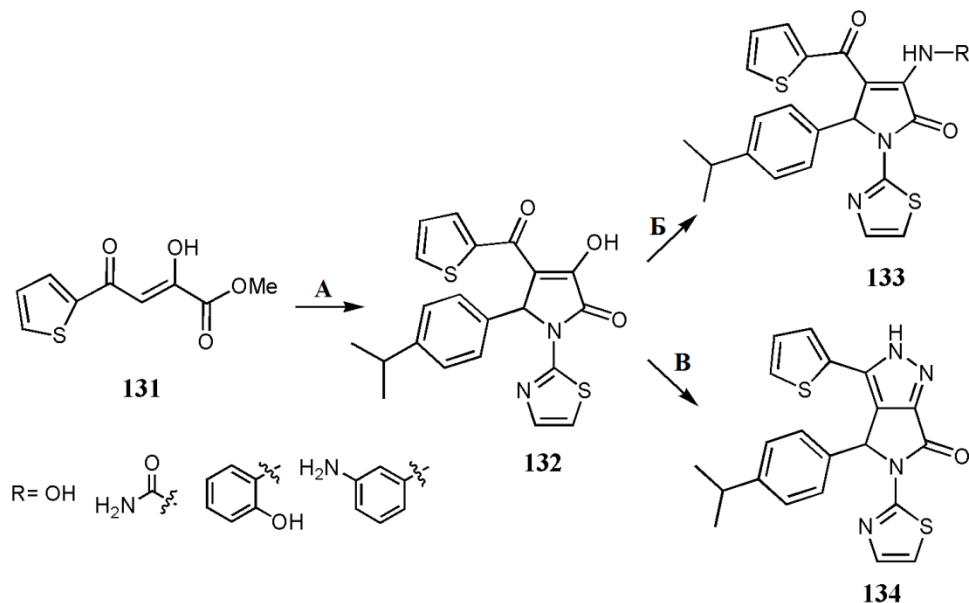
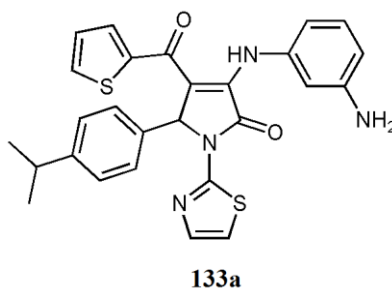


Схема 39. Општа процедура за синтезу деривата 3-аминопиролидинона **133** и пироло[3,4]-пиразола **134**. Услови реакције: **A** 4-изопропилбензалдехид, тиазол-2-амин, глицерална АсОН, рефлукс; **B** амин, АсОН, рефлукс; **B** хидразин хидрат, АсОН, рефлукс.

У другом реакционом кораку одговарајући 3-амино деривати и пироло[3,4]-пиразоли **133** и **134** добијени су из интермедијерног једињења **132** нуклеофилном супституцијом са *o*-аминофенолом, *m*-фенилендиамином, хидроксиламином и уреом или реакцијом циклизације са хидразином (Схема 39).

Аутори су синтетисали ова једињења да би испитали акутну токсичност и аналгетску активност. Прелиминарни тестови биолошких студија показали су да једињење **132** показује статистички значајан аналгетски ефекат. Студија је такође показала да сва једињења имају значајну аналгетску активност, док су једињења **133a** (Слика 36) и **134** најактивнија са LD_{50} од 21,33, односно 20,8 mg/kg.¹¹⁴



Слика 36. Структура једињења **133a**

Y. Zhao и сарадници¹¹⁵ синтетисали су серију 3-хидроксипиролидиноних деривата **135** користећи различите ацилпирувате **134** као прекурсоре, по процедури описаној на Схеми 40. Аутори су синтетисали ове молекуле на основу чињенице да хумана афричка трипаносомијаза, епидемија фаталне болести на простору сахарске Африке^{116,117} хитно захтева откриће нових лекова, посебно оних са бољим инхибиторским механизмом деловања на синтетички домен T. brucei LeuRS.

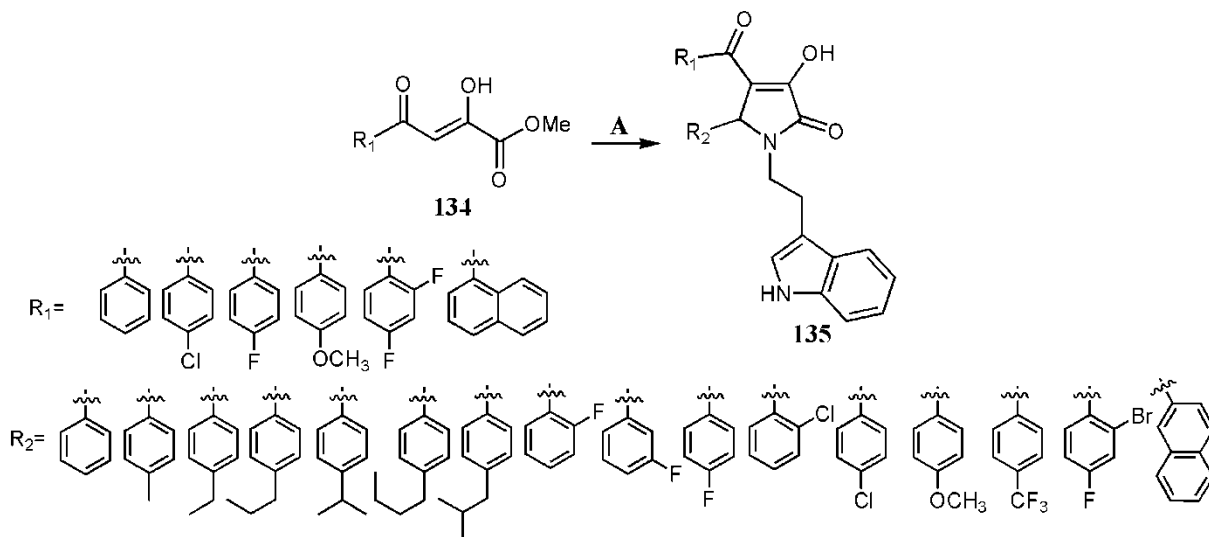
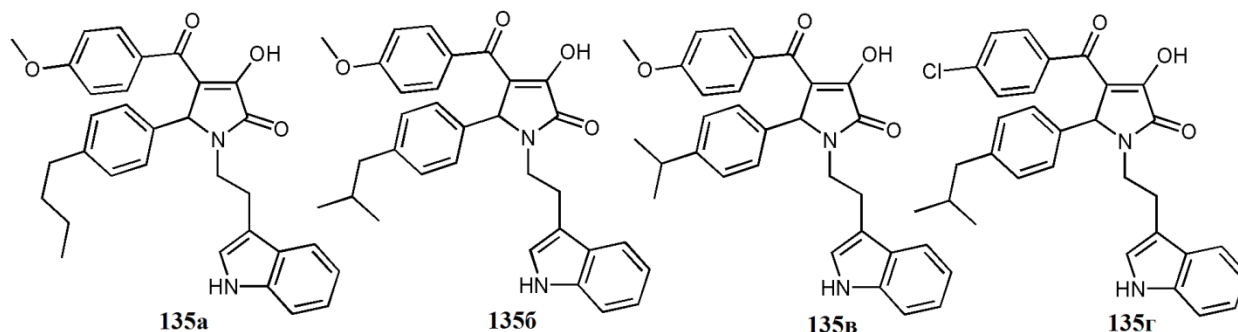


Схема 40. Опита процедура за синтезу 3-хидроксипиролидинона **135**. Реакциони услови: *A* алдехид, 2-(1H-индол-3-ил)етанамин, DIPEA, EtOH, рефлукс.

Сви 3-хидроксипиролидинонски деривати **135** синтетисани су преко трокомпонентне реакције између ацилпирувата **134**, алдехида и 2-(1*H*-индол-3-ил)етанамина.

Испитивања биолошке активности су показала да када је R₂ остатак на молекулу бутил или изобутил група, инхибиторска активност једињења буде значајно побољшана као што је случај код једињења **135a** и **135b** (Слика 37) (IC₅₀ = 43,9 и 31,9 μM). Додатно, једињење **135в** (Слика 37) такође је показало добру инхибиторску активност (IC₅₀ = 43,1 μM), док су супституције халогена и замена фенил групе пентил групом резултирале смањеном активношћу. На крају, синтетисали су једињење **135г** (Слика 37) хлоридни аналог једињења **135b** који је показао сличну IC₅₀ од 41,0 μM, док је флуоридни аналог показао доста мању активност.¹¹⁵



Слика 37. Структуре једињења **135a**, **135b**, **135в** и **135г**

С друге стране, студија коју су С. S. Brown и сарадинци¹¹⁸ извели је показала да пиролидинонски деривати **137**, добијени из ацилпирувата **136** као прекурсора по процедури описаној на Схеми 41, имају добар потенцијал да постану агенси за антивирусну терапију. Антивирусни потенцијал заснован је на чињеници да ови молекули имају способност да инхибирају интеракције интерферона и виралног протеина 35 (Viral protein 35 - VP35) као и његову функцију у минигеномском тесту. Научници су очекивали да ће лекови овог типа имати способност да инхибирају репликацију вируса еболе. Откриће лекова овог типа је од виталног значаја јер је познато да се инфекција ебола вирусом одликује тешком хеморагијском грозницом која обично доводи до фаталних исхода (близу 90%).¹¹⁹

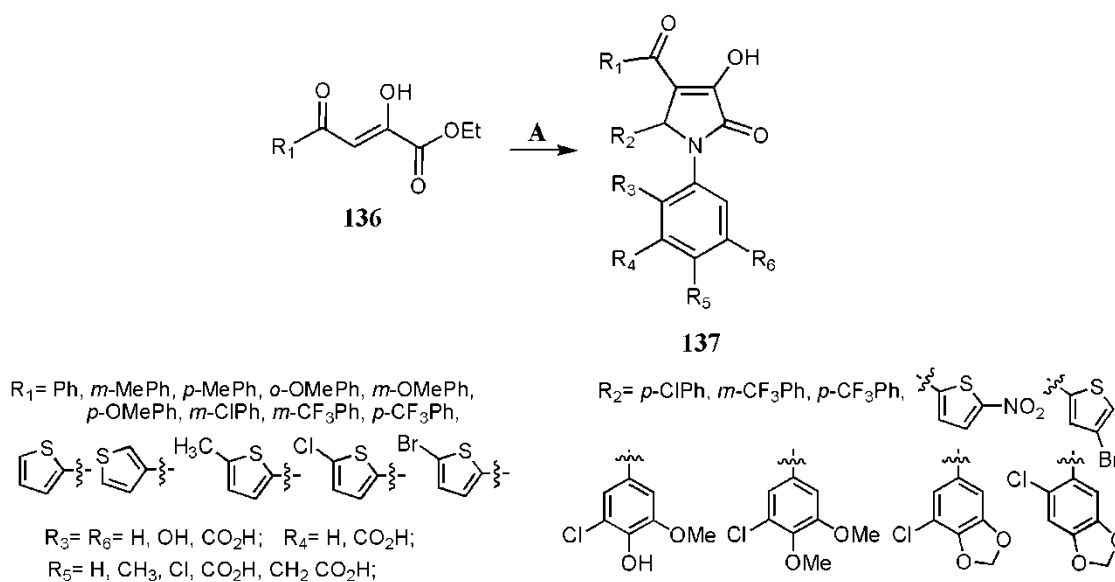
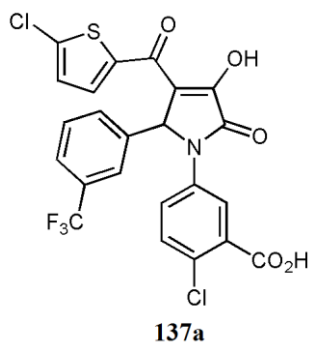
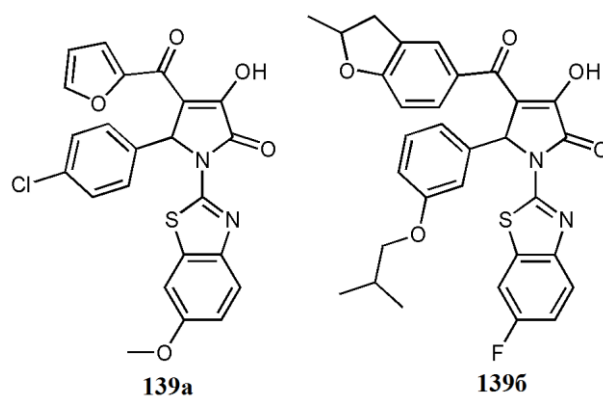


Схема 41. Опита процедура за синтезу 3-хидроксипиролидинона **137**. Реакциони услови: *A* ариламин, алдехид, триетиламин, диоксан, рефлукс.

Добијеним *in vitro* резултатима аутори су потврдили способност ових једињења да инхибирају VP35 у домену интеракције интерферона и нуклеопротеина, и да имају способност да спрече репликацију вируса у ћелијама. Студија је показала да тестирана једињења имају K_d опсег од $\sim 30 \mu\text{M}$ до $\sim 10 \mu\text{M}$. Најбољи резултати нађени су за пиролидинон **137a** (Слика 38). Структуре овог типа се у комплексу са VP35 везују преко неколико хидрофобних интеракција помоћу својих функционалних група са бочним ланцима VP35 који су од кључне важности за његову функцију, указујући да ови молекули могу водити до открића нових лекова у панфиловирусној терапији.¹¹⁸



Слика 38. Структура једињења **137a**



Слика 39. Структуре једињења 139a и 1396

Даље, S. S. Zimmerman и сарадници¹²⁶ су синтетисали серију деривата пиролидинона **141** користећи ацилпирувате **140** као прекурсоре по процедури описаној на Схеми 43 и тестирали их као потенцијалне рецепторе који садрже GluN2C.

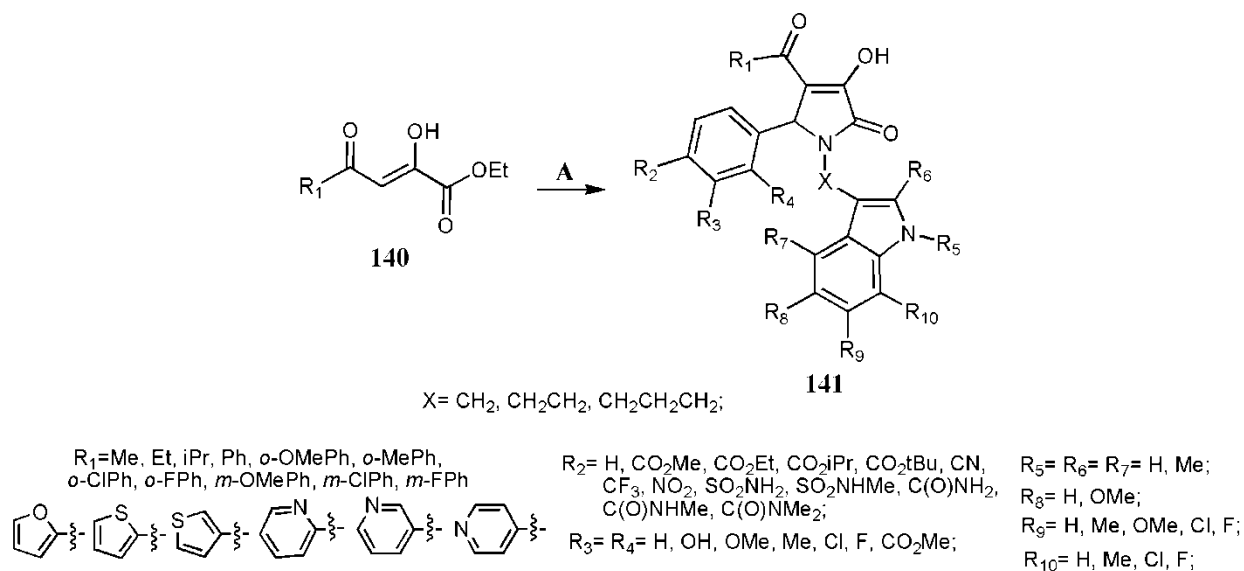
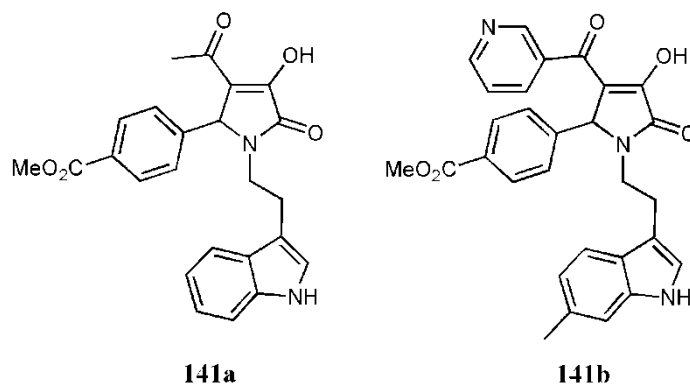


Схема 43. Опита процедура за синтезу деривата 3-хидрокси-пиролидинона **141**. Услови реакције: *A* алдехид, триптамин, пиридинијум-4-метилбензенсулфонат, диоксан, собна температура.

Познато је да су *N*-метил-D-аспартатни (NMDA) рецептори тетрамерни комплекси састављени од подјединица GluN1 и GluN2A–D које посредују Ca²⁺-пропустљивој компоненти екситаторне синаптичке трансмисије. Хиперактивација NMDA рецептора ослобађа Mg²⁺ узрокујући екстремни прилив Ca²⁺ који може довести до ексцитотоксичности. Штавише, ексцитотоксичност је укључена у неке

неуродегенеративне поремећаје као што су Паркинсонова болест, Алцхајмерова болест и Хунтингтонова болест.¹²⁷⁻¹²⁹ Према томе блокирање NMDA рецептора може бити корисно у лечењу таквих болести. Имајући ово на уму аутори су синтетисали низ пиролидинона као нових инхибитора NMDA рецептора који садрже подјединицу GluN2C.

Резултати биолошких испитивања су показали да 3-хидрокси-пиролидинон **141a** на 100 μM (Слика 40) појачава GluN1/GluN2C одговоре на 238 % контроле са EC_{50} од 24 μM . Такође једињење **141a** није имало сопствену агонистичку активност и није индуковало тренутне одговоре у ооцитима који експримирају GluN1/GluN2C у одсуству глутамата и глицина. Увођењем метил групе на С-7 позицију индола, од једињења **141a** добили су једињење **141b** (Слика 40), које селективно инхибира NMDA рецепторе који садрже GluN2C са EC_{50} од 4,3 μM . Важно је закључити да ова серија молекула може послужити као фармаколошко средство за процену улоге подјединице GluN2C у нормалној и неуропатолошкој функцији.



Слика 40. Структуре једињења **141a** и **141b**

1.3.5. Синтеза хиноксалинона и 1,4-бензоксазин-2-она

Хетероцикли као што су хиноксалини^{130,131} или бензоксазини¹³² придобили су много пажње у медицинској хемији јер су структурни фрагменти биолошки важних молекула. Једињења овог типа су показала различите биолошке активности као што су антимикробна,¹³³ антиинфламаторна,¹³⁴ антидијабетска,¹³⁵ антивирусна,¹³⁶ антитуморска^{137,138} и антитуберкулозна¹³⁹ активност. Стога су веома важна истраживања метода за синтезу ових хетероцикала.

Да би тестирали ове хетероцикле за потенцијалну употребу у лечењу канцера, Ј. Petronijević и сарадници¹⁴⁰ су синтетисали две серије хиноксалинона и бензоксазин-2-она **143** реакцијом хетероциклизације ацилпирувата **142** са *o*-фенилендиамином или *o*-аминофенолом по процедури описаној на Схеми 44.

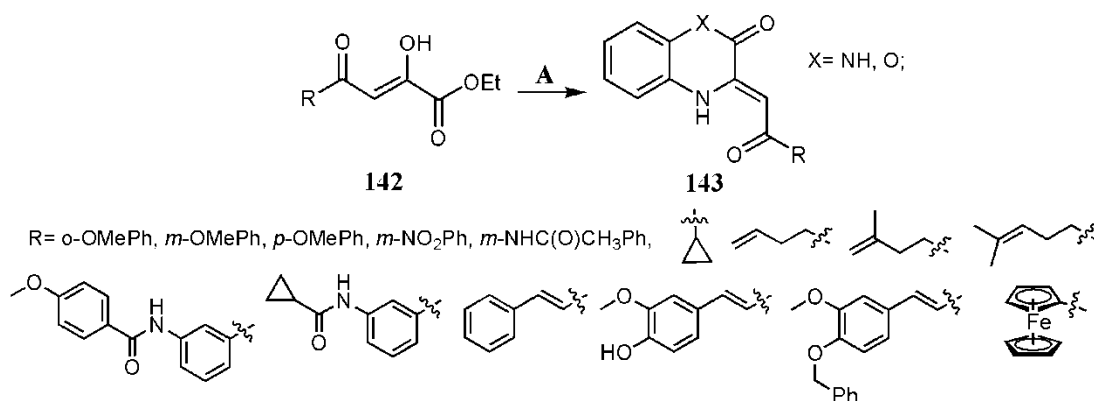
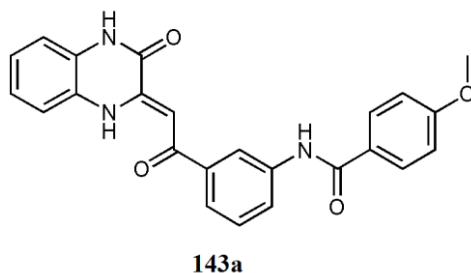


Схема 44. Општа процедура за синтезу хиноксалинона и бензоксазин-2-она **143**. Реакциони услови: А *o*-фенилендиамин/*o*-аминофенол, лимунов сок, рефлукс.

Антитуморска активност свих синтетисаних хиноксалинона и бензоксазин-2-она испитивана је на HeLa, ћелијама хуманог карцинома дебелог црева (LS174), A549 и нормалним ћелијским линијама фибробласта плућа (MRC-5). Добијени резултати су показали да неколико једињења има добру цитотоксичну активност на HeLa туморским ћелијама, док је најнижа IC₅₀ вредност од 10,46 μM добијена за хиноксалинон **143a** (Слика 41).¹⁴¹

Слика 41. Структура једињења **143a**

Нека истраживања су показала да бензоксазини, синтетисани из ацилпирувата, имају добру антибактеријску активност.^{142,143} У ту сврху V. L. Gein и сарадници¹⁴² су синтетисали серију 1,4-бензоксазин-2-она **145** употребом ацилпирувата **144**, по процедури описаној на Схеми 45.

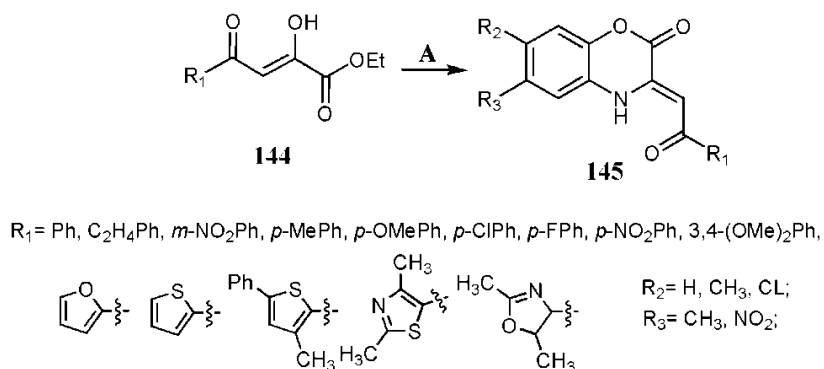
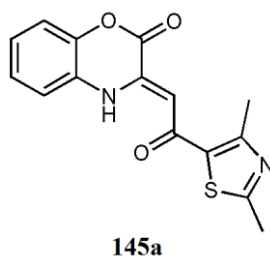


Схема 45. Општа процедура за синтезу бензоксазин-2-она **145**. Реакциони услови: **A** *о*-аминофенол, рефлукс.

Студија је показала да синтетисани 4-бензоксазин-2-они поседује антимикробну активност упоредиву са етакридин-лактатом и HgCl_2 . За дериват бензоксазин-2-она **145a** (Слика 42) откривено је да поседује још бољу активност од употребљених стандарда (MIC = 250 $\mu\text{g/ml}$) на употребљеним сојевима бактерија.

Слика 42. Структура једињења **145a**

Имајући у виду да је менахинон витална компонента за пренос електрона у многим патогенима, Х. Ли и сарадници¹⁴³ су синтетисали серију бензоксазин-2-она **147** употребом ацилпирувата **146** као прекурсора, по процедури описаној на Схеми 46. Аутори су синтетисали ове молекуле да би испитали антибактеријску активност на соју бактерија *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

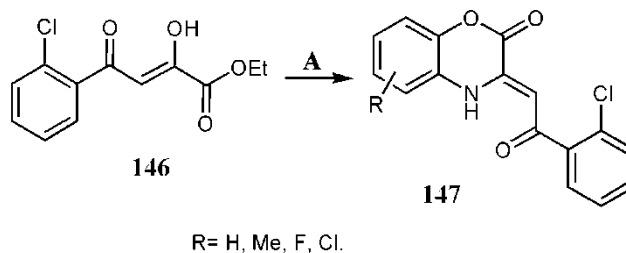
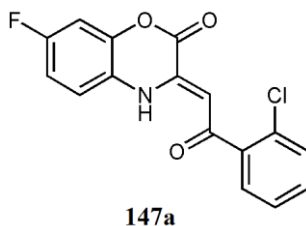


Схема 46. Општа процедура за синтезу бензоксазин-2-она **147**. Реакциони услови: **A** *o*-аминофенол, АсОН, рефлукс.

Биолошка испитивања су открила да синтетисана једињења имају добру способност да инхибирају раст *M. tuberculosis H37Rv*. Аутори су открили да неколико бензоксазин-2-она поседују одличну антибактеријску активност са вредностима МИС мањим од 4 $\mu\text{g/ml}$. Нађено је да бензоксазин-2-он **147a** највише инхибира раст *M. tuberculosis H37Rv* (Слика 43) са МИС од 1,56 $\mu\text{g/ml}$. Ова студија је додатно потврдила да је језгро бензоксазина неопходно за антибактеријску активност, као и за инхибицију одговарајућих ензима.



Слика 43. Структура једињења **147a**

1.3.6. Синтеза комплекса метала

Комплекси метала су одиграли кључну улогу у развоју нових фармацеутских производа и модерне хемиотерапије.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ На пример, лекови на бази платине појављују се у хемотерапијском третману више од било које друге класе антиканцерогених агенаса. Важност испитивања металних комплекса је битан допринос лечењу болести које су препознали Национални институти за здравље и примену метала у медицини.¹⁴⁷ Штавише лекови на бази метала остају мањина свих терапеутика на тржишту данас, па се зато све више истражују нови терапеутици на бази метала. Комбинација високо-електрофилног карактера и координационих места богатих кисеоником у комбинацији са капацитетом за формирање стабилних комплекса са већином метала услед појављивања таквих једињења у енолном облику чини ацилпирувате одличним кандидатима за синтезу металних комплекса. Поред свега тога до данас има мало студија које су описале употребу ових лиганата за синтезу комплекса са јонима метала, а само једна је описала употребу ових молекула као лиганата за комплексе од биолошког значаја.

У тој студији М. Sechi и сарадници¹⁴⁸ користећи ацилпирувате **148** као лиганде синтетисали су два комплекса метала **149** са Mg^{2+} јоном по процедури описаној на Схеми 47, и тестирали њихов антивирални потенцијал као анти-HIV агенаса.

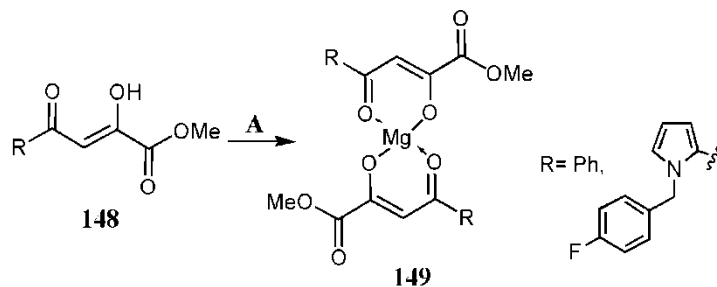
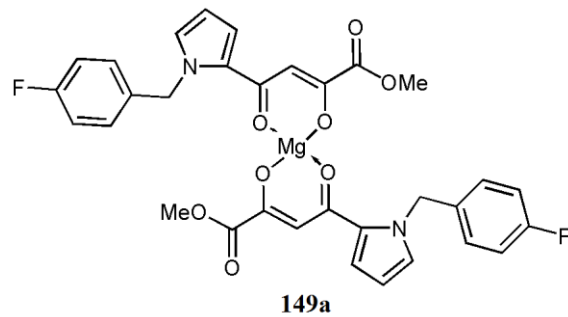


Схема 47. Општа процедура за синтезу Mg комплекса **149**. Реакциони услови: А MeOH, $Mg(OH)_2/H_2O$, собна температура.

Резултати биолошких испитивања показали су да је инхибиторска активност Mg^{2+} комплекса **149a** (Слика 44) била 6-оструко повећана у поређењу са одговарајућим ацилпируватом (48 и 8 μM), док други ацилпируват и његов комплекс нису били активни. Ова истраживања су важна за израду нове генерације инхибитора овог типа.



Слика 44. Структура једињења 149a

2. НАШИ РАДОВИ

2.1. Увод

Молекули попут ацилпирувата нашироко су коришћени као полазни супстрати у медицинској хемији и фармакологији за добијање нових лекова. Овакав структурни сегмент може се наћи у многим биолошки активним једињењима и природним производима. Такође, многи деривати ацилпирувата су синтетисани због веома повољних услова за синтезу.

Ови молекули су у центру истраживања многих научника, стога је све више студија које указују на важност ацилпирувата у медицинској хемији и фармакологији као битних прекурсора за развој и откриће нових лекова. Бројне аспекте примене ацилпирувата попут синтезе и изоловања њихових деривата, развоја нових синтетичких методологија, процене њихових биолошких својстава као и механизме деловања деривата ацилпирувата јако је важно изучавати.

У оквиру ове дисертације синтетисана је серија ацилпирувата^{149,150} у високим приносима, реакцијом Клајзенове кондензације, полазећи од различитих метил кетона и диетил-оксалата. Ови молекули су се показали као јако захвални и за неке даље хемијске трансформације. Синтетисани ацилпирувати су затим употребљени као прекурсори за синтезу три нове класе једињења.

Знајући да ацилпирувати имају способност да формирају стабилне комплексе са већином метала, што је као што смо већ напоменули директна последица присуства енолног облика код ових молекула, и знајући да је утицај координације за јон метала на биолошку активност ових молекула веома мало испитиван, синтетисали смо серију метало-органских комплекса бакра(II)¹⁴⁹ а затим и серију комплекса паладијума(II)¹⁵⁰ са овим молекулима. Такође, знајући да деривати пиролдинона припадају класи биолошки активних једињења која показују велики број различитих активности као што су антиинфламаторна, антивирусна, антибактеријска, антифунгална или ноотропна, а да се мало зна о њиховом антитуморском и антиоксидативном деловању синтетисана је серија 3-хидрокси-3-пироллин-2-она¹⁵¹.

На новосинтетисаним дериватима урађена је серија експеримената са циљем да се испита њихов биолошки потенцијал и подобност за потенцијалну примену као лекова за

третман неких болести.¹⁴⁹⁻¹⁵² Такође испитивали смо и утицај одређених супституената у овим молекулима на њихово биолошко понашање.

Све претходно поменуте синтезе које подразумевају добијање ацилпирувата и њихове трансформације приказане су на Схеми 48.

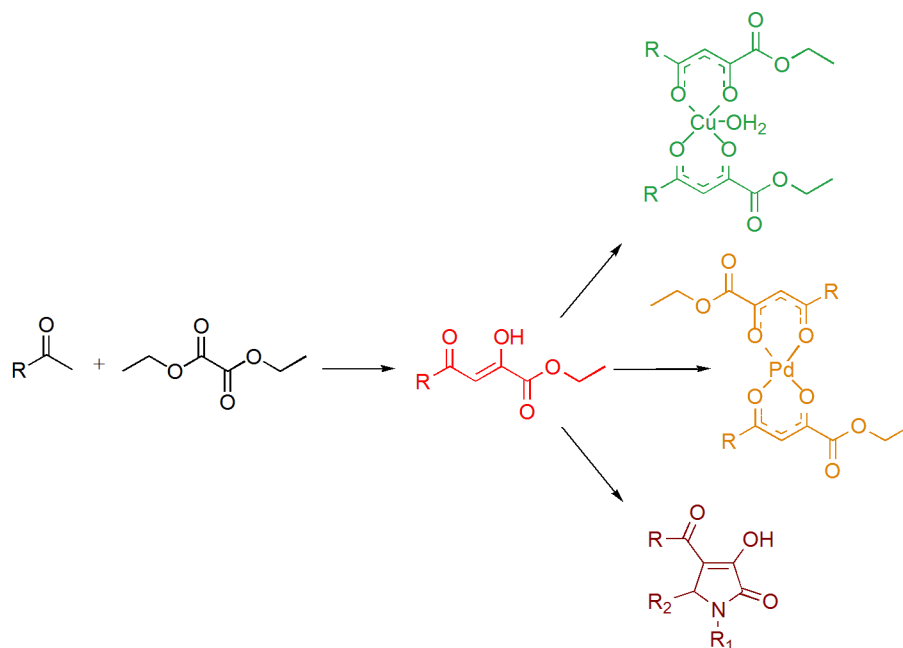


Схема 48. Синтеза и хемијске трансформације ацилпирувата

Ради одређивања структуре новосинтетисаних једињења, урађена су спектроскопске анализе (UV-Vis, IR, ¹H NMR, ¹³C NMR) и детаљна тумачења резултата добијених овим анализама. Осим спектроскопских, урађене су још масена и елементална анализа, а код одређених молекула (где је било могуће) урађена је и рендгенска структурна анализа. Обзиром да су новосинтетисани деривати ацилпирувата показали добре резултате на биолошким испитивањима, додатно су испитивани механизми деловања најактивнијих деривата. Додатно су урађена испитивања интеракција ових деривата са неким природним макромолекулима као што су ДНК и BSA да би се ближе одредила подобност ових деривата за потенцијалу примену у клиничкој пракси у будућности.

2.2. Синтеза ацилпирувата 2А-И

Реакција Клајзенове кондензације између метил кетона и диетил-оксалата у литератури је описана као једна од главних метода за синтезу једињења као што су ацилпирувати.

Имајући ово на уму, синтетисана је серија ацилпирувата реакцијом Клајзенове кондензације, различито супституисаних на -R остатку (Схема 49).

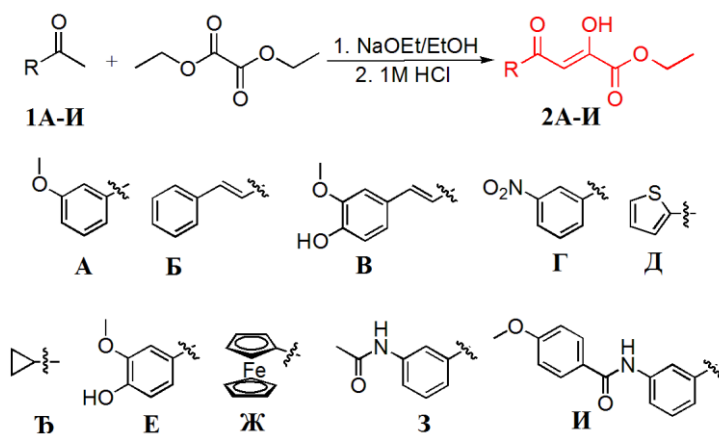


Схема 49. Синтеза ацилпирувата 2А-И

Као што је приказано на Схеми 49 сви ацилпирувати синтетисани су у реакцији између различито супституисаних метил кетона и диетил-оксалата у базним условима. Синтетисана је серија од десет ацилпирувата 2А-Е полазећи од одговарајућих метил кетона 1А-И у етанолу на температури од -10°C . Приноси у овој реакцији били су добри до одлични (до 93 %). Структуре синтетисаних ацилпирувата потврђене су ^1H и ^{13}C NMR спектроскопским анализама (Слике П1-П20).

2.3. Синтеза комплекса бакра(II) и испитивање биолошке активности

Бакар поседује значајну биохемијску улогу било као есенцијални микроелемет или као састојак различитих егзогенних конзумента код људи. Бакар има бројне улоге у биолошким системима као што су способност да се веже за церулоплазмин, албумин и друге протеине, као и способност да се у биолошким системима веже за лиганде различитих врста формирајући комплексе који интерагују са биомолекулама (углавном протеинима и нуклеинским киселинама). Вишеструка улога бакра у биолошким системима објашњена је у неколико студија. Посебно је улога бакра код неких болести описана са медицинско-хемијског¹⁵³ и биохемијског аспекта¹⁵⁴, са посебним освртом на молекуларну физиологију транспорта бакра¹⁵⁵. Велики део тренутних истраживања усредсређен је на хомеостазу бакра¹⁵⁶ и њену везу са метаболизмом гвожђа¹⁵⁷, као и на улогу бакра у биолошким процесима који се односе на физиологију и патологију човека.^{158,159} Ово је посебно значајно зато што су бројне студије показале да комплекси бакра са лигандима као што су салицилалдехид бензоилхидразон,¹⁶⁰ 2-оксохинолин-3-карбалдехид шифове базе,¹⁶¹ пиридоксал-семикарбазони,¹⁶² пиридинских прстенова са 1-адамантил-хидразоном¹⁶³ и 2-ацетилпиридин-бензоил-хидразони¹⁶⁴ показују јако добар биолошки потенцијал.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

2.3.1. Синтеза и карактеризација једињења 3А-Д

Имајући у виду претходно изнето, синтетисана је серија комплекса бакра(II) са ацилпируватима као лигандима (Схема 50) са циљем да се испита биолошки потенцијал новосинтетисаних молекула.¹⁴⁹

Да бисмо оптимизовали услове реакције, ацилпируват **2А** је комплексиран са неколико различитих соли бакра(II) [$\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ и $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$] у кључалом етанолу. Међутим добијени приноси нису били задовољавајући (29, 42 и 34% за **3А**), па је испробана друга синтетичка метода. Инспирирани одличном својствима соли бакра(II) $(\text{PhNH}_3)_2\text{CuCl}_4$ у претходним студијама¹⁶⁸⁻¹⁷⁰, одлучили смо да је применимо у синтези комплекса **3А-Д**. Као што се може видети са Схеме 50, ова комплексирајућа со даје комплексе **3А-Д** са лигандима **2** у кратком реакционом времену (~10 мин.) на собној температури. Приноси у овој реакцији (до 88%), били су много бољи него код претходно

употребљених соли бакара(II). Једно од објашњења за овако добре резултате реакције (виши приноси, нижа температура и брже време реакције) највероватније је повезано са геометријом CuCl_4 јона.^{171,172} Сви комплекси су растворни у поларним органским растварачима [CH₃OH, 1,4-диоксан, диметилсулфоксид и диметилформамид] и стабилни су на ваздуху.

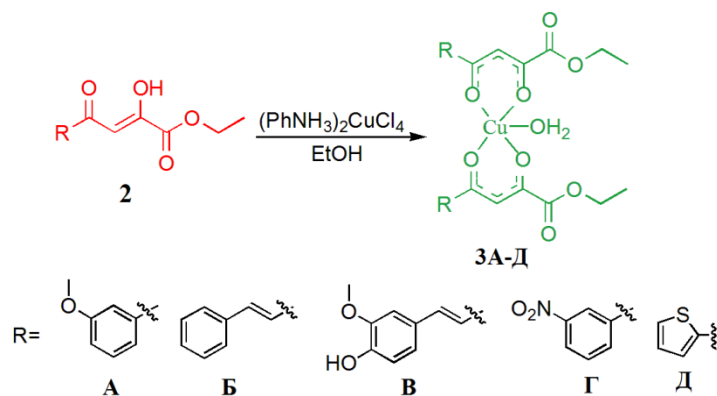


Схема 50. Синтеза комплекса бакра(II) 3А-Д

Сви синтетисани комплекси окарактерисани су UV-Vis, IR и EPR спектроскопијом, масеном спектрометријом и елементалном анализом, за једињење 3А урађена је и рендгенска структурна анализа. IR спектри комплекса у поређењу са одговарајућим спектрима лиганда показују да је $\nu\text{C}=\text{O}$ трака негативно померена за приближно 15 cm^{-1} . Присуство интензивних трака близу 1270 cm^{-1} у спектрима лиганда 2 последица је деформационих O–H вибрација у равни,^{173,174} док је њихово одсуство у спектрима комплекса последица депротоновања O–H групе услед координације лиганда за бакра(II).

2.3.1.1. Кристална структура једињења 3А

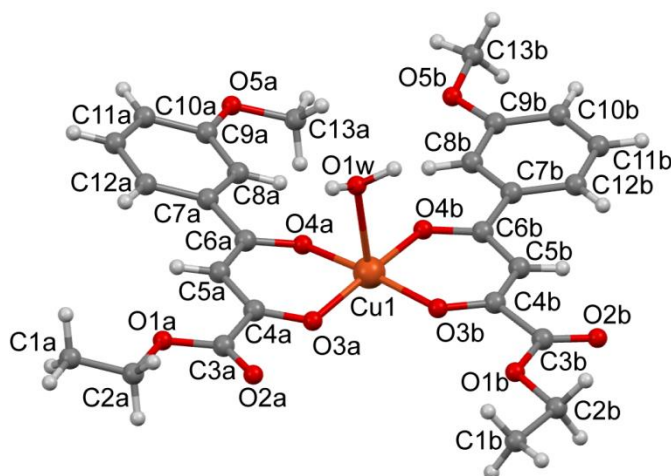
Кристална структура комплекса Cu(II) одређена рендгенском структурном анализом (Слика 45). Cu(II) јон је смештен у готово идеалном квадратно-пирамидалном окружењу које формирају бидентатни кисеоник-донорски лиганди који чине базу ове пирамиде и кисеоник-донор из воде који је смештен на врху пирамиде. Координовањем за Cu(II), органски лиганди формирају шесточлане хелатне прстенове са *cis* геометријом. Лиганди који се координују као кето-енол ањони показују мале разлике у дужинама четири Cu–O веза [1,914(2) до 1,927(2) Å]. Као што се очекивало, апикални кисеоник се

налази на нешто већој удаљености од метала [2,371(2) Å]. Највеће одступање углова од идеалне квадратне пирамидалне геометрије износи 7,2° и односи се на *trans* угао O4a–Cu–O3b који чини базу пирамиде.

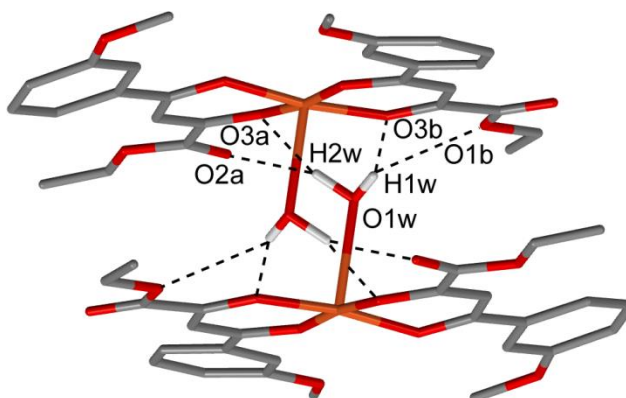
Иако приказују исти начин координације, два ацилпирувата заузимају делимично различиту молекулску конформацију. То се углавном одражава у оријентацији функционалних група лигананда где одговарајући карбоксил O2 узима *cis* или *trans* позицију у односу на атом O3 у лигандима а и b [торзиони углови O2–C3–C4–O3 износе 5,1(4) и -179,1(3)° за а и b]. Додатна разлика се појављује у оријентацији метокси групе која се налази на фенил прстену [торзиони углови C8–C9–O5–C13 износе 0,5(4) и 179,9(3)° за лиганде а и b]. Без обзира на ове разлике у конформацији, два лиганда имају сличне дужине и углове веза (Табела П1). Дужине C–O [C4–O3 = 1,227 и C6–O4 = 1,227 Å у просеку] и C–C веза [C4–C5 = 1,338 и C5–C6 = 1,405 Å у просеку] сугеришу делокализацију електрона унутар дикето фрагмента. Као резултат тога, шесточлани хелатни прстенови формирану након координације приближно су у равни. Премештање Cu(II) јона из равни хелатног прстена донекле се разликује и износи -0,158(1) и 0,033(1) Å за лиганде а и b.

У кристалном паковању центросиметрично повезани молекули међусобно су везани O–H \cdots O водоничним везама формирајући различите димере (Слика 46).

Унутар димера, сваки аксијални молекул воде инкорпориран је између четири O акцептора из суседног молекула и истовремено формира четири O–H \cdots O водоничне везе. Водоничне везе умерено су јаке, са растојањем O \cdots O у опсегу од 2,945(3) до 3,212(3) Å.



Слика 45. Кристална структура једињења 3А

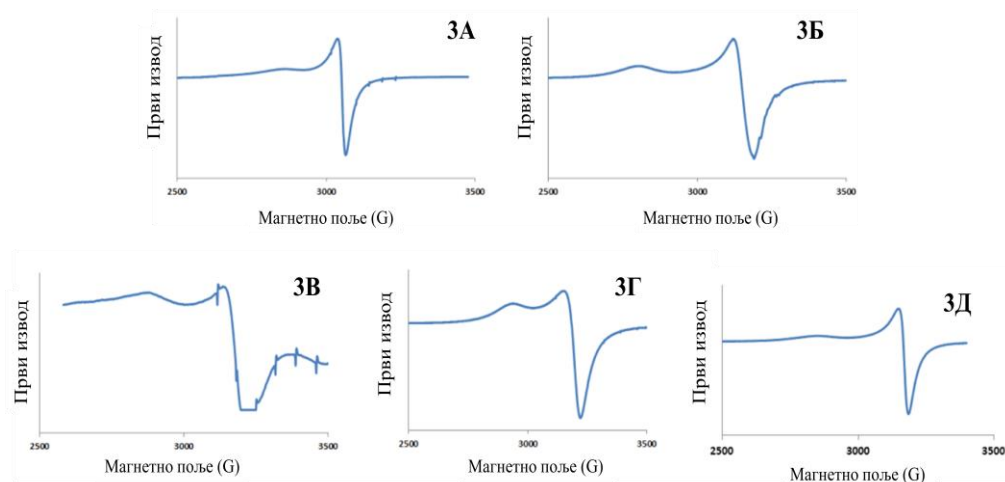


Слика 46. Комплексни молекули 3А распоређени у различите димере повезане водоничним везама. Геометријски параметри Н-веза дати су у Табели П2. Н атоми који не граде водоничне везе нису приказани ради јасноће.

2.3.1.2. Карактеризација комплекса бакра помоћу електронске парамагнетне резонанце (ЕПР)

ЕПР спектри поликристалних комплекса 3А-Д на фреквенцији од $\approx 9,5$ GHz и температури од 77 K, користећи Mn-ZnS као опсежни маркер, приказани су на Слици 47.

Вредности паралелног (g_{\parallel}), перпединуклеарног (g_{\perp}) и анизотропног тензора (g) приказане су у Табели 1. Добијени резултати сугеришу да је орбитала $d_{x^2-y^2}$ Cu(II) јона основно стање за парамагнетични електрон.^{175,176}



Слика 47. ЕПР спектри једињења 3А-Д на температури од 77 К

У представљеним аксијалним спектрима (Слика 47) g -вредности су повезане изразом $G=(g_{\parallel}-g_e)/(g_{\perp}-g_e)$.¹⁷⁵ Добијене G вредности ($G < 4,0$), приказане у табели 1, и показују да је присутна интеракција измене спинова.

Табела 1. ЕПР подаци за једињења 3А-Д. У свим случајевима стандардна девијација износи $\pm 0,0001$.

Једињење	g_{\parallel}	g_{\perp}	G
3А	2,3389	2,1127	3,0489
3Б	2,3867	2,1267	3,0900
3В	2,3343	2,1158	2,9251
3Г	2,2787	2,1024	2,7612
3Д	2,3537	2,1129	3,1772

2.3.2. Биолошки потенцијал једињења 3А-Д

Како би испитали биолошки потенцијал једињења 3А-Д, сва једињења су тестирана на антиоксидативну¹⁵², антимицробну¹⁴⁹ и антитуморску активност¹⁴⁹. Додатно, да бисмо испитали подобност ових молекула за примену у клиничкој пракси у будућности испитан је механизам деловања ових молекула са биомакромолекулима као што су ДНК и BSA.^{149,152}

2.3.2.1. Антиоксидативна активност једињења 3А-Д

За процену антиоксидативне активности, тестирали смо пет синтетисаних ацилпирувата **2А-Д**. Поред тога, како бисмо истражили како координација за јон бакра(II) утиче на антиоксидативну активност ацилпирувата, испитали смо и одговарајуће комплексна једињења бакра **3А-Д**.

Резултати уклањања 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала испитиваних узорак приказани су у табели 2. Испитана једињења су показала добру активност уклањања DPPH радикала (IC_{50} у распону од 232,81-996,47 $\mu\text{g/ml}$), мада је активност била нижа од стандарда (аскорбинска киселина). Резултати су показали да једињења **2Б**, **2Г** и **2Д** поседују највеће активности уклањања DPPH радикала. Такође, DPPH тест је открио да ацилпирувати имају бољу антиоксидативну активност од одговарајућих комплекса бакра(II), осим у случају **2В** где комплексно једињење **3В** има нешто бољу активност од одговарајућег ацилпирувата. Уклањање слободних радикала сматра се једним од бројних механизма за антиоксидативну активност. Метода се заснива на редукцији алкохолног раствора DPPH у присуству антиоксиданта који донира водоник за стварање нерадикалског облика DPPH-H. Овај тест се користи као прелиминарни тест који даје информације о реактивности испитиваног једињења са стабилним слободним радикалом, јер неспарени електрон из DPPH даје јак апсорпциони максимум на 517 nm (љубичасте боје). Услед неутрализације овог слободног радикала од стране неког једињења долази до смањења апсорпције и дисколорације из љубичасте у жуту боју раствора. Ова метода је брза, нису потребни скупи реагенси или софистицирани инструменти.¹⁷⁷

Резултати активности уклањања супероксидног аниона приказани су у Табели 2. IC_{50} вредност за тестирана једињења била је у опсегу од 188,25–327,96 $\mu\text{g/ml}$. Максималну активност уклањања показало је једињење **2Б** ($IC_{50} = 188,25 \mu\text{g/ml}$), а такође добре активности су показала и једињења **2В** и **2А**. Овај тест је открио да већина ацилпирувата има бољу активност од одговарајућих комплекса бакара. Ово смањење активности највероватније настаје као резултат депротоновања ОН групе лиганда услед координације за јон бакра(II). Многобројне реакције у биолошким системима покрећу супероксидни радикали који су веома токсичне врсте. Иако не могу директно покренути оксидацију липида, супероксидни анион-радикали потенцијални су прекурсори штетних кисеоничних

врста и стога је важно проучавање начина уклањања овог радикала. У PMS/NADH-NBT систему, супероксидни анијон настаје неензимском реакцијом феназин-метосулфата у присуству NADH и молекулског кисеоника. Смањење апсорпције на 560 nm у присуству антиоксиданта указује на смањење концентрације супероксидног анијона у реакционој смеши.¹⁷⁸

Табела 2. Потенцијал уклањања DPPH и супероксидног анијон-радикала једињења 2А-Д и 3А-Д

Једињење	Уклањање DPPH радикала	Уклањање супероксидног анијона
	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)
2А	309,25 ± 2,12	208,41 ± 1,91
2Б	280,53 ± 2,08	188,25 ± 1,66
2В	320,66 ± 2,51	207,66 ± 1,91
2Г	232,81 ± 2,42	284,15 ± 2,02
2Д	298,65 ± 2,15	212,19 ± 1,99
3А	734,07 ± 2,66	310,77 ± 2,75
3Б	996,47 ± 3,02	327,96 ± 2,72
3В	278,15 ± 2,14	293,22 ± 2,03
3Г	775,88 ± 2,87	247,64 ± 2,28
3Д	615,06 ± 2,84	257,19 ± 2,02
Аскорбинска киселина	21,18 ± 1,12	121,46 ± 1,22

Резултати редукционе моћи испитиваних узорака сумирани су у Табели 3. Велика апсорбанца указује на високу редукциону моћ. Међу испитиваним једињењима, **2В** је показало највећу редукциону моћ, мада доста слабију од стандарда (аскорбинска киселина). Редукциони капацитет једињења може послужити као значајан показатељ његове потенцијалне антиоксидативне активности. Фери јон (Fe³⁺) производи радикале из пероксида, мада десетоструко мање од феро јона (Fe²⁺). Феро јони (Fe²⁺) су најмоћнији про-оксиданти међу различитим врстама јона метала. Смањење концентрације феро јона (Fe²⁺) на минимум може пружити заштиту од оксидативних оштећења инхибирањем производње ROS-а. Присуство редуктаната узрокује конверзију Fe³⁺ у Fe²⁺ јоне.¹⁷⁷

Табела 3. Редукциона моћ једињења 2А-Д и 3А-Д

Тестирана једињења	Апсорбанца (700 nm)		
	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
2А	0,105 ± ,011	0,093 ± ,009	0,021 ± ,008
2Б	0,267 ± ,016	0,161 ± ,017	0,126 ± ,017
2В	0,430 ± ,029	0,299 ± ,019	0,258 ± ,023
2Г	0,226 ± ,018	0,117 ± ,012	0,108 ± ,015
2Д	0,390 ± ,024	0,295 ± ,019	0,218 ± ,019
3А	0,064 ± ,007	0,044 ± ,003	0,022 ± ,001
3Б	0,073 ± ,009	0,018 ± ,002	0,036 ± ,002
3В	0,278 ± ,017	0,207 ± ,017	0,137 ± ,012
3Г	0,089 ± ,009	0,051 ± ,004	0,049 ± ,003
3Д	0,254 ± ,016	0,165 ± ,015	0,105 ± ,011
Аскорбинска киселина	2,421 ± ,091	1,936 ± ,063	1,097 ± ,037

2.3.2.2. Антимикробна активност једињења 3А-Д

Антимикробна активност испитиваних једињења на испитаним микроорганизмима приказана је у табели 4. Испитана једињења су показала релативно снажно антимикробно деловање. МИС вредности за различита једињења на тестираним микроорганизмима кретале су се у распону од 0,048 до 3,125 mg/ml. Најјаче антибактеријско деловање показала су једињења **3В** и **3Г**, која су у врло малим концентрацијама (Табела 4) инхибирала све тестиране сојеве бактерија. Најнижа измерена МИС вредност (0,048 mg/ml) добијена је за једињење **3В** тестираног на сој бактерија *Proteus mirabilis*. Ова једињења су такође инхибирала раст свих испитиваних гљивица, али при нешто вишим концентрацијама. Једињења **3А**, **3Б** и **3Г** показала су сличну антифунгалну активност са МИС вредностима у распону од 0,195 до 3,125 mg/ml. Слабија антифунгална активност пронађена је код једињења **3В** и **3Г**.

Најосетљивији сој бактерија био је *Proteus mirabilis*, док је међу гљивама најосетљивији сој био *Candida albicans*.

Антимикробна активност упоређена је са стандардима, антибиотиком стрептомицином (за бактерије) и антимиотиком кетоконазолом (за гљивице). Резултати су показали да стандарди имају нешто већу активност од тестираних узорака као што се може видети из Табеле 4. У негативној контроли, DMSO није имао инхибиторски ефекат на тестиране организме.

Табела 4. Антимикробна активност једињења 3А-Д (MIC у mg/ml). Контрола: Кетоконазол за гљивице; Стрептомицин за бактерије. Вредности су представљене на три децимале. У свим случајевима стандардна девијација износи $\pm 0,002$.

Једињење	3А	3Б	3В	3Г	3Д	контрола
Микроорганизам	MIC (mg/mL)					
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,781	0,390	0,097	0,195	1,562	0,031
<i>Bacillus subtilis</i>	0,781	0,781	0,097	0,390	0,781	0,016
<i>Bacillus cereus</i>	1,562	0,390	0,390	0,195	0,390	0,016
<i>Escherichia coli</i>	1,562	0,781	0,781	0,195	0,390	0,062
<i>Proteus mirabilis</i>	0,097	0,195	0,048	0,097	0,195	0,016
<i>Aspergillus niger</i>	0,390	0,390	1,562	1,562	0,781	0,156
<i>Candida albicans</i>	0,195	0,390	0,195	0,781	0,781	0,039
<i>Penicillium italicum</i>	0,781	0,390	3,125	3,125	0,390	0,156
<i>Fusarium solani</i>	1,562	0,390	3,125	3,125	0,195	0,156
<i>Mucor mucedo</i>	3,125	1,562	3,125	3,125	1,562	0,625
<i>Trichoderma viride</i>	1,562	0,781	1,562	3,125	0,781	0,156

У овим експериментима, испитана једињења су при истим концентрацијама показала нешто јачу антибактеријску од антигљивичне активности. Ови резултати су донекеле били очекивани због чињенице да су бројна испитивања показала да су бактерије осетљивије на антибиотик у поређењу с гљивицама. Разлог различитих осетљивости између гљивица и бактерија може се наћи у различитој пропустљивости ћелијске мембране. Ћелијска мембрана грам-позитивних бактерија састоји се од пептидогликана (муреин) и тејхојичне киселине, док се ћелијска мембрана грам-негативних бактерија

састоји од липополисахарида и липополипротеина.¹⁷⁹ Са друге стране, ћелијска мембрана гљивица се састоји од полисахарида као што су хитин и глукан.¹⁸⁰

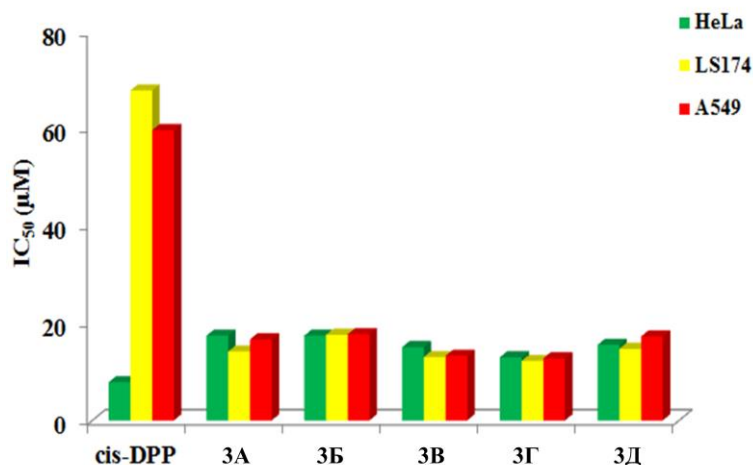
2.3.2.3. Антитуморска активност једињења 3А-Д

Цитотоксичност једињења 3А-Д и одговарајућих лиганата тестирана је на хуманим ћелијским линијама карцинома материце (HeLa), карцинома плућа (A549) и карцинома дебелог црева (LS174) користећи МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид] тест и цисплатину (*cis*-DDP) као контролу. Резултати су показали да једињења 3А-Д имају далеко бољу активност од одговарајућих лиганата. Резултати цитотоксичне активности једињења 3А-Д приказани су у Табели 5, и изражене су као IC₅₀ вредности (µg/ml). Поред тога, вредности IC₅₀ изражене у µМ приказане су графички на Слици 48.

Табела 5. Цитотоксична активност (вредности IC₅₀) једињења 3А-Д на ћелијским линијама карцинома и нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). IC₅₀ вредности (µg/ml) изражене су као средња вредност ± СД одређена на основу резултата МТТ теста из три независна експеримента.

Једињење	HeLa	LS174	A549	MRC-5
	IC ₅₀ (µg/ml)			
3А	10,12 ± 1,69	8,22 ± 0,62	9,67 ± 0,59	21,22 ± 1,53
3Б	9,98 ± 1,23	10,09 ± 1,02	10,15 ± 1,16	15,64 ± 1,17
3В	10,01 ± 1,15	8,65 ± 0,72	8,83 ± 0,67	11,69 ± 0,72
3Г	7,91 ± 0,37	7,45 ± 0,91	7,78 ± 1,02	19,13 ± 0,44
3Д	8,26 ± 0,21	7,82 ± 0,55	9,17 ± 0,13	22,55 ± 1,26
<i>cis</i>-DDP	2,36 ± 0,28	20,38 ± 0,44	17,93 ± 0,88	4,26 ± 0,46

Као што је приказано у Табели 5, сви узорци су показали изузетно високу цитотоксичну активност. Комплекс 3Г је показао најбољи ефекат на све три (HeLa, LS174 и A549) ћелијске линије (IC₅₀ = 7,91, односно 7,45 и 7,78 µg/ml). Сви узорци су показали већу цитотоксичну активност на LS174 и A549 ћелијским линијама у поређењу са цисплатином.



Слика 48. Графички приказ цитотоксичне активности (IC_{50} у μM) једињења 3А-Д на HeLa, LS174 и A549 ћелијским линијама

Поред тога, индекс селективности једињења 3А-Д (Табела 6) показао је да сва једињења имају бољу селективност од цисплатине (и до 13 пута).

Табела 6. Индекс селективности једињења 3А-Д

Једињење	HeLa	LS174	A549
	$IC_{50}(MRC-5)/IC_{50}(ћелијска\ линија)$		
3А	2,10	2,58	2,19
3Б	1,57	1,55	1,54
3В	1,17	1,35	1,32
3Г	2,42	2,57	2,46
3Д	2,73	2,88	2,46
cis-DDP	1,81	0,21	0,24

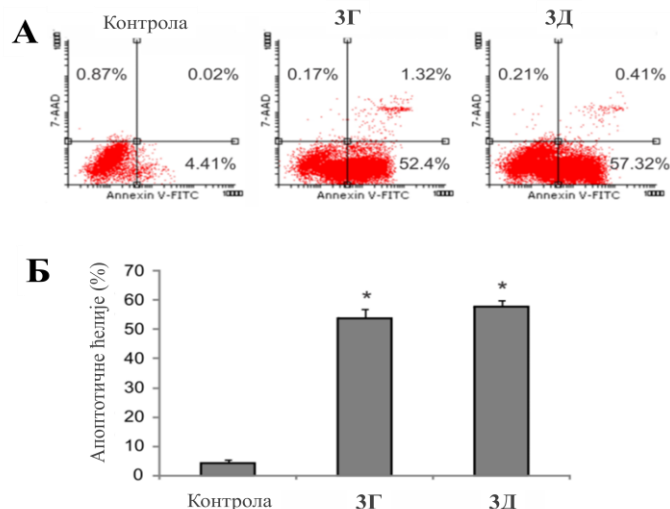
На основу добијених резултата цитотоксичности и селективности (Табеле 5 и 6) једињења 3Г и 3Д су упућена на даља испитивања као што су механизам деловања и интеракције са природним макромолекулима да би се боље одредила подобност ових молекула за потенцијалну примену у клиничкој пракси.

2.3.2.4. Механизам антитуморског деловања једињења 3Г и 3Д

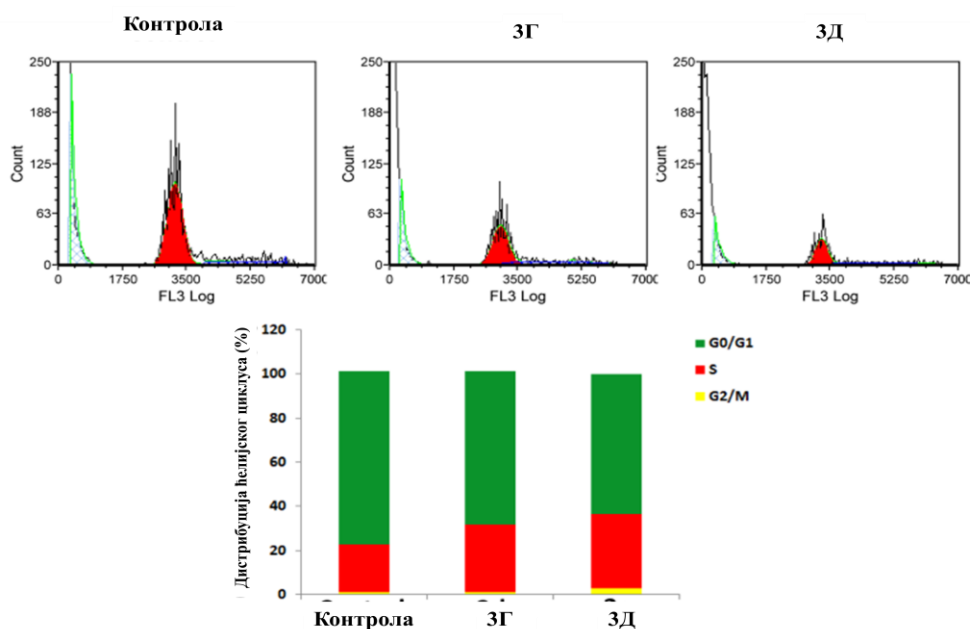
Да би испитали механизам цитотоксичног дејства једињења 3Г и 3Д на А549 ћелијској линији, тип ћелијске смрти је проучаван проточном цитометријом користећи Annexin V/7-AAD за бојење ћелија. Прво је испитиван утицај новосинтетисаних комплекса бакра на апоптозу у ћелијској линији А549. Ћелије А549 третиране су са 10 $\mu\text{g/ml}$ једињења 3Г и 3Д или контролом током 24 часова. Једињења 3Г и 3Д значајно су повећали проценат апоптотичних А549 ћелија (52,4% и 57,32% ране апоптотичне; 1,32% и 0,48% касне апоптотичне), у поређењу са нетретираним (контролним) ћелијама (4,41% и 0,02%) (Слика 49, $p < 0.001$). Није било значајних разлика између процената некротичних А549 ћелија третираних са 3Г (0,17%) и 3Д (0,21%) у поређењу са контролом (0,87%). Ови резултати су показали да 3Г и 3Д у концентрацији у близини IC_{50} изазивају апоптозу у преко 50% А549 ћелија (Слика 49), што указује да је апоптоза врста ћелијске смрти која је индукована тестираним супстанцама.

Даље је испитиван утицај једињења 3Г и 3Д на ћелијски циклус у ћелијској линији А549. Да бисмо открили механизме инхибиторског деловања једињења 3Г и 3Д, утицај испитиваних супстанци на дистрибуцију ћелијског циклуса у А549 ћелијама испитиван је проточном цитометријом (Слика 50).

24-Часовно третирање А549 ћелија са 10 $\mu\text{g/ml}$ једињења 3Г резултирало је статистички значајним повећањем процента ћелија акумулираних у S фази, и смањењем процента ћелија у G0/G1 фази циклуса ($p < 0,05$). Слични резултати добијени су након 24-сатног третмана А549 ћелија са 10 $\mu\text{g/ml}$ једињења 3Д ($p < 0,05$) (Слика 50). Ови резултати показали су да и 3Г и 3Д заустављају митозу и ћелијски циклус у S фази што резултира ћелијском апоптозом.



Слика 49. *Анализа проточне цитометрије са Annexin V/7-AAD бојењем. (А) Тачкасте парцеле представљају проценат одрживих (доњи леви квадрант), раних апоптогичних (доњи десни квадрант), касних апоптогичних (горњи десни квадрант) и некротичних ћелија (горњи леви квадрант). (Б) Процент апоптогичних ћелија у контроли и ћелија третираних са 10 $\mu\text{g/ml}$ 3Г и 3Д.*



Слика 50. *Анализа проточне цитометрије ћелијског циклуса. Изнад: хистограми представљају расподелу ћелија по фазама ћелијског циклуса у нетретираним ћелијама (контрола) и ћелијама третираним са 10 $\mu\text{g/ml}$ једињења 3Г и 3Д. Испод: Оба једињења су индуковала сличан процентуални пораст ћелија у S фази циклуса.*

Апоптоза и ћелијски циклус су директно повезани.¹⁸¹ Машине ћелијског циклуса имају скуп регулаторних молекула који у случају оштећења индукују заустављање ћелијског циклуса, пружајући ћелији време за опоравак. У случају да се оштећена ћелија не може регенерисати наступа апоптоза. Према томе, заустављање циклуса у G2/M фази индуковано једињењима **3Г** и **3Д** може бити могући механизам који покреће апоптозу. Заустављање ћелијског циклуса у S фази изазвано **3Г** и **3Д** указује на блокаду репликације ДНК што представља могући механизам који покреће апоптозу. Треба напоменути да селективна апоптоза за ћелије у S фази указује на могућу инхибицију топоизомеразе I.¹⁸²

2.3.3. Интеракције једињења **3Г** и **3Д** са деоксирибонуклеинском киселином (ДНК)

Мерења интензитета флуоресценције *in situ* формираних врста етидијум-бромида (ЕБ) и ДНК (ЕБ-ДНК) испитивана су у присуству једињења **3Г** и **3Д** у физиолошком пуферу (PBS). Молекулски интеркалатор флуорофора ЕБ нарочито се користи будући да, када је везан за ДНК, показује интензивну емисију због снажне интеркалације између суседних парова база у ДНК.¹⁸³

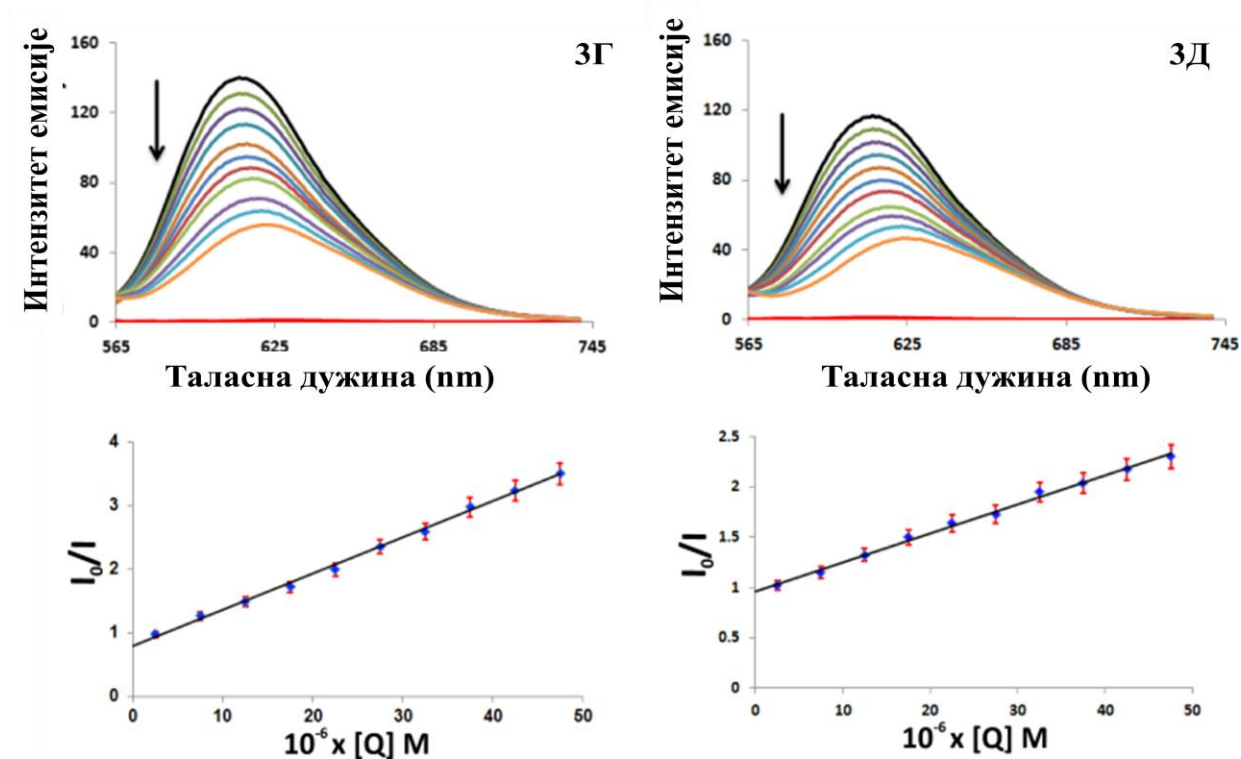
Спектри титрације комплекса ЕБ-ДНК са **3Г** и **3Д** снимани су у распону од 565-740 nm (Слика 51). Интензитет емисије флуоресценције на 613 и 615 nm у раствору ЕБ-ДНК показао је значајно смањење интензитета емисије (хипохромизам) са повећањем концентрација **3Г** и **3Д**. Поред тога, забележено је и померање апсорпционих максимума ка вишим таласним дужинама (црвено померање) ЕБ-ДНК комплексне врсте за око 12 nm. Запажено смањење интензитета флуоресценције ЕБ-ДНК комплекса указује на конкуренцију између тестираних молекула и ЕБ за интеракцију са ДНК.

Смањење интензитета флуоресценције у присуству једињења **3Г** и **3Д** испитивано је помоћу Стерн-Волмерове једначине (1),¹⁸⁴ испитивањем зависности I_0/I од $[Q]$ (Слика 51).

$$I_0/I = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

У једначини (1) I_0 и I су интензитети емисије у одсуству и у присуству једињења **3Г** и **3Д**, $[Q]$ је укупна концентрација једињења **3Г** и **3Д**, k_q је константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуоресценције а τ_0 је просечни животни век ДНК у

одсуству једињења **ЗГ** и **ЗД** (10^{-8} s). K_{sv} је Стерн-Волмерова константа чије су вредности добијене испитивањем зависности I_0/I од $[Q]$.



Слика 51. Интеракције једињења **ЗГ** и **ЗД** са ДНК. Горе: емисиони спектар ЕБ везан за ДНК у одсуству (црне линије) и у присуству једињења **ЗГ** и **ЗД**. Црвене линије одговарају растворима: пуфер + испитивано једињење. $[EB] = 47,5 \mu M$, $[ДНК] = 47,5 \mu M$; $[ЗГ]$ и $[ЗД] = 0-47,5 \mu M$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 500 nm$. Доле: зависност I_0/I од $[Q]$.

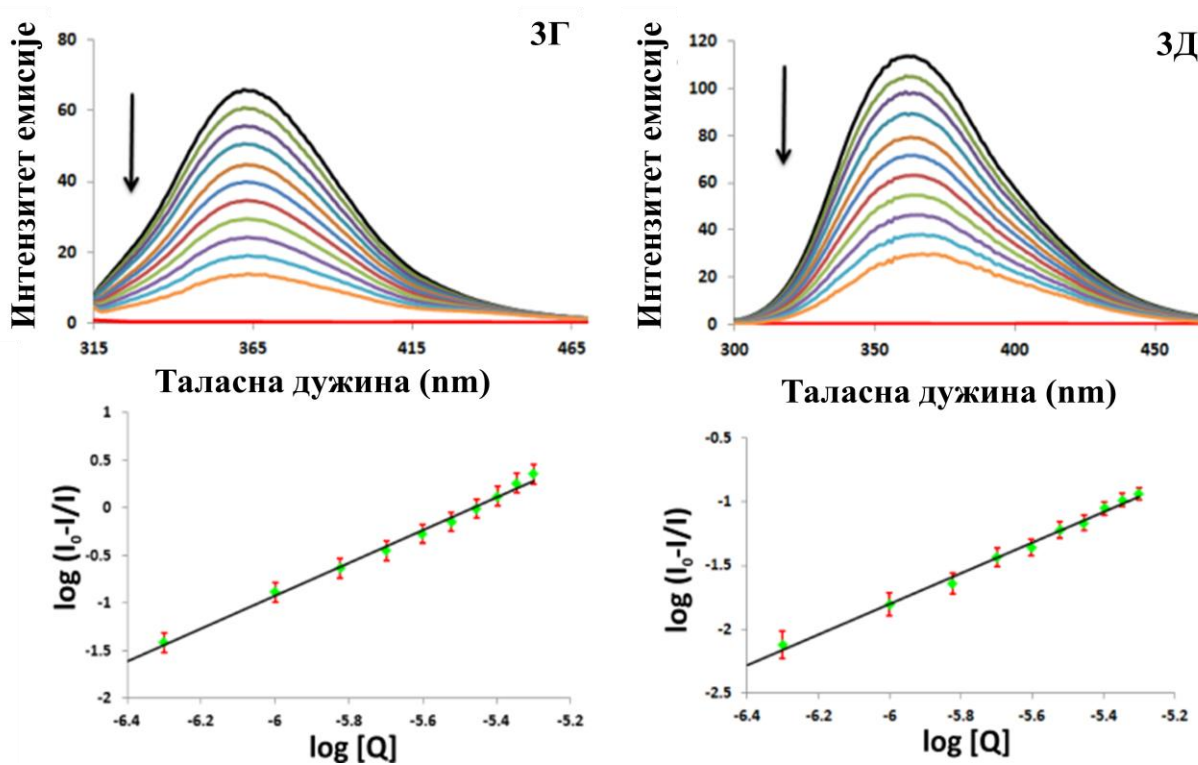
Добијени параметри за **ЗГ** и **ЗД** $[(1,4 \pm 0,2) \times 10^4]$, односно $(2,9 \pm 0,1) \times 10^4 M^{-1}$ који су представљени у Табели 7 указују на то да испитивана једињења имају велики афинитет и ефикасност да замене ЕБ из ЕБ-ДНА комплекса.

Табела 7. Константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуоресценције (k_q), Стерн-Волмерова константа (K_{sv}) и коефицијент корелације (R) за једињења **ЗГ** и **ЗД**.

Једињење	$k_q [M^{-1} s^{-1}]$	$K_{sv} [M^{-1}]$	R
ЗГ	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{12}$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^4$	0,997
ЗД	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^{12}$	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^4$	0,991

2.3.4. Интеракције ЗГ и ЗД са серум албумином

Испитивање афинитета једињења ЗГ и ЗД за везивање за серум албумин (BSA) заснива се на чињеници да ефикасност лекова зависи од њихове способности да се везују за транспортне протеине. Својства везивања испитивана су титрацијом BSA са ЗГ и ЗД методом флуориметријске титрације. Забележени су спектри титрације BSA са ЗГ и ЗД на таласним дужинама од 315–465, односно 300–465 nm. Као што се може видети на Слици 52, са порастом концентрације ЗГ и ЗД континуирано се смањује интензитет флуоресценције BSA.



Слика 52. Интеракције једињења ЗГ и ЗД са BSA. Изнад: Емисиони спектар BSA у одсуству (црне линије) и у присуству једињења ЗГ и ЗД. Црвене линије одговарају растворима: пуфер + испитивано једињење. $[BSA] = 2,0 \mu M$; $[ЗГ]$ и $[ЗД] = 0,0-5,0 \mu M$; $pH=7,4$; $\lambda_{ex}=280 \text{ nm}$. Испод: зависност $\log(I_0-I/I)$ од $\log[Q]$.

Резултати флуоресцентне титрације испитани су употребом једначине (2)¹⁸⁵:

$$\log(I_0-I/I) = \log K_a + n \log[Q] \quad (2)$$

где су I_0 и I су интензитети емисије у одсуству и присуству једињења **ЗГ** и **ЗД**, K_a је константа везивања за **ЗГ** и **ЗД**-BSA, n је број везивних места по молекули BSA а $[Q]$ је укупна концентрација једињења **ЗГ** и **ЗД**. Криве зависности $\log[(I_0-I)/I]$ од $\log[Q]$ приказане су на Слици 52. Вредности K_a и n добијене су из нагиба правих, добијених испитивањем ових зависности. Вредности параметара везивања за **ЗГ**- и **ЗД**-BSA комплексе дате су у Табели 8.

Добијене вредности K_a (Табела 8) које су у оптималном распону, за који се сматра да је 10^4 - 10^6 M^{-1} , показују да оба једињења имају одговарајућу способност везивања за BSA. Поред тога, K_a вредности за **ЗГ**-BSA и **ЗД**-BSA комплексе показују да су оба једињења погодна за дистрибуцију кроз ћелију, односно да се могу користити као лекови.

Табела 8. Везивни параметри (K_a и n) и коефицијент корелације (R) за интеракцију **ЗГ** и **ЗД** са BSA.

Једињење	K_a (M^{-1})	n	R
ЗГ	$(2,9 \pm 0,2) \times 10^6$	1,71	0,991
ЗД	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^5$	1,21	0,996

Број везивних места једињења **ЗД** ($n \approx 1$, Табела 8) указује да се он везује за BSA у молском односу 1:1, док број везивних места ($n \approx 2$) једињења **ЗГ** указује да се он везује за BSA у молском односу 2:1. Поред тога, стехиометрија интеракције **ЗГ** и BSA је даље тестирана применом Жобове методе континуалне варијације. Добијени резултати показали су да максимум Жобове криве одговара моларном односу **ЗГ** : BSA приближно 2 : 1 ($X_{ЗГ} : X_{BSA} = 0,65 \pm 0,02 : 0,35 \pm 0,02$, Слика П25). Ови резултати потврдили су да је 2 : 1 стехиометрија **ЗГ** : BSA.

2.4. Синтеза комплекса паладијума(II) и испитивање биолошке активности

Открићем цисплатине која је ушла у клиничка испитивања 1971. године и која је од тада нашла примену у хемотерапији, комплекси метала добили су на значају у медицини.^{186,187} Иако се лекови на бази Pt(II) нашироко користе као антиканцерогена средства, такође имају неколико недостатака као што су акутна нефротоксичност и неуротоксичност.¹⁸⁸⁻¹⁹³ Поред нуспојава, ограничена примена Pt комплекса на неким типовима ћелија тумора (карцином плућа или карцином јајника), који су показали резистенцију након иницијалног лечења цисплатином, био је додатни разлог за развој нових лекова са побољшаним својствима.^{194,195} Истраживања нових антитуморских лекова са побољшаним својствима дуго су усмерена на синтезу нових лекова који би као металну компоненту садржали неки други племенити метал. Један од главних разлога и великог интересовања за развој антитуморских лекова на бази паладијума заснива се на сличном координационом понашању платине(II) и паладијума(II).¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Испитивања лекова на бази Pd показала су да ова једињења поседују бољу или бар упоредиву антитуморску активност са цисплатином.^{199,200} Паладијумови комплекси са лигандима као што су иминофосфини²⁰¹, иминофосфорани²⁰², моносупституисани пиридини²⁰³, тиосемикарбазони²⁰⁴, пирозоли²⁰⁵ и деривати фенантролина и глицина²⁰⁶ показали су јако добро цитотоксично деловање. Са друге стране, објављено је да су неки комплекси Pd у поређењу са цисплатином и другим Pt комплексима показивали доста мању нефротоксичност.²⁰⁷

2.4.1. Синтеза и карактеризација једињења 4А-Ђ

На основу претходно изнесеног, полазећи од различитих ацилпирувата синтетисана је серија Pd комплекса **4А-Ђ** са циљем да се испита биолошки потенцијал новосинтетисаних молекула. Као што је приказано на Схеми 51, у реакција између $K_2[PdCl_4]$ и серије ацилпирувата у 1:1 раствору вода/метанол синтетисано је шест нових комплекса паладијума (II)¹⁵⁰.

$K_2[PdCl_4]$ у реакцији са ацилпируватима даје комплексе **4А-Ђ** у кратком реакционом времену (~10 мин) на собној температури. Добијени приноси су били и до 90%.

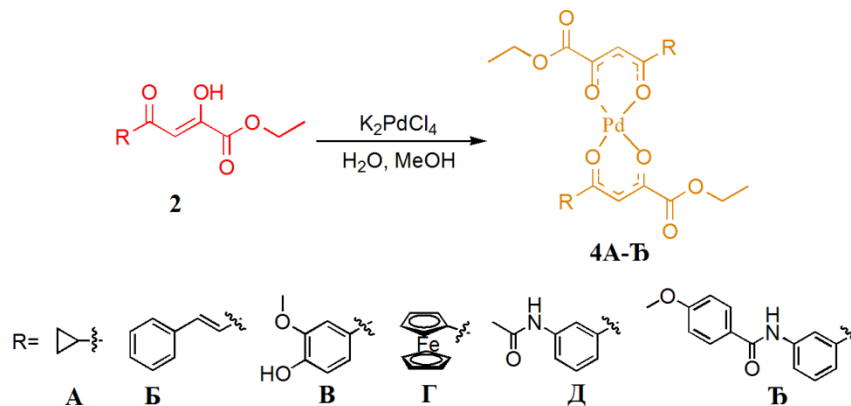


Схема 51. Синтеза нових комплекса паладијума(II) **4А-Ђ**

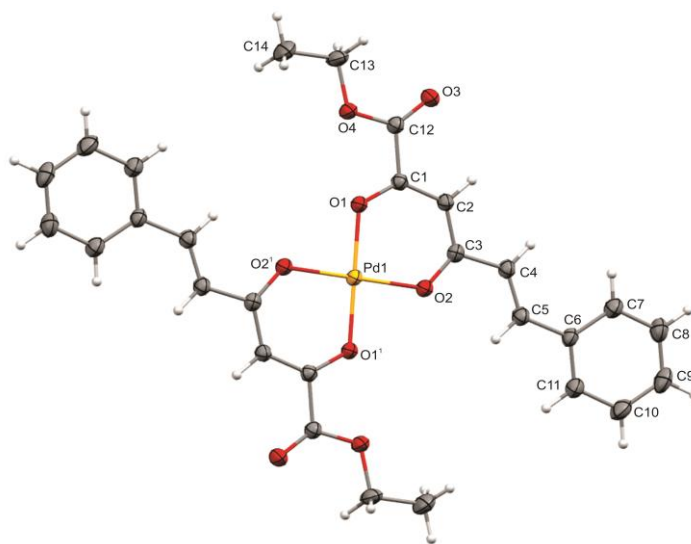
IR спектри свих комплекса у поређењу са одговарајућим спектрима лиганда показују да се $\nu(C=O)$ налази на нижим вредностима хемијских померања за приближно 15 cm^{-1} . Одсуство интензивних трака близу 1270 cm^{-1} у спектрима комплекса а које се појављују у спектрима лиганда као последица деформационих O–H вибрација у равни²⁰⁸ последица је депротоновања O–H групе услед координације лиганда за јон паладијума. Слично је и код 1H NMR спектара, сигнал енолног протона који се јавио на 13,76 ppm у спектру лиганда (Слика П11) недостаје у спектру одговарајућег комплекса **4А** (Слика П21), што имплицира да је лиганд координован за јон паладијума(II). Такође, пик протона који је везан за C=C код лиганда (6,50 ppm) налази се на нешто нижим вредностима хемијског померања у односу на одговарајући сигнал у комплексу **4А** (6,37 ppm).

2.4.1.1. Кристална структура једињења **4Б**

Изглед асиметричне јединице кристалне структуре једињења **4Б** приказан је на слици 53, док је начин кристалног паковања **4Б** приказан на Слици 54.

Са овог становишта треба нагласити две карактеристике једињења **4Б**, а то су координација Pd1 атома и кристално паковање. Атом Pd1 има уобичајену квадратно-планарну геометрију формирану од стране четири атома кисеоника (Слика 53).

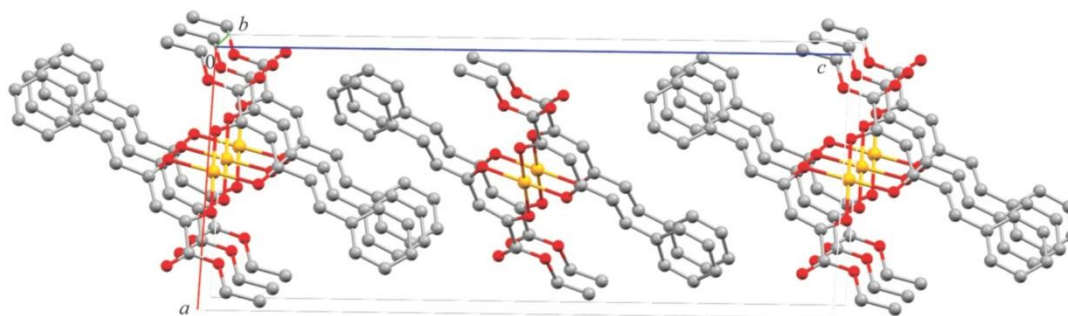
Главне геометријске карактеристике PdO₄ групе приказане су у Табели ПЗ. Ова група је савршено планарна јер Pd1 атом лежи у центру инверзије, а атоми Pd1, O1 и O2 чине једну Pd1/O1/O2 раван. Конформација **4Б** комплекса такође је скоро савршено планарна јер максимално одступање из Pd1/O1/O2 равни свих атома у молекулу (изузимајући H атоме) износи 0,351(6) Å за C13 атом. Угао између равни најмањег квадрата C6/C7/C8/C9/C10/C11 прстена и Pd1/O1/O2 равни износи 5,59(2)°, а угао између најмањег квадрата равни O3/C12/O4/C13/C14 и Pd1/O1/O2 износи 5,33(2)°. Ове вредности заједно са вредностима торзионих углова, приказаних у Табели ПЗ, потврђују скоро идеално планарну геометрију молекула.



Слика 53. ORTEP²⁰⁹ приказ молекулске структуре једињења **4Б** са нумерисаним атомима H и термалним елипсоидима са вероватноћом од 30%.

На Слици 54 приказано је кристално паковање једињења **4Б**, распоређено помоћу две врсте интеракција за слагање. Терминалне фенил групе суседних (Слика 54) молекула слажу се под савршеним међупланарним углом од 0,00° и хоризонталним растојањем од 2,77 Å. Енергија интеракције између два молекула бензена на овој раздаљини износи -2,3 kcal/mol²¹⁰⁻²¹². Штавише, хелатни прстенови паладијума формирају паралелно удаљено хелат-хелатно слагање²¹³ са савршеним међупланарним углом од 0,00°, Ω-Pd-Pd'-Ω' углом од 180,00° и хоризонталним растојањем од 1,331 Å (Ω означава центар хелатног прстена). Енергија интеракције слагања два паладијумова хелатна прстена износи -7,5 kcal/mol²¹⁴, чиме ово хелат-хелат слагање спада у најјачу појединачну интеракцију у овој кристалној

структури. Ниједна водонична веза није пронађена у интра- или интермолекулском простору.



Слика 54. *MERCURY*²¹⁵ приказ кристалног паковања једињења 4Б.

2.4.2. Биолошка испитивања једињења 4А-Ђ

Како би испитали биолошки потенцијал молекула овог типа, једињења 4А-Ђ су тестирана на антитуморску активност. Такође, да бисмо испитали подобност ових молекула за примену у клиничкој пракси у будућности, испитани су механизам цитотоксичног деловања ових молекула и интеракције са биомакромолекулима.¹⁵⁰

2.4.2.1. Антитуморска активност једињења 4А-Ђ

Антитуморски потенцијал комплекса паладијума испитиван је на две ћелијске линије тумора (HeLa и MRC-5 ћелијским линијама) у концентрацији од 100 μ M. Сви комплекси су показали високу цитотоксичну активност на HeLa ћелијама у распону од 70,65% до 88,93%, и различите али незнатне ефекте на MRC-5 ћелијама.

На основу добијених резултата тестираних комплекса на HeLa и MDA-MB 231 ћелијама израчунати су IC₅₀ вредности.

Као што је приказано у Табели 9, ове две ћелијске линије су показале различиту осетљивост на испитиваним једињењима 4А-Ђ. IC₅₀ вредности биле су ниже за HeLa ћелије, што указује на већу осетљивост ових у поређењу са MDA-MB 231 ћелијама. HeLa и MDA-MB 231 ћелијске линије разликују се не само хистолошким типом, већ и карактеристикама као што су различита експресија гена. Стога се очекује различит одговор на цитотоксичне агенсе.

На основу ових резултата изабрали смо три комплекса (**4В**, **4Г** и **4Д**) који су показали најбоље ефекте за даља испитивања. За комплексе је утврђено да утичу на одрживост MRC-5 ћелија. Нормални фибробласти су третирани истим концентрацијама комплексних једињења током 24 и 48 сати, а израчунате вредности IC_{50} представљене су у Табели 9. Оно што је посебно важно, једињења **4Г** и **4Д** су показала добру селективност обзиром да су добијене IC_{50} вредности након 24 и 48 сати биле више или близу 100 μM . Једињење **4В** је показало високу цитотоксичну активност на нормалним фибробластима након 48 h третмана са IC_{50} од 19,22 μM .

Табела 9. *In vitro* инхибиторска активност (IC_{50}) (μM) једињења **4А-Б** на хуманим ћелијским линијама карцинома (*HeLa* и *MDA-MB 231*) и хуманим фибробластима (*MRC-5*) након 24 и 48 h третмана. Цисплатина је коришћена као позитивна контрола. (н.о. - није одређено)

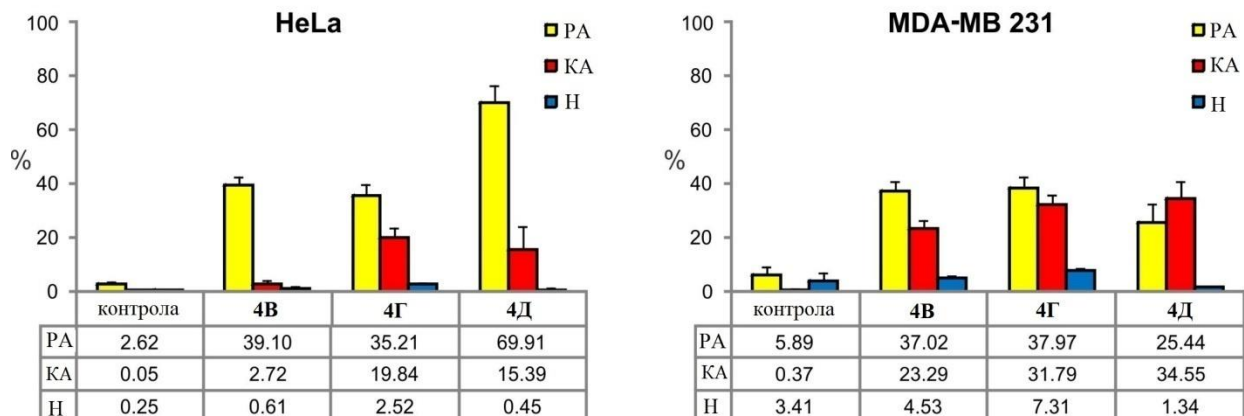
	MDA MB 231		HeLa		MRC-5	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
4А	185,8 ± 48,7	86,3 ± 29,8	52,7 ± 7,43	44,0 ± 4,3	н.о.	н.о.
4Б	165,9 ± 12,8	122,6 ± 16,6	81,8 ± 14,5	27,3 ± 4,4	н.о.	н.о.
4В	55,7 ± 7,2	16,4 ± 6,2	9,7 ± 1,0	0,5 ± 2,8	>100	19,2 ± 8,8
4Г	264,3 ± 39,7	99,1 ± 14,2	55,7 ± 22,9	10,6 ± 2,4	>100	91,6 ± 13,4
4Д	391,3 ± 126,6	36,1 ± 18,1	158,6 ± 70,9	34,3 ± 13,7	>100	>100
4Ђ	382,4 ± 53,0	132,4 ± 21,7	37,4 ± 10,7	18,1 ± 6,1	н.о.	н.о.
cisDDP	101,2 ± 6,7	53,8 ± 2,8	25,7 ± 2,9	8,7 ± 1,3	183,7 ± 16,2	43,1 ± 8,8

2.4.2.2. Механизам антитуморског деловања једињења 4В, 4Г и 4Д

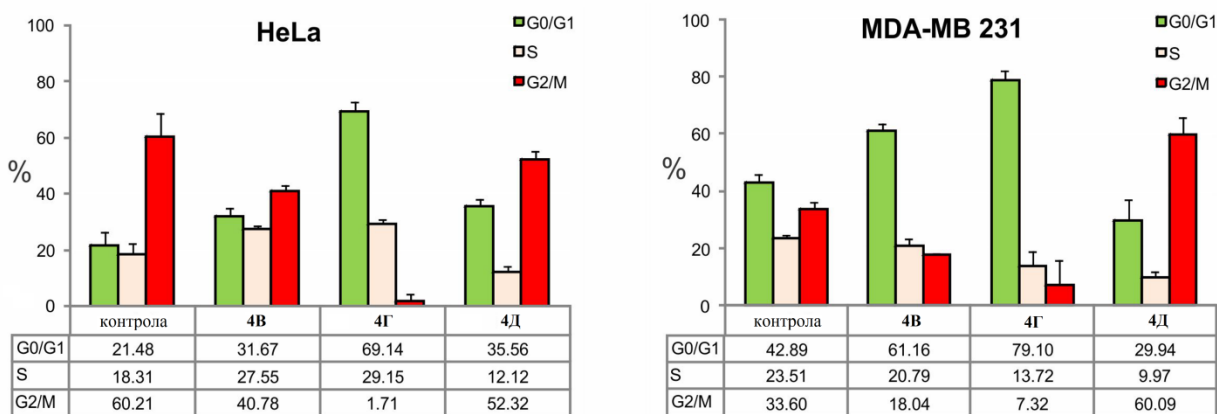
Бојење у ћелијама анексином V-FITC/7-AAD третираних са IC₅₀ концентрацијама једињења 4В, 4Г и 4Д показало је да сви комплекси индукују апоптотични тип ћелијске смрти и у HeLa и MDA-MB 231 ћелијским линијама (Слике 55 и П26). Третиране ћелије углавном су биле ране или касне апоптотичне ћелије, а мањи је проценат био некротичних ћелија. Некроза је врста ћелијске смрти која индукује упалу и оштећење околног ткива, супротно апоптози која је ограничена на поједине ћелије. Стога је циљ антиканцерогене терапије индукција апоптозе у ћелијама тумора и њихова елиминација без нежељених упалних дејстава.

Анализа ћелијског циклуса показала је да једињења 4В, 4Г и 4Д изазивају заустављање ћелијског циклуса. Као што је осетљивост HeLa и MDA-MB 231 ћелија на овим једињењима била различита, њихов утицај на ћелијски циклус такође је био другачији (Слике 56 и П27).

Добијени резултати су показали да у HeLa ћелијама једињење 4Г утиче на заустављање ћелијског циклуса у G₀/G₁ фази, док су једињења 4В и 4Д индуковала стопирање ћелијског циклуса у G₀/G₁ и G₂/M фазама. Код MDA-MB 231 ћелија, једињења 4В и 4Г стопирају ћелијски циклус у G₀/G₁ фази док је једињење 4Д индуковало заустављање циклуса у G₂/M фази. Ови резултати сугеришу да тестирана једињења циљају молекуле који се различито експримирају у тестираним ћелијским линијама. У сваком случају, заустављање ћелијског циклуса највероватније је повезано са апоптозом.



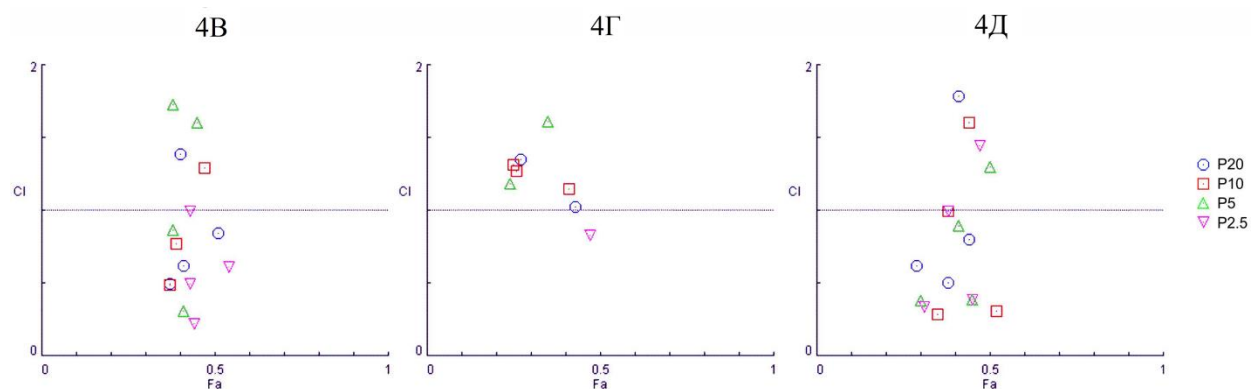
Слика 55. Анализа проточне цитометрије са Annexin V-FITC/7-AAD бојењем. Графикони представљају проценат раних апоптотичних ћелија Анексина V-FITC+7-AAD- (РА), касних апоптотичних ћелија Annexin V+FITC/7-AAD+ (КА) и некротичних ћелија Annexin V-FITC-7-AAD+ (Н) у контроли (нетретираним) и третираним HeLa и MDA-MB 231 ћелијама. Приказани подаци су средње вредности из два независна експеримента.



Слика 56. Анализа ћелијског циклуса. Графикони показују расподелу ћелија по фазама ћелијског циклуса у нетретираним (контрола) и третираним HeLa и MDA-MB 231 ћелијама. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента.

2.4.2.3. Интеракције једињења 4В, 4Г и 4Д са цисплатином

Цитотоксични ефекат цисплатине и тестираних комплекса одвојено, и у комбинацији истих на HeLa ћелијама коришћени су за израчунавање комбинационог индекса (CI). Посматрани су синергистички цитотоксични ефекти за различите комбинације концентрације цисплатине и комплекса **4В**, **4Г** и **4Д** (Слика 57). Нарочито је важно истаћи да су комбинације најнижих концентрација цисплатине и једињења **4В** и **4Д** биле најефикасније, имајући у виду да вредност CI показују јак (најниже концентрације оба) до умерени синергизам (најниже концентрације цисплатине и више концентрације једињења). Ови резултати показују да комплекси **4В** и **4Д** могу бити корисни као адјуванси у терапији тумора, смањењем дозе цисплатине па самим тим и нуспојаве које се јављају код терапије са цисплатином. Треба нагласити да, иако је комплекс **4В** био високо цитотоксичан за нормалне фибробласте (IC_{50} након 48 h био је $19,2 \mu\text{M}$), концентрације које синергистички делују са цисплатином ($0,5$ и $0,25 \mu\text{M}$) нису имале такав утицај. На крају интеракција **4Г** са цисплатином била је антагонистичка при свим концентрацијама (Слика 57). Ипак, ниска IC_{50} вредност ($10,6 \pm 2,37 \mu\text{M}$) указује на његову ефикасност као појединачног цитотоксичног средства.

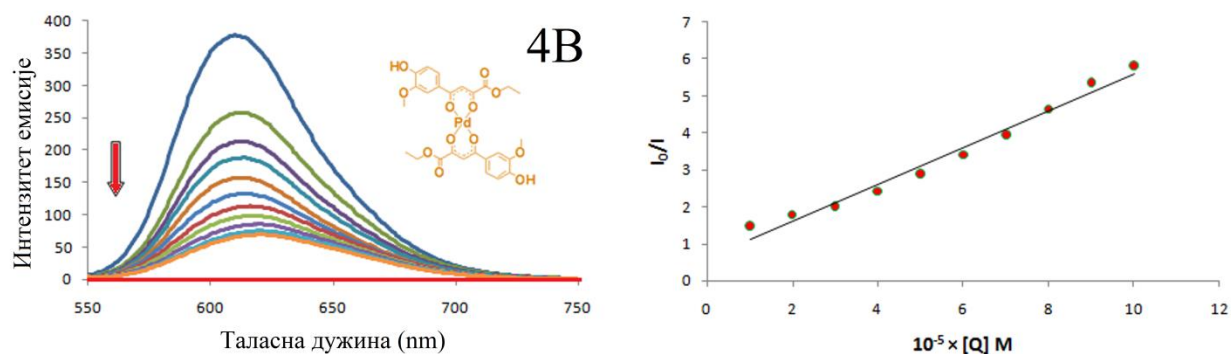


Слика 57. Графикони индекса комбинације који представљају комбиноване ефекте Pd комплекса и цисплатине на HeLa ћелијама. Различите концентрације комплекса комбиноване су са концентрацијама цисплатине: $20 \mu\text{M}$ (cPt $20 \mu\text{M}$, плави кругови), $10 \mu\text{M}$ (cPt $10 \mu\text{M}$, црвени квадрати), $5 \mu\text{M}$ (cPt $5 \mu\text{M}$, зелени троуглови) и $2,5 \mu\text{M}$ (cPt $2,5 \mu\text{M}$, љубичасти троуглови).

2.4.3. Интеракције једињења **4В** са деооксирибонуклеинском киселином

2.4.3.1. Флуориметријска титрација ЕБ-ДНК комплексом **4В**

Компетитивно везивање најактивнијег комплекса паладијума **4В** са ДНК проучавано је праћењем промене интензитета емисије ЕБ везаног за ДНК. ЕБ молекуларни флуорофор, када је везан за ДНК, показује интензивну емисију због своје снажне интеркалације између суседних парова ДНК базе.¹⁸³ Спектри флуориметријске титрације ЕБ-ДНК са **4В** раствора посматрани су у области од 550–750 nm. Добијени спектри флуоресценције ЕБ везаног за ДНА у присуству комплекса **4В** (Слика 58) илуструју да, како концентрација комплекса расте, емисиони спектри на 611 nm показују хипохромизам, а апсорпциони максимум ЕБ-ДНК комплекса је померен ка вишим таласним дужинама.



Слика 58. Интеракције једињења **4В** са ДНК. Лево: емисиони спектар ЕБ-ДНК комплекса у одсуству (плава линија) и у присуству једињења **4В**. Црвена линија одговара рстворима: пуфер + испитивано једињење. $[EB] = 100 \mu M$, $[ДНК] = 100 \mu M$; $[4В] = 0-100 \mu M$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex}=500 nm$. Десно: зависност I_0/I од $[Q]$.

Стерн-Волмерова константа је израчуната користећи једначину (1). K_{sv} вредности добијене су испитивањем зависности I_0/I од $[Q]$. Добијена константа за једињење **4В** $[(5,0 \pm 0,1) \times 10^5 M^{-1}]$ приказана је у Табели 10 и указује да **4В** има велику способност и афинитет за супституцију ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК, снажно се везујући за ДНК.

Табела 10. Константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуоресценције (k_q), Стерн-Волмерова константа (K_{sv}) и коефицијент корелације (R) за једињење **4В**.

Једињење	k_q [$M^{-1} s^{-1}$]	K_{sv} [M^{-1}]	R
4В	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^{13}$	$(5,0 \pm 0,1) \times 10^5$	0,989

2.4.3.2. Мерења вискозности раствора ДНК у присуству **4В**

Да би се додатно разјаснила интеракција између испитиваног једињења **4В** и ДНК, вршена су мерења вискозности. Позната је чињеница да су мерења вискозности раствора који садрже ДНК осетљиви на промену дужине ланца киселине, па према томе могу пружити значајне информације о начину везивању у испитиваном систему.^{216,217} У класичном моделу интеркалације, парови база су раздвојени због интеракције са лигандом, што доводи до продужења спирале ДНК и повећања вискозитета.²¹⁸⁻²²⁰ Супротно томе, лиганди који улазе у ДНК преко неklasичне интеркалације изазивају мање изражену и занемарљиву промену вискозитета.^{221,222}

Релативна вискозност ДНК (η/η_o) повезана је са релативном дужином ДНК (L/L_o) преко једначине (3)^{223,224}:

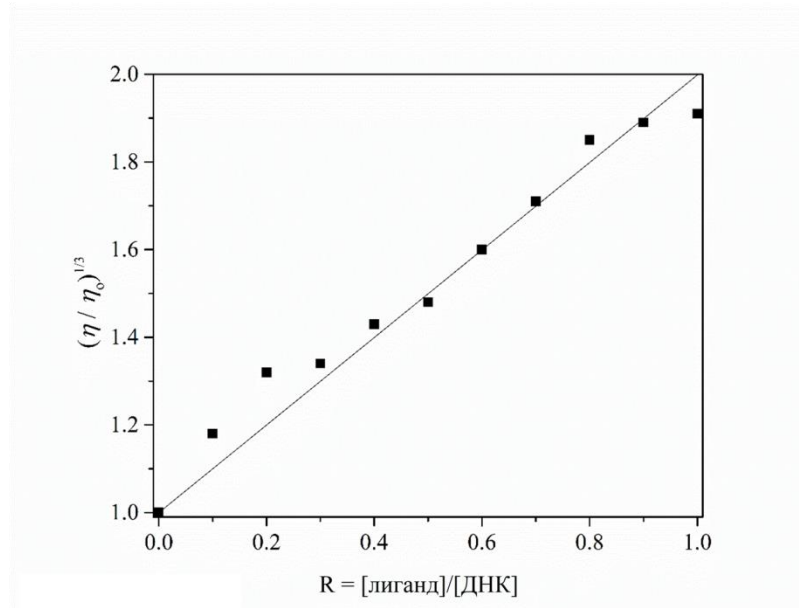
$$\frac{\eta}{\eta_o} = \left(\frac{L}{L_o} \right)^{1/3} \quad (3)$$

Зависност релативне специфичне вискозности (η/η_o)^{1/3} од R ($R = [\text{лиганд}]/[\text{ДНК}]$) у одсуству и у присуству **4В** у *tris*-HCl пуферу приказана је на Слици 59.

Са Слике 59 може се уочити да како концентрација комплекса расте, тако расте и вискозност раствора ДНК. Добијени резултати потврдили су интеркалативни начин интеракције између испитиваног лиганда и ДНК.²²⁵ Такође се примећује да је промена вискозитета израженија у раствору ДНК након додавања комплекса **4В**.

Li и сарадници²²⁶ су показали да је у присуству етидијум-бромида, класичног органског интеркалатора, повећан релативни вискозитет ДНК, а нагиб графа зависности (η/η_o)^{1/3} од R био је 0,96. У нашем случају, релативна вискозност се повећава са нагибом од 0,98. Ови резултати указују на продужење ДНК хеликса због одвајања базних парова

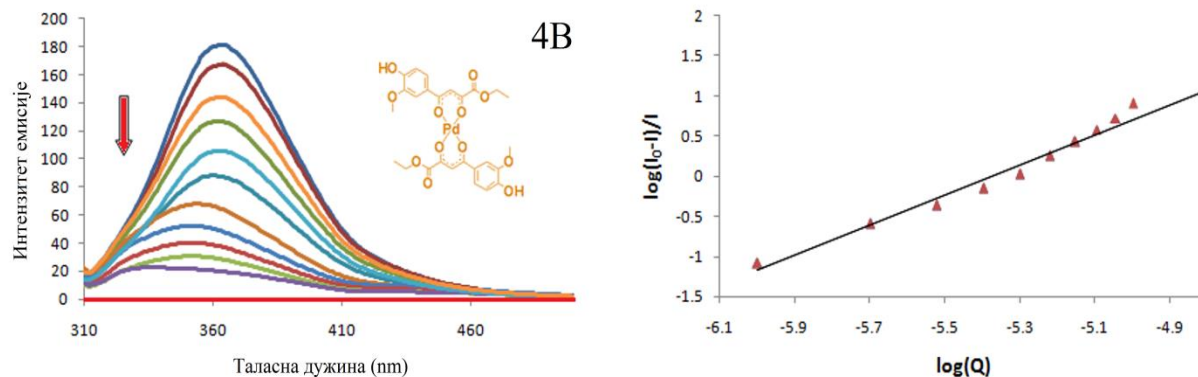
услед интеракције са лигандом. Високе вредности нагиба за комплекс **4В**, сличне вредностима код етидијум-бромид, указују да је у оваквим системима интеркалација доминантнија од било које друге интеракције.



Слика 59. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК (0,01 mM) у пуферу (50 mM NaCl и 5 mM tris-HCl на рН 7,4) у присуству растућих концентрација комплекса **4В** (R).

2.4.4. Интеракције **4В** са серум албумином

Испитивање интеракције BSA са комплексом **4В** засновано је на методи флуориметријске титрације као што је био случај код предходне групе једињења. Спектри су бележени на таласним дужинама у опсегу од 310–500 nm. Молски односи BSA и једињења **4В** пратили су редослед: 1:0 (контрола), 1:0,1, 1:0,2, 1:0,3, 1:0,4, 1:0,5, 1:0,6, 1:0,7, 1:0,8, 1:0,9, 1:1, у укупној запремини 5,0 ml, рН 7,4, на 25°C са временом инкубације 6 h. Добијени резултати су показали да се интензитет флуоресценције BSA континуирано смањује са порастом концентрације једињења **4В** (Слика 60).



Слика 60. Интеракције једињења **4B** са BSA. Лево: емисиони спектар BSA у одсуству (плава линија) и у присуству једињења **4B**. Црвена линија одговара растворима: пуфер + испитивано једињење. $[BSA] = 10.0 \mu M$; $[4B] = 0-10 \mu M$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$. Десно: зависност $\log(I_0-I)/I$ од $\log[Q]$.

Добијени резултати флуориметријске титрације евалуирани су употребом једначине (2). Дијаграм зависности $\log(I_0-I)/I$ од $\log[Q]$ приказан је на Слици 60. K_a и n вредности добијене су из нагиба праве. Израчунати параметри дати су у Табели 11. Добијена вредност K_a која је у оптималном распону показује да једињење **4B** има одговарајућу способност за интеракцију са BSA. K_a вредност за комплекс **4B**-BSA показује да наше једињење има добар потенцијал да се користи у будућности као лек. Број места везивања једињења **4B** ($n \approx 2$, Табела 11) упућује на то да се оно везује за BSA у моласком односу 2: 1.

Табела 11. Везивни параметри (K_a и n) и коефицијент корелације (R) за интеракцију једињења **4B** са BSA.

Једињење	K_a [M^{-1}]	n	R
4B	$(3,6 \pm 0,2) \times 10^5$	1,95	0,989

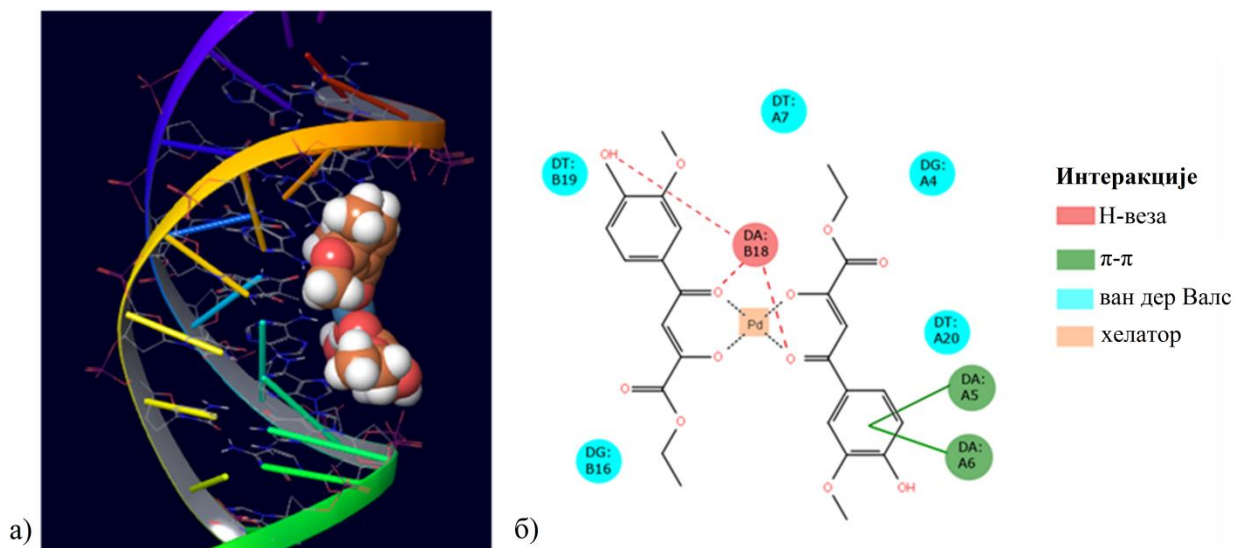
2.4.5. Докинг студија једињења 4В

Као потпора експерименталним резултатима урађена је докинг студија како би се истражила интеракција једињења **4В** са ДНК и BSA, као потенцијалног новог лека. Технике молекулског докинга предлажу најприхватљивији механизам за интермолекулске интеракције неког лека са биомолекулама. На основу резултата молекулског докинга истражени су пожељни начини везивања једињења **4В** са ДНК и BSA, а структуре са најнижим енергијама употребљене су за даља израчунавања. Интеракције између једињења **4В** и ДНК ланца приказане су на Слици 61, а добијени резултати енергије везивања и константе инхибиције приказани су у Табели 12. Резултати докинг студије потврдили су експерименталне резултате у којима је откривено да једињење **4В** интерагује са ДНК интеркалацијом.^{227,228} Као што се може видети са Слике 61, једињење **4В** се налази између нуклеотида ДНК без руптура двоструке спирале ланца.

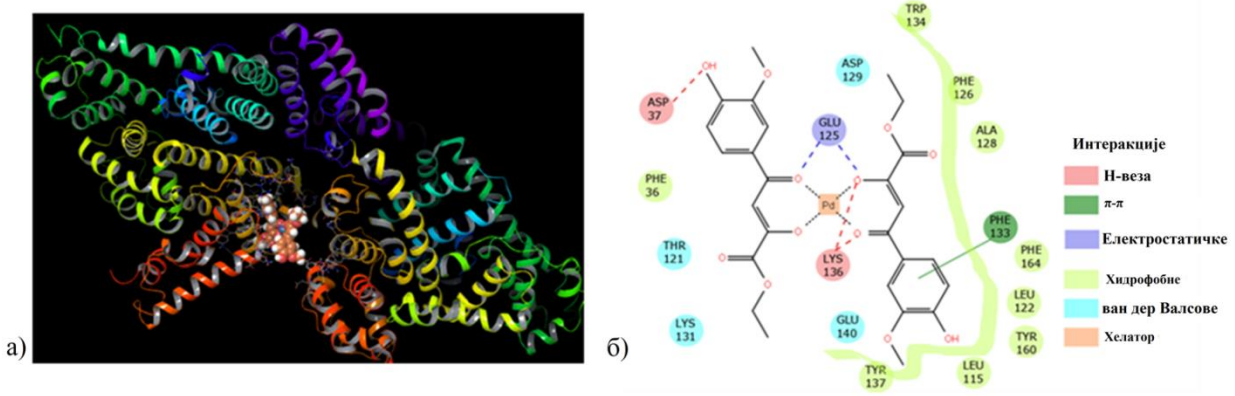
Једињење **4В** ступа у интеракцију са ДНК преко ван дер Валсових сила, π - π интеракције са аденинским базним паром (DA:A5 и DA:A6) и формирањем водоничне везе са DA:B18. Откривено је да слободна енергија везе износи $-58,104 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$, што указује да постоји снажан афинитет испитиваног једињења ка рецепторима ДНК.

Анализа молекулског докинга једињења **4В** са BSA такође је спроведена да би се потврдили експериментални резултати и утврдили могући начини и места везивања. Резултати докинг студије за једињење **4В** са BSA сумирани су у Табели 12, а 3D приказ везивања једињења **4В** за BSA представљен је на Слици 62.

Из добијених резултата види се да је једињење **4В** смештено у "цепу" молекула BSA (Слика 62) у домену I.²²⁹ Интеракције између **4В** и BSA јављају се у виду формирања водоничне везе између атома кисеоника из **4В**, COO^- групе из Asp 37 и NH_2 групе Lis 136. Везивне силе додатно јачају услед електростатичких интеракција између Glu 125 и **4В**, као и π - π интеракција између Phe 133 и ароматичног прстена једињења **4В**. Формирање хидрофобног цепа (Tyr 137, Leu 115, Tyr 160, Leu 122, Phe 164, Ala 128, Phe 126 и Trp 134) има велики допринос код хидрофобних интеракција у укупној енергији везе. Утврђено је да је слободна енергија везе $-58.104 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$, што указује на снажан афинитет за интеракцију између **4В** и BSA.



Слика 61. а) Молекулски докинг једињења **4В** са ДНК, б) дводимензионални приказ интеракција



Слика 62. а) Молекулски докинг једињења **4В** са BSA, б) дводимензионални приказ интеракција

Табела 12. Докинг параметри једињења **4В**

Једињење	Докинг учинак	Енергија везе / $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Константа инхибиције / μM
Молекул 4В			
ДНК	-8,127	-58,104	0,977
цисплатина ¹⁴¹	-6,345	-37,06	0,304
BSA	-7,003	-45,072	1,268
цисплатина ¹⁴¹	-5,321	-20,18	291,35

2.5. Синтеза пиролидинона и испитивање њихове биолошке активности

Будући да се мало зна о антитуморском и антиоксидативном потенцијалу ових молекула, наш циљ је био да синтетисемо серију ових молекула¹⁵¹ и испитамо њихов биолошки потенцијал примарно у овом домену а касније и антимикуробни потенцијал.

2.5.1. Синтеза и карактеризација пиролидинона 5A-X

За синтезу пиролидинона користили смо трокомпонентну реакцију етил-2-хидрокси-4-оксо-4-(тиофен-2-ил)-бут-2-еноата (2Д) и различито супституисаних ароматичних алдехида и ароматичних амина. Синтетисано је двадесет и пет нових 1,5-диарил-4-(2-тиенилкарбонил)-3-хидрокси-3-пиролин-2-она (5А, 5B-X), док је један од раније познат (5Б) (Схема 52). Као што је приказано на Схеми 52, сва једињења су добијена у глацијалној сирћетној киселини као катализатору и растварачу по поступку описаном раније у литератури²³⁰ уз мање корекције услова реакције.

Сва новосинтетисана једињења окарактерисана су UV-Vis, NMR (¹H и ¹³C спектри за једињење 5А приказани су прилогу, Сlike П23 и П24), MS спектроскопијом и елементалном анализом. За једињење 5Б које је прекристалисано из DMSO раствора одговарајућег једињења одређена је кристална структура коришћењем рендгенске структурне анализе одговарајућег монокристала.

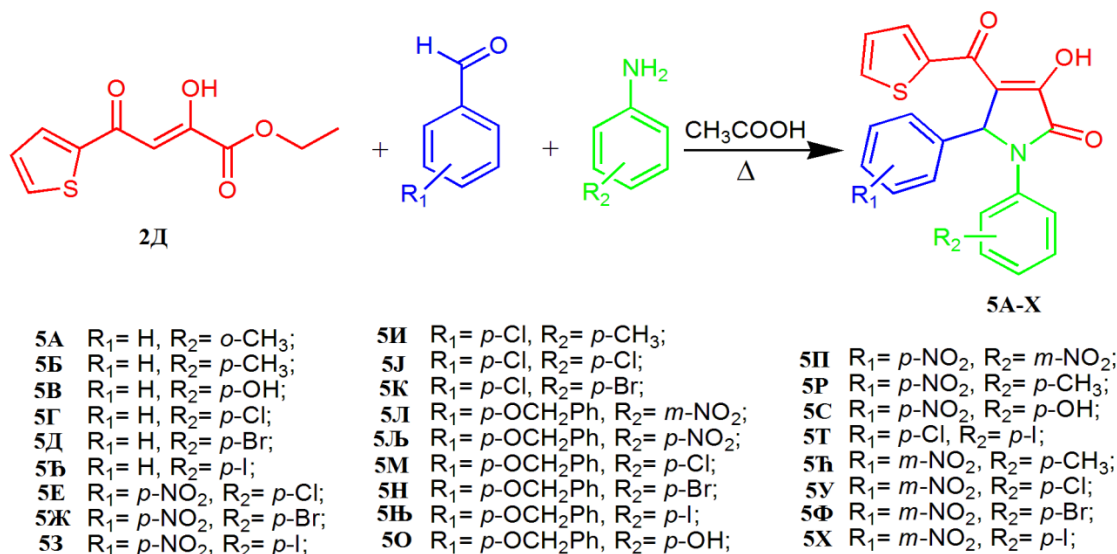
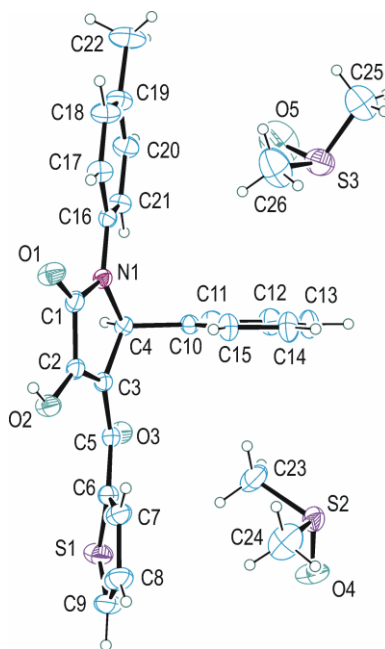


Схема 52. Синтеза 1,5-диарил-4-(2-тиенилкарбонил)-3-хидрокси-3-пиролин-2-она (5A-X).

2.5.1.1. Кристална и молекулска структура једињења 5Б

Резултати рендгенска дифракција испитиваног монокристала су показали да је једињење **5Б** кристалисало са два молекула DMSO (Слика 63). Јасно је потврђено присуство две карбонилне (C1–O1 и C5–O3) и једне хидроксилне групе (C2–O2H) у молекулу **5Б**. Средишњи N1 петочлани прстен је готово идеално планаран (средњи квадрат девијације атома је 0,012 Å). Овај прстен формира диедарски угао од 16,9(1)° са суседним фенил прстеном C16–C21. Карбонилна група C5–O3, усмерена између N1 и S1 петочланих прстенова [торзиони углови C4–C3–C5–O3 и O3–C5–C6–S1 износе -16,1(3) и -18,0(3)°], приближно на два једнака дела сече диедарски угао између ова два хетероцикла. Са диедарским углом од 89,2(1)°, фенилни прстен C10–C15 и центрани прстен N1 позиционирани су у готово идеалном ортогоналном положају.

Веза C2–C3 са дужином од 1,341(3) Å (Табела П4) најкраћа је C–C веза у целом молекулу, док је најдужа измерена C4–C10 од 1,522(3) Å. N1 је очигледно sp^2 хибридизован атом, будући да сума углова веза око овог атома износи 359,9° и све N–C везе су копланарне. N1 формира три N–C везе са значајно различитим дужинама (Табела П4). Најкраћа измерена била је N1–C1 веза са интератомским растојањем од 1,369(3) Å.



Слика 63. Кристална структура и шема нумерисања атома једињења **5Б**.

Једина класична интермолекулска водонична веза у кристалној структури једињења **5Б** јесте $O2-H\cdots O4^i$ веза. Међутим ова веза има прилично малу удаљеност $H\cdots O$ од 1,78 (3) Å [$O2-H = 0,80(3)$ Å, $O2\cdots O3^i = 2,538(3)$ Å, $O2-H\cdots O3^i = 159(3)^\circ$; код симетрије: (i) x+1, y, z]. Карбонилне групе C1–O1 и C5–O3 формирају врло слабе C–H \cdots O водоничне везе са удаљеностима $H\cdots O$ већим од 2,55 Å. Интермолекулске интеракције C–H \cdots π по фреквенцији доминирају у кристалном паковању. На Слици 63 може се видети да су метил групе оба молекула DMSO усмерене ка центрима суседних π система.

2.5.2. Биолошка испитивања једињења 5А-Х

Како би испитали биолошки потенцијал једињења **5А-Х**, сва једињења су тестирана на антиоксидативну, антимикуробну и антитуморску активност. Додатно, да бисмо испитали подобност ових молекула за примену у клиничкој пракси у будућности, испитан је механизам деловања ових молекула са биомакромолекулима.

2.5.2.1. Антиоксидативна активност једињења 5А-Х

За тестирање антиоксидативног потенцијала нових деривата пиролидинона користили смо DPPH тест. Резултати уклањања DPPH радикала испитиваних узорака приказани су у Табели 13. Испитивани узорци показали су релативно високу активност уклањања DPPH радикала (IC_{50} у распону од 166,75-727,17 µg/ml), иако је активност била нижа од стандарда (аскорбинске киселине). Међу тестираним једињењима, једињење **5О** је показало највећу активност уклањања DPPH радикала са IC_{50} од 166,75 µg/ml. Ова активност је такође била добра за једињења **5З**, **5Д**, **5В** и **5Д**.

Резултати испитивања редукционе моћи тестираних узорака сумирани су у Табели 14. Измерене вредности апсорбанције варирале су од 0,001 до 0,176. Велика апсорбанција указује на велику редукциону моћ. Као што је приказано у Табели 14, редукциона моћ зависна је од концентрације узорака. Једињења **5О**, **5В** и **5С** показала су највећу редукујућу моћ, мада знатно нижу од стандарда (аскорбинска киселина).

Табела 13. Потенцијал уклањања DPPH радикала једињења 5А-Х.

Тестирана једињења	Уклањање DPPH радикала IC ₅₀ (µg /ml)
5А	647,24 ± 2,11
5В	461,54 ± 1,68
5Г	483,28 ± 2,81
5Д	438,75 ± 1,56
5Ђ	531,16 ± 2,21
5Е	654,19 ± 2,17
5Ж	539,22 ± 2,06
5З	397,72 ± 1,47
5И	675,64 ± 2,17
5Ј	665,43 ± 2,16
5К	639,11 ± 2,13
5Л	569,45 ± 2,19
5Љ	708,82 ± 2,57
5М	464,09 ± 1,69
5Н	625,56 ± 2,26
5Њ	561,19 ± 2,09
5О	166,75 ± 1,24
5П	692,86 ± 2,13
5Р	727,17 ± 2,41
5С	613,85 ± 2,09
5Т	641,42 ± 2,23
5Ђ	683,66 ± 2,28
5У	646,08 ± 2,29
5Ф	704,71 ± 2,39
5Х	631,32 ± 2,25
Аскорбинска киселина	21,18 ± 1,12

Табела 14. Редукциона моћ једињења 5А-Х

Једињење	Апсорбанца (700 nm)		
	1000 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
5А	0,023 ± 0,002	0,017 ± 0,001	0,006 ± 0,001
5В	0,117 ± 0,012	0,084 ± 0,009	0,071 ± 0,008
5Г	0,018 ± 0,002	0,014 ± 0,002	0,009 ± 0,001
5Д	0,077 ± 0,009	0,019 ± 0,002	0,014 ± 0,002
5Ђ	0,011 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,005 ± 0,001
5Е	0,038 ± 0,004	0,030 ± 0,003	0,026 ± 0,002
5Ж	0,042 ± 0,004	0,034 ± 0,003	0,029 ± 0,003
5З	0,030 ± 0,003	0,027 ± 0,002	0,025 ± 0,002
5И	0,034 ± 0,003	0,028 ± 0,002	0,020 ± 0,002
5Ј	0,011 ± 0,001	0,004 ± 0,000	0,001 ± 0,000
5К	0,021 ± 0,002	0,014 ± 0,001	0,011 ± 0,001
5Л	0,015 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,002 ± 0,000
5Љ	0,019 ± 0,002	0,007 ± 0,001	0,003 ± 0,000
5М	0,046 ± 0,005	0,034 ± 0,003	0,029 ± 0,003
5Н	0,010 ± 0,001	0,003 ± 0,000	0,001 ± 0,000
5Њ	0,009 ± 0,001	0,002 ± 0,000	0,001 ± 0,000
5О	0,176 ± 0,019	0,106 ± 0,012	0,073 ± 0,007
5П	0,026 ± 0,003	0,023 ± 0,002	0,020 ± 0,002
5Р	0,024 ± 0,002	0,017 ± 0,002	0,006 ± 0,001
5С	0,108 ± 0,011	0,038 ± 0,003	0,036 ± 0,004
5Т	0,084 ± 0,009	0,040 ± 0,003	0,021 ± 0,002
5Ѡ	0,049 ± 0,005	0,030 ± 0,003	0,026 ± 0,003
5У	0,027 ± 0,002	0,022 ± 0,002	0,020 ± 0,002
5Ф	0,031 ± 0,003	0,025 ± 0,002	0,021 ± 0,002
5Х	0,040 ± 0,004	0,030 ± 0,002	0,024 ± 0,003
Аскорбинска киселина	2,421 ± 0,091	1,936 ± 0,063	1,097 ± 0,037

2.5.2.2. Антимикробна активност једињења 5А-Х

За испитивање антимикробног потенцијала, једињења **5А-Х** тестирана су на четири врсте бактерија и пет врста гљивица (узročника разних болести људи, животиња и биљака, који производе микотоксине и изазивају кварење хране). Резултати *in vitro* тестирања антибактеријских и антигљивичних активности испитиваних једињења на одабране врсте микроорганизама приказани су у Табелама 15 и 16.

Што се тиче антибактеријске активности, МИС вредности за тестирана једињења кретала се у распону од 0,312 до 10 mg/ml. Међу тестираним једињењима, **5К** и **5М** су показала значајну инхибиторску активност на соју бактерија *Staphylococcus aureus* у ниским концентрацијама (МИС су биле 0,312, односно 0,625 mg/ml). Резултати су такође показали да је најосетљивија бактерија била *Staphylococcus aureus*, док су преостали сојеви бактерија били отпорнији.

Израчунате МИС вредности за тестирана једињења на сојевима гљивица кретале су се у распону од 0,625 до 10 mg/ml. Најбољу антифунгалну активност показала су једињења **5Л**, **5М** и **5Њ** на соју *Trichophyton mentagrophytes* са МИС од 0,625 mg/ml. Антифунгална активност такође је била добра за једињења **5Е** и **5И** на соју *Candida albicans* и једињења **5Е**, **5Ж**, **5З**, **5Н**, **5Р**, **5У**, **5Ф** и **5Х** на соју *T. mentagrophytes* са МИС вредностима од 1,25 mg/ml.

Интензитет антимикробног деловања варирао је у зависности од типа тестираног једињења и врсте микроорганизама. Тестирана једињења су имала сличну антибактеријску и антифунгалну активност. Међу бактеријама, сој бактерија *Staphylococcus aureus* био је најосетљивији. *S. aureus* је грам-позитивна бактерија, док су преостале тестиране бактерије грам-негативне. Ови резултати нису неочекивани, јер као што смо раније напоменули, познато је да грам-негативне бактерије за разлику од грам-позитивних бактерија садрже спољашњу мембрану која има заштитну улогу и спречава улазак штетних једињења укључујући антибактеријска средства²³¹. Међу гљивицама, најосетљивији сој гљивица био је *T. mentagrophytes*. То су патогене гљивице које инфицирају људску кожу, нокте и косу, и изазивају дерматофитозу.

Табела 15. Антибактеријска активност једињења 5А-Х

Бактерија	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
МИС (mg/ml)				
5А	2,5	10	10	10
5В	10	10	10	10
5Г	5	10	10	10
5Д	5	/	10	10
5Ђ	10	10	10	10
5Е	1,25	10	5	5
5Ж	1,25	10	5	5
5З	2,5	10	5	5
5И	5	10	5	5
5Ј	10	10	10	5
5К	0,312	10	10	5
5Л	5	5	5	5
5Љ	10	10	10	10
5М	0,625	10	5	5
5Н	10	10	10	10
5Њ	10	10	10	10
5О	2,5	10	10	5
5П	2,5	10	5	5
5Р	2,5	10	5	5
5С	10	10	10	10
5Т	2,5	10	10	5
5ћ	5	10	5	5
5У	2,5	10	5	5
5Ф	2,5	10	5	5
5Х	2,5	10	5	5
Стрептомицин	0,031	0,031	0,062	0,062

Табела 16. Антифунгална активност једињења 5А-Х

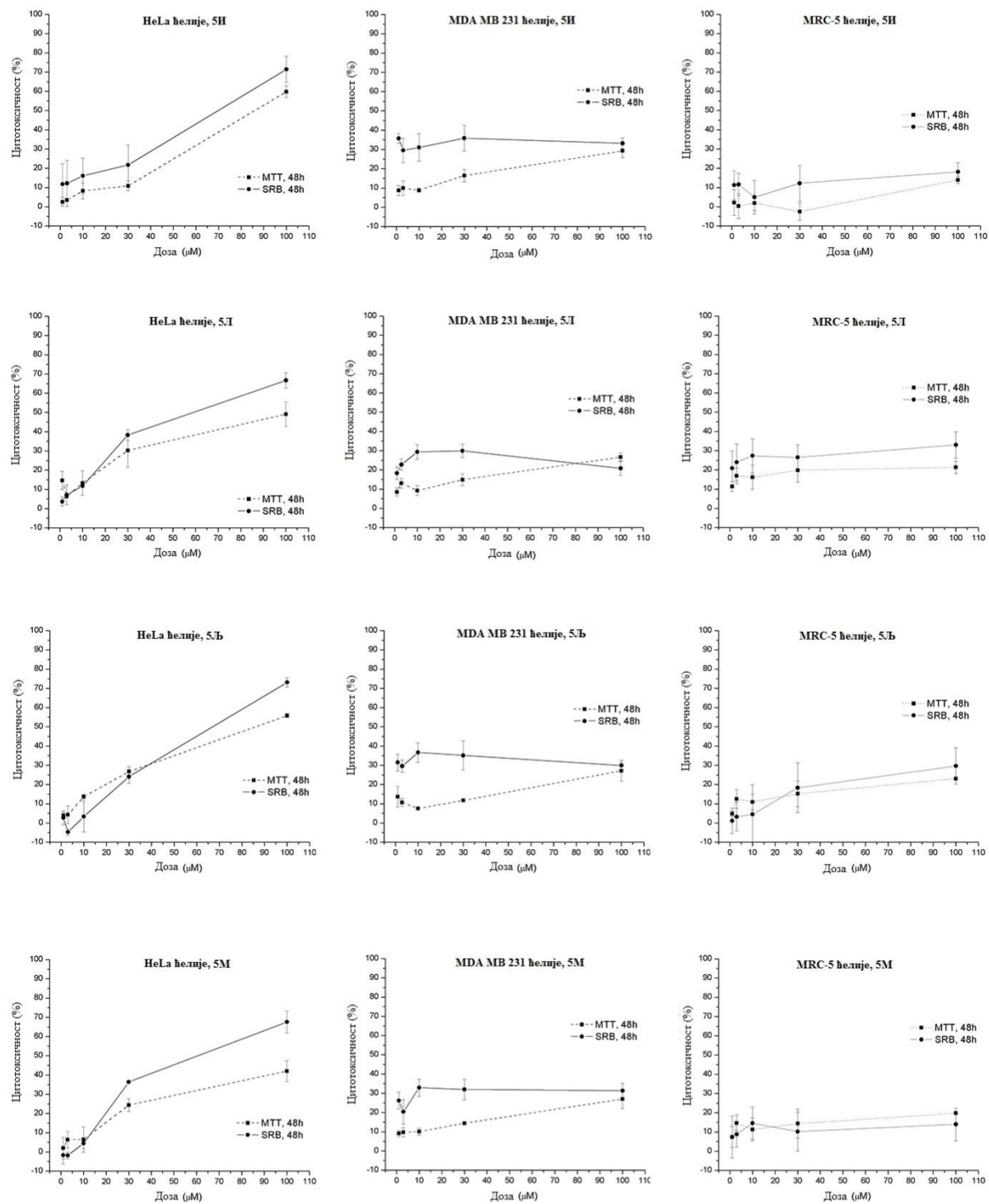
Гљивица	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium italicum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Mucor mucedo</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
Једињење	MIC (mg/ml)				
5А	10	5	10	5	2,5
5В	10	5	10	5	2,5
5Г	10	5	10	10	2,5
5Д	10	5	10	10	2,5
5Ђ	10	5	10	5	2,5
5Е	10	5	1,25	5	1,25
5Ж	10	5	2,5	5	1,25
5З	5	5	5	5	1,25
5И	10	5	1,25	5	2,5
5Ј	10	5	2,5	5	2,5
5К	10	5	2,5	5	2,5
5Л	5	2,5	5	2,5	0,625
5Љ	10	10	10	10	5
5М	5	2,5	5	2,5	0,625
5Н	10	2,5	10	5	1,25
5Њ	10	2,5	10	5	0,625
5О	10	5	10	10	2,5
5П	10	5	10	5	2,5
5Р	10	5	5	5	1,25
5С	5	2,5	10	5	2,5
5Т	10	5	2,5	5	2,5
5Ћ	10	5	2,5	5	2,5
5У	10	5	2,5	5	1,25
5Ф	10	5	2,5	5	1,25
5Х	10	5	2,5	5	1,25
Кетоконазол	0,078	0,156	0,039	0,156	0,078

2.5.2.3. Антитуморска активност једињења 5А-М

У првој фази скрининга, цитотоксична активност новосинтетисаних једињења (**5А-М**) испитивана је на HeLa, MDA-MB 231 и MRC-5 ћелијским линијама употребом МТТ теста. Ћелије су третиране истим дозама (100 μM) једињења. Четири једињења (**5И**, **5Ј**, **5Љ** и **5М**) која су показала највећу цитотоксичност на малигним ћелијама и најбољу селективност према нормалним ћелијама изабрана су за даље експерименте.

Цитотоксични ефекат једињења **5И**, **5Ј**, **5Љ** и **5М** даље је испитан у распону од пет концентрација на све три ћелијске линије током 24 h и 48 h употребом МТТ и SRB тестова. Главна разлика је што МТТ мери метаболичку активност, док се SRB заснива на мерењу садржаја ћелијског протеина и индиректно мери број ћелија. Према томе, обе анализе су урађена да би утврдили да ли тестирана једињења убијају или утичу на метаболичку активност ћелија.^{232,233} Генерално, МТТ и SRB тестови су показали упоредиве вредности цитотоксичног ефекта за сва тестирана једињења на све три ћелијске линије. Резултати оба испитивања представљени су у облику упоредних крива зависности употребљених доза од одговора (Слика 64).

Једињења **5И**, **5Ј**, **5Љ** и **5М** су показала цитотоксични ефекат на тестираним ћелијским линијама тумора, нешто јачи на HeLa него на MDA-MB 231 ћелијама. Израчунате IC_{50} вредности за MDA-MB 231 и фибробласте MRC-5 биле су изнад највиших коришћених концентрација у експериментима ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Показано је да су сви третмани на HeLa ћелијској линији индуковали инхибицију раста ове ћелије. Једињење **5Ј** показало је најјачи цитотоксични ефекат након 48h третмана HeLa ћелија са IC_{50} од $40,9 \pm 5,9 \mu\text{M}$ и $54,35 \pm 8,56 \mu\text{M}$ за SRB и МТТ тестове (Табела П5).



Слика 64. Упоредне криве зависности дозе од одговора МТТ и SRB теста након 48h третмана HeLa, MDA-MB 231 и MRC-5 једињењима 5И, 5Л, 5Љ и 5М. Резултати су представљени као средња вредност ± СД.

Из горе поменуте анализе може се приметити да је, када је R_1 бензилокси група значајно побољшана активност, што се може видети на примеру три једињења (**5Л**, **5Љ** и **5М**) која садрже овај фрагмент. Неки значајанији утицај супституената R_1 није примећен, осим у случају **5И** ($R_1 = Cl$) где је такође примећено побољшање у активности, али у мањој мери у односу на једињења са бензилокси групом. Такође, примећено је да премештањем нитро групе из мета у пара положај, као што се може видети код једињења **5Л** и **5Љ**, долази до промене активности. Нешто боље антитуморско деловање примећено је када је нитро група у мета положају. Ова различита активност је такође примећена за нека органска једињења у скорије објављеним студијама,²³⁴ а највероватније је повезана са стерним ефектима у самом молекулу. Мала разлика у активности примећена је код једињења **5М**, када је $R_4 = Cl$, показујући позитивну промену антитуморске активности у поређењу са једињењем **5Љ**.

У литератури нема много података о антитуморским ефектима ове класе једињења. Неколико студија показује да њихова биолошка активност зависи од модификација хетероцикличног прстена. Деривати пиридинона су показали *in vitro* антитуморску активност на три ћелијске линије хепатома (MG-22A), меланома (V16) и неуробластома (Neuro2A).²³⁵ Студије *in vitro* показале су да су неки деривати пиридинона имају генотоксичне ефекте на коштаном сржи мишева.²³⁶ Такође постоје подаци о антитуморским ефектима неких пиридинона на хуманим малигним ћелијама, попут U-937 ћелија.²³⁷ Готово да нема података о механизму деловања ових једињења, као и о врсти ћелијске смрти коју они изазивају, па смо испитали да ли је цитотоксичност тестираних једињења индукована апоптозом или заустављањем ћелијског циклуса.

2.5.2.4. Механизми цитотоксичне активности једињења **5И**, **5Л**, **5Љ** и **5М**

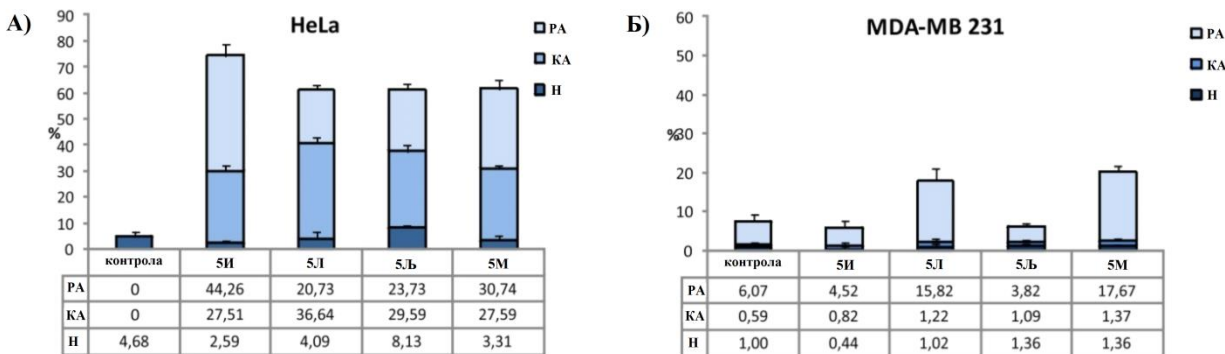
Да би се одредио тип ћелијске смрти узрокован од стране изабраних пиридинона урађен је Annexin V-FITC/7-AAD тест. Анализа проточне цитометрије је показала да сва тестирана једињења индукују апоптозу у HeLa ћелијама, док је проценат некротичних ћелија занемарљив. С обзиром да апоптоза, за разлику од некрозе, не изазива упалне процесе у ћелијама и оштећење околног ткива, агенси који индукују ову врсту ћелијске смрти могу се сматрати потенцијалним антитуморским лековима.²³⁸ У складу са резултатима МТТ и SRB тестова, проточна цитометрија је показала да третман MDA-MB

231 ћелија са 100 μ M концентрацијом свих испитиваних једињења резултира малим процентом мртвих, претежно апоптотичких ћелија (Слика 65).

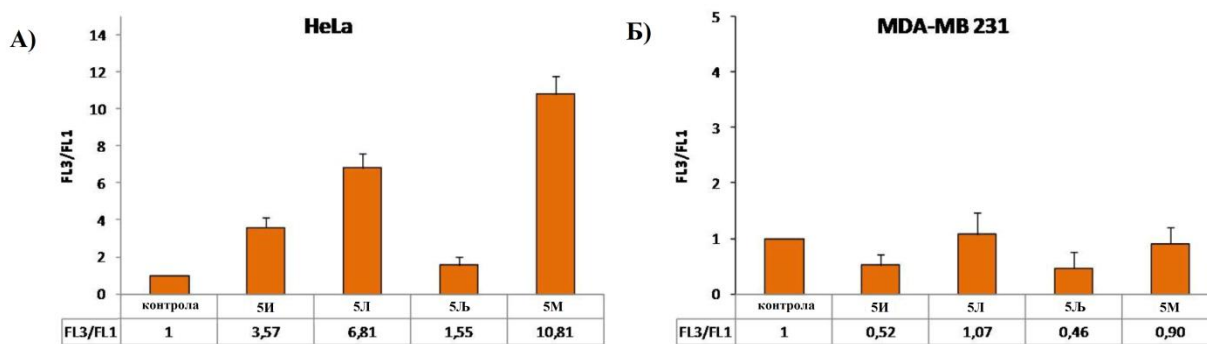
Слично претходном, утицај деривата пирролидинона на аутофагију био је различит код ових ћелијских линија. У HeLa ћелијама је запажено да једињења **5Л** и **5М** индукују значајано повећање интензитета црвене флуоресценције, док једињење **5И** индукује умерено повећање интензитета. Супротно томе, у MDA-MB 231 ћелијама не само да једињења **5Л** и **5М** нису утицала на индукцију аутофагије, већ су једињења **5И** и **5Љ** у одређеној мери чак инхибирала аутофагију (Слика 66).

Да би открили улогу коју аутофагија игра у цитотоксичности изазваној дериватима пирролидинона, ћелије су третиране инхибитором аутофагије хлорохином (CQ). Резултати су показали различите ефекате једињења **5Л** и **5М** у HeLa и MDA-MB 231 ћелијама (Слика 67). Док у HeLa ћелијама долази до повећане инхибиције апофазе аутофагијом, у MDA-MB 231 ћелијама долази до смањења V-позитивних ћелија. Код једињења **5И** и **5Љ**, којим су третиране и HeLa и MDA-MB 231 ћелије, инхибиција аутофагије није утицала на индукцију апоптозе.

Добро је документована двострука улога аутофагије, катаболичког процеса којим ћелије разграђују и рециклирају своје састојке. Аутофагија је први пут описана као механизам за преживљавање ћелија који одржава нормалну ћелијску функцију у условима интра и ванћелијских стресова. Међутим, аутофагија може такође активирати апоптотски програм и поспешити ћелијску смрт. Из тог разлога, средства која покрећу аутофагију могу послужити као терапеутска предност.²³⁹ Наши резултати су показали да аутофагија у HeLa ћелијама индукована једињењима **5Л** и **5М** има цитопротективну улогу, јер њена инхибиција појачава апоптозу. У MDA-MB 231 ћелијама третираним једињењима **5Л** и **5М** аутофагија је остала на базалном нивоу, па је инхибиција аутофагије као хомеостатског механизма резултирала смањењем ћелијске смрти. Иако је једињење **5И** појачало аутофагију у HeLa ћелијама, третман са CQ није имао утицаја на апоптозу, указујући да аутофагија није умешана у пут ћелијске смрти. Ови резултати показују да аутофагија није део механизма цитотоксичне активности изазване тестираним дериватима пирролидинона.

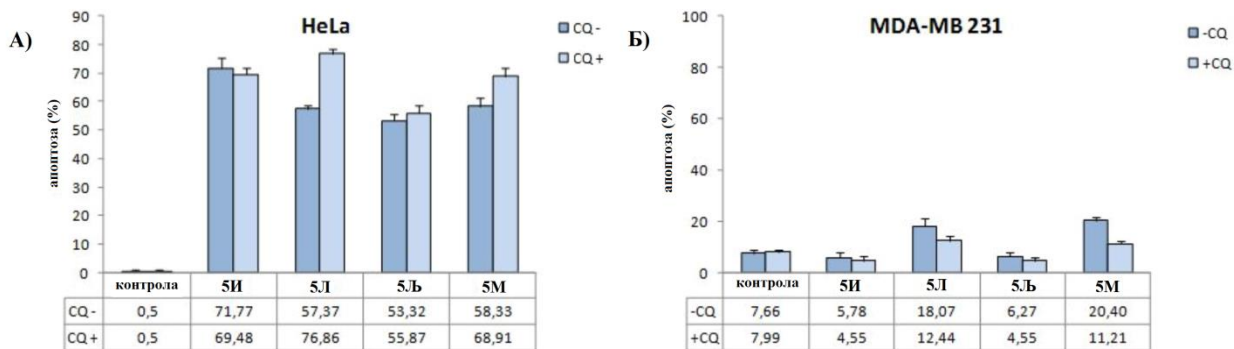


Слика 65. Анализа проточне цитометрије Annexin V-FITC/7-AAD бојења. Графикони који приказују проценат раних апоптотичких (РА), касних апоптотичких (КА) и некротичних ћелија (Н) у нетретираним (контролним) и третираним HeLa и MDA-MB 231 ћелијама. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента ± СД.

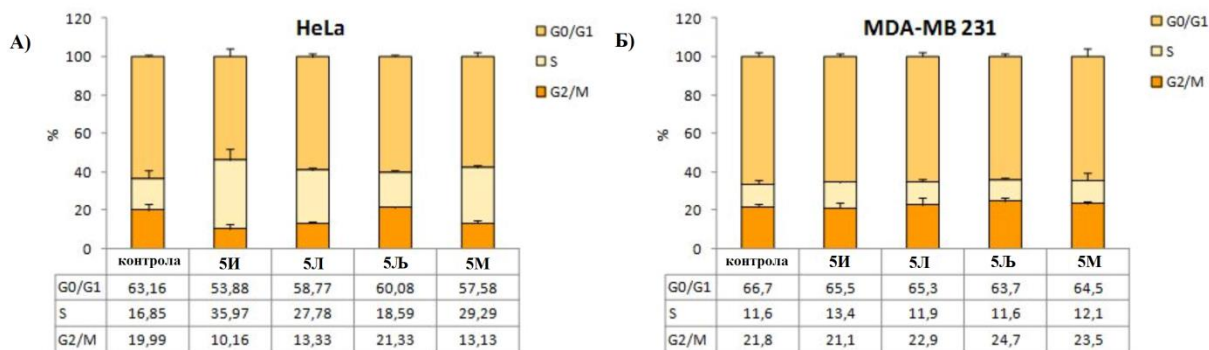


Слика 66. Квантификација аутофагије. Графикони приказују црвене/зелене (FL3/FL1) промене средњег интензитета флуоресценције у нетретираним (контролним) и третираним HeLa и MDA-MB 231 ћелијама. Резултати су представљени као средња вредност из три независна експеримента ± СД.

Да бисмо даље испитали механизми цитотоксичности извршена је анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом. Код вишећелијских организама, апоптоза и прогресија ћелијског циклуса кључни су за одржавање хомеостазе ткива. Бројни докази су открили да ови процеси деле скуп регулаторних молекула. Манипулација ћелијским циклусом може спречити или изазвати апоптозу. Наши резултати су показали да су у HeLa ћелијама једињења **5И**, **5Л** и **5М** заустављају ћелијски циклус у S фази, што указује на инхибицију репликације ДНК, док једињење **5Љ** није утицало на прогресију ћелијског циклуса. Као што је очекивано, концентрација од 100 μM тестираних пирролидинона није утицала на прогресију ћелијског циклуса у MDA-MB 231 ћелијама (Слика 68).



Слика 67. Утицај инхибиције аутофагије на апоптозу. Процент апоптотичних ћелија са (CQ+) или без (CQ-) котретмана са инхибитором аутофагије хлорохином утврђен је анализом проточне цитометрије двоструко обојених ћелија анексином V/7-AAD. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента ± СД.



Слика 68. Анализа ћелијског циклуса. Графикони показују расподелу ћелија по фазама ћелијског циклуса у нетретираним (контролним) и третираним HeLa и MDA-MB 231 ћелијама. Резултати су представљени као средња вредност три независна експеримента ± СД.

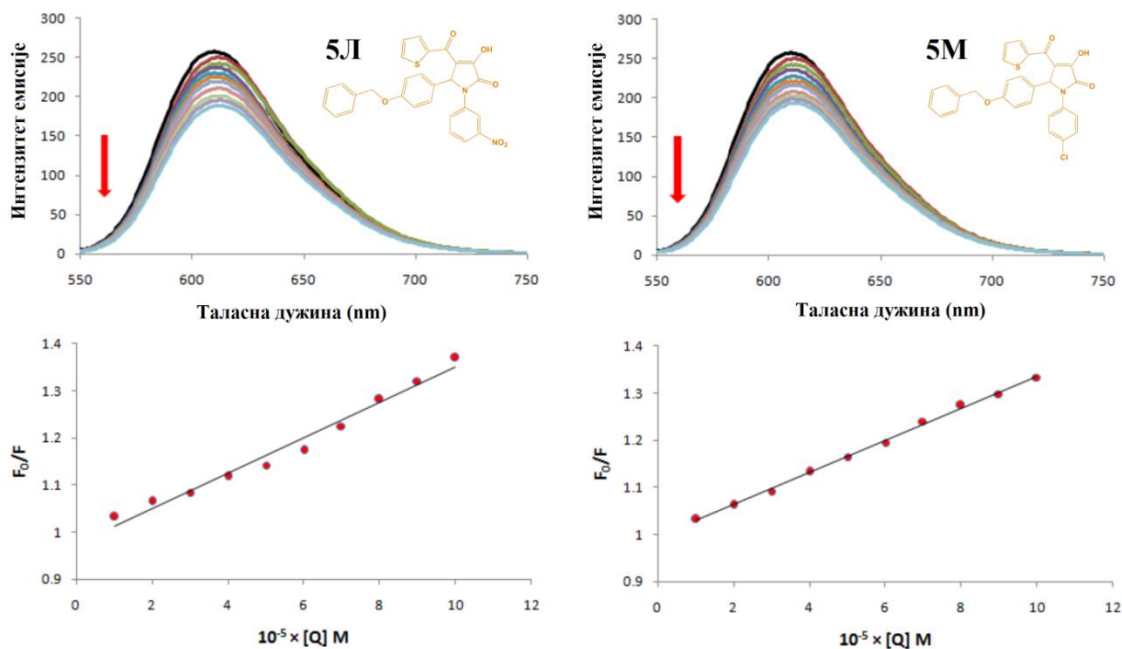
Може се закључити да HeLa и MDA-MB 231 ћелијске линије не само да се разликују у хистолошком типу, већ су и високо хетерогене у погледу мутација повезаних са генима који контролишу програмирану ћелијску смрт и напредовање ћелијског циклуса. Ова чињеница објашњава различиту осетљивост ових ћелијских линија на тестирана једињења. Испитана једињења очигледно циљају молекуле који су различито експримирани у HeLa и MDA-MB 231 ћелијама. Представљени подаци указују да тестирана једињења индукују апоптозу у HeLa ћелијама која је повезана са заустављањем ћелијског циклуса у S фази (5И, 5Л и 5М) или нису повезана са дистрибуцијом ћелијског циклуса (5Љ).

2.5.3. Интеракције једињења 5Л и 5М са деоксирибонуклеинском киселином

2.5.3.1. Флуориметријска титрација ЕБ-ДНК једињењима 5Л и 5М

Спектри флуориметријске титрације ЕБ-ДНК са једињењима **5Л** и **5М** снимљени у распону од 550–750 nm и показују опадајући тренд на максимуму таласне дужине од 610 nm са повећањем концентрације једињења **5Л** и **5М**, што указује да ЕБ бива делимично супституисан једињењима. Молски односи ЕБ-ДНК : **5Л** или **5М** пратили су редослед: 1:0 (контрола), 1:0,2, 1:0,4, 1:0,6, 1:0,8, 1:1, 1:1,2, 1:1,4, 1:1,6, 1:1,8, 1:2, у укупној запремини 5,0 ml, pH 7,4, на 25°C са инкубационим временом од 6 h. Добијени резултати су показали да оба једињења интерагују са ДНК интеркалацијом.

Да би боље разумели јачину везе испитиваних једињења са ДНК, израчуната је Стерне-Волмерова константа преко једначине (1), испитивањем зависности F_0/F од $[Q]$ (Слика 69). Израчунате константе за једињења **5Л** и **5М** приказане су у Табели 17 и указују да оба једињења имају способност да истисну ЕБ из комплекса ЕБ-ДНК везујући се за ДНК¹⁴⁰.



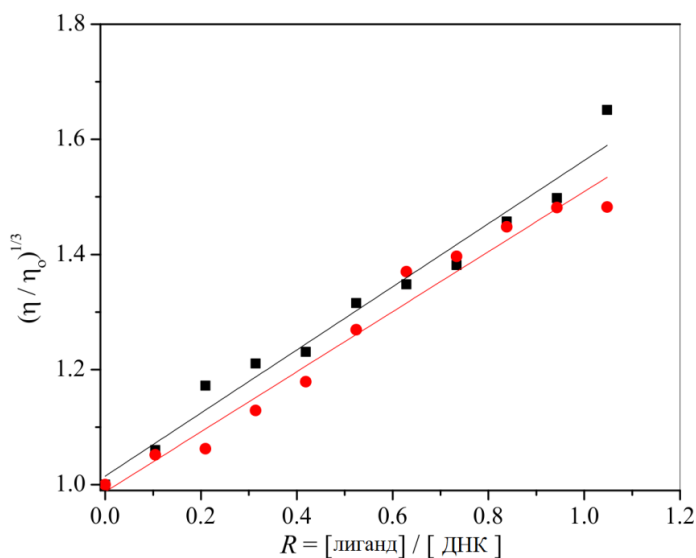
Слика 69. Интеракције једињења **5Л** и **5М** са ДНК. Изнад: Емисиони спектри ЕБ-ДНА у одсуству (црне линије) и у присуству једињења **5Л** и **5М**. $[ЕБ] = 50 \mu\text{M}$, $[ДНК] = 50 \mu\text{M}$; $[5Л]$ и $[5М] = 0\text{--}100 \mu\text{M}$; $pH = 7,4$; $\lambda_{ex} = 500 \text{ nm}$. Испод: Зависност F_0/F од $[Q]$.

Табела 17. Константа брзине бимолекулског смањења интензитета флуоресценције (k_q), Стерн-Волмерова константа (K_{sv}) и коефицијент корелације (R) за једињења **5Л** и **5М**.

Једињење	k_q [$M^{-1} s^{-1}$]	K_{sv} [M^{-1}]	R
5Л	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^{11}$	$(3,7 \pm 0,1) \times 10^3$	0,989
5М	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^{11}$	$(3,4 \pm 0,1) \times 10^3$	0,998

2.5.3.2. Мерења вискозности раствора ДНК у присуству **5Л** и **5М**

Утицаји испитиваних молекула **5Л** и **5М** на вискозност ДНК приказани су на Слици 70. У нашем случају, релативни вискозитет се повећава са нагибом од 0,52 (**5Л**) и 0,55 (**5М**). Након додавања једињења у раствор ДНК, релативни вискозитет се стално повећавао, као што је случај код неких класичних интеркалатора. Резултати су показали да се лиганди везују за ДНК интеркалативним режимом, јер се повећавање вискозности ДНК приписује интеркалативном начину везивања, што за последицу има издужење ДНК ланца. Нагиб релативне вискозности био је сличан код оба лиганда, што указује на сличан афинитет везивања за ДНК.

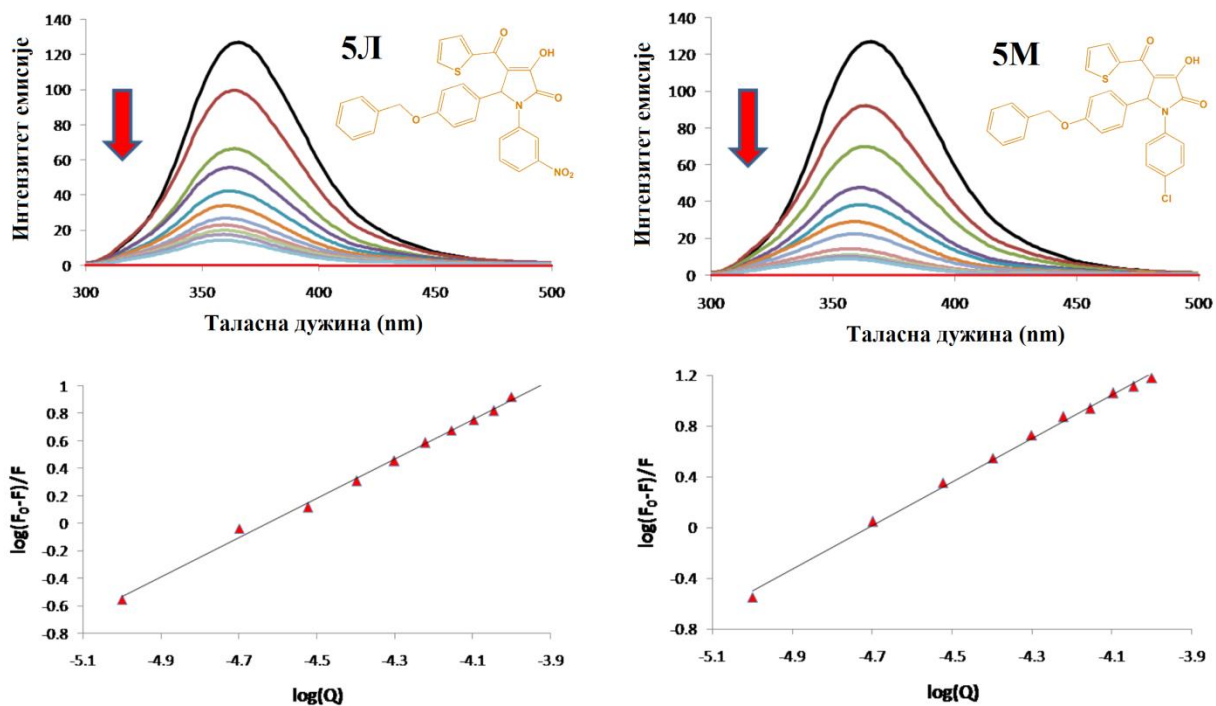


Слика 70. Релативна вискозност $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ ДНК (0,01 mM) у пуферу (50 mM NaCl и 5 mM tris-HCl на рН 7,4) у присуству растућих концентрација једињења **5М** (црни квадрат) и **5Л** (црвени круг) (R).

2.5.4. Интеракције 5J и 5M са серум албумином

На основу чињенице да ефикасност потенцијалних лекова зависи од њихове способности да се везују за транспортне протеине, испитали смо афинитет везивања једињења **5J** и **5M** за BSA. Флуориметријска титрација BSA једињењима **5J** и **5M** коришћена је за испитивање својстава везивања ових молекула. Спектри су посматрани у таласном опсегу од 300–500 nm (Слика 71).

Молски односи BSA : **5J** или **5M** следили су редослед: 1:0 (контрола), 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, у укупној запремини 5,0 ml, рН 7,4, на 25°C са временом инкубације од 6h. Подаци као што су константа везивања (K_a) и број места везивања по молекули BSA (n) добијени су из једначине (2)²⁴⁰.



Слика 71. Интеракције једињења **5J** и **5M** са BSA. Изнад: Емисиони спектри BSA у одсуству (црне линије) и у присуству једињења **5J** и **5M**. Црвене линије одговарају рстворима: пуфер + испитивано једињење. $[BSA] = 10,0 \mu M$; $[5J]$ или $[5M] = 0,0-100,0 \mu M$; $pH=7,4$; $\lambda_{ex}=280 nm$. Испод: зависност $\log(F_0-F)/F$ од $\log(Q)$.

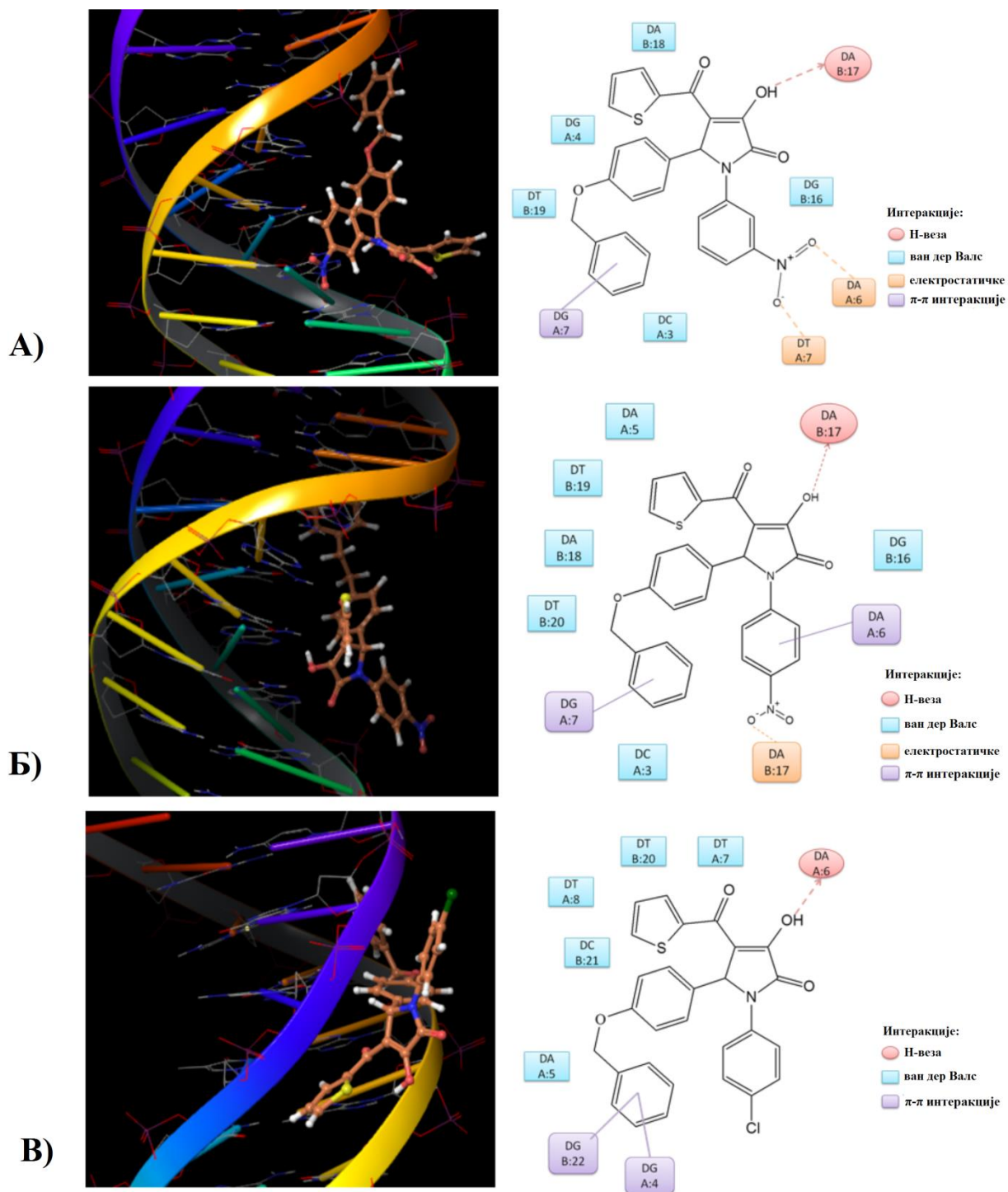
Добијене вредности K_a , дате у Табели 18, указују да оба једињења имају одговарајућу способност везања за BSA. Број места везивања **5Л** или **5М** ($n \approx 1,5$, Табела 2) указује на то да се и **5Л** и **5М** везују за BSA у молском односу 1,5: 1.

Табела 18. Везивни параметри (K_a и n) и коефицијент корелације (R) за интеракцију **5Л** и **5М** са BSA.

Једињење	K_a [M^{-1}]	n	R
5Л	$(4,2 \pm 0,2) \times 10^5$	1,47	0,998
5М	$(2,6 \pm 0,2) \times 10^5$	1,69	0,998

2.5.5. Докинг студија једињења **5Л**, **5Љ** и **5М**

Да би се додатно разјаснио начин интеракције и афинитет везивања урађене су докинг студије ДНК и BSA у присуству **5Л**, **5Љ** и **5М**. Најбоља места за везивање испитиваних једињења са ДНК ланцом приказана су на Слици 72, а израчунати резултати за енергије веза и константе инхибиције приказани су у Табели 19. Студија је открила да лиганди интерагују са ДНК интеркалативним режимом преко спољашњих π - π интеракција између гуанина и бензилног прстена лиганда. На Слици 72, из структура се јасно види да су лиганди добро упаковани у мање шупљине ДНК и углавном су стабилисани ван дер Валсовим интеракцијама. Откривено је да релативна енергија везе докованих структура за **5Л**, **5Љ** и **5М** износи $-51,035$, односно $-49,814$ и $-52,312$ $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Нешто нижа енергија везе једињења **5Љ** може бити последица једне електростатичке интеракције мање која потиче од $-\text{NO}_2$ групе. Са Слике 72 може се приметити различита оријентација једињења **5Л** и **5Љ** према ДНК, у поређењу са **5М**. Наиме, једињења **5Л** и **5Љ** додатно су стабилисана електростатичким интеракцијама $-\text{NO}_2$ и аденина, заузимајући нешто другачију конформацију од **5М** након докинга. С друге стране, хлоробензилни прстен из молекула **5М** налази се ван ДНК спирале и не доприноси афинитету везивања. Нешто већа енергија везе молекула **5М** може се приписати још једној π - π интеракцији са ДНК.

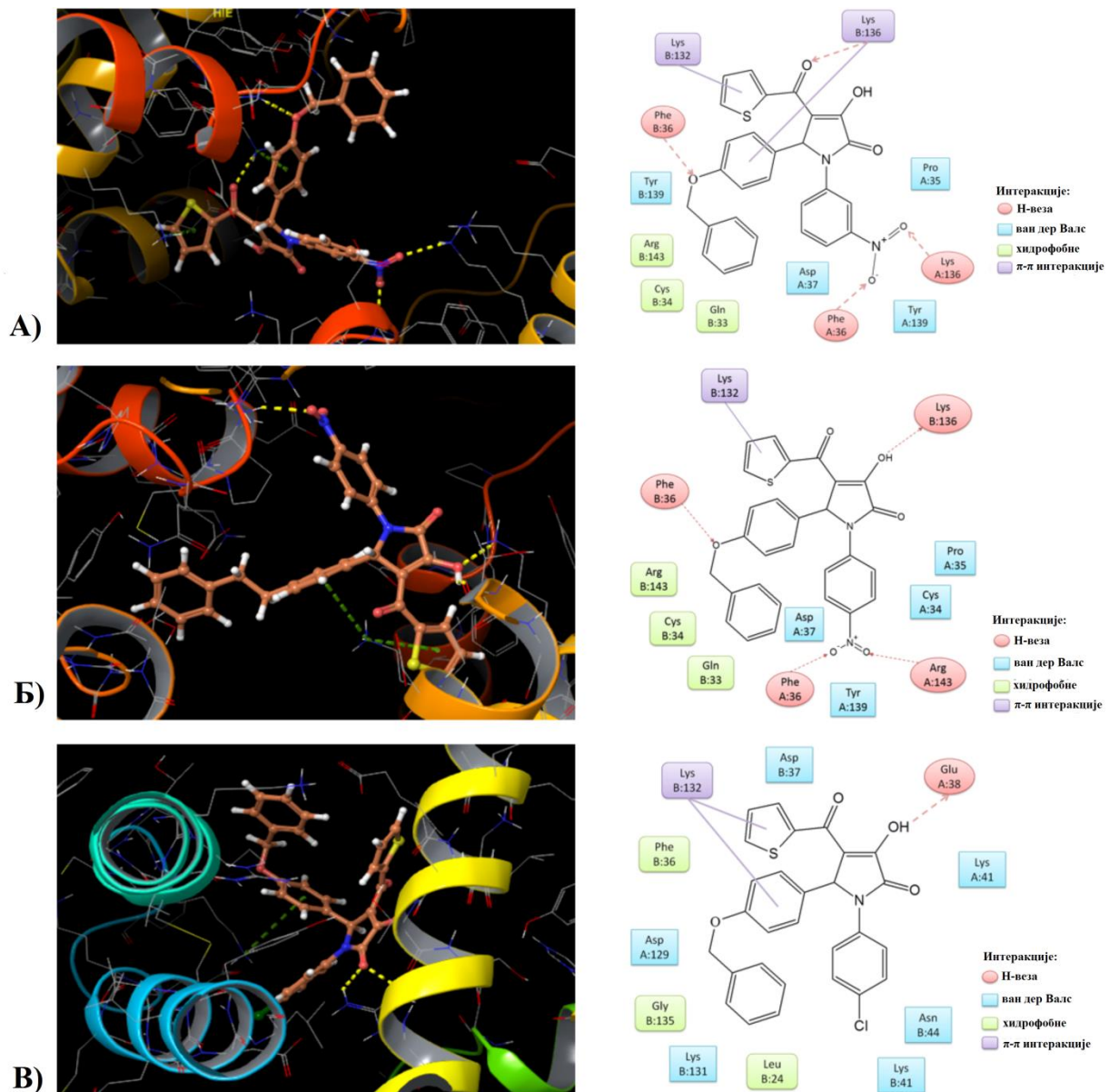


Слика 72. Молекулски докинг једињења 5Л(А), 5Лб(Б) и 5М(В) са ДНК и дводимензионални приказ интеракција.

Интеракције лиганда **5Л**, **5Љ** и **5М** са BSA јављају се на сличним положајима у домену I.²²⁹ Најзначајније молекулске интеракције једињења **5Л**, **5Љ** и **5М** и BSA биле су хидрофобне интеракције и ван дер Валсова сила. У комплексу **5Л**-BSA примећене су три водоничне везе: кисеоник из $-\text{NO}_2$ групе гради две водоничне везе са Lys A:136 и Phe A:36, а трећа се формира између кисеоника (из бензилокси групе) и Phe B:36. За лиганд **5Љ** интеракција са BSA одвија се преко 4 водоничне везе, три као и код молекула **5Л**, и једне додатне између $-\text{OH}$ групе и Lys B:136. Молекул **5М** гради само једну водоничну везу са Glu A:38 (Слика 73). Формирање водоничних веза стабилизује комплекс **5Л** и **5Љ** са BSA, значајно више од **5М**-BSA, што показују више енергије везивања молекула **5Л** и **5Љ**. Интеракције свих лиганда додатно су појачане π - π интеракцијама с аминокиселинама Lys (Lys B:132 и Lys B:136). Будући да се везивно место налази дубоко у молекулу BSA а не на површини протеина, оба лиганда морају проћи поред аминокиселинских остатака који се налазе на површини молекула протеина да би дошли до одговарајућег положаја у BSA. Овај процес не доприноси укупној енергији везе и повећава његову активациону енергију.

Табела 19. Докинг параметри једињења **5Л**, **5Љ** и **5М**.

Једињење	Докинг учинак	Енергија везе / $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	Инхибициона константа докинга / μM
			ДНК
5Л	-4,852	-51,035	1,144
5Љ	-4,551	-49,814	1,873
5М	-5,187	-52,312	0,684
		BSA	
5Л	-4,075	-55,203	0,213
5Љ	-3,848	-57,662	0,079
5М	-4,253	-51,643	0,895



Слика 73. Молекулски докинг једињења 5Л(А), 5Л(Б) и 5М(В) са BSA и дводимензионални приказ интеракција

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Опште напомене

Сви растварачи [метанол (99,9%), апсолутни етанол (99,8%), суви диетил етар (99,7%), ацетон (99,5%), CH_2Cl_2 и глацијална сирћетна киселина], супстрати [K_2PdCl_4 , $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 3'-аминоацетофенон, ацетил хлорид, 4-метоксибензоил хлорид, амини, алдехиди, диетил оксалат, 3-метоксиацетофенон (**1А**), 4-фенил-3-бутен-2-он (**1Б**), 3-нитроацетофенон (**1Г**) и 2-ацетилтиофен (**1Д**), циклопропил метил кетон (**1Ђ**), ацетилфероцен (**1Ж**), ДНК, BSA и реагенси су набављени из Sigma Aldrich. 4-(4'-хидрокси-3'-метоксифенил)-3-бутен-2-он (**1В**), *N*-(3-ацетилфенил)ацетамид (**1З**) и *N*-(3-ацетилфенил)-4-метоксибензамид (**1И**) синтетисани су по раније описаном поступку.²⁴¹ Фосфатни пуфер у облику таблета (PBS) набављен је од Fisher BioReagents. Комплексна со $(\text{PhNH}_3)_2\text{CuCl}_4$ је синтетисана по раније описаном поступку.¹⁷²

Свеж раствор ДНК припремљен је у 10 mM PBS пуферу на pH=7,4. ДНК раствор је дао однос UV апсорпције на 260 nm и 280 nm (A_{260}/A_{280}) од 1,8–1,9, што указује да је ДНК била ослобођена од протеина. Концентрација ДНК израчуната је мерењем интензитета апсорбације на 260 nm ($\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).²⁴²

Танкослојна хроматографија рађена је на плочама алуминијума које су превучене танким слојем силика-гела дебљине 0,2 mm (Silica gel 60, Merck и Silica gel 40, F254, Merck), изазивањем мрља раствором KMnO_4 или визуелизацијом под UV лампом (254 nm). Синтетисана једињења су пречишћавана хроматографијом на колони која је пуњена силика-гелом (Silica gel 60, 0,063-0,200 mm, Merck).

Тачке топљења (Тт) су одређене на MelTemp апарату и нису вршене додатне корекције. UV-Vis спектари снимани су на Perkin Elmer 35 спектрофотометру.

IR спектри су снимљени на Perkin–Elmer Spectrum One FT-IR спектрометру у KBr пилули. Мерења електрон-парамагнетне резонанције чврстих узорака на собној температури изведена су на Bruker ESP300 спектрометру користећи Mn-ZnS као маркер. ЕПР спектри снимљени су коришћењем следећих параметара: микроталасна фреквенција 9,76 GHz, микроталасна снага 2,27 mW, атенуатор 20 dB, амплитуда модулације 6 Гауса и фреквенција модулације 100 kHz. ^1H и ^{13}C NMR спектри снимани су у CDCl_3 и DMSO-d_6 у односу на тетраметилсилан (TMS, $\delta=0$) на спектрометру VarianGemini 200 MHz NMR (200

MHz за ^1H и 50 MHz за ^{13}C). Хемијска померања (δ) су представљена у ppm (parts per million). Скраћенице које су коришћене за сигнале ^1H NMR: s (синглет), d (дублет), t (триплет), q (квартет), m (мултиплет), dd (дублет-дублета), br. s. (широки синглет). Константе спрезања (J) изражене су у херцима (Hz).

Масени спектри су снимљени на Waters Micromass Quattro II triple quadrupole масеном спектрометру са MassLynx софтвером за контролу и обраду података.

Микроанализе су рађене на инструменту CarloErba EA1108. За мерења флуоресценције коришћен је RF-1501 спектрофлуорометар.

Резултати дифракције X-зрака на монокристалима одговарајућих молекула прикупљани су на собној температури, употребом Agilent Gemini S дифрактометра, опремљеног извором зрачења $\text{Mo K}\alpha$ ($\lambda = 0,71073\text{\AA}$). CrysAlisPro и CrysAlis RED²⁴³ софтвери су коришћени за анализу података. Кристалне структуре решене су директним методом, користећи SHELXS, SHELXT и SHELXL програме.²⁴⁴

Сви сојеви бактерија и гљивица који су коришћени у овим истраживањима (бактерије: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (ATCC 10987), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13833), *Proteus mirabilis* (ATCC 29906) и *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); гљивице: *Aspergillus niger* (ATCC 16888), *Candida albicans* (ATCC 10259), *Fusarium solani* (ATCC 36031), *Mucor mucedo* (ATCC 20094) *Penicillium italicum* (ATCC 10454) и *Trichoderma viride* (ATCC 13233)) су добијени из American Type Culture Collection (ATCC). Културе бактерија су одржаване на *Mueller-Hinton* агару (Торлак, Београд), док су културе гљивица одржаване на кромпировом декстрозном агару (PD), осим културе *Candida albicans* која је одржавана на Sabourad декстрозном агару (SD) (Торлак, Београд). Све културе су чуване на 4°C.

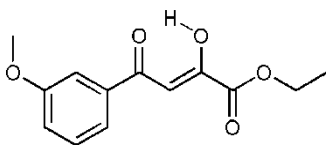
Ћелијске линије HeLa, MDA-MB 231, A549, LS174 и MRC-5 су такође прибављене од American Type Culture Collection (ATCC). Ћелијске линије A549, LS174 и један део HeLa и MRC-5 ћелија су одржаване у виду монослоја у хранљивом медијуму RPMI 1640 (Sigma Aldrich, Минхен, Немачка). Пре коришћења, у хранљиве подлоге се додаје 10% инактивираниог феталног говеђег серума (56°C) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA), 3 mmol/ml L-глутамин, 100 mg/ml стрептомицин и 100 IU/ml пеницилин. Други део HeLa

и MRC-5 ћелија су одржаване у Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), док су MDA-MB 231 ћелије одржаване у Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640) медијуму. У оба медијума је додато 10% FBS, 100 µg/mL стрептомицина и 100 IU/ml пеницилина (Sigma). Све ћелије су култивисане на 37°C, у атмосфери са 5% CO₂ и апсолутне влаге.

3.2. Синтеза ацилпирувата (2А-И)

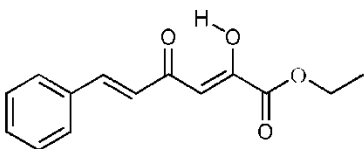
Диетил-оксалат (1,75 g, 12 mmol) и одговарајући кетон (1А-Д, 10 mmol) растворе се у 50 ml сувог диетил етра и охладје до температуре од -10°C у леденом купатилу. Након постизања температуре од -10°C , у капима се додаје натријум-етоксид (1,02 g, 15 mmol) који је претходно растворен у 5 ml апсолутног етанола. Врло брзо, током укапавања раствора натријум-етоксида долази је до таложења натријумове соли одговарајућег ацилпирувата. Након додатка комплетне количине натријум-етоксида, реакциона смеша је мешана током 30 минута на собној температури. Добијена со је филтрирана, испрана сувим етром и сушена на собној температури. Затим је со растворена у води (200 ml) и закишељена са 6М раствором HCl до pH = 2. После закишељавања долази до таложења производа. Одговарајући ацилпируват је затим филтриран, испран водом и остављен на собној температури да се осуши. Приноси у реакцији били су до 93%. Овим поступком су добијени ацилпирувати 2А-Д, док су осталих пет ацилпирувата (2Ђ-И) синтетисани по раније објављеној процедури.²⁴⁵ Синтетисани ацилпирувати су окарактерисани NMR спектроскопијом.

Етил 2-хидрокси-4-(3-метоксифенил)-4-оксо-2-бутеноат (2А)



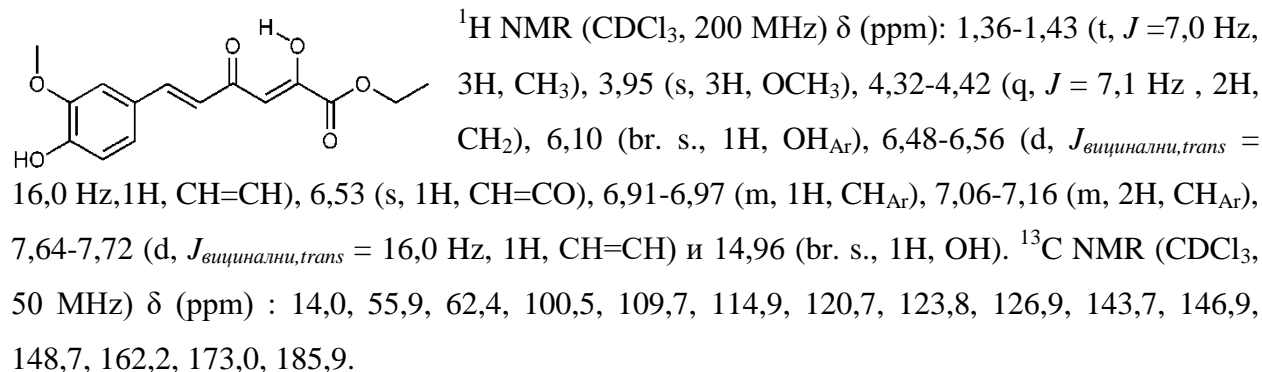
^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 1,38-1,45 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3), 3,88 (s, 3H, OCH_3), 4,35-4,46 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 7,06 (s, 1H, $\text{CH}=\text{CO}$), 7,12-7,18 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,37-7,59 (m, 3H, CH_{Ar}), 15,28 (br. s., 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm): 14,0, 55,5, 62,5, 98,2, 112,3, 120,1, 120,4, 129,8, 136,4, 160,0, 162,2, 169,4, 190,7.

Етил 2-хидрокси-4-[(Е)-2-фенилвинил]-4-оксо-2-бутеноат (2Б)

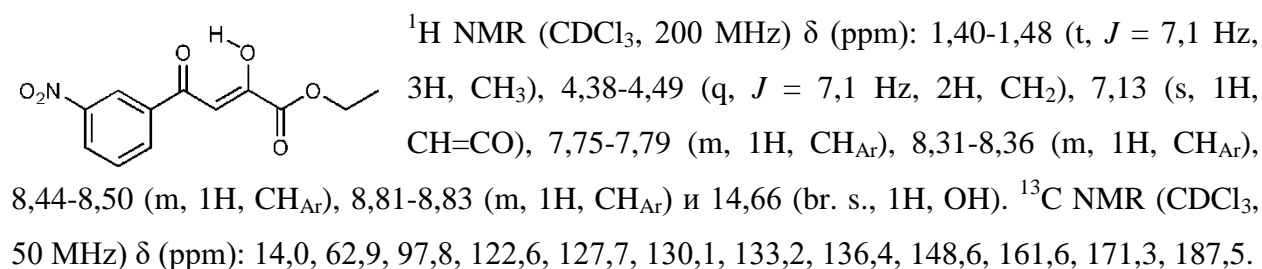


^1H NMR (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 1,37-1,44 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H, CH_3), 4,32-4,43 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 6,55 (s, 1H, $\text{CH}=\text{CO}$), 6,62-6,70 (d, $J_{\text{внцнналнн,trans}} = 16,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$), 7,40-7,43 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,55-7,60 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,70-7,78 (d, $J_{\text{внцнналнн,trans}} = 16,0$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}$) и 14,77 (br. s., 1H, OH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm): 14,0, 62,5, 100,6, 123,0, 128,4, 129,0, 130,8, 134,3, 143,2, 162,0, 174,3, 184,9.

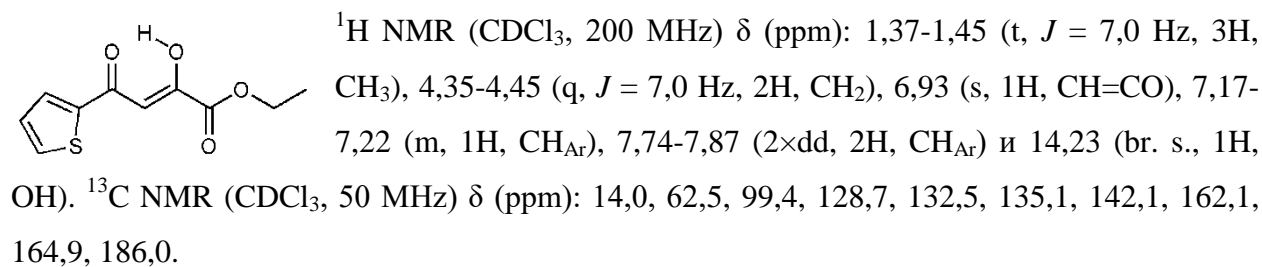
Етил 2-хидрокси-4-[(Е)-2-(4-хидрокси-3-метоксифенил)винил]-4-оксо-2-бутеноат (2В)



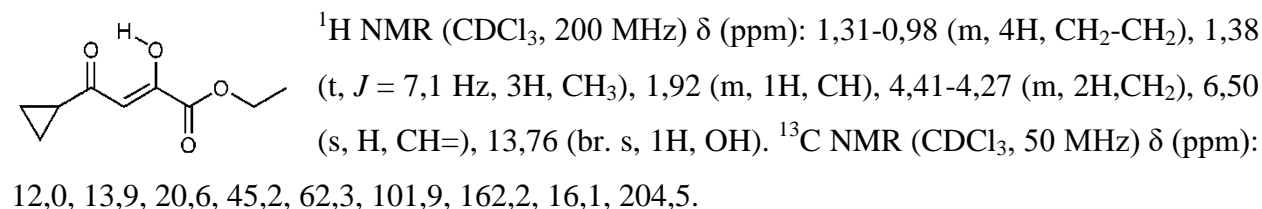
Етил 2-хидрокси-4-(3-нитрофенил)-4-оксо-2-бутеноат (2Г)

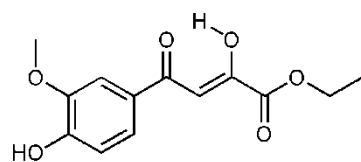


Етил 2-хидрокси-4-(2-тиенил)-4-оксо-2-бутеноат (2Д)

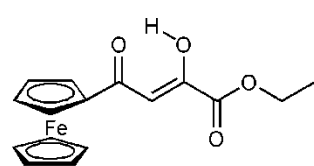


Етил 2-хидрокси-4-циклопропил-4-оксо-2-бутеноат (2Ђ)

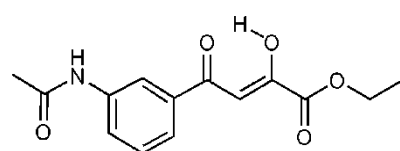


Етил 2-хидрокси-4-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-4-оксо-2-бутеноат (**2Е**)

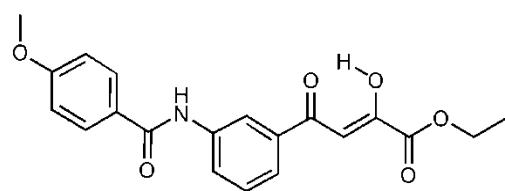
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz) δ (ppm): 1,30 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3), 3,86 (s, 3H, CH_3), 4,30 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 6,92 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7,07 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 7,54 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7,66 (dd, $J = 8,4, 2,0$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 10,37 (br. s, 1H, OH_{Ar}). $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz) δ (ppm): 13,8, 55,7, 62,0, 97,8, 110,9, 115,5, 123,5, 125,9, 147,9, 153,2, 161,9, 166,8, 190,3.

Етил 2-хидрокси-4-фероценил-4-оксо-2-бутеноат (**2Ж**)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 1,42 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3), 4,23 (s, 5H, CH_{Ar}), 4,40 (q, $J = 7,3$ Hz, 2H, CH_2), 4,89-4,66 (m, 6H, CH_{Ar}), 6,57 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 15,03 (s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm): 14,1, 62,3, 69,4, 70,6, 73,5, 100,2, 162,8, 163,7, 197,9.

Етил 2-хидрокси-4-(3-ацетамидофенил)-4-оксо-2-бутеноат (**2З**)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 1,40 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3), 2,22 (s, 2H, CH_3), 4,39 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 7,02 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 7,42 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7,79 (d, 2H, CH_{Ar}), 8,04 (s, 1H, CH_{Ar}), 8,22 (s, 1H, NH), 15,16 (br. s, 1H, OH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm): 14,0, 24,4, 62,6, 98,0, 118,9, 123,5, 125,2, 129,5, 135,5, 138,8, 162,1, 169,0, 169,9, 190,12.

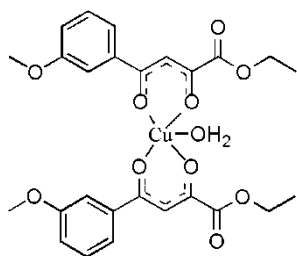
Етил 2-хидрокси-4-(3-(4-метоксибензамидо)фенил)-4-оксо-2-бутеноат (**2И**)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 200 MHz) δ (ppm): 1,40 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3), 3,85 (s, 3H, CH_3), 4,39 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H, CH_2), 6,94 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 7,03 (s, 1H, $\text{CH}=\text{C}$), 7,45 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,71 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 7,85 (t, $J = 6,1$ Hz, 2H, CH_{Ar}), 8,04 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 8,12 (t, $J = 1,8$ Hz, 1H, CH_{Ar}), 8,27 (s, 1H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 50 MHz) δ (ppm): 14,0, 55,4, 62,6, 98,0, 114,0, 119,3, 123,6, 125,5, 126,5, 129,0, 129,6, 135,6, 138,9, 162,1, 162,7, 165,6, 169,9, 190,1.

3.3. Синтеза Cu(II) комплекса (3А-Д)

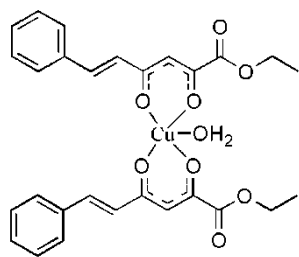
Одговарајући ацилпирувати (1 mmol) растворени су у апсолутном етанолу (3 ml). Након тога, у раствор лиганда додаје се комплексна со $(\text{PhNH}_3)_2\text{CuCl}_4$ (0,19 g, 0,5 mmol). Након 5 до 10 минута јавља се талог од насталог комплекса. Реакција је праћена танкослојном хроматографијом са хлороформом као развијачем. Добијени комплекси су филтрирани и испрани сувим диетил етром. Прекристализација комплекса је извршена из врелог етанола. После хлађења, исталожени комплекси су филтрирани, испрани диетил етром и сушени на собној температури.

3А $[\text{Cu}(2\text{A})_2\text{H}_2\text{O}]$



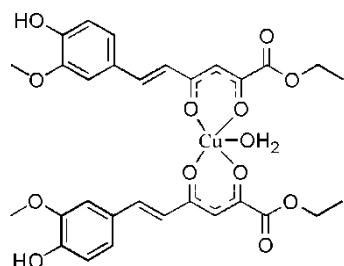
Кристали зелене боје; Принос: 81% (0,469 g); $T_f = 128^\circ\text{C}$; ESI-MS : $[\text{M}^+] = 580$ (11%); Израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{11}\text{Cu}$ (%): C 53,84 H 4,87; Нађено (%): C 53,96 H 4,91; IR (KBr, cm^{-1}): ν 3502, 3457, 1730, 1601, 1583, 1569, 1510, 1486, 1442, 1368, 1297, 1260, 1245, 1181, 1164, 1084, 1022, 756; UV-Vis (CH_3OH , $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$, $(\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}))$): 350 (4,46), 289 (4,25).

3Б $[\text{Cu}(2\text{B})_2\text{H}_2\text{O}]$



Прах жуте боје; Принос: 65% (0,372 g); $T_f = 210^\circ\text{C}$; ESI-MS : $[\text{M}^+] = 572$ (31%); Израчунато за $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_9\text{Cu}$ (%): C 58,79 H 4,93; Нађено (%): C 58,60 H 5,01; IR (KBr, cm^{-1}): ν 3500, 3457, 1726, 1637, 1578, 1571, 1511, 1445, 1333, 1285, 1258, 1179, 1160, 1018, 863, 779; UV-Vis (CH_3OH , $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$, $(\log(\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}))$): 587 (2,91), 371 (4,64), 328 (4,50).

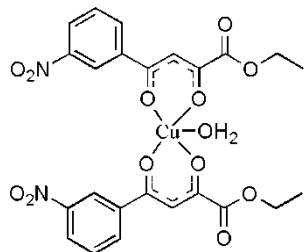
3В $[\text{Cu}(2\text{B})_2\text{H}_2\text{O}]$



Кристали браон боје; Принос: 78% (0,518 g); $T_f = 146^\circ\text{C}$; ESI-MS : $[\text{M}^+] = 664$ (21%); Израчунато за $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{13}\text{Cu}$ (%): C 54,26 H 4,86; Нађено (%): C 54,36 H 4,75; IR (KBr, cm^{-1}): ν 3456, 3047, 2977, 2937, 2637, 1728, 1629, 1566, 1513, 1428, 1266, 1177, 1158, 1125, 1026, 947, 842; UV-Vis

(CH₃OH, λ_{max}/nm, (log (ε/M⁻¹ cm⁻¹)): 404 (4,71), 283 (4,37).

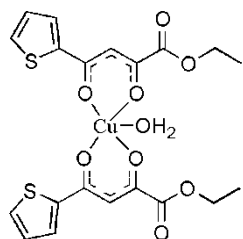
3Г [Cu(2Г)₂H₂O]



Кристали светло зелене боје; Принос: 69% (0,420 g); Т_т = 236°C; ESI-MS : [M⁺] = 609 (10%); Израчунато за C₂₄H₂₂N₂O₁₃Cu (%): С 47,26 Н 3,64 Н 4,59; Нађено (%): С 47,39 Н 3,68 Н 4,63; IR (KBr, cm⁻¹): ν 3456, 3091, 2986, 1722, 1593, 1565, 1523, 1426, 1349, 1301, 1243, 1077, 1020, 716; UV-

Vis (CH₃OH, λ_{max}/nm, (log (ε/M⁻¹ cm⁻¹)): 353 (4,06).

3Д [Cu(2Д)₂H₂O]



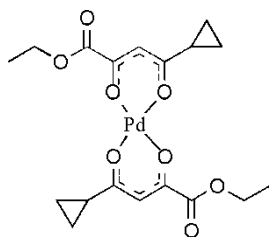
Прах зелене боје; Принос: 88% (0,468 g); Т_т = 111°C; ESI-MS : [M⁺ + Na] = 555 (14%); Израчунато за C₂₀H₂₀S₂O₉Cu (%): С 45,15 Н 3,79; Нађено (%): С 45,26 Н 3,85; IR (KBr, cm⁻¹): ν 3535, 3490, 3094, 2978, 1729, 1573, 1530, 1507, 1446, 1411, 1355, 1291, 1245, 1229, 1144, 1034, 1012, 775; UV-Vis (CH₃OH, λ_{max}/nm, (log (ε/M⁻¹

cm⁻¹)): 362 (4,60), 282 (4,29).

3.4. Синтеза Pd(II) комплекса (4А-Ђ)

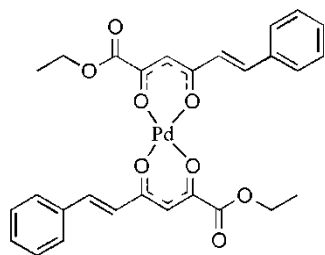
Одговарајући ацилпирувати (0,2 mmol) растворени су у метанола (2 ml) у који је затим додат водени раствор $K_2[PdCl_4]$ (0,1 mmol). Након кратког времена (20-30 секунди), дошло је до таложења жељених комплекса. Реакција је праћена танкослојном хроматографијом са $CH_2Cl_2 : CH_3OH = 9 : 1$ као развијачем. Комплекси су онда филтрирани и испрани сувим диетил етром. Прекристализација комплекса је извршена из кључалог метанола. Након хлађења, комплекси су филтрирани, испрани диетил етром и сушени на собној температури. Синтетисани комплекси су окарактерисани NMR спектроскопијом.

4А [$Pd(2Б)_2$].

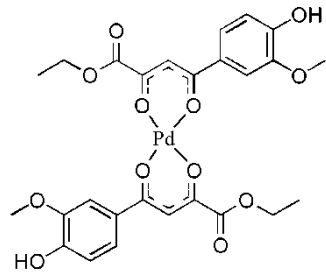


Прах жуте боје; Принос: 89%; $T_m = 168^\circ C$; UV-Vis (λ_{max}/nm , $(\log(\epsilon/M^{-1} cm^{-1}))$): 300 (4,10); IR (KBr, cm^{-1}): ν 3419, 3113, 2985, 1720, 1567, 1524 1449, 1428, 1382, 1259, 1148, 1099, 1018, 935, 862, 784; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 0,95-1,03 (m, 8H, $2 \times CH_2CH_2$), 1,24-1,27 (m, 6H, $2 \times CH_3$), 2,04-2,12 (m, 2H, $2 \times CH$), 4,17-4,26 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 6,32-6,37 (s, 2H, $2 \times CH=$) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 11,76, 11,90, 13,81, 13,86, 19,21, 62,21, 99,80, 100,16, 159,98, 166,59, 166,66, 195,83, 196,03 ppm; ESI-MS (m/z): $[M + Na]^+ = 495$; Израчунато за $C_{18}H_{22}O_8Pd$ (%): C 45,73 H 4,69; Нађено (%): C 46,63 H 4,75.

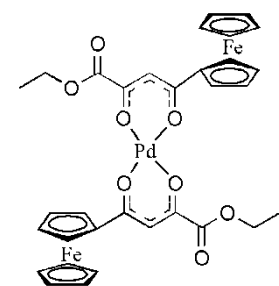
4Б [$Pd(2Б)_2$].



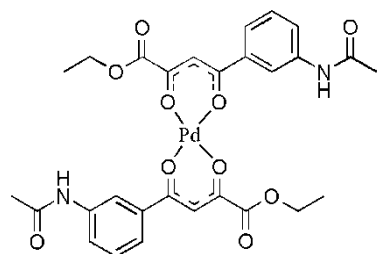
Кристали жуте боје; Принос: 89%; $T_m = 220^\circ C$; UV-Vis (λ_{max}/nm , $(\log(\epsilon/M^{-1} cm^{-1}))$): 363 (4,39); IR (KBr, cm^{-1}): ν 3566, 3439, 1728, 1631, 1565, 1513, 1448, 1426, 1332, 1289, 1261, 1148, 1025, 760; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 1,28-1,35 (m, 6H, $2 \times CH_3$), 4,25-4,33 (m, 4H, $2 \times CH_2$), 6,60 (s, 2H, $2 \times CH=$), 7,11-7,22 (m, 2H, $2 \times CH=$), 7,44-7,49 (m, 6H, $2 \times CH_{Ar}$), 7,76-7,87 (m, 4H, $2 \times CH_{Ar}$) ppm; ESI-MS (m/z): $[M]^+ = 596$; Израчунато за $C_{28}H_{26}O_8Pd$ (%): C 56,34 H 4,39; Нађено (%): C 55,73 H 4,43.

4В [Pd(2E)₂].

Прах жуте боје; Принос: 90%; Т_т = 183°C; UV-Vis (λ_{max} /nm, (log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)): 349 (4,17); IR (KBr, cm⁻¹): ν 3504, 3144, 2941, 1727, 1568, 1507, 1433, 1368, 1282, 1218, 1131, 1023, 773; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 1,28-1,36 (m, 6H, 2×CH₃), 3,84-3,87 (m, 6H, 2×OCH₃), 4,23-4,30 (m, 4H, 2×CH₂), 6,85-6,92 (m, 4H, 2×CH= + 2×CH_{Ar}), 7,43-7,58 (m, 4H, 2×CH_{Ar}), 10,30 (s, 2H, 2×OH_{Ar}) ppm; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 13,76, 13,90, 55,31, 55,37, 62,18, 62,25, 96,85, 96,94, 111,25, 111,32, 115,46, 122,88, 122,98, 125,15, 125,22, 147,73, 147,79, 152,43, 152,52, 160,27, 160,32, 168,54, 168,61, 182,76, 182,94 ppm; ESI-MS (m/z): [M]⁺ = 637; Израчунато за C₂₆H₂₆O₁₂Pd (%): C 49,03 H 4,11; Нађено (%): C 50,27 H 4,16.

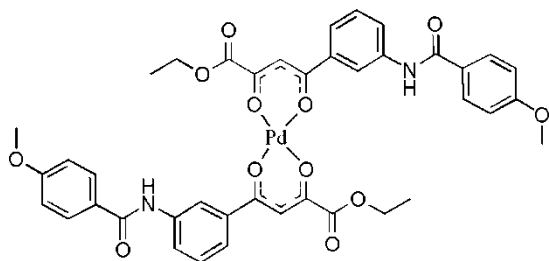
4Г [Pd(2Ж)₂].

Љубичасти кристали; Принос: 73%; Т_т = 156°C; UV-Vis (λ_{max} /nm, (log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)): 290 (4,27); IR (KBr, cm⁻¹): ν 3452, 3105, 2924, 1728, 1568, 1511, 1460, 1413, 1375, 1289, 1249, 1111, 956, 825, 782; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 1,25-1,36 (m, 6H, 2×CH₃), 4,19-4,33 (m, 14H, 2×CH₂ + 2×CH_{Fc}), 4,74-4,78 (m, 4H, 2×CH_{Fc}), 5,02 (s, 4H, 2×CH_{Fc}), 6,63 (s, 2H, 2×CH=) ppm; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 13,89, 61,96, 69,43, 70,46, 70,72, 73,90, 77,35, 100,24, 160,57, 162,10, 162,28 ppm; ESI-MS (m/z): [M]⁺ = 784; Израчунато за C₃₂H₃₀O₈Fe₂Pd (%): C 50,53 H 3,95; Нађено (%): C 50,07 H 3,89.

4Д [Pd(2З)₂].

Прах жуте боје; Принос: 81%; Т_т = 193°C; UV-Vis (λ_{max} /nm, (log(ϵ /M⁻¹ cm⁻¹)): 337 (4,28); IR (KBr, cm⁻¹): ν 3452, 3322, 2985, 1727, 1673, 1601, 1546 1481, 1436, 1367, 1292, 1253, 1018, 775; ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) δ 1,29-1,34 (m, 6H, 2×CH₃), 2,08 (d, 6H, 2×COCH₃), 4,26-4,33 (m, 4H, 2×CH₂), 6,87-6,92 (d, J = 19,8 Hz, 2H, 2×CH=), 7,44-7,71 (m, 4H, 2×CH_{Ar}), 7,88-7,92 (t, J = 8,2 Hz, 2H, 2×CH_{Ar}), 8,12-8,24 (m, 2H, 2×CH_{Ar}), 10,18 (d, 2H, 2×NH) ppm; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz) δ 14,29, 14,35, 24,47, 24,58, 62,99, 98,22, 98,52, 118,39, 122,86, 123,02, 124,01, 124,08,

129,97, 130,09, 134,84, 135,19, 140,35, 160,31, 169,14, 169,24, 170,79, 184,27, 184,88 ppm;
ESI-MS (m/z): $[M + H]^+ = 659$; Израчунато за $C_{28}H_{28}N_2O_{10}Pd$ (%): C 51,04 H 4,28 N 4,25;
Нађено (%): C 52,24 H 4,23 N 4,18.

4Б [Pd(2И)₂].

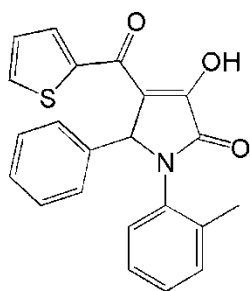
Кристали жуте боје; Принос: 79%; $T_m = 184^\circ C$;
UV-Vis (λ_{max}/nm , $(\log(\epsilon/M^{-1} cm^{-1}))$): 279 (4,57);
IR (KBr, cm^{-1}): ν 3508, 3362, 2934, 1732, 1649,
1607, 1562, 1508, 1434, 1295, 1251, 1175, 1022,
774; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 1,24-1,34

(m, 3H, 2 \times CH₃), 3,85 (s, 6H, 2 \times OCH₃), 4,26-4,37 (m, 4H, 2 \times CH₂), 6,94-7,10 (m, 18H, CH= +
CH_{Ar}), 10,37 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, 2 \times NH) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 13,83, 13,91,
55,47, 62,55, 97,96, 113,67, 119,22, 122,86, 122,98, 124,84, 126,57, 129,67, 134,38, 134,64,
140,02, 159,93, 162,07, 165,17, 168,93, 170,39, 184,0 ppm; ESI-MS (m/z): $[M + H]^+ = 843$.
Израчунато за $C_{40}H_{36}N_2O_{12}Pd$ (%): C 56,98 H 4,30 N 3,32; Нађено (%): C 57,32 H 4,34 N
3,35.

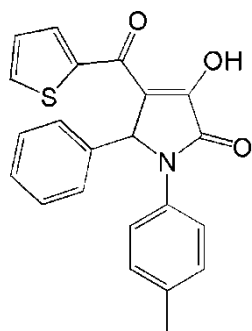
3.5. Синтеза 1,5-диарил-4-(2-тиенилкарбонил)-3-хидрокси-3-пиролин-2-она (5А-Х)

Смеша од 1 mmol-а ароматичног алдехида и 1 mmol-а ароматичног амина растворених у 3 ml глацијалне сирћетне киселине загревана је до 50°C. Након постизања одговарајуће температуре, у капима се додаје раствор 1 mmol ацилпирувата **2Д** раствореног у 2 ml глацијалне сирћетне киселине. Након 3-5 h реакционог времена дошло је до таложења одговарајућег производа. Након 8 h талог је филтриран и испран безводним диетил етром (једињења **5А-М**). У случају када након 8 h реакције није дошло до таложења производа (једињења **5Н-Х**), глацијална сирћетна киселина се упари до сува а у суви остатак се дода 5 ml сувог диетил етра. Талог се затим процеди, и додатно испере сувим диетил етром. Прекристализација је извршена из кључалог етанола. Добијени производи **5А-Х** су сушени на собној температури. Реакција је праћена танкослојном хроматографијом са CH₂Cl₂ : CH₃CH₂OH = 9 : 1 као развијачем. Сва синтетисана једињења су окарактерисана NMR спектроскопијом.

3-хидрокси-5-фенил-1-(*o*-толил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**5А**)

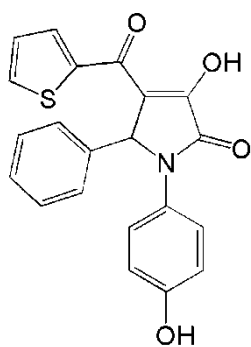


Прах беле боје; Принос: 85%; T_т = 257°C; IR (KBr): ν 3246, 1710, 1690, 1680, 1612, 1515, 1499, 1405, 1339, 1299, 1248, 1184, 1053, 988, 856, 832, 762, 740 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): δ = 1,91 (s, 3H, CH₃), 6,44 (s, 1H, CH), 7,03-7,30 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,38-7,43 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,88-8,09 (m, 4H, CH_{Ar}), 8,11-8,25 (m, 2H, CH_{Ar}) ppm; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): δ = 21,2, 61,2, 121,2, 121,9, 124,5, 127,9, 128,4, 128,7, 134,9, 135,6, 135,9, 143,3, 143,7, 143,9, 148,2, 165,5, 172,2, 180,5 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 375 [M]⁺. Израчунато за C₂₂H₁₇NO₃S (%): C 70,38, H 4,56, N 3,73; Нађено: C 70,52, H 4,51, N 3,75.

3-хидрокси-5-фенил-1-(*p*-толил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5Б).

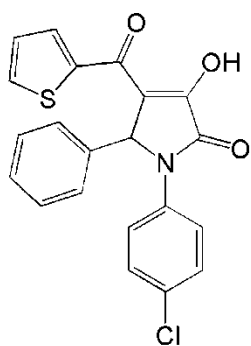
Прах беле боје; Принос: 88%; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ = 1,91 (s, 3H, CH_3), 6,24 (s, 1H, CH), 6,99-7,38 (m, 8H, CH_{Ar}), 7,47 (d, 2H, J = 8,4 Hz, CH_{Ar}), 7,95 (dd, 1H, J = 4,9, 1,1 Hz), 8,05 (dd, 1H, J = 3,8, 1,1 Hz) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ = 21,2, 61,6, 120,2, 122,9, 127,9, 128,1, 128,5, 128,6, 129,3, 133,9, 134,6, 134,9, 135,2, 136,5, 144,1, 149,3, 164,5 ppm ESI-MS: m/z (%) = 375 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{S}$ (%): C 70,38, H 4,56, N 3,73; Нађено: C 70,52, H 4,51, N

3,75.

3-хидрокси-5-фенил-1-(4-хидроксифенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5В)

Прах жуте боје; Принос: 72%; T_m = 246°C; IR (KBr): ν 3468, 3199, 1701, 1677, 1610, 1520, 1455, 1409, 1376, 1262, 1239, 1181, 1137, 1125, 996, 836, 824, 740, 714 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ = 6,16 (s, 1H, CH), 6,61-6,74 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,07-7,39 (m, 8H, CH_{Ar}), 7,95 (dd, 1H, J = 4,9 Hz, 1,1 CH_{Ar}), 8,06 (dd, 1H, J = 3,8, 1,1 Hz), 9,47 (s, 1H, OH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ = 115,4, 119,9, 125,0, 127,8, 127,9, 128,5, 128,6, 136,6, 144,2, 149,6, 155,4, 164,3, 180,4 ppm; ESI-

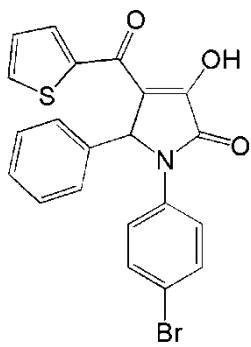
MS: m/z (%) = 377 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$ (%): C 66,83, H 4,01, N 3,71; Нађено: C 67,01, H 4,11, N 3,75.

3-хидрокси-5-фенил-1-(4-хлорфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5Г)

Прах беле боје; Принос: 81%; T_m = 240°C; IR (KBr): ν 3187, 1709, 1672, 1610, 1495, 1414, 1370, 1298, 1281, 1245, 1187, 1091, 987, 852, 836, 742, 725 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ = 6,32 (s, 1H, CH), 7,09-7,24 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,29-7,42 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,61-7,70 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,96 (dd, 1H, J = 4,9 Hz, 1,1 CH_{Ar}), 8,02 (dd, 1H, J = 3,8, 1,1 Hz), 12,0 (s, 1H, OH_{enol}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ = 61,4, 120,5, 124,3, 127,9, 128,6, 128,8, 129,6, 135,4, 136,2, 144,0, 148,9, 164,8, 180,4 ppm; ESI-MS:

m/z (%) = 396 $[M]^+$. Израчунато за $C_{21}H_{14}ClNO_3S$ (%): C 63,72, H 3,56, N 3,54; Нађено: C 63,52, H 3,59, N 3,55.

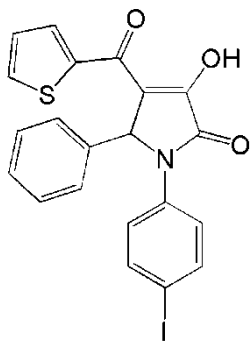
3-хидрокси-5-фенил-1-(4-бромфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он
(5Д)



Прах беле боје; Принос: 84%; $T_m = 237^\circ C$; IR (KBr): ν 3188, 1709, 1684, 1671, 1610, 1492, 1412, 1370, 1297, 1245, 1128, 986, 852, 833, 741, 724 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,31$ (s, 1H, CH), 7,02-7,41 (m, 6H, CH_{Ar}), 7,41-7,68 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,96 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, 1,1 CH_{Ar}), 8,05 (dd, 1H, $J = 3,8, 1,2$ Hz) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 117,9, 120,5, 124,6, 127,9, 128,6, 131,7, 135,8, 136,2, 144,0, 148,9, 165,8, 180,4$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 440 $[M]^+$. Израчунато за $C_{21}H_{14}BrNO_3S$

(%): C 57,28, H 3,20, N 3,18; Нађено: C 57,42, H 3,22, N 3,15.

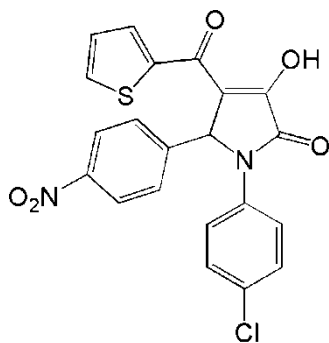
3-хидрокси-5-фенил-1-(4-јодфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5Ђ)



Прах беле боје; Принос: 72%; $T_m = 239^\circ C$; IR (KBr): ν 3178, 1684, 1665, 1608, 1490, 1413, 1383, 1292, 1244, 1134, 983, 852, 826, 715, 698 cm^{-1} ; 1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,30$ (s, 1H, CH), 7,09-7,24 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,30-7,35 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,41-7,51 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,59-7,69 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,96 (dd, 1H, $J = 5,0$ Hz, 1,1 CH_{Ar}), 8,04 (dd, 1H, $J = 3,8, 1,2$ Hz) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 61,2, 90,3, 120,5, 124,7, 127,8, 128,2, 128,6, 134,7, 135,3, 136,2, 137,5, 144,0, 148,8, 165,7, 180,4$

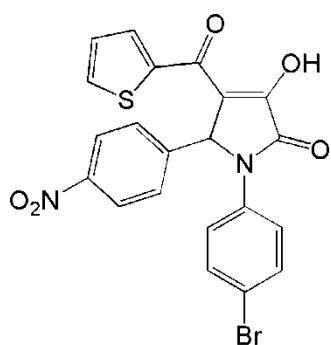
ppm; ESI-MS: m/z (%) = 487 $[M]^+$. Израчунато за $C_{21}H_{14}INO_3S$ (%): C 51,76, H 2,90, N 2,87; Нађено: C 51,86, H 2,91, N 2,85.

3-хидрокси-1-(4-хлорфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-нитрофенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**5E**)



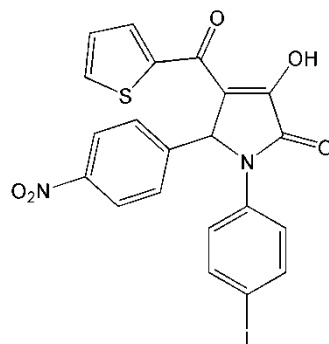
Прах жуте боје; Принос: 77%; $T_m = 225^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3102, 1703, 1667, 1599, 1535, 1494, 1411, 1376, 1350, 1264, 1244, 1205, 1092, 987, 836, 745, 728 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,50$ (s, 1H, CH), 7,14-7,29 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,37 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, CH_{Ar}), 7,65-7,70 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,87-8,18 (m, 4H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,6$, 119,4, 123,6, 124,2, 128,6, 128,9, 129,3, 129,9, 134,6, 135,0, 135,3, 143,8, 144,2, 147,3, 149,7, 164,6, 179,9 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 441 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 57,21, H 2,97, N 6,35; Нађено: C 57,42, H 3,00, N 6,32.

3-хидрокси-1-(4-бромфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-нитрофенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**5Ж**)



Прах жуте боје; Принос: 79%; $T_m = 188^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3084, 1702, 1667, 1599, 1534, 1489, 1410, 1375, 1349, 1264, 1243, 1197, 1130, 986, 834, 745, 728 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,49$ (s, 1H, CH), 7,21 (dd, 1H, $J = 4,9, 3,9$ Hz, CH_{Ar}), 7,50 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, CH_{Ar}), 7,57-7,73 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,90-8,18 (m, 4H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,5$, 118,1, 119,3, 123,6, 124,5, 128,6, 129,3, 131,8, 134,6, 135,3, 135,4, 143,8, 144,3, 147,3, 149,8, 164,6, 179,8 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 485 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 51,97, H 2,70, N 5,77; Нађено: C 52,02, H 2,71, N 5,75.

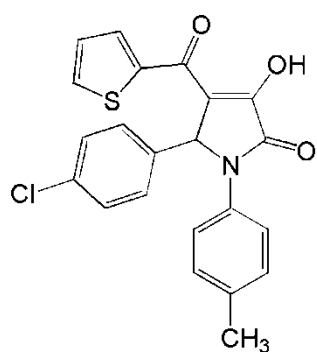
3-хидрокси-1-(4-јодфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-нитрофенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**53**)



Прах жуте боје; Принос: 67%; $T_m = 195^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3106, 1710, 1669, 1602, 1518, 1490, 1410, 1373, 1346, 1267, 1245, 1193, 1129, 1056, 986, 827, 743, 720 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,49$ (s, 1H, CH), 6,47-6,50 (m, 1H, CH), 7,15-7,27 (m, 1H, CH), 7,47 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz), 7,60-7,72 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,95-8,12 (m, 4H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,4$,

90,7, 119,3, 123,6, 124,5, 128,6, 129,3, 134,6, 135,3, 135,9, 137,7, 143,8, 144,3, 147,3, 149,9, 164,6, 179,8 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 532 [M]⁺. Израчунато за C₂₁H₁₃IN₂O₅S (%): C 47,38, H 2,46, N 5,26; Нађено: C 47,30, H 2,44, N 5,28.

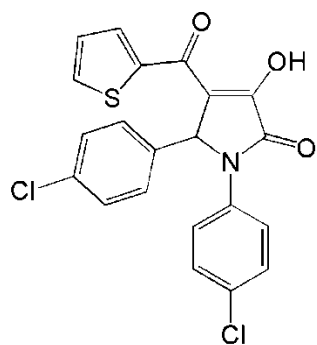
*3-хидрокси-1-(*p*-толил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-хлорфенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5И)*



Прах жуте боје; Принос: 92%; Т_т = 240°C; IR (KBr): ν 3099, 1708, 1666, 1595, 1513, 1407, 1379, 1268, 1245, 1089, 988, 826, 751, 729 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): δ = 1,91 (s, 3H, CH₃), 6,28 (s, 1H, CH), 7,10 (d, 2H, J = 8,3 Hz), 7,16-7,28 (m, 3H, CH), 7,35 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,47 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,96 (dd, 1H, J = 4,9, 1,0 Hz), 8,08 (dd, 2H, J = 3,8, 1,0 Hz) ppm; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): δ = 21,2, 60,8, 119,6, 122,8, 128,4, 128,6, 129,3, 129,7, 132,6,

133,6, 134,5, 135,0, 135,2, 135,7, 144,0, 149,5, 164,3, 180,2 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 410 [M]⁺. Израчунато за C₂₂H₁₆ClNO₃S (%): C 64,47, H 3,93, N 3,42; Нађено: C 64,53, H 3,91, N 3,40.

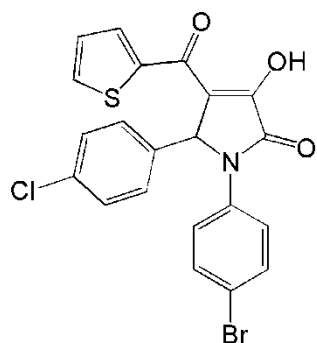
3-хидрокси-1,5-bis(4-хлорфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5Ј)



Прах беле боје; Принос: 85%; Т_т = 231°C; IR (KBr): ν 3172, 1711, 1670, 1607, 1494, 1416, 1371, 1280, 1248, 1090, 988, 833, 760, 724 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-d₆, 200 MHz): δ = 6,34 (s, 1H, CH), 7,19-7,28 (m, 3H, CH), 7,34-7,43 (m, 4H, CH), 7,66 (d, 2H, J = 9,0 Hz), 7,97 (dd, 1H, J = 4,9, 1,1 Hz), 8,09 (dd, 1H, J = 3,8, 1,1 Hz), 11,87 (br. s, 1H, OH_{енол}) ppm; ¹³C NMR (DMSO-d₆, 50 MHz): δ = 60,9, 120,2, 124,6, 128,9, 129,0, 129,2, 130,0, 130,2, 133,1, 135,1, 135,7,

144,3, 149,6, 165,0, 172,5, 180,6 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 430 [M]⁺. Израчунато за C₂₁H₁₃Cl₂NO₃S (%): C 58,62, H 3,05, N 3,26; Нађено: C 58,68, H 3,02, N 3,25.

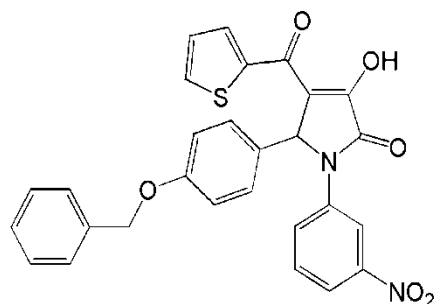
3-хидрокси-1-(4-бромфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-хлорфенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (5К).



Прах беле боје; Принос: 80%; $T_m = 230^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3161, 1711, 1670, 1606, 1492, 1412, 1371, 1279, 1284, 1092, 988, 831, 759, 722 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,34$ (s, 1H, CH), 7,18-7,28 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,35-7,43 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,47-7,54 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,56-7,65 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,96 (dd, 1H, $J = 4,9, 1,1$ Hz, CH_{Ar}), 8,09 (dd, 1H, $J = 3,8, 1,1$ Hz, CH_{Ar}), 11,96 (br. s, 1H, $\text{OH}_{\text{енол}}$) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,9, 118,3, 120,3, 124,9, 128,9,$

129,0, 130,1, 132,1, 133,1, 135,1, 135,6, 135,7, 135,9, 144,3, 149,6, 165,0, 172,5, 180,6 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 475 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{BrClNO}_3\text{S}$ (%): C 53,13, H 2,76, N 2,95; Нађено: C 53,22, H 2,74, N 2,96.

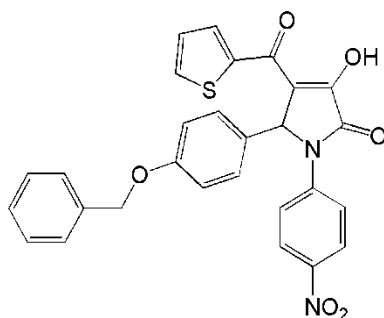
3-хидрокси-1-(3-нитрофенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-(бензилокси)фенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (5Л).



Прах жуте боје; Принос: 73%; $T_m = 209^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3159, 1681, 1666, 1606, 1496, 1414, 1383, 1243, 1172, 1091, 984, 846, 755, 715 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 4,92$ (s, 2H, OCH_2), 6,28 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz, CH), 6,82 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, CH_{Ar}), 7,16-7,52 (m, 10H, CH_{Ar}), 7,61-7,73 (m, 2H, CH_{Ar}), 7,97-8,07 (m, 2H, CH_{Ar}), 11,68

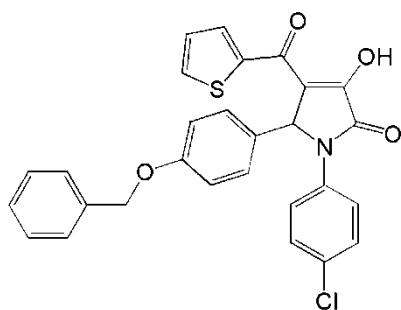
(br. s, 1H, $\text{OH}_{\text{енол}}$) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 61,2, 115,0, 124,7, 128,2, 128,3, 128,6, 128,8, 129,0, 129,1, 129,5, 129,6, 129,9, 132,3, 135,1, 135,6, 135,7, 137,3, 144,4, 149,0, 158,6, 165,0, 180,9$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 513 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{28}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (%): C 65,62, H 3,93, N 5,47; Нађено: C 65,71, H 3,91, N 5,44.

3-хидрокси-1-(4-нитрофенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-(бензилокси)фенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (**5Ј**).



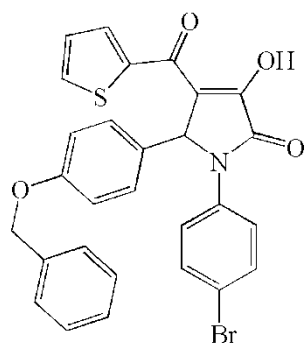
Прах жуте боје; Принос: 77%; $T_m = 242^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3226, 1689, 1678, 1609, 1512, 1338, 1248, 1172, 988, 859, 753, 722 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 4,91$ (s, 2H, OCH $_2$), 6,38 (s, 1H, CH), 6,83 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz, CH $_{Ar}$), 7,20-7,35 (m, 8H, CH $_{Ar}$), 7,89-8,08 (m, 4H, CH $_{Ar}$), 8,18 (d, 2H, $J = 9,2$ Hz, CH $_{Ar}$) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,8, 69,4, 114,8, 121,2, 122,0, 124,4, 127,5, 127,9, 128,5, 128,7, 129,1, 134,9, 135,5, 136,9, 142,2, 143,6, 143,8, 147,9, 158,2, 165,3, 180,4$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 513 [M] $^+$. Израчунато за C $_{28}$ H $_{20}$ N $_2$ O $_6$ S (%): C 65,62, H 3,93, N 5,47; Нађено: C 65,70, H 3,92, N 5,49.

3-хидрокси-1-(4-хлорфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-(бензилокси)фенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (**5М**)



Прах жуте боје; Принос: 79%; $T_m = 205^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3178, 1682, 1667, 1607, 1512, 1496, 1384, 1244, 1173, 1092, 985, 847, 756, 716 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 4,93$ (s, 2H, OCH $_2$), 6,28 (s, 1H, CH), 6,83 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, CH $_{Ar}$), 7,21-7,39 (m, 10H, CH $_{Ar}$), 7,67 (d, 2H, $J = 8,9$ Hz, CH $_{Ar}$), 7,97 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz, CH $_{Ar}$), 8,07 (d, 1H, $J = 3,8$ Hz, CH $_{Ar}$), 11,93 (s, 1H, OH $_{енол}$) ppm; $^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 61,2, 69,7, 115,0, 115,8, 120,8, 124,7, 128,1, 128,2, 128,3, 128,6, 128,8, 129,0, 129,1, 129,5, 129,8, 132,3, 135,1, 135,6, 135,7, 137,3, 144,4, 149,0, 158,6, 165,0, 180,8$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 502 [M] $^+$. Израчунато за C $_{28}$ H $_{20}$ ClNO $_4$ S (%): C 66,99, H 4,02, N 2,79; Нађено: C 67,04, H 3,99, N 2,77.

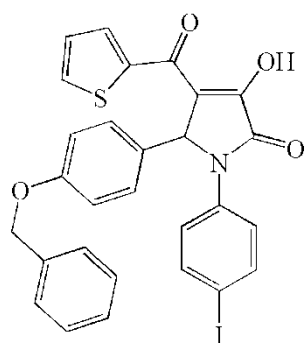
3-хидрокси-1-(4-бромфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-(бензилокси)фенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**5H**)



Праx жуте боје; Принос: 81%; Т_т = 202°C; IR (KBr): ν 3175, 1681, 1667, 1609, 1510, 1492, 1412, 1372, 1246, 1174, 987, 828, 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ = 4,92 (s, 2H, OCH₂), 6,26 (s, 1H, CH), 6,81 (d, 2H, J = 8,8 Hz, CH_{Ar}), 7,24-7,36 (m, 8H, CH_{Ar}), 7,67 (m, 4H, CH_{Ar}), 8,06 (m, 2H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ = 60,8, 69,4, 114,6, 117,8, 120,5, 124,6, 127,8, 127,9, 128,4, 128,6, 129,0, 131,6, 134,6, 135,7, 136,9, 148,6, 158,1, 180,4 ppm; ESI-

MS: m/z (%) = 546 [M]⁺. Израчунато за C₂₈H₂₀BrNO₄S (%): C 61,54, H 3,69, N 2,56; Нађено: C 60,04, H 3,71, N 2,59.

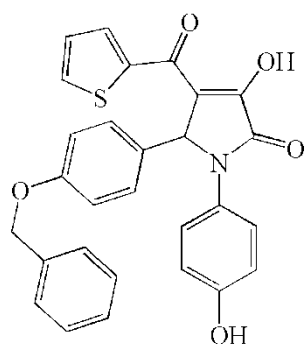
3-хидрокси-1-(4-јодфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-(бензилокси)фенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**5B**)



Праx жуте боје; Принос: 80 %; Т_т = 182°C; IR (KBr): ν 3244, 1682, 1607, 1510, 1489, 1410, 1367, 1240, 1174, 987, 826, 755 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): δ = 4,92 (s, 2H, OCH₂), 6,24 (s, 1H, CH), 6,44 (d, 1H, CH_{Ar}), 6,81 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,23-7,47 (m, 9H, CH_{Ar}), 7,65 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,85-8,06 (m, 2H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): δ = 90,2, 114,6, 115,4, 116,7, 124,7, 127,9, 128,4, 128,6, 129,0, 131,9, 137,5, 144,1, 148,7, 158,1, 164,5, 180,2 ppm ESI-MS:

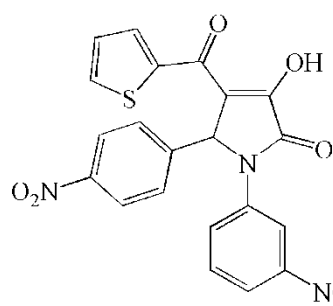
m/z (%) = 593 [M]⁺. Израчунато за C₂₈H₂₀INO₄S (%): C 56,67, H 3,40, N 2,36; Нађено: C 57,04, H 3,44, N 2,32.

3-хидрокси-1-(4-хидроксифенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-(бензилокси)фенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**50**)



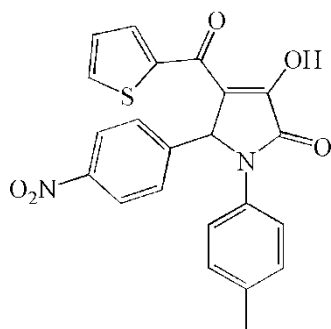
Прах жуте боје; Принос: 85 %; $T_m = 214^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3151, 1679, 1667, 1608, 1514, 1411, 1385, 1242, 1172, 988, 829, 737, 718 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 4,92$ (s, 2H, OCH_2), 6,08 (s, 1H, CH), 6,65-6,82 (m, 5H, CH_{Ar}), 7,14-7,36 (m, 9H, CH_{Ar}), 7,85-7,92 (m, 2H, CH_{Ar}), 9,94 (s, 1H, OH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 114,5, 115,2, 115,3, 115,8, 119,3, 122,4, 124,9, 127,9, 128,4, 128,5, 128,7, 129,0, 130,1, 134,2, 134,6, 137,0, 144,5, 155,2, 158,0, 164,3, 180,0$ DMSO- d_6): $\delta = 61,5, 69,5$, ppm; ESI-MS: m/z (%) = 483 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{S}$ (%): C 69,55, H 4,38, N 2,90; Нађено: C 67,04, H 4,40, N 2,92.

3-хидрокси-1-(3-нитрофенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-нитрофенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (**5II**)



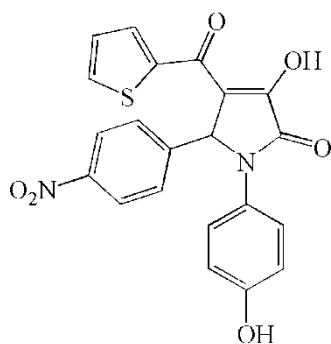
Прах жуте боје; Принос: 87 %; $T_m = 207^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3174, 1693, 1679, 1579, 1532, 1521, 1406, 1382, 1350, 1245, 1195, 841, 824, 728 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,64$ (s, 1H, CH), 7,21 (t, 1H, CH_{Ar}), 7,23-7,64 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,75 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,93-8,68 (m, 6H, CH_{Ar}), 8,70 (d, 1H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,5, 116,7, 120,2, 123,7, 128,0, 128,6, 129,4, 130,4, 134,8, 135,5, 137,2, 143,9, 147,4, 148,0, 165,1, 179,9$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 451 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ (%): C 55,88, H 2,90, N 9,31; Нађено: C 54,04, H 2,93, N 9,29.

3-хидрокси-1-(*p*-толил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-нитрофенил)-2,5-дихидро-1*H*-пирол-2-он (**5P**)



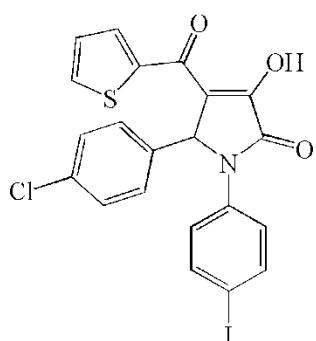
Праx жуте боје; Принос: 89 %; $T_m = 221^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3034, 1704, 1667, 1593, 1513, 1407, 1350, 1265, 1132, 987, 829, 745, 728 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 1,91$ (s, 3H, CH_3), 6,44 (s, 1H, CH), 7,08-7,21 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,23-7,66 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,94-8,13 (m, 4H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 21,25, 60,75, 119,1, 122,7, 123,5, 128,6, 129,3, 129,5, 133,6, 134,7, 135,2, 143,9, 144,7, 147,2, 150,1, 164,4, 179,9$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 420 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 62,85, H 3,84, N 6,66; Нађено: C 63,74, H 3,83, N 6,69.

3-хидрокси-1-(4-хидроксифенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-нитрофенил)-2,5-дихидро-1*H*-пирол-2-он (**5C**)



Праx жуте боје; Принос: 85 %; $T_m = 231^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3394, 3110, 1685, 1664, 1579, 1514, 1410, 1352, 1273, 1242, 1124, 988, 829, 738 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,34$ (s, 1H, CH), 6,67 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,19-7,23 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,36 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,60 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,93-8,15 (m, 4H, CH_{Ar}), 9,53 (s, 1H, OH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 61,3, 115,5, 118,8, 123,5, 124,9, 127,5, 128,6, 129,3, 134,4, 135,1, 144,0, 144,8, 147,2, 150,5, 155,5, 164,2, 179,8$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 422 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ (%): C 59,71, H 3,34, N 6,63; Нађено: C 60,74, H 3,33, N 6,67.

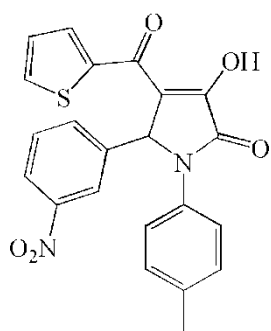
3-хидрокси-1-(4-јодфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(4-хлорфенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (5Т)



Прах жуте боје; Принос: 89 %; $T_m = 225^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3084, 1703, 1667, 1603, 1488, 1409, 1374, 1267, 1244, 1193, 1089, 987, 829, 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,31$ (s, 1H, CH), 7,19-7,26 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,35-7,46 (m, 4H, CH_{Ar}), 7,65 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,95-7,98 (m, 1H, CH_{Ar}), 8,06-8,09 (m, 1H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,5, 90,5, 119,9, 124,6, 128,6, 129,8, 132,8, 134,7, 135,4, 136,0, 137,6, 149,2, 164,6, 180,2$ ppm; ESI-MS:

m/z (%) = 522 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{ClINO}_3\text{S}$ (%): C 48,34, H 2,51, N 2,68; Нађено: C 49,74, H 2,53, N 2,67.

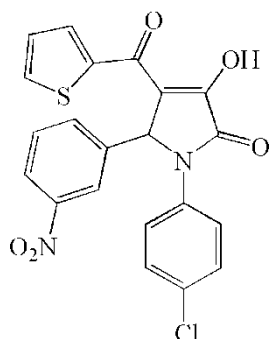
*3-хидрокси-1-(*p*-толил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(3-нитрофенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (5Ђ)*



Прах жуте боје; Принос: 81 %; $T_m = 227^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3078, 1703, 1668, 1588, 1531, 1500, 1407, 1380, 1351, 1269, 1244, 1129, 1064, 986, 829, 752 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 2,18$ (s, 3H, CH_3), 6,48 (s, 1H, CH), 7,08-7,23 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,43-7,54 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,80 (d, 1H, CH_{Ar}), 7,93-7,96 (m, 2H, CH_{Ar}), 8,13-8,15 (t, 1H, CH_{Ar}), 8,26 (s, 1H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 21,2, 60,6, 122,8, 123,0, 123,2, 128,6, 129,5, 130,1, 133,4, 134,2, 134,5, 135,2, 139,4,$

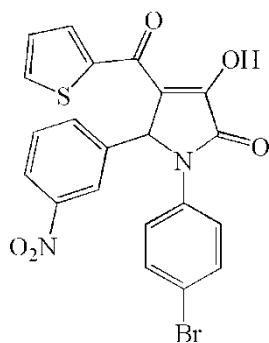
147,7, 150,2, 164,4, 180,0 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 420 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 62,85, H 3,84, N 6,66; Нађено: C 61,74, H 3,80, N 6,67.

3-хидрокси-1-(4-хлорфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(3-нитрофенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5У)



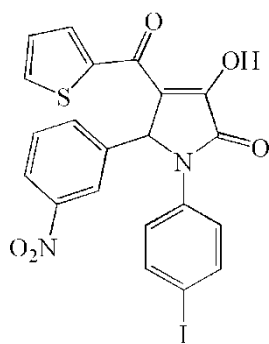
Прах жуте боје; Принос: 76 %; $T_m = 211^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3078, 1705, 1660, 1529, 1496, 1414, 1376, 1350, 1269, 1248, 1091, 987, 833, 757 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,52$ (s, 1H, CH), 7,19-7,23 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,35-7,53 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,67-8,12 (m, 5H, CH_{Ar}), 8,13-8,15 (t, 1H, CH_{Ar}), 8,31 (s, 1H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,5, 123,1, 123,3, 124,3, 128,6, 129,0, 129,9, 130,1, 134,2, 134,7, 134,9, 139,0, 147,7, 149,9, 164,6, 180,0$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 440 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 57,21, H 2,97, N 6,35; Нађено: C 57,99, H 3,01, N 6,37.

3-хидрокси-1-(4-бромфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(3-нитрофенил)-2,5-дихидро-1H-пирол-2-он (5Ф)



Прах жуте боје; Принос: 73 %; $T_m = 167^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3099, 1703, 1661, 1527, 1491, 1411, 1376, 1350, 1268, 1248, 1130, 1064, 986, 830, 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,52$ (s, 1H, CH), 7,19-7,23 (m, 1H, CH_{Ar}), 7,45-7,66 (m, 5H, CH_{Ar}), 7,80-8,01 (m, 3H, CH_{Ar}), 8,13 (d, 1H, CH_{Ar}), 8,31 (s, 1H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,4, 118,1, 123,1, 123,3, 124,6, 128,6, 130,1, 131,9, 134,2, 134,7, 135,3, 139,0, 147,7, 149,9, 164,6, 180,0$ ppm; ESI-MS: m/z (%) = 485 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 51,97, H 2,70, N 5,77; Нађено: C 50,99, H 2,75, N 5,81.

3-хидрокси-1-(4-јодфенил)-4-(2-тиенилкарбонил)-5-(3-нитрофенил)-2,5-дихидро-1Н-пирол-2-он (5Н)



Прах жуте боје; Принос: 69 %; $T_m = 217^\circ\text{C}$; IR (KBr): ν 3075, 1701, 1669, 1588, 1526, 1490, 1410, 1375, 1350, 1266, 1247, 1130, 1063, 984, 828, 755 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 200 MHz): $\delta = 6,50$ (s, 1H, CH), 7,18-7,23 (t, 1H, CH_{Ar}), 7,45-7,52 (m, 3H, CH_{Ar}), 7,65 (d, 2H, CH_{Ar}), 7,82 (d, 1H, CH_{Ar}), 7,94-8,01 (m, 2H, CH_{Ar}), 8,14 (d, 1H, CH_{Ar}), 8,30 (s, 1H, CH_{Ar}) ppm; ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 50 MHz): $\delta = 60,3, 90,7, 123,1, 123,3, 124,6, 128,6, 130,1, 134,1, 134,6, 135,8, 137,7, 139,0, 164,6,$

179,9 ppm; ESI-MS: m/z (%) = 532 $[\text{M}]^+$. Израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{IN}_2\text{O}_5\text{S}$ (%): C 47,38, H 2,46, N 5,26; Нађено: C 49,99, H 2,43, N 5,22.

4. Закључак

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Синтетисана је серија од десет ацилпирувата реакцијом Клајзенове кондензације, полазећи од различитих метил кетона и диетил-оксалата, у високим приносима. Ацилпирувати су затим употребљени као прекурсори за синтезу три нове класе једињења.
- Сва новосинтетисана једињења су окарактерисана спектроскопским анализама (UV-Vis, IR, ^1H и ^{13}C NMR), масеном спектрометријом и елементалном анализом. За одређена једињења је урађена и рендгенска структурна анализа.
- DPPH тест је показао да ацилпирувати имају бољу антиоксидативну активност од одговарајућих комплекса бакра(II), осим у случају комплекса **3В**.
- Једињење **2Б** са $\text{IC}_{50} = 188,25 \mu\text{g/ml}$ показало се као најбољи потенцијални хватач супероксидног ањона.
- MIC вредности за комплексе бакра(II) на тестираним микроорганизмима кретале су се у распону од 0,048 до 3,125 mg/ml. Најосетљивији сој бактерија био је *Proteus mirabilis*, док је међу гљивицама најосетљивији сој био *Candida albicans*.
- Сви комплекси бакра(II) показали су ниже вредности IC_{50} на ћелијским линијама LS174 и A549 у односу на цисплатину. Комплекс **3Г** је показао најбољу активност на HeLa, LS174 и A549 ћелијским линијама ($\text{IC}_{50} = 7,91$, односно 7,45 и 7,78 $\mu\text{g/ml}$)
- Резултати антитуморске активности паладијумових комплекса показали су да три комплекса (**4В**, **4Г** и **4Д**) имају прилично добру цитотоксичну активност на HeLa ћелијама и значајну активност на MDA-MB 231 ћелијама. Најнижа IC_{50} вредност ($0,5 \pm 2,8 \mu\text{M}$) измерена је за комплекс **4В** на HeLa ћелијској линији. Поред тога, једињење **4В** је показало много бољу селективност на MRC-5 ћелијама у поређењу са цисплатином.
- Резултати добијени испитивањем итеракција између једињења паладијума и цисплатине показују да комплекси **4В** и **4Г** могу бити корисни као помоћна средства у терапији за лечење тумора, смањујући дозе цисплатина и тиме нежељених ефеката овог лека. Треба нагласити да, иако је комплекс **4В** био високо цитотоксичан за нормалне фибробласте (IC_{50} након 48h била је 19,2 μM), концентрације које

синергистички делују са цисплатином (0,5 и 0,25 μM) нису показале цитотоксичност на фибробластима.

- Међу тестираним пириролидинонима, једињење **5O** је показало највећи потенцијал уклањања DPPH радикала са IC_{50} од 166,75 $\mu\text{g/ml}$. Способност уклањања DPPH радикала је такође била добра за пириролидиноне **5З**, **5В** и **5Д**.
- Пириролидинони **5К** и **5М** показали су значајну инхибиторну активност на соју бактерија *Staphylococcus aureus* у прилично ниским концентрацијама (MIC су биле 0,312, односно 0,625 mg/ml).
- Најбољу антифунгалну активност из серије пириролидиносних деривата показала су једињења **5Л**, **5М** и **5Њ** на соју *Trichophyton mentagrophytes* са MIC од 0,625 mg/ml.
- Резултати антитуморске активности пириролидинона показали су да једињења **5И**, **5Л**, **5Љ** и **5М** имају најбољи цитотоксични ефекат на тестираним ћелијским линијама тумора, и то нешто јачи на HeLa него на MDA-MB 231 ћелијама. Пириролидинос **5Л** је показао најјачи цитотоксични ефекат на HeLa ћелијама са IC_{50} вредностима од $40,9 \pm 5,9 \mu\text{M}$ и $54,35 \pm 8,56 \mu\text{M}$ за SRB, односно МТТ тест.
- Резултати добијени испитивањем интеракција ДНК са молекулима из све три групе једињења (комплекси бакра(II), комплекси паладијума(II) и пириролидинони) показали су да једињења интерагују са ДНК путем интеркалације, што је додатно потврђено мерењем вискозности одговарајућих раствора.
- Испитивањем интеракције одабраних молекула, из све три групе (комплекси бакра(II), комплекси паладијума(II) и пириролидинони), са серум албумином дошло се до открића да се значајна количина тестираних једињења може транспортовати и дистрибуирати кроз ћелије.
- Резултати испитивања биолошког потенцијала све три групе једињења (комплекси бакра, комплекси паладијума и пириролидинони) показали су да ови молекули имају добар потенцијал за примену у медицини у будућности, за лечење неких болести, а све заједно указује на значај супстрата као што су ацилпиривати у медицинској и синтетичкој хемији.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. C. S. Marvel, E. E. Dreger, *Org. Synth.*, 1926, **6**, 40.
2. V. V. Zalesov, S. S. Kataev, N. A. Pulina, N. A. Kovylyayeva, *Russ. J. Org. Chem.*, 2002, **38**, 840.
3. H.-L. Huang, I. V. Krieger, M. K. Parai, V. B. Gawandi, J. C. Sacchettini, *J. Biol. Chem.*, 2016, **291**, 27421.
4. G. Guo, J. Liu, G. Wang, D. Zhang, J. Lu, G. Zhao, *Anti-Cancer Drugs*, 2016, **27**, 278.
5. W. S. S. Gehan, T. El-Bassyouni, *J. Iran. Chem. Soc.*, 2018, **15**, 1639.
6. V. L. Gein, E. A. Buldakova, A. N. Korol, G. A. Veikhman, M. V. Dmitriev, *Russ. J. Gen. Chem.*, 2018, **88**, 908.
7. E. E. Stepanova, M. V. Dmitriev, A. N. Maslivets, *Russ. J. Org. Chem.*, 2019, **55**, 402.
8. I. V. Kulakov, A. A. Karbainova, Z. T. Shulgau, T. M. Seilkhanov, Y. V. Gatilov, A. S. Fisyuk, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2017, **53**, 1094.
9. K. Ya. Zhrebker, A. N. Rodionov, E. S. Pilipenko, V. V. Kachala, O. M. Nikitin, Yu. A. Belousov, A. A. Simenel, *Russ. J. Org. Chem.*, 2014, **50**, 1150.
10. H. Kabirifard, S. Ghahremani, A. Afsharpoor, *J. Sulf. Chem.*, 2015, **36**, 591.
11. P. Prokop T. Gelbrich J. Sieler R. Richter L. Beyer, *Zeit. Anorg. Allg. Chem.*, 2001, **627**, 965.
12. A. V. Kormanov, D. L. Lipilin, T. K. Shkineva, I. A. Vatsadze, A. M. Kozeev, I. L. Dalinger, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2017, **53**, 876.
13. J.-A. Jiang, C.-Y. Du, C.-H. Gu, Y.-F. Ji, *Synlett*, 2012, **23**, 2965.
14. D. L. Obydenov, L. R. Khammatova, O. S. Eltsov, V. Y. Sosnovskikh, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 1692.
15. V. Uchil, B. Seo, V. Nair, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 8577.
16. Y. Liu, M. Liu, S. Guo, H. Tu, Y. Zhou, H. Gao, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 3445.
17. P. Herczegh, I. Kovacs, A. Kovacs, L. Szilagyi, F. Sztaricskai, *Synlett*, 1991, **10**, 705.
18. E. S. Childress, J. M. Wieting, A. S. Felts, M. M. Breiner, M. F. Long, V. B. Luscombe, A. L. Rodriguez, H. P. Cho, A. L. Blobaum, C. M. Niswender, K. A. Emmitte, P. J. Conn, C. W. Lindsley, *J. Med. Chem.*, 2019, **62**, 378.
19. S.-Z. Rena, Z.-C. Wang, X.-H. Zhua, D. Zhua, Z. Lia, F.-Q. Shena, Y.-T. Duanc, H. Caoa, J. Zhaob, H.-L. Zhua, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26**, 4264.
20. S. A. Usachev, V. Ya. Sosnovskikh, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2016, **52**, 1005.

21. M. Alvarado, J. Decara, M. Jesús Luque, L. Hernandez-Folgado, M. Gómez-Cañas, M. Gómez-Ruiz, J. Fernández-Ruiz, J. Elguero, N. Jagerovic, A. Serrano, P. Goya, F. Rodríguez de Fonseca, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 1708.
22. B. Asproni, I. Manca, G. Pinna, E. Cichero, P. Fossa, G. Murineddu, P. Lazzari, G. Loriga, G. A. Pinna, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2017, **1**, 13.
23. D. L. Obydenov, L. R. Khammatova, V. Ya. Sosnovskikh, *Mendeleev Commun.*, 2017, **27**, 172.
24. D. L. Obydenov, G.-V. Rösenthaller, V. Ya. Sosnovskikh, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 472.
25. D. L. Obydenov, V. Ya. Sosnovskikh, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2014, **50**, 579.
26. A. O. Chagarovskiy, O. A. Ivanova, A. N. Shumsky, I. V. Trushkov, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2017, **53**, 1220.
27. D. R. Fandrick, S. Sanyal, J. Kaloko, J. A. Mulder, Y. Wang, L. Wu, H. Lee, F. Roschangar, M. Hoffmann, C. H. Senanayake, *Org. Lett.*, 2015, **17**, 2964.
28. J. C. Sloop, B. Lechner, G. Washington, C. L. Bumgardner, W. D. Loehle, W. Creasy, *Int. J. Chem. Kinet.*, 2008, **40**, 370.
29. D. K. Kölmel, E. T. Kool, *Chem. Rev.*, 2017, **117**, 10358.
30. E. T. Kool, D.-H. Park, P. Crisalli, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 17663.
31. J. March, *Adv. Org. Chem.*, 1999, 599.
32. S. E. Sen, S. L. Roach, J. K. Boggs, G. J. Ewing, J. J. Magrath, *Org. Chem.*, 1997, **62**, 6684.
33. C.-Y. Zhou, P. Chan, C.-M. Che, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 325.
34. E. Mizushima, K. Sato, T. Hayashi, M. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 4563.
35. M. Letizia, B. Stefania, F. Angela, R. L. De LucaMaria, Z. Anna-Maria, M. Zeger, D. Myriam, W. A. Chimirri, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 7084.
36. Z. Li, Z.-C. Wang, X. Li, M. Abbas, S.-Y. Wu, S.-Z. Ren, Q.-X. Liu, Y. Liu, P.-W. Chen, Y.-T. Duan, P.-C. Lv, H.-L. Zhu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, **169**, 168.
37. G. Dannhardt, G. Lambrecht, S. Laufer, E. Mutschler, J. Schweiger, *Arch Pharm (Weinheim)*. 1995, **328**, 437.
38. W.-H. Zhou, X.-G. Xu, J. Li, X. Min, J.-Z. Yao, G.-Q. Dong, C.-L. Zhuang, Z.-Y. Miao, W.-N. Zhang, *Chin. Chem. Lett.*, 2017, **28**, 422.

39. A. Shi, L. Zhang, H. Wang, S. Wang, M. Yang, Q. Guan, K. Bao, W. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **155**, 590.
40. V. Nair, M. O. Okello, N. K. Mangu, B. I. Seo, M. G. Gund, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 1269.
41. A. K. Sharma, U. H. Sk, M. A. Gimbor, J. A. Hengst, X. Wang, J. Yun, S. Amin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 4149.
42. M. Okello, M. Nishonov, P. Singh, S. Mishra, N. Mangu, B. Seo, M. Gund, V. Nair, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 7852.
43. X. Z. Zhao, E. A. Semenova, C. Liao, M. Nicklaus, Y. Pommierb, T. R. Burke, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 7816.
44. B. I. Seo, V. R. Uchil, M. Okello, S. Mishra, X.-H. Ma, M. Nishonov, Q. Shu, G. Chi, V. Nair, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2011, **2**, 877.
45. R. Costi, M. Metifiot, F. Esposito, G. C. Crucitti, L. Pescatori, A. Messori, L. Scipione, S. Tortorella, L. Zinzula, E. Novellino, Y. Pommier, E. Tramontano, C. Marchand, R. Di Santo, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 8588.
46. R. Costi, M. Metifiot, S. Chung, G. C. Crucitti, K. Maddali, L. Pescatori, A. Messori, V. N. Madia, G. Pupo, L. Scipione, S. Tortorella, F. Saverio Di Leva, S. Cosconati, L. Marinelli, E. Novellino, S. F. J. Le Grice, A. Corona, Y. Pommier, C. Marchand, R. Di Santo, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 3223.
47. O. Sari, V. Roy, M. Metifiot, C. Marchand, Y. Pommier, S. Bourg, P. Bonnet, R. F. Schinazi, L. A. Agrofoglio, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **104**, 127.
48. L. Pescatori, M. Métifiot, S. Chung, T. Masaoka, G. C. Crucitti, A. Messori, G. Pupo, V. N. Madia, F. Saccoliti, L. Scipione, S. Tortorella, F. Saverio Di Leva, S. Cosconati, L. Marinelli, E. Novellino, S. F. John Le Grice, Y. Pommier, C. Marchand, R. Costi, R. Di Santo, *J. Med. Chem.*, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00159, 2015.
49. G. C. Crucitti, M. Métifiot, L. Pescatori, A. Messori, V. N. Madia, G. Pupo, F. Saccoliti, L. Scipione, S. Tortorella, F. Esposito, A. Corona, M. Cadeddu, C. Marchand, Y. Pommier, E. Tramontano, R. Costi, R. Di Santo, *J. Med. Chem.*, DOI: 10.1021/jm501799k, 2015.
50. A. Bhatta, K.R. Gurukumarb, A. Basub, M. R. Patela, N. Kaushik-Basub, T. T. Talelea, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 5138.

51. A. M. Kashid, P. N. Dube, P. G. Alkutkar, K. G. Bothara, S. N. Mokale, S. C. Dhawale, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 4633.
52. M. M. Masood, V. K. Pillalamarri, M. Irfan, B. Aneja, M. A. Jairajpuri, Md. Zafaryab, M. M. A. Rizvi, U. Yadava, A. Addlagatta, *M. Abid, RSC Adv.*, 2015, **5**, 34173.
53. M. J. Naim, O. Alam, F. Nawaz, Md. J. Alam, P. Alam, *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 2016, **8**, 2.
54. T. Eicher, S. Hauptmann, 2nd ed. New York: Wiley-VCH; 2003. *The Chemistry of Heterocycles: Structure, Reactions, Synthesis and Applications.*
55. D. D. Perrin, London: Butterworths; 1972. *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution.*
56. Y. R. Girish, K. S. S. Kumar, H. S. Manasa, S. Shashikanth, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2014, **61**, 1175.
57. A. A. Radwan, M. M. Ghorab, M. S. Alsaied, F. K. Alanz., *Acta Pharm.*, 2014, **64**, 335.
58. D. Geffken, R. Soliman, F. S. G. Soliman, M. M. Abdel-Khalek, D. A. E. Iss, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 408.
59. L.-W. Chen, P.-F. Wang, D.-J. Tang, X.-X. Tao, R.-J. Man, H.-Y. Qiu, Z.-C. Wang, C. Xu, H.-L. Zhu, *Chem. Biol. Drug. Des.*, 2016, 1.
60. Y. Ma, S. Liang, Y. Zhang, D. Yang, R. Wang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.040.
61. A. Kamal, A. B. Shaik, S. Polepalli, V. S. Reddy, G. B. Kumar, S. Gupta, K. V. S. R. Krishna, A. Nagabhushana, R. K. Mishrae, N. Jain, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 7993.
62. J. B. Shi, W. J. Tang, X. Bao qi, R. Li, X. H. Liu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **90**, 889.
63. X.-Y. Lu, Z.-C. Wang, S.-Z. Ren, F.-Q. Shen, R.-J. Man, H.-L. Zhu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.037>.
64. S.-Z. Rena, Z.-C. Wang, X.-H. Zhua, D. Zhua, Z. Lia, F.-Q. Shena, Y.-T. Duanc, H. Caoa, J. Zhao, H.-L. Zhua, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018,**26**, 4264.
65. S.-Z. Ren, Z.-C. Wang, D. Zhu, X.-H. Zhu, F.-Q. Shen, S.-Y. Wu, J.-J. Chen, C. Xu, H.-L. Zhu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **157**, 909.
66. X.-Y. Lu, Z.-C. Wang, T. Wei, X.-Q. Yan, P.-F. Wang, H.-L. Zhu, *RSC Adv.*, 2016, DOI: 10.1039/C6RA02168A.

67. S. H. Hwang, K. M. Wagner, C. Morisseau, J.-Y. Liu, H. Dong, A. T. Wecksler, B. D. Hammock, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 3037.
68. T. Rogez-Florent, S. Meignan, C. Foulon, P. Six, A. Gros, C. Bal-Mahieu, C. T. Supuran, A. Scozzafava, R. Frédérick, B. Masereel, P. Depreux, A. Lansiaux, J.-F. Goossens, S. Gluszok, L. Goossens, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 1451.
69. H.-Z. Zhang, Z.-L. Zhao, C.-H. Zhou, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.044.
70. W. Shi, J. Hu, N. Bao, D. Li, L. Chen, J. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2017, **27**, 147.
71. C. Zhang, X. Wang, H. Liu, M. Zhang, M. Geng, L. Sun, A. Shen, A. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **125**, 315.
72. D. Li, N. Gao, N. Zhu, Y. Lin, Y. Li, M. Chen, X. You, Y. Lu, K. Wan, J. D. Jiang, W. Jiang, S. Si, *Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 5178.
73. P. Neeraja, S. Srinivas, K. Mukkanti, P. K. Dubey, S. Pal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 5212.
74. W. Zhang, J. Liu, J. M. Macho, X. Jiang, D. Xie, F. Jiang, W. Liu, L. Fu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **126**, 7.
75. M. Z. Zhang, Q. Chen, C. H. Xie, N. Mulholland, S. Turner, D. Irwin, Y. C. Gu, G. F. Yang, J. Clough, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **92**, 776.
76. F. Li, Y. Hu, Y. Wang, C. Ma, J. Wang, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 1580.
77. S. R. Pedada, N. S. Yarla, P. J. Tambade, B. L. Dhananjaya, A. Bishayee, K. M. Arunasree, G. H. Philip, G. Dharmapuri, G. Aliev, S. Putta, G. Rangaiah, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **112**, 289.
78. A. M. Abeles, J. Y. Park, M. H. Pillinger, B. N. Cronstein, *Curr. Pain Headache Rep.*, 2007, **11**, 440.
79. S. Wang, J. Yan, J. Wang, J. Chen, T. Zhang, Y. Zhao, M. Xue, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 2663.
80. B. T. Emmerson, *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 445.
81. D. L. Boger, H. Sato, A. E. Lerner, B. J. Austin, J. E. Patterson, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 265.
82. M. H. Bracey, M. A. Hanson, K. R. Masuda, R. C. Stevens, B. F. Cravatt, *Science*, 2002, **298**, 1793.

83. V. Andrzejak, G. G. Muccioli, M. Body-Malapel, J. El Bakali, M. Djouina, N. Renault, P. Chavatte, P. Desreumaux, D. M. Lambert, R. Millet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 3777.
84. W. Tuo, N. Leleu-Chavain, A. Barczyk, N. Renault, L. Lemaire, P. Chavatte, R. Millet, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 2701.
85. L. A. Matsuda, S. J. Lolait, M. J. Brownstein, A. C. Young, T. I. Bonner, *Nature*, 1990, **346**, 561.
86. S. Munro, K. L. Thomas, M. Abu-Shaar, *Nature*, 1993, **365**, 61.
87. A. A. Izzo, M. Camilleri, *Gut*, 2008, **57**, 1140.
88. S. Vandevoorde, D. M. Lambert, *Chem. Biodivers.*, 2007, **4**, 1858.
89. K. Ahn, M. K. McKinney, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 1687.
90. T. P. Dinh, T. F. Freund, D. Piomelli, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, **121**, 149.
91. G. G. Muccioli, *Drug Discovery Today*, 2010, **15**, 474.
92. A. Tourteau, V. Andrzejak, M. Body-Malapel, L. Lemaire, A. Lemoine, R. Mansouri, M. Djouina, N. Renault, J. El Bakali, P. Desreumaux, G. G. Muccioli, D. M. Lambert, P. Chavatte, B. Rigo, N. Leleu-Chavain, R. Millet, *Bioorg. Med. Chem.*, 2013, **21**, 5383.
93. E. Banoglu, B. Caliskan, S. Luderer, G. Eren, Y. Ozkan, W. Altenhofen, C. Weinigel, D. Barz, J. Gerstmeier, C. Pergola, O. Werz, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 3728.
94. E. Banoglu, E. Çelikoglu, S. Volker, A. Olgaç, J. Gerstmeier, U. Garscha, B. Çaliskan, U. S. Schubert, A. Carotti, A. Macchiarulo, O. Werz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **113**, 1.
95. J. A. Bernstein, N. Liu, B. A. Knorr, S. S. Smugar, W. D. Hanley, T. F. Reiss, S. Greenberg, *Respir. Med.*, 2011, **105**, 392.
96. Y. Ducharme, M. Blouin, C. Brideau, A. Chateaufneuf, Y. Gareau, E. L. Grimm, H. Juteau, S. Laliberte, B. MacKay, F. Masse, M. Ouellet, M. Salem, A. Styhler, R. W. Friesen, *ACS Med. Chem. Lett.*, 2010, **1**, 170.
97. Y. S. Wasfi, C. Villaran, B. de Tillegem Cle, S. S. Smugar, W. D. Hanley, T. F. Reiss, B. A. Knorr, *Respir. Med.*, 2012, **106**, 34.
98. M. Lemurell, J. Ulander, S. Winiwarer, A. Dahlen, O. Davidsson, H. Emtenas, J. Broddefalk, M. Wanson, D. Hovdal, A. T. Plowright, A. Pettersen, M. RydenLandergren, J. Barlind, A. Llinas, M. Herslof, T. Drmota, K. Sigfridsson, S. Moses, C. Whatling, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 897.

99. H. Takahashi, D. Riether, A. Bartolozzi, T. Bosanac, V. Berger, R. Binetti, J. Broadwater, Z. Chen, R. Crux, S. De Lombaert, R. Dave, J. A. Dines, T. FadraKhan, A. Flegg, M. Garrigou, M. H. Hao, J. Huber, J. M. Hutzler, S. Kerr, A. Kotey, W. Liu, H. Y. Lo, P. L. Loke, P. E. Mahaney, T. M. Morwick, S. Napier, A. Olague, E. Pack, A. K. Padyana, D. S. Thomson, H. Tye, L. Wu, R. M. Zindell, A. Abeywardane, T. Simpson, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 1669.
100. P. A. Brough, W. Aherne, X. Barril, J. Borgognoni, K. Boxall, J. E. Cansfield, K.-M. J. Cheung, I. Collins, N. G. M. Davies, M. J. Drysdale, B. Dymock, S. A. Eccles, H. Finch, A. Fink, A. Hayes, R. Howes, R. E. Hubbard, K. James, A. M. Jordan, A. Lockie, V. Martins, A. Massey, T. P. Matthews, E. McDonald, C. J. Northfield, L. H. Pearl, C. Prodromou, S. Ray, F. I. Raynaud, S. D. Roughley, S. Y. Sharp, A. Surgenor, D. L. Walmsley, P. Webb, M. Wood, P. Workman, L. Wright, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 196.
101. M. V. Powers, P. Workman, *Endocr. Relat. Cancer*, 2006, **13**, S125.
102. G. Chiosis, L. E. Caldas, D. Solit, *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 2006, **7**, 534.
103. W. Xu, L. Neckers, *Clin. Cancer Res.*, 2007, **13**, 1625.
104. J. Sun, C. Lin, X. Qin, X. Dong, Z. Tu, F. Tang, C. Chen, J. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015
105. S. S. Zimmerman, A. Khatri, E. C. Garnier-Amblard, P. Mullasseril, N. L. Kurtkaya, S. Gyoneva, K. B. Hansen, S. F. Traynelis, D. C. Liotta, Design, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 2334.
106. V. L. Gein, V. N. Vychezhnina, E. B. Levandovskaya, B. Ya. Syropyatov, M. I. Vakhrin, E. V. Voronina, N. V. Danilova, *Pharm. Chem. J.*, 2010, **44**, 370.
107. V. L. Gein, V. S. Platonov, É. V. Voronina, *Pharm. Chem. J.*, 2004, **38**, 316.
108. V. L. Gein, V. A. Mihalev, N. N. Kasimova, E. V. Voronina, M. I. Vakhrin, E. B. Babushkina, *Pharm. Chem. J.*, 2007, **41**, 208.
109. V. L. Gein, A. A. Bobyleva, E. B. Levandovskaya, T. F. Odegova M. I. Vakhrin, *Pharm. Chem. J.*, 2012, **46**, 23.
110. V. L. Gein, T. F. Odegova, S. N. Rogachev, A. A. Bobyleva, L. F. Gein, *Pharm. Chem. J.*, 2015, **49**, 175.
111. V. L. Gein, E. V. Shumilovskikh, Yu. S. Andreichikov, R. F. Saraeva, L. V. Korobchenko, G. V. Vladyko, E. I. Boreko, *Pharm. Chem. J.*, 1991, **25**, 884.

112. V. L. Gein, O. V. Voronina, T. E. Ryumina, G. N. Novoselova, K. D. Potemkin, Y. S. Andreichikov, *Pharm. Chem. J.*, 1996, **30**, 95.
113. V. L. Gein, A. V. Popov, V. É. Kolla, N. A. Popova, K. D. Potemkin, *Pharm. Chem. J.*, 1993, **27**, 343.
114. V. L. Gein, M. A. Maryasov, T. A. Silina, R. R. Makhmudov, *Pharm. Chem. J.*, 2014, **47**, 33.
115. Y. Zhao, Q. Wang, Q. Meng, D. Ding, H. Yang, G. Gao, D. Li, W. Zhu, H. Zhou, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 1240.
116. R. Pink, A. Hudson, M. A. Mouries, M. Bendig, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2005, **4**, 727.
117. P. P. Simarro, J. Jannin, P. Cattand, *PLoS Med.*, 2008, **5**, 55.
118. C. S. Brown, M. S. Lee, D. W. Leung, T. Wang, W. Xu, P. Luthra, M. Anantpadma, R. S. Shabman, L. M. Melito, K. S. MacMillan, D. M. Borek, Z. Otwinowski, P. Ramanan, A. J. Stubbs, D. S. Peterson, J. M. Binning, M. Tonelli, M. A. Olson, R. A. Davey, J. M. Ready, C. F. Basler, G. K. Amarasinghe, *J. Mol. Biol.*, 2014, **426**, 2045.
119. H. Feldmann, T. W. Geisbert, *Lancet*, 2011, **377**, 849.
120. S. A. Starosyla, G. P. Volynets, S. S. Lukashov, O. B. Gorbatiuk, A. G. Golub, V. G. Bdzholo, S. M. Yarmoluk, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 2489.
121. K. Yamaguchi, K. Takeda, H. Kadowaki, I. Ueda, Y. Namba, Y. Ouchi, H. Nishitoh, H. Ichijo, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1830**, 3656.
122. X. Guo, C. Harada, K. Namekata, A. Matsuzawa, M. Camps, H. Ji, D. Swinnen, C. Jorand-Lebrun, M. Muzerelle, P. A. Vitte, T. Rückle, A. Kimura, K. Kohyama, Y. Matsumoto, H. Ichijo, T. Harada, *EMBO Mol. Med.*, 2010, **2**, 504.
123. Y. Hayakawa, Y. Hirata, K. Sakitani, H. Nakagawa, W. Nakata, H. Kinoshita, R. Takahashi, K. Takeda, H. Ichijo, S. Maeda, K. Koike, *Cancer Sci.* 2012, 2181.
124. L. Mateos, T. Persson, S. Katoozi, F. J. Gil-Bea, A. Cedazo-Minguez, *Neurosci. Lett.*, 2012, **506**, 245.
125. K.-W. Lee, X. Zhao, J.-Y. Im, H. Grosso, W. H. Jang, T. W. Chan, P. K. Sonsalla, D. C. German, H. Ichijo, E. Junn, M. M. Mouradian, *PLoS ONE*, 2012, **7**, 29935.
126. S. S. Zimmerman, A. Khatri, E. C. Garnier-Amblard, P. Mullasseril, N. L. Kurtkaya, S. Gyoneva, K. B. Hansen, S. F. Traynelis, D. C. Liotta, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 2334.
127. H.-S. V. Chen, S. A. Lipton, *J. Neurochem.*, 2006, **97**, 1611.

128. J. A. Kemp, R. M. McKernan, *Nature Neuroscience*, 2002, **5**, 1039.
129. S. A. Lipton, *Nat. Rev. Drug Disc.*, 2006, **5**, 160.
130. Y. Ramli, A. Moussaif, K. Karrouchi, E. M. Essassi, *J. Chem.*, 2014, (ID 563406).
131. J. A. Pereira, A. M. Pessoa, M. N. Cordeiro, R. Fernandes, C. Prudêncio, J. P. Noronha, M. Vieira, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 664.
132. T. J. Sindhu, S. D. Arikatt, G. Vincent, M. Chandran, A. R. Bhat, K. Krishnakumar, *Inter. J. Pharm. Sci. Res.*, 2013, **4**, 134.
133. D. P. Singh, S. K. Deivedi, S. R. Hashim, R. G. Singhal, *Pharmaceuticals*, 2010, **3**, 2416.
134. S. Noorulla, N. Sreenivasulu, *Inter. J. Pharm. Sci. Res.*, 2011, **2**, 2337.
135. Y. Yang, S. Zhang, B. Wu, M. Ma, X. Chen, X. Qin, M. He, S. Hussain, C. Jing, B. Ma, C. Zhu, *ChemMedChem*, 2012, **7**, 823.
136. J. Balzarini, E. De Clercq, A. Carbonez, V. Burt, J.-P. Kleim, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2000, **16**, 517.
137. P. Sanna, A. Carta, M. Loriga, S. Zanettiand, L. Sechi, *Farmaco*, 1999, **54**, 161.
138. A. Carta, M. Loriga, S. Prisas, G. Paglietti, P. La Colla, B. Busonera, G. Collu, R. Loddo, *Med. Chem.*, 2006, **2**, 113.
139. B. Zarranz, A. Jaso, I. Aldana, A. Monge, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 2149.
140. J. Petronijevic, Z. M. Bugarcic, G. A. Bogdanovic, S. Stefanovic, N. Z. Jankovic, *Green Chem.*, 2016, DOI: 10.1039/C6GC02893D.
141. J. Petronijević, N. Janković, T. P. Stanojković, N. Joksimović, N. Đ. Grozdanić, M. Vraneš, A. Tot, Z. Bugarčić, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2018, doi: 10.1002/ardp.201700308.
142. V. L. Gein, N. A. Rassudikhina, N. V. Shepelina, M. I. Vakhrin, E. B. Babushkina, E. V. Voronina, *Pharm. Chem. J.*, 2008, **42**, 34.
143. X. Li, N. Liu, H. Zhang, S. E. Knudson, R. A. Slayden, P. J. Tonge, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 6306.
144. M. Gielen, E. R. T. Tiekink, Eds., *Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents, The Use of Metals in Medicine* (Wiley, Chichester, 2005).
145. J. L. Sessler, S. R. Doctrow, T. J. McMurry, S. J. Lippard, Eds., *Medicinal Inorganic Chemistry* (American Chemical Society, Washington, DC, 2003).
146. K. H. Thompson, C. Orvig, *Science* 300, 936 (2003).

147. www.nigms.nih.gov/Initiatives/metals.html.
148. M. Sechi, A. Bacchi, M. Carcelli, C. Compari, E. Duce, E. Fisicaro, D. Rogolino, P. Gates, M. Derudas, L. Q. Al-Mawsawi, N. Neamati, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 4248.
149. N. Joksimović, D. Baskić, S. Popović, M. Zarić, M. Kosanić, B. Ranković, T. Stanojković, S. B. Novaković, G. Davidović, Z. Bugarčić, N. Janković, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 15067.
150. N. Joksimović, N. Janković, J. Petronijević, D. Baskić, S. Popovic, D. Todorović, M. Zarić, O. Klisurić, M. Vraneš, A. Tot, Z. Bugarčić, *Med. Chem.*, 2020, **16**, 78.
151. N. Joksimović, J. Petronijević, N. Janković, D. Baskić, S. Popović, D. Todorović, S. Matić, G. A. Bogdanović, M. Vraneš, A. Tot, Z. Bugarčić, *Bioorg. Chem.*, 2019, **88**, 102954.
152. N. Joksimović, J. Petronijević, N. Janković, M. Kosanić, D. Milivojević, M. Vraneš, A. Tot, Z. Bugarčić, *Med. Chem.*, 2019. doi: 10.2174/1573406415666191024102520.
153. G. J. Brewer, *J. Am. Coll. Nutr.*, 2009, **28**, 238.
154. K. G. Daniel, P. Gupta, R. H. Harbach, W. C. Guida, Q. P. Dou, *Biochem. Pharm.*, 2004, **67**, 1139.
155. S. Puig, D. J. Thiele, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, **6**, 171.
156. K. Balamurugan, W. Schaffner, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1763**, 737.
157. M. Arredondo, M. T. Nunez, *Mol. Aspects Med.*, 2005, **26**, 313.
158. J. Y. Uriu-Adams C. L. Keen, *Mol. Aspects Med.*, 2005, **26**, 268.
159. G. Crisponi, V. M. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 876.
160. E. W. Ainscough, A. M. Brodie, W. A. Denny, G. J. Finla, S. A. Gothe, J. D. Ranford, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **77**, 125.
161. Z.-C. Liu, B.-D. Wang, B. Li, Q. Wang, Z.-Y. Yang, T.-R. Li, Y. Li, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 5353.
162. V. Jevtović, S. Ivković, S. Kaisarević, R. Kovačević, *Contemporary Mat.* 2010, **I-2**, 133.
163. M. Rodic, V. Leovac, Lj. Jovanovic, V. Spasojevic, M. Joksovic, T. Stanojkovic, I. Matic, Lj. Vojinovic-Jesic, V. Markovic, *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, **115**, 75.
164. M. Alagesan, N. S. P. Bhuvanesh, N. Dharmaraj, *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 7210.

165. M. O. Agwara, P. T. Ndifon, N. B. Ndosiri, A. G. Paboudam, D. M. Yufanyi, A. Mohamadou, *Bull. Chem. Soc. Ethiop.*, 2010, **24**, 383.
166. J. Joseph, K. Nagashri, G. AyishaBibin Rani, *J. Saudi Chem. Soc.*, 2013, **17**, 285.
167. H. Liu, W. Yang, W. Zhou, Y. Xu, J. Xie, M. Li, *Inorg. Chim. Acta*, 2013, **405**, 387.
168. N. Janković, Z. Bugarčić, S. Marković, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2015, **80**, 595.
169. J. Muškinja, N. Janković, Z. Ratković, G. Bogdanović, Z. Bugarčić, *Mol. Divers.*, 2016, DOI 10.1007/s11030-016-9658-y.
170. N. Janković, J. Muškinja, Z. Ratković, Z. Bugarčić, B. Ranković, M. Kosanić, S. Stefanović, *RSC Advances*, 2016, **6**, 39452.
171. E. López-Torres, A. R. Cowley, J. R. Dilworth, *Dalton Trans.*, 2007, 1194.
172. P. K. Larsen, *Acta. Chem. Scand.*, 1974, **28A**, 194.
173. S. X. dos Santos, É. T. G. CavalheiroII, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2014, **25**, 1071.
174. S. Zolezzi, A. Decinti, E. Spodine, *Polyhedron*, 1999, **18**, 897.
175. B. J. Hathaway, D. E. Billing, *Coord. Chem. Rev.*, 1970, **5**, 143.
176. M. Mahajan, K. N. Saxena, C. P. Saxena, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 1981, **43**, 2148.
177. I. Gulcin, A. Dastan, *J. Enzym Inhib. Med. Chem.*, 2007, **22**, 685.
178. A. Peksel, C. Celik, N. Y. Ocal, R. Yanargad, *J. Serb. Chem. Soc.*, 2013, **78**,15.
179. I. Heijenoort, *Glycobiology*, 2001, **11**, 25.
180. V. Farkaš, *Folia Microbiol.*, 2003, **48**, 469.
181. B. Pucci, M. Kasten, A. Giordano, *Neoplasia*, 2000, **2**, 291.
182. X. Huang, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, *Cell Cycle*, 2003, **2**, 614
183. J. Olmsted, D. R. Kearns III, *Biochemistry*, 1977, **16**, 3647.
184. R. Lakowicz, G. Weber, *Biochemistry*, 1973, **12**, 4161.
185. W. L. Gabler, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 1991, **72**, 39
186. B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 1965, **205**, 698.

187. B. Desoize, C. Madoulet, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002, **42**, 317.
188. I. Ott, R. Gust, *Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.)*, 2007, **340**, 117.
189. J. T. Hartmann, L. M. Fels, S. Knop, H. Stolt, L. Kanz, C. Bokemeyer, *Invest. New Drugs.*, 2000, **18**, 281.
190. J. T. Hartmann, H. P. Lipp, *Expert Opin. Pharmacother*, 2003, **4**, 889.
191. J. Sastry, S. J. Kellie, *Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2005, **22**, 441.
192. R. P. Miller, R. K. Tadagavadi, G. Ramesh, W. B. Reeves, *Toxins*, 2010, **2**, 2490.
193. S. R. McWhinney, R. M. Goldberg, H. L. McLeod, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**, 10.
194. M. A. Fuertes, C. Alonso, J. M. Pérez, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 645.
195. P. A. Neves, B. G. da Silva, D. M. Vargas, B. C. Pinheiro, C. L. Visentin, D. B. M. J. Filho, J. A. Araújo, V. L. Costa-Lotufo, C. Pessoa, O. M. de Moraes, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 10203.
196. K.-I. Lee, T. Tashiro, M. Noji, *Chem. Pharm. Bull.*, 1994, **43**, 702-703.
197. L. M. González, M. J. Tercero, A. Matilla, J. Niclós-Gutiérrez, T. M. Fernández, C. M. López C. Alonso, S. González, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1806.
198. M. A. Ali, A. H. Mirza, R. J. Butcher, M. T. H. Tarafder, T. B. Keat, A. M. Ali, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 141.
199. J.-Y. Lee, J.-Y. Lee, Y.-Y. Chang, C.-H. Hu, M. N. Wang, H. M. Lee, *Organometallics*, 2015, **34**, 4359.
200. E. H. M. Mazumder, P. Beale, C. Chan, Q. J. Yu, F. Huq, *Chem. Med. Chem.*, 2012, **7**, 1840.
201. H. Chiririwa, R. J. Moss, D. Hendricks, R. Meijboom, A. Muller, *Trans. Met. Chem.*, 2013, **38**, 165.
202. M. Carreira, R. Calvo-Sanjua, M. Sanau, I. Marzo, M. Contel, *Organometallics*, 2012, **31**, 5772.
203. A. Krogul, J. Cedrowski, K. Wiktorska, P. W. Oziminski, J. Skupinska, G. Litwinienko, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 658.

204. P. I. da S. Maria, A. Graminha, R. F. Pavan, Q. F. C. Leite, A. A. Batista, F. D. Back, S. E. Lang., J. Ellena, S. de S.Lemos, S. H. Salistre-de-Araujog, M. V. Deflon, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2010, **21**, 1177.
205. S. A. Abu-Surrah, A. K. Abu Safieh, M. I. Ahmad, Y. M. Abdalla, T. M. Ayoub, K. A. Qaroush, M. A. Abu-Mahtheieh, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 471.
206. D. Ajloo, E. M. Moghadam, K. Ghadimi, M. Ghadamgahi, A. A. Saboury, A. Divsalar, M. Sheikh Mohammadi, K. Yousefi, *Inorg. Chim. Act.*, 2015, **430**, 144.
207. A. Trevisan, C. Marzano, P. Cristofori, M. BorellaVenturini, L. Giovagnini, D. Fregona, *Arch. Toxicol.*, 2002, **76**, 262.
208. O. E. Sherif, H. M. Abd El-Fattah, *J. Therm. Anal. Cal.*, 2003, **74**, 181.
209. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.*, 1997, **30**, 565.
210. D. B. Ninković, G. V. Janjić, D. Ž. Veljković, D. N. Sredojević, S. D. Zarić, *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 3511.
211. D. P. Malenov, S. D. Zarić, in *Non-Covalent Interact. Synth. Des. New Compd.* (Eds.: A. M. Maharramov, K. T. Mahmudov, M. N. Kopylovich, A. J. L. Pombeiro), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2016; pp. 241–260.
212. D. P. Malenov, I. S. Antonijević, S. D. Zarić, in *Multi-Component Cryst. Synth. Concepts, Funct.* (Eds.: E.R.T. Tiekink, J. Zukerman-Schpector), De Gruyter, Berlin, 2017; pp. 255–271.
213. D. N. Sredojević, Z. D. Tomić, S. D. Zarić, *Cryst. Growth Des.*, 2010, **10**, 3901.
214. D. P. Malenov, G. V. Janjić, V. B. Medaković, M. B. Hall, S. D. Zarić, *Coord. Chem. Rev.*, 2017, **345**, 318.
215. I. J. Bruno, J. C. Cole, P. R. Edgington, M. K. Kessler, C. F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson, R. Taylor, *Acta Crystallogr.*, 2002, **B58**, 389.
216. H. Chao, W. J. Mei, Q. W. Huang, L. N. Ji, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 165.
217. S. Satyanarayana, J. C. Dabrowiak, J. B. Chaires, *Biochem.*, 1992, **31**, 9319.
218. D. S. Sigma, A. Mazuder, D. M. Pemn, *Chem. Rev.*, 1993, **93**, 2295.

219. A. Tarushi, E. Polatoglou, J. Kljun, I. Turel, G. Psomas, D. P. Kessissoglou, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 9461.
220. K. C. Skyrianou, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, D. P. Kessissoglou, G. Psomas, *Polyhedron*, 2009, **28**, 3265.
221. C. Tolia, A. N. Papadopoulos, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, C. Garino, L. Salassa, G. J. Psomas, *Inorg. Biochem.*, 2013, **123**, 53.
222. A. Tarushi, C. P. Raptopoulou, V. Psycharis, D. P. Kessissoglou, A. N. Papadopoulos, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **140**, 185.
223. D. Li, J. Tian, W. Gu, X. Liu, S. Yan, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 171.
224. J. L. Garcia-Gimenez, M. Gonzalez-Alvarez, M. Liu-Gonzalez, B. Macias, J. Borrás, G. Alzuet, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **105**, 923.
225. G. Cohen, H. Eisenberg, *Biopolymers*, 1969, **8**, 45.
226. F. H. Li, G. H. Zhao, H. X. Wu, H. Lin, X. X. Wu, S. R. Zhu, H. K. Lin, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 36.
227. P. K. Ghosh, S. Saha, A. Mahapatra, *Polyhedron*, 2007, **26**, 2655.
228. E. Nyarko, N. Hanada, A. Habib, M. Tabata, *Inorg. Chim. Acta.*, 2004, **357**, 739.
229. J. R. Brown, *Albumin Structure, Function and Uses*, Pergamon, Oxford UK, editors: V. M. Rosenoer, M. Oratz, M. A. Rotschild, 1977, 27.
230. V. L. Gein, M. A. Maryasov, *Russ. J. Org. Chem.*, 2015, **51**, 110.
231. J. Muškinja, A. Burmudžija, Z. Ratković, B. Ranković, M. Kosanić, G. A. Bogdanović, S. B. Novaković, *Med Chem Res.*, 2016, **25**, 1744.
232. T. Mosmann, *J. Immunol. Method*, 1983, **65**, 55.
233. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 1990, **82**, 1107.
234. S.-Z. Rena, Z.-C. Wanga, X.-H. Zhua, D. Zhua, Z. Lia, F.-Q. Shena, Y.-T. Duanc, H. Caoa, J. Zhaob, H.-L. Zhua, *Bioorg. Med. Chem.*, 2018, **26**, 4264.

235. L. Leite, D. Jansone, I. Shestakova, I. Domracheva, N. Veretennikova, E. Lukevics, G. Melikyan, *Drugs of the Future* 27 (Suppl A) (2002) P336 (abstr).
236. A. Nersesyan, G. S. Melikyan, H. Stopper, *Exp. Oncol.*, 2003, **25**, 176.
237. P. Mowery, F. Banales Mejia, C. L. Franceschi, M. H. Kean, D. O. Kwansare, M. M. Lafferty, N. D. Neerukonda, C. E. Rolph, N. J. Truax, E. T. Pelkey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2016, **27**, 191.
238. R. S. Y. Wong, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2011, **30**, 87.
239. E. White, *Nat. Rev. Cancer*, 2012, **12**, 401.
240. L. Streckowski, B. Wilson, *Mut. Res.*, 2007, **623**, 3.
241. X. Ninga, Y. Guoa, X. Maa, R. Zhua, C. Tiana, X. Wanga, Z. Mac, Z. Zhanga, J. Liua, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 3700.
242. K. A. Meadows, F. Liu, J. Sou, B. P. Hudson, D. R. McMillin, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 2919.
243. CrysAlis CCD and CrysAlis Red. Oxford Diffraction, Abingdon **2009**.
244. G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.*, 2015, **A71**, 3.
245. V. Andrzejak, R. Millet, J. El Bakali, A. Guelzim, S. Gluszok, P. Chavatte, P. J. Bonte, C. Vaccher, E. Lipka, *Lett. Org. Chem.*, 2010, **7**, 32.

6. БИОГРАФИЈА



Ненад Јоксимовић рођен је 06.05.1991. године у Пећи. Основну школу завршио је у Бадњевцу, са одличним успехом. Гимназију у Крагујевцу завршио је у 2010. године. На Природно-математички факултет, одсек хемија – општи смер уписао се на I годину академске 2010/2011, а дипломирао је 05.12.2014. године са просечном оценом 8.59. Мастер академске студије уписао је академске 2014/15 године, а дипломирао је 16.10.2015. године са просечном оценом 9,44. Од академске 2015/16 студент је докторских академских студија. Од 07.07.2016. године ангажован на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије - „Испитивање механизма реакција комплекса јона прелазних метала са биолошки значајним молекулима”, бр. 172011. Као студент докторских студија, ангажована је и у извођењу практичне наставе из предмета Методика наставе хемије у раду са даровитим ученицима и Органска хемија животне средине.

Ненад Јоксимовић се бави истраживачким радом у области органске, биоорганске и медицинске хемије. Предмет истраживања на којима је он ангажован су синтеза, карактеризација, испитивање биолошке активности неких биолошки важних једињења као и испитивање њихових интеракција са природним макромолекулима.

Списак научних радова

Списак резултата **M21a** - Рад у међународном часопису изузетних вредности

1. Nenad Janković, Srđan Stefanović, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Slađana B. Novaković, Goran A. Bogdanović, Jovana Muškinja, Milan Vraneš, Zoran Ratković and Zorica Bugarčić, Water-tuned tautomer-selective tandem synthesis of the 5,6-Dihydropyrimidin-4(3H)-ones, driven under the umbrella of sustainable chemistry, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, (2018), vol. 6 , str. 13358–13366. doi:10.1021/acssuschemeng.8b03127

Списак резултата **M21** - Рад у врхунском међународном часопису

1. Nenad Joksimović, Dejan Baskić, Suzana Popović, Milan Zarić, Marijana Kosanić, Branislav Ranković, Tatjana Stanojković, Sladjana B. Novaković, Goran Davidović, Zorica Bugarčić, Nenad Janković, Synthesis, characterization, biological activity, DNA and BSA binding study: novel copper(II) complexes with 2-hydroxy-4-aryl4-oxo-2-butenate, *Dalton Transactions*, (2016), vol. 45, str. 15067–15077. doi: 10.1039/C6DT02257J

2. Marijana Gavrilović, Nenad Janković, Ljubinka Joksović, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić, Water ultrasound-assisted oxidation of 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines and benzylic acid salts, *Environmental Chemistry Letters*, (2018), vol. 16, str. 1501-1506. doi: 10.1007/s10311-018-0766-z.
3. Nenad Janković, Jovana Trifunović, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Tatjana Stanojković, Marija Đorđić Crnogorac, Nina Petrović, Ivana Boljević, Ivana Z. Matić, Goran A. Bogdanović, Momir Mikov, Zorica Bugarčić, Discovery of the Biginelli hybrids as novel caspase-9 activators in apoptotic machines: lipophilicity, molecular docking study, influence on angiogenesis gene and miR-21 expression levels, *Bioorganic Chemistry*, (2019), vol. 86, str. 569-582. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.02.026.
4. Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Nenad Janković, Dejan Baskić, Suzana Popović, Danijela Todorović, Sanja Matić, Goran A. Bogdanović, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Zorica Bugarčić, Synthesis, characterization, anticancer evaluation and mechanisms of cytotoxic activity of novel 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment: DNA, BSA interactions and molecular docking study, *Bioorganic Chemistry*, (2019), vol. 88, str. 102954. doi: 10.1016/j.bioorg.2019.102954.

Списак резултата **M22** - Рад у истакнутом међународном часопису

1. Jelena Petronijević, Nenad Janković, Tatjana P. Stanojković, Nenad Joksimović, Nađa Đ. Grozdanić, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Zorica Bugarčić, Biological evaluation of selected 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones and 3,4-dihydro-1,4-benzoxazin-2-ones: Molecular docking study, *Archive der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*, 2018, vol. 351, str. 1700308. doi: 10.1002/ardp.201700308
2. Nenad Joksimović, Nenad Janković, Jelena Petronijević, Dejan Baskić, Suzana Popovic, Danijela Todorović, Milan Zarić, Olivera Klisurić, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Zorica Bugarčić, Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with cisplatin of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study, *Medicinal Chemistry*, (2019). doi: 10.2174/1573406415666190128095732.
3. Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Nenad Janković, Marijana Kosanić, Dušan Milivojević, Milan Vraneš, Aleksandar Tot, Zorica Bugarčić, Synthesis, characterization, antioxidant activity of β -diketonates, and effects of coordination to copper(II) ion on their activity: DNA, BSA interactions and molecular docking study, *Medicinal Chemistry*, (2019). doi: 10.2174/1573406415666191024102520.

Списак резултата **M23** - Рад у међународном часопису

1. Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić, Elvira Đurđić, Nenad Janković, Experimental and computational analysis (DFT method) of some quinoxalinones and

benzoxazinones: spectroscopic investigation (FTIR, FT-Raman, UV-Vis, NMR), *Journal of Chemical Sciences*, 2019, vol. 131, str. 106. doi: 10.1007/s12039-019-1681-y

Списак резултата **M34** - Саопштење са међународног скупа штампано у изводу

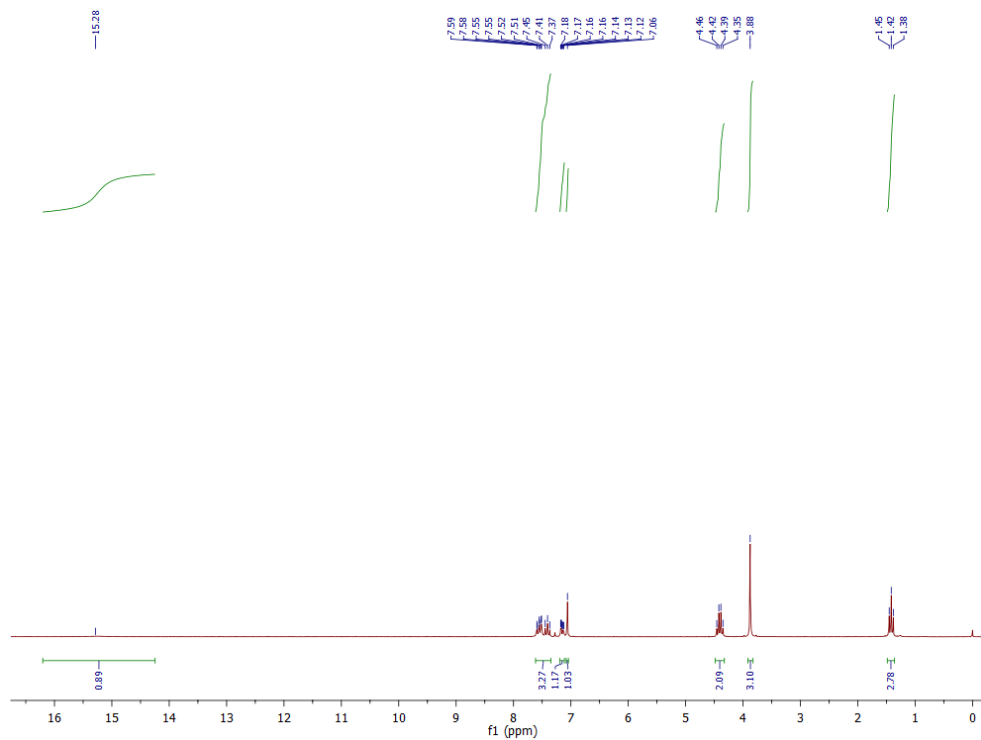
1. Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Nenad Janković, Vesna Stanojlović, *BSA binding study of copper(II) complexes with 2-hydroxy-4-aryl-4-oxo-2-butenolate and their effects on apoptosis and cell cycle in A549 cell line*, 24th Young Research Fellow Meeting, 8-10 February 2017, Paris, France, PC 069.
2. Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Nenad Janković, Vera Divac, *Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-quinoxalinones-based potential pharmacophores in lemon juice*, 24th Young Research Fellow Meeting, 8-10 February 2017, Paris, France, PC 083.
3. Vesna Stanojlović, Nenad Joksimović, Nenad Janković, Zorica Bugarčić, *Synthesis, characterization and cytotoxic activity of 2-hydroxy-4-aryl-4-oxo-2-butenolate*, 24th Young Research Fellow Meeting, 8-10 February 2017, Paris, France, PC 085.
4. Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Emilija Milović, Nenad Janković, *Biginelli hybrids as antitumor agents: mechanism of action*, 6th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 5-6 September 2019, Athens, Greece, P-074.
5. Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Emilija Milović, Nenad Janković, *Synthesis, anticancer evaluation and mechanism of cytotoxic activity of 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment*, 6th EFMC Young Medicinal Chemist Symposium, 5-6 September 2019, Athens, Greece, P-042.

Списак резултата **M64**

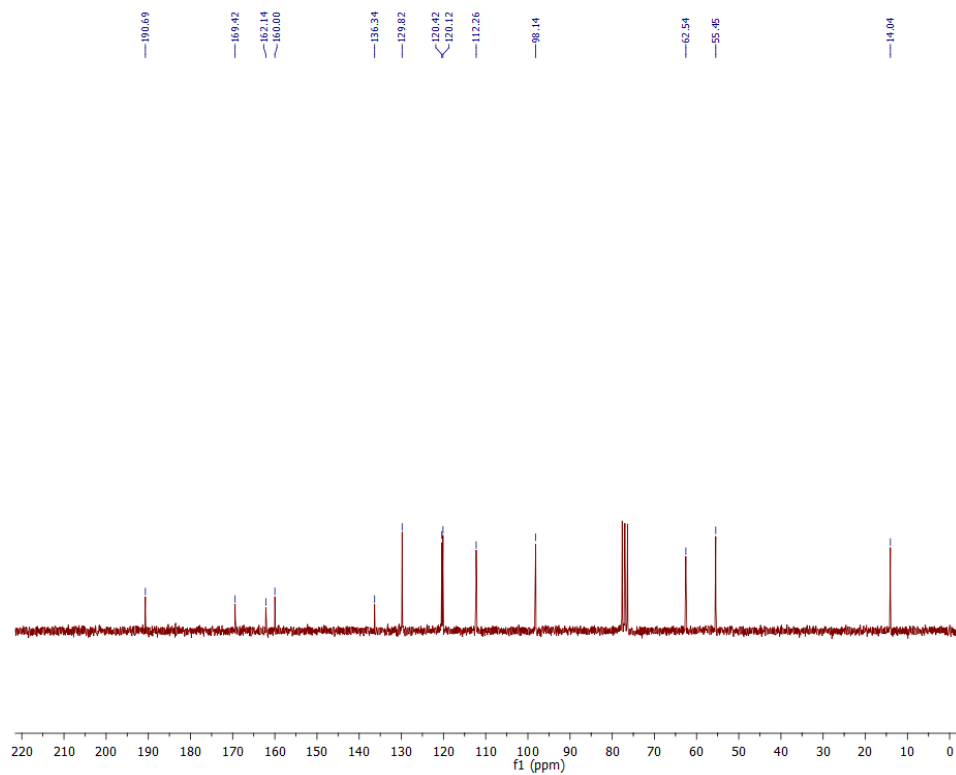
1. Nenad Janković, Vesna Stanojlović, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić, *Functionalization of 2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine and synthesis of novel chalcones under solvent-free conditions*, 52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, 29-30 May 2015, Novi Sad, Republic of Serbia, Book of Abstracts, OH P07, p. 121.
2. Nenad Joksimović, Nenad Janković, Vesna Stanojlović, Jelena Petronijević, *Synthesis and characterization of novel pyrimidine tricyclic derivatives*, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, 24. oktobar 2015, Beograd, Srpsko hemijsko društvo, Book of Abstracts, HS P08, p. 35.
3. Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Vesna Stanojlović, Nenad Janković, *Meldrum's acid as a C2-sinton*, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, 24. oktobar 2015, Beograd, Srpsko hemijsko društvo, Book of Abstracts, HS P11, p. 38.

4. Nenad Janković, Vesna Stanojlović, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Synthesis of novel Biginelli analogs with 1,3-thiazine ring, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, 24. oktobar 2015, Beograd, Srpsko hemijsko drustvo, Book of Abstracts, HS P13, p. 40.
5. Nenad Janković, Vesna Stanojlović, Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Snežana Dorđević, Vera Divac, Marina Rvović, Zorica Bugarčić, Application of acyl pyruvates in synthetic chemistry, 53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, 10-11 Jun 2016, Kragujevac, Republic of Serbia, Book of Abstracts, OH P16, p. 114.
6. Nenad Joksimović, Zorica Bugarčić, Nenad Janković, Goran Davidović, Synthesis, biological activity and DNA binding study of novel copper(II) complexes with 2-hydroxy-4-aryl-4-oxo-2-butenolate, Četvrta konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 5. novembar, 2016, pp. 58.
7. Vera Divac, Marina Rvović, Nenad Janković, Nenad Joksimović, Regioselectivity and kinetics of cobalt(II) chloride catalyzed phenylselenocyclization of 6-methyl-hept-5-en-2-ol, 53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, Srbija, Kragujevac, 10.-11. Jun, 2016, pp. 108.
8. Jelena M. Petronijević, Nenad Joksimović, Marina Kostić, Vera Divac and Nenad Janković, Biološka aktivnost 3,4-dihidro-2(1H)-hinoksalinona i 3,4-dihidro-1,4-benzoksazin-2-ona, 55. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, 8-9. Jun 2018, Novi Sad, Book of abstracts, OH P11 (str. 99).
9. Emilija Milović, Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Nenad Janković, Green synthesis of bicyclic thiazolo-pyrimidines, 7th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 2nd November 2019, Book of Abstracts, CS PP 06.
10. Nenad Joksimović, Jelena Petronijević, Emilija Milović, Nenad Janković, Antioxidant activity of β -diketonates and effects of coordination to copper(II) ion on their activity, 7th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 2nd November 2019, Book of Abstracts, MC PP 01.
11. Jelena Petronijević, Nenad Joksimović, Emilija Milović, Nenad Janković, Experimental and computational analysis (DFT method) of some quinoxalinones and benzoxazinones, 7th Conference of the Young Chemists of Serbia, Belgrade, 2nd November 2019, Book of Abstracts, TC PP 01.

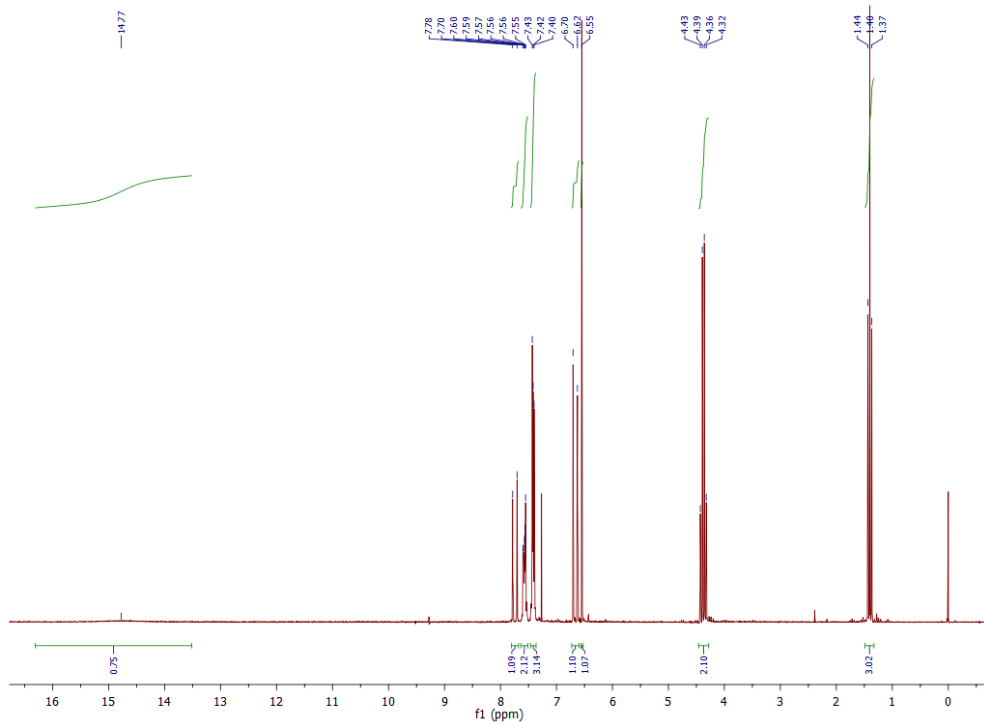
7. ПРИЛОГ



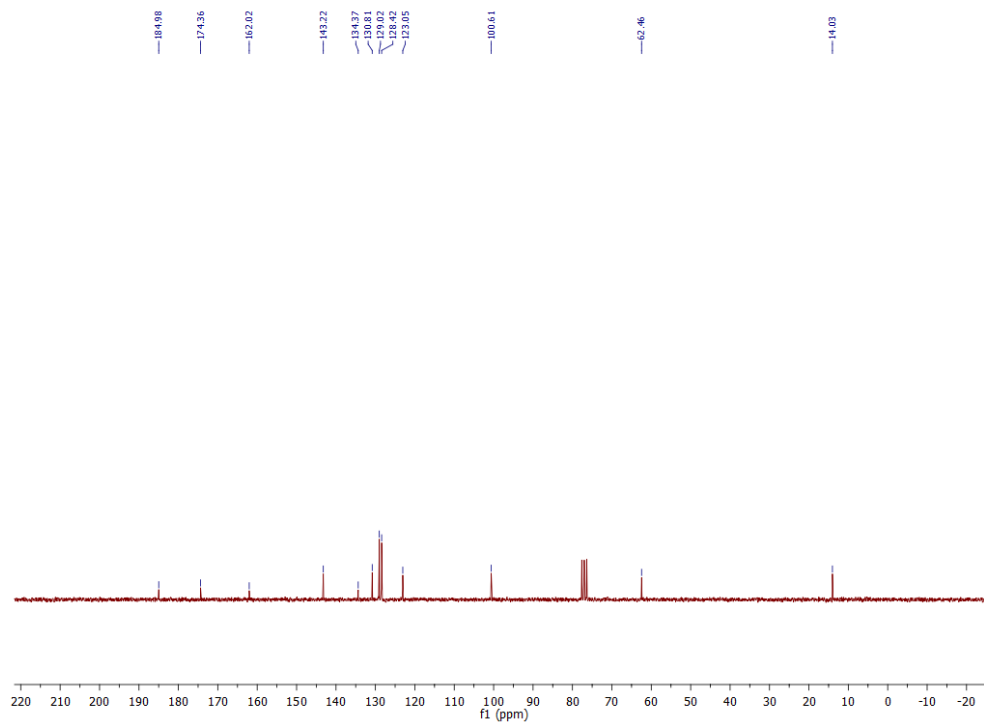
Слика П1. ^1H NMR спектар једињења 2A



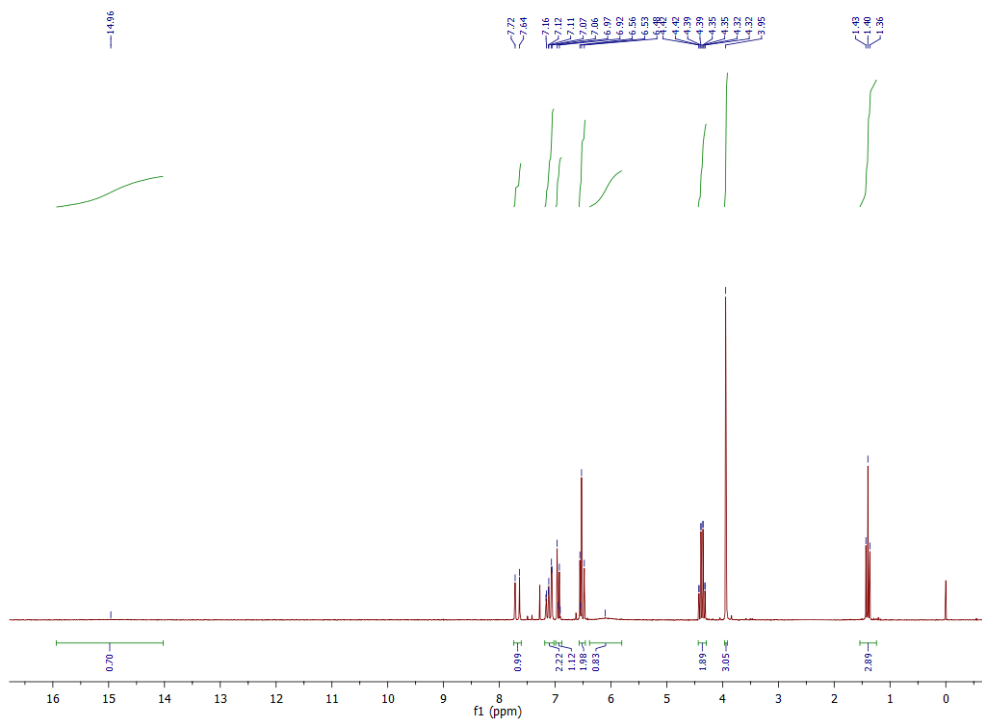
Слика П2. ^{13}C NMR спектар једињења 2A



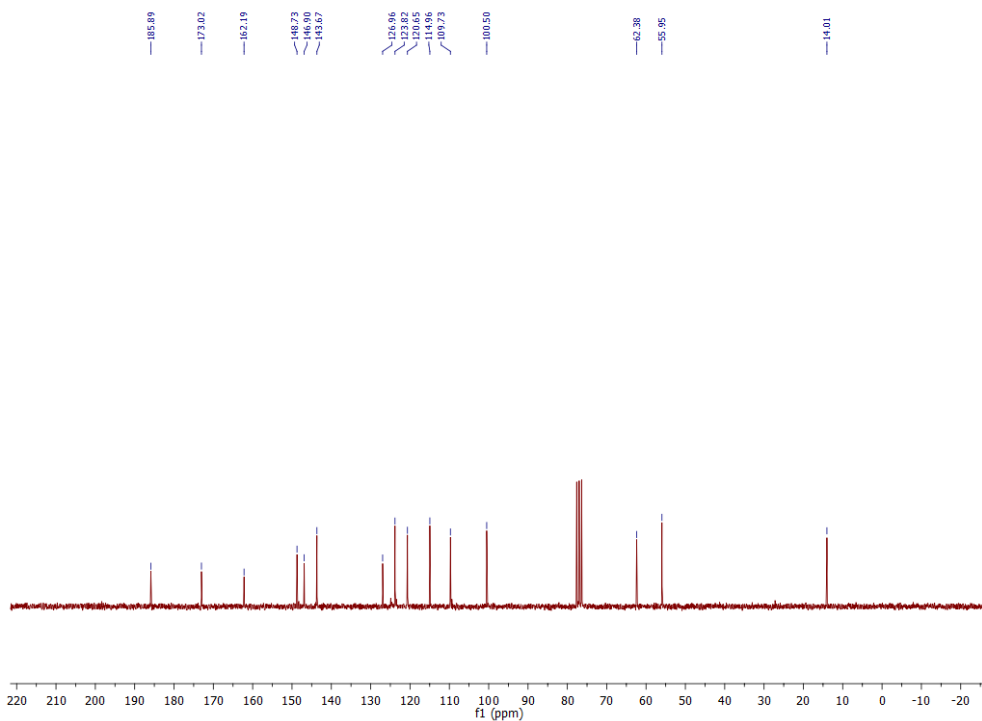
Слика ПЗ. ^1H NMR спектар једињења 2Б



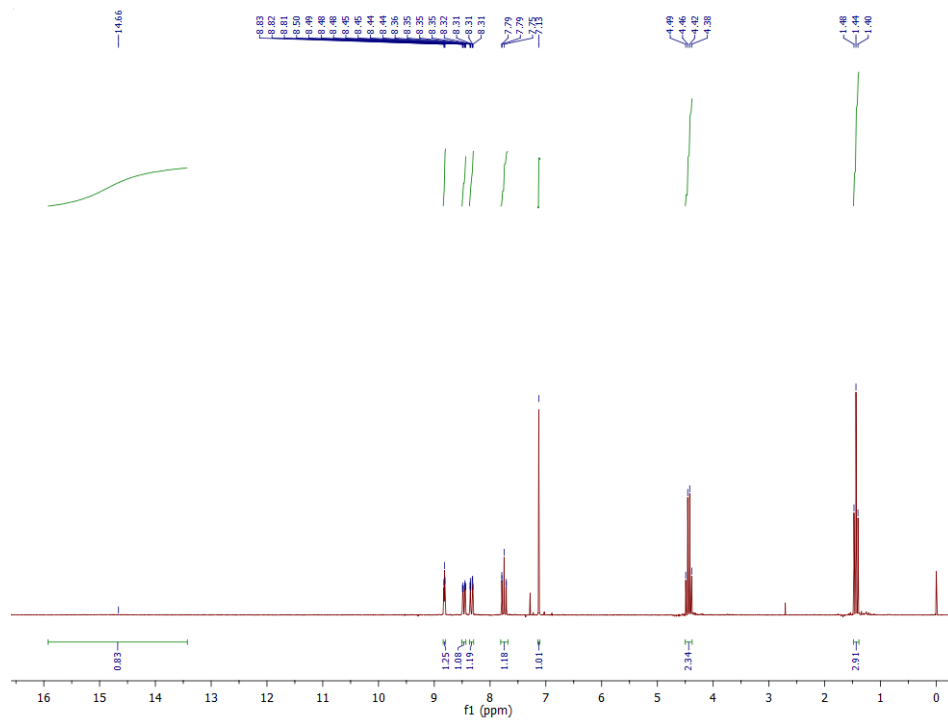
Слика П4. ^{13}C NMR спектар једињења 2Б



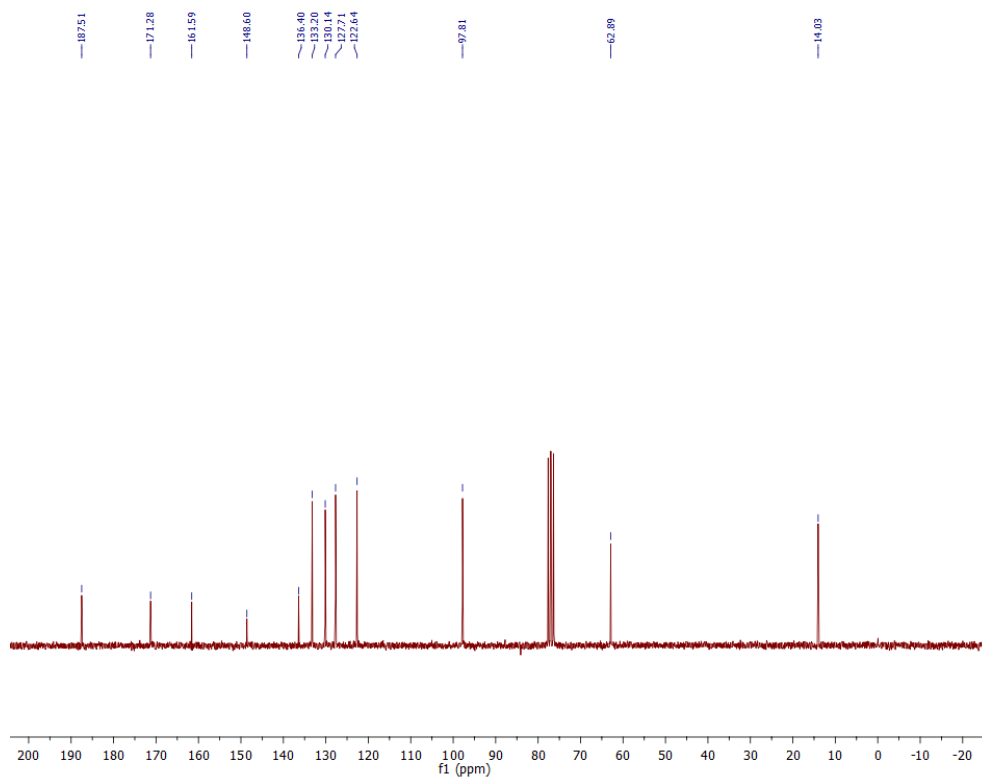
Слика П5. ^1H NMR спектар једињења 2В



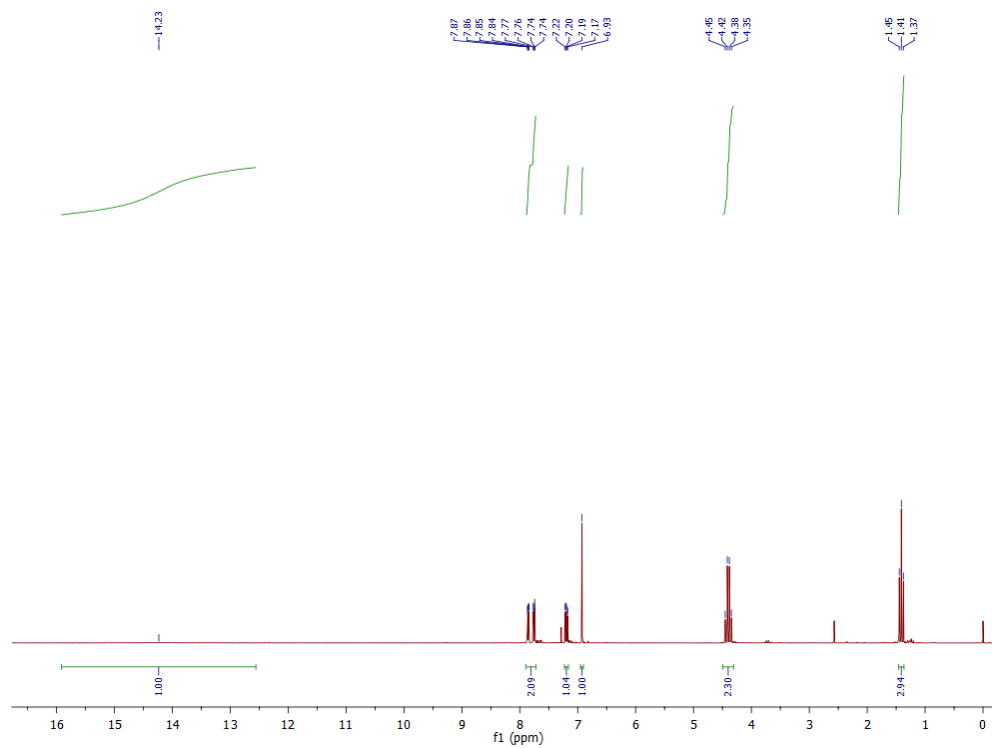
Слика П6. ^{13}C NMR спектар једињења 2В



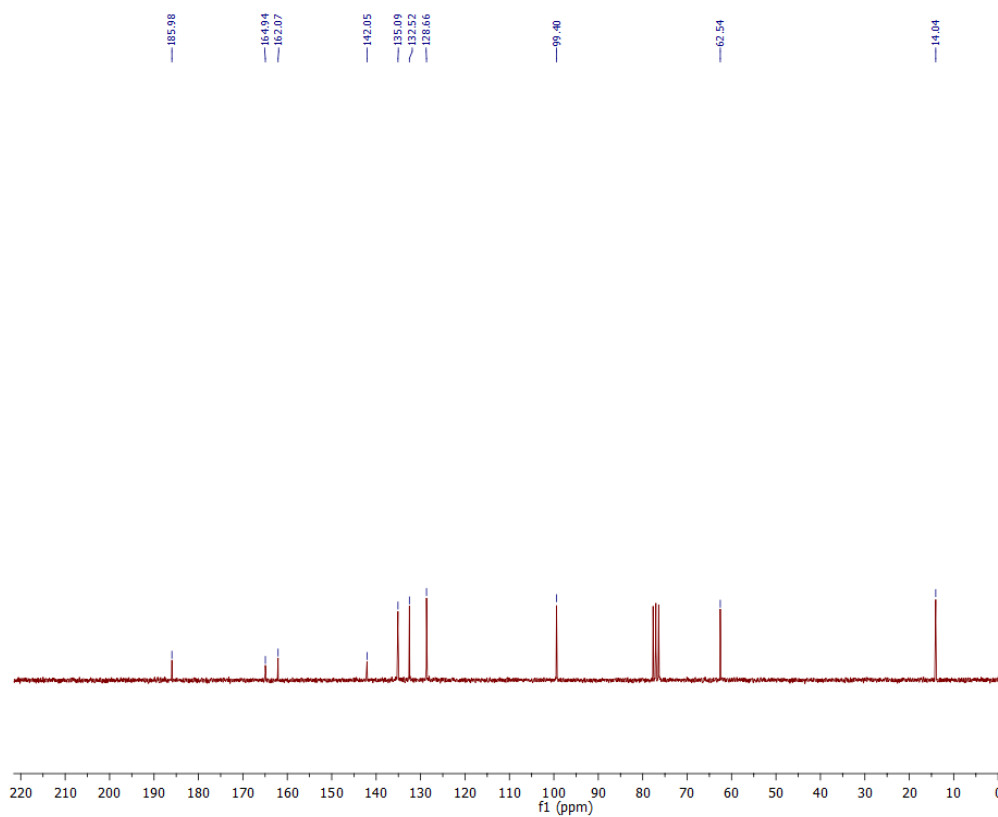
Слика П7. ^1H NMR спектар једињења 2Г



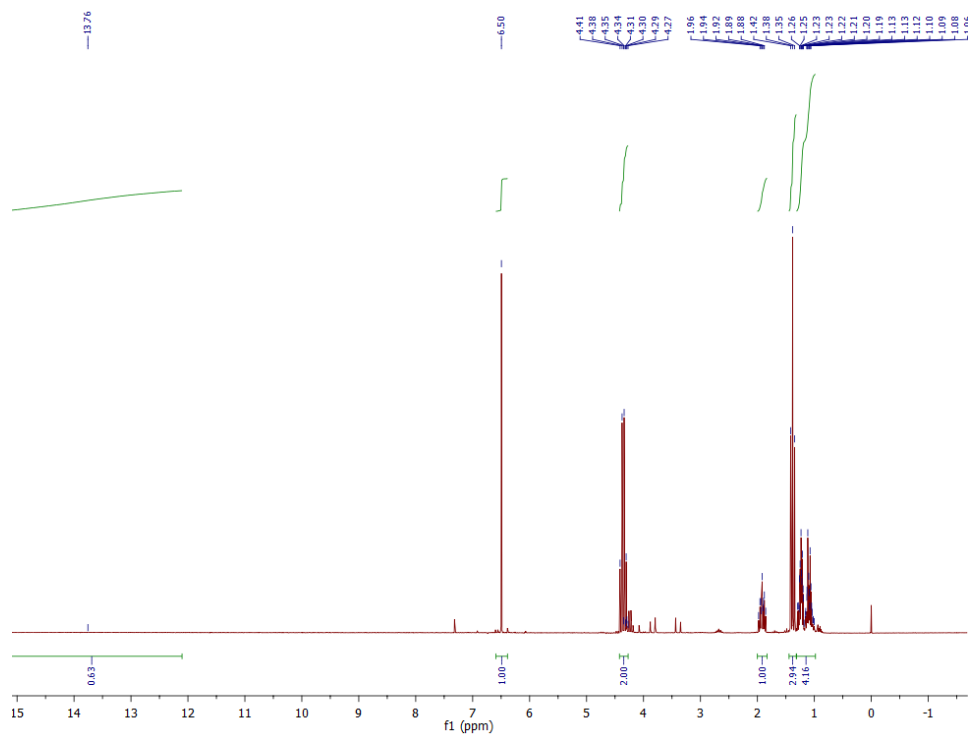
Слика П8. ^{13}C NMR спектар једињења 2Г



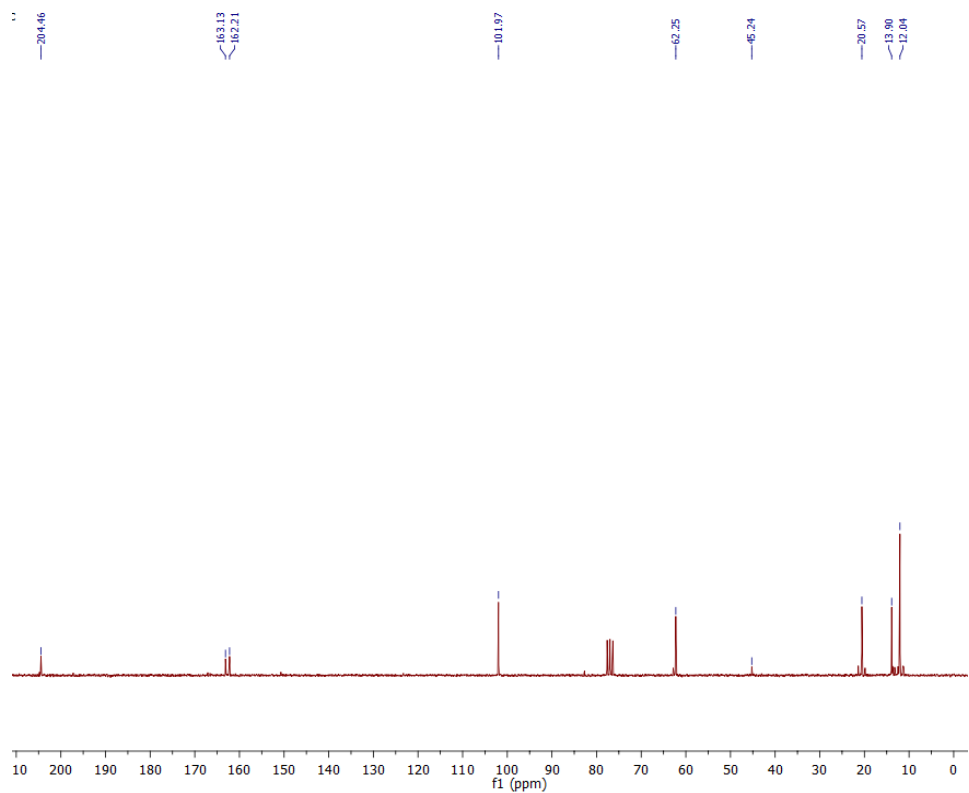
Слика П9. ^1H NMR спектар једињења 2Д



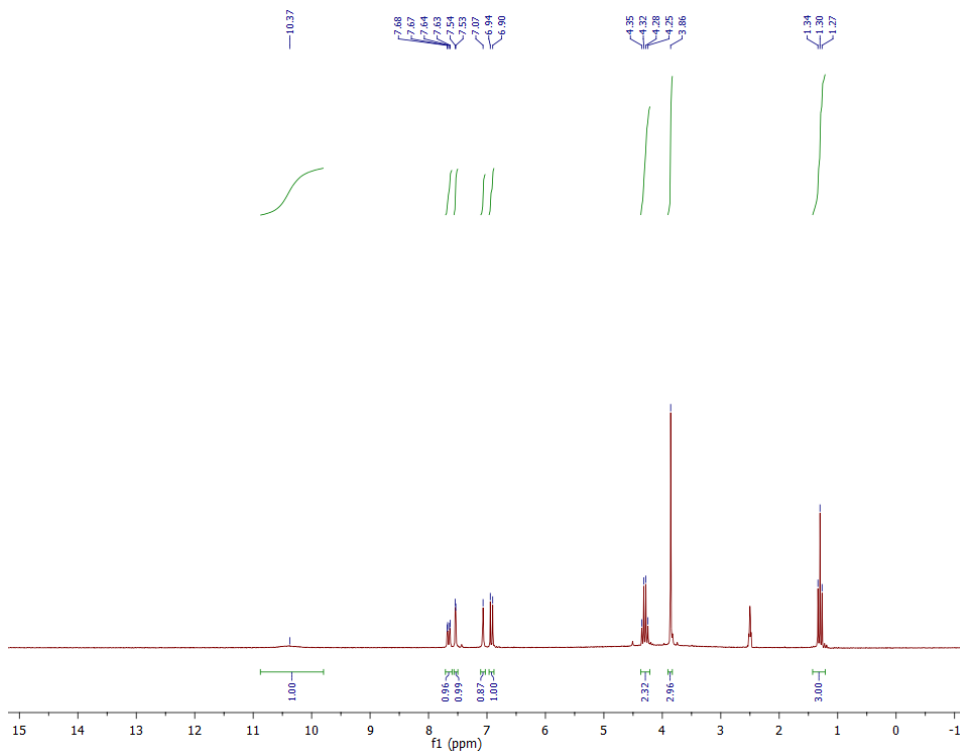
Слика П10. ^{13}C NMR спектар једињења 2Д



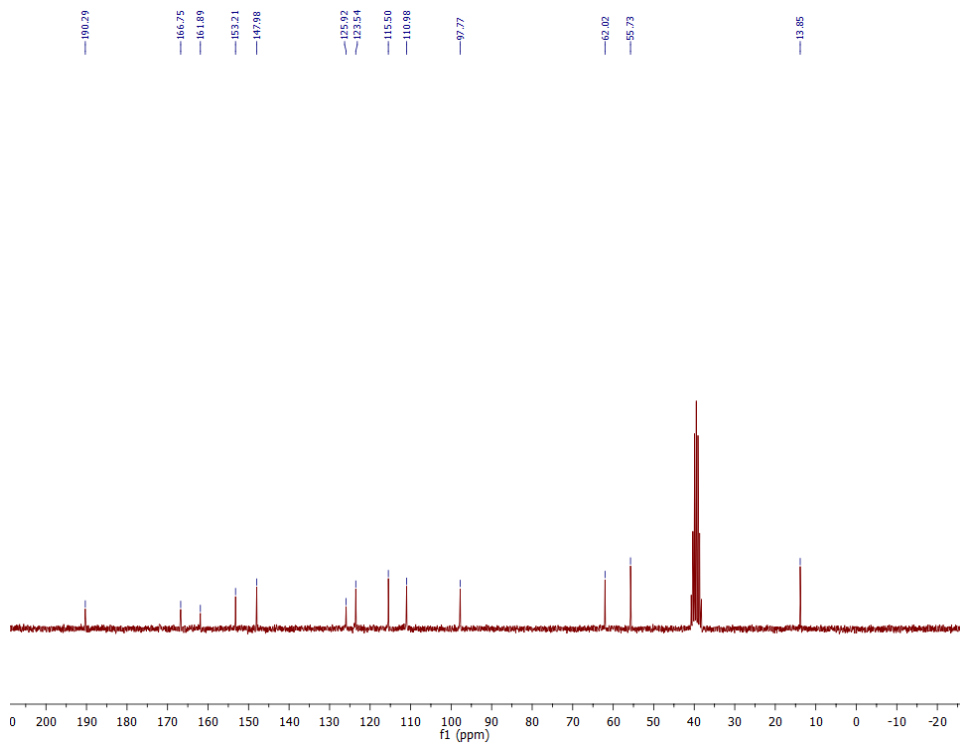
Слика П11. ^1H NMR спектар једињења 2Б



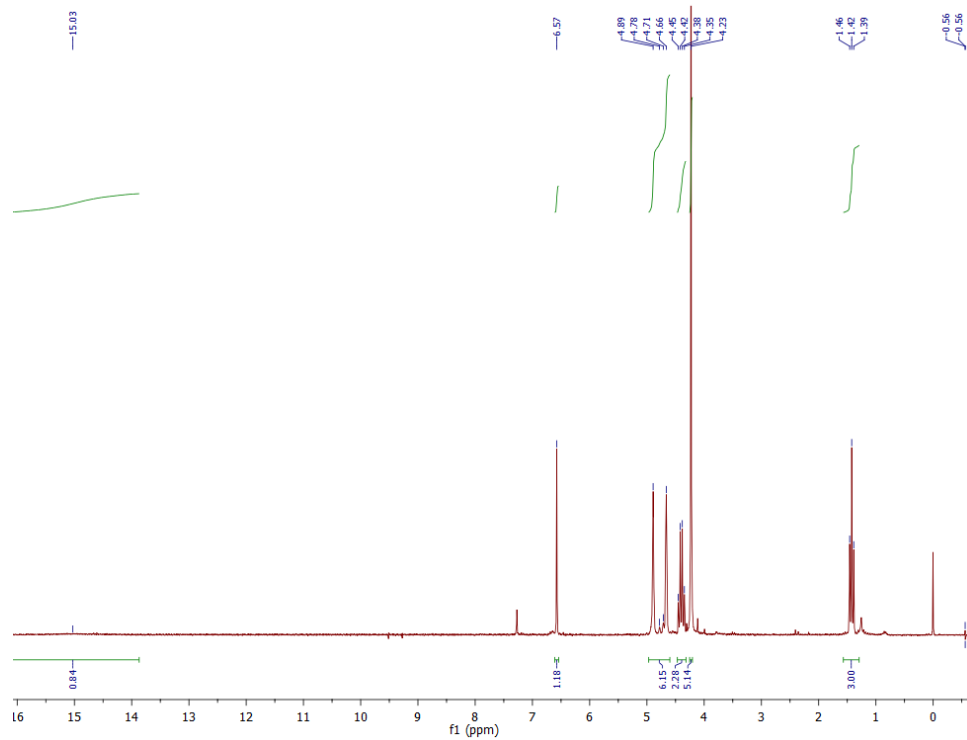
Слика П12. ^{13}C NMR спектар једињења 2Б



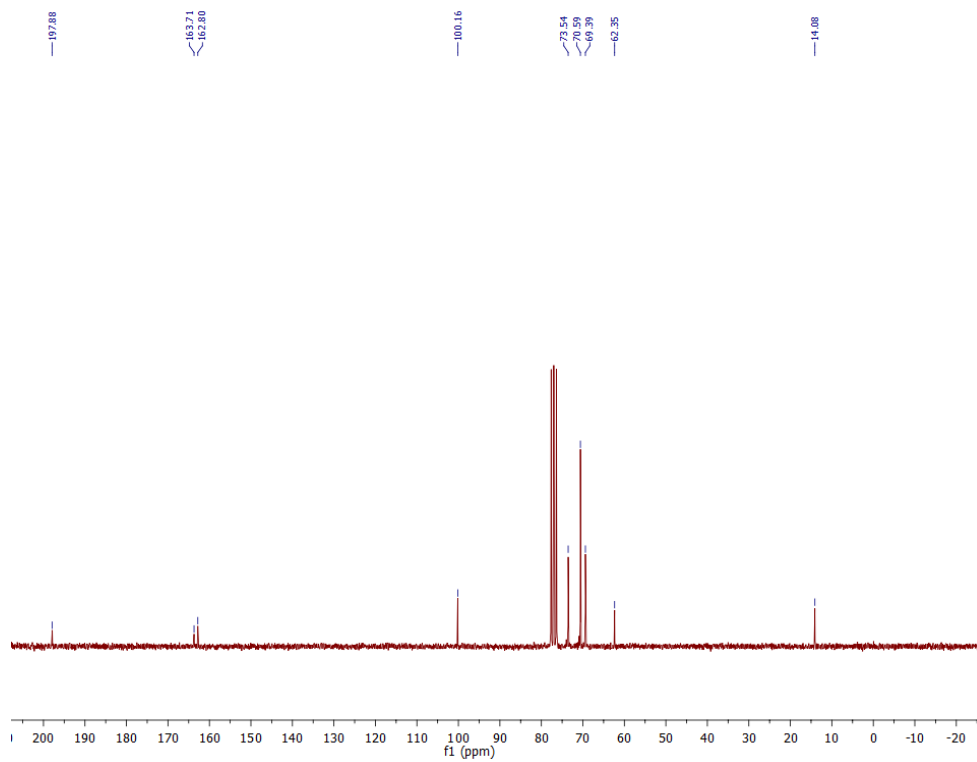
Слика П13. ^1H NMR спектар једињења **2E**



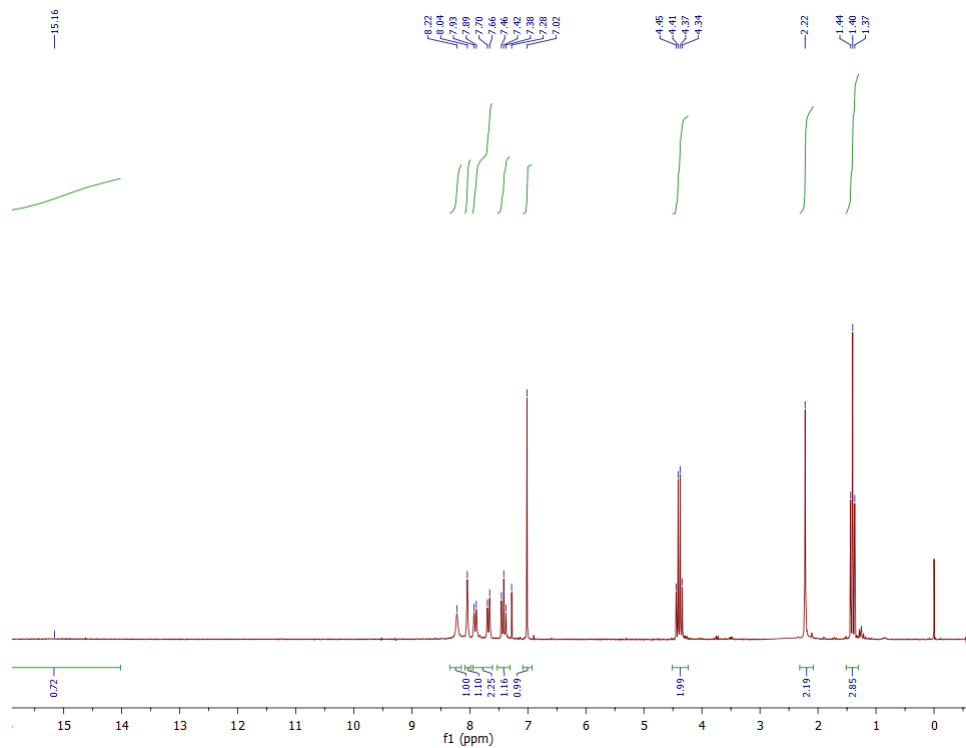
Слика П14. ^{13}C NMR спектар једињења **2E**



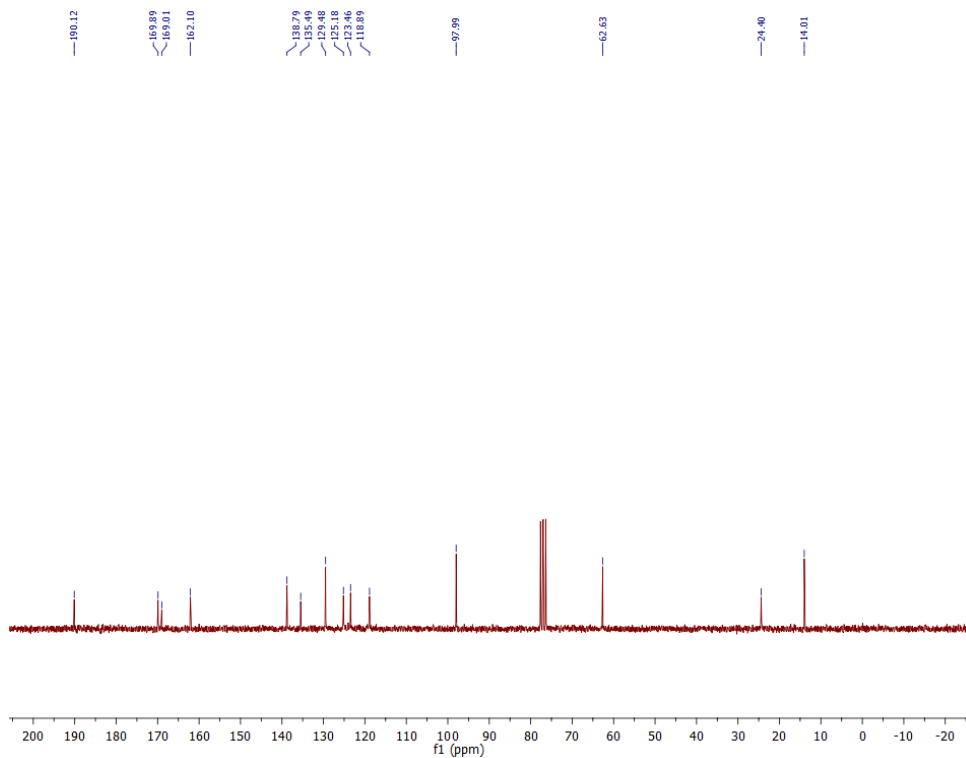
Слика П15. ^1H NMR спектар једињења 2Ж



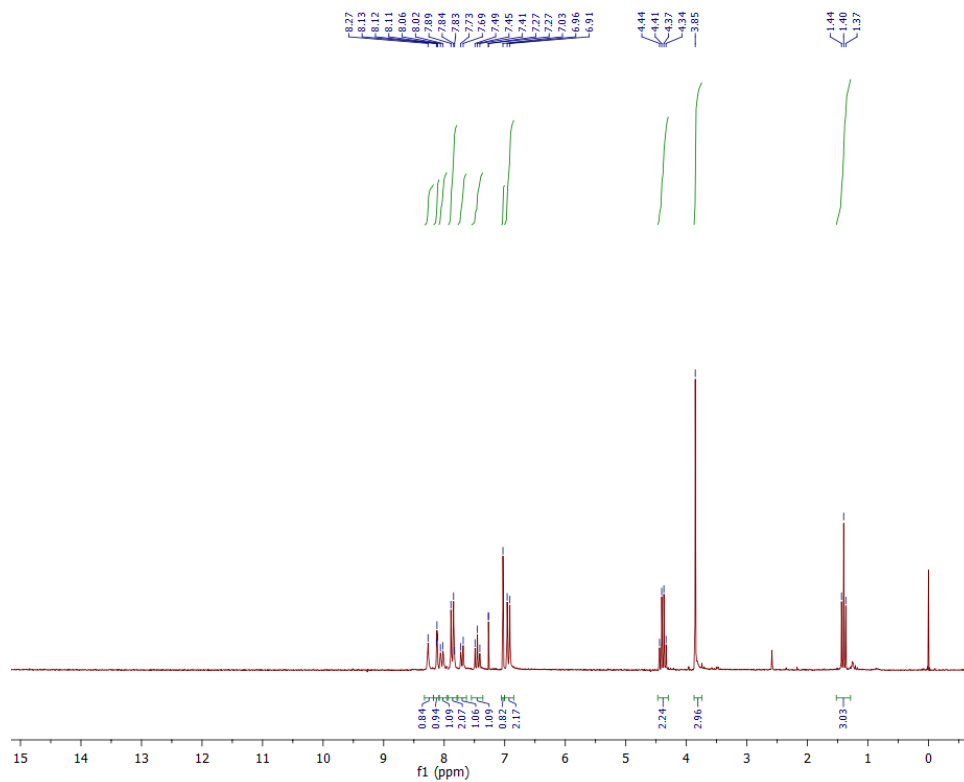
Слика П16. ^{13}C NMR спектар једињења 2Ж



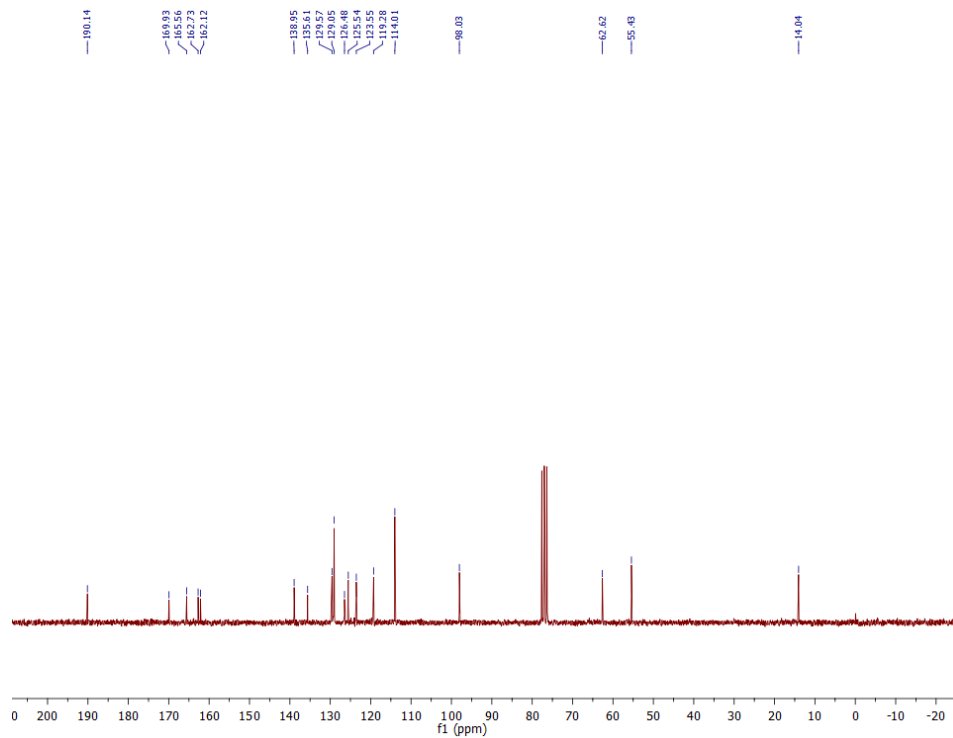
Слика П17. ^1H NMR спектар једињења 23



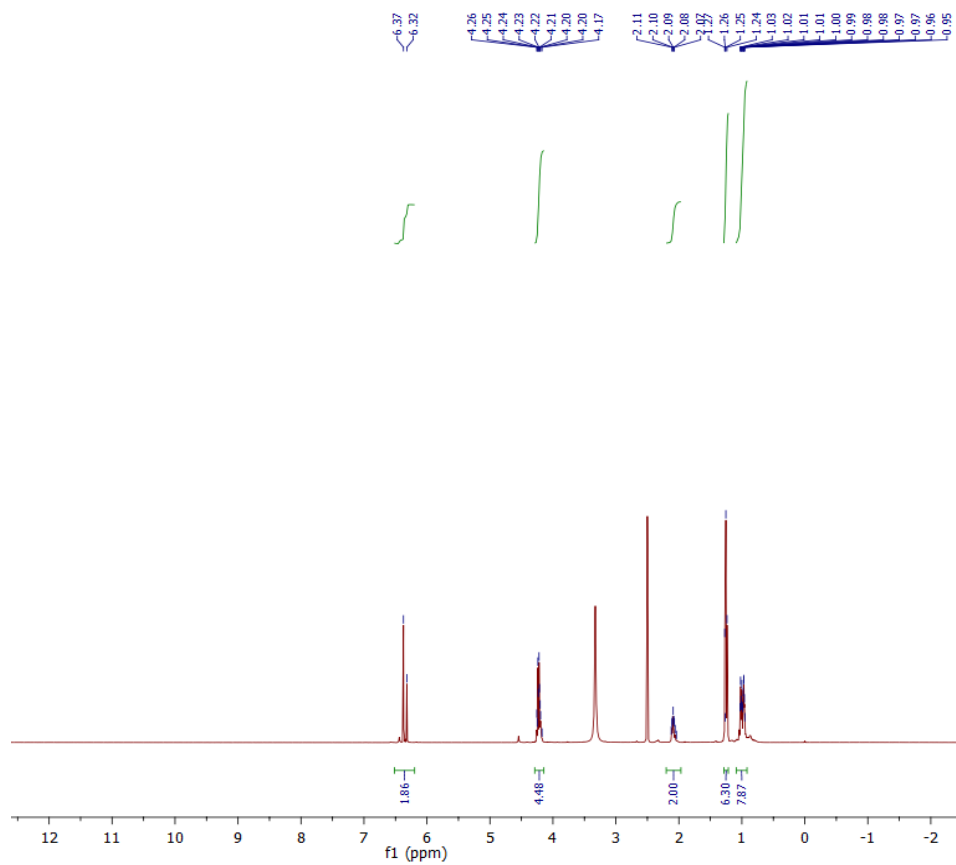
Слика П18. ^{13}C NMR спектар једињења 23



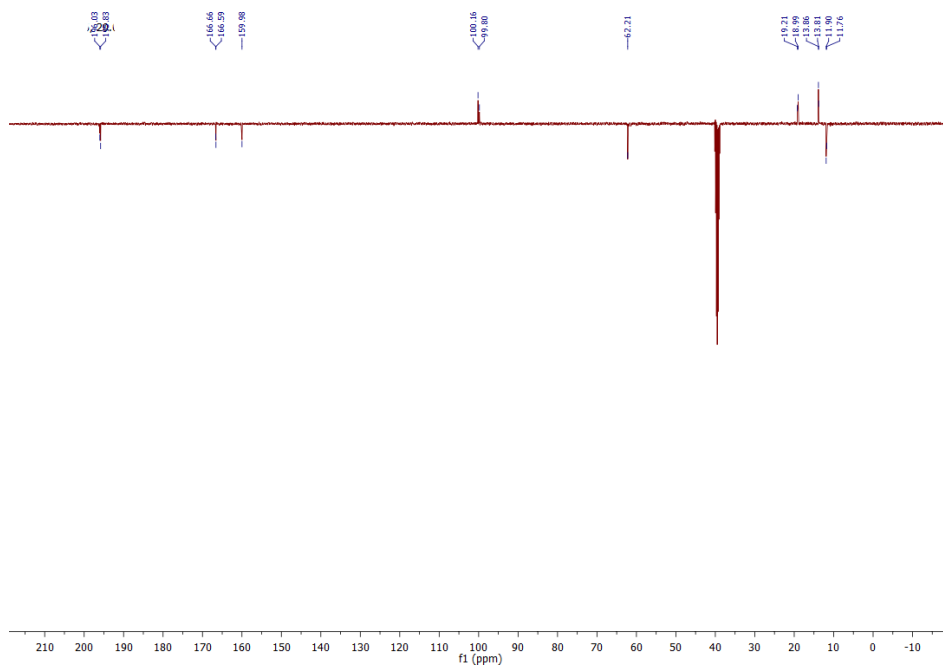
Слика П19. ^1H NMR спектар једињења **2И**



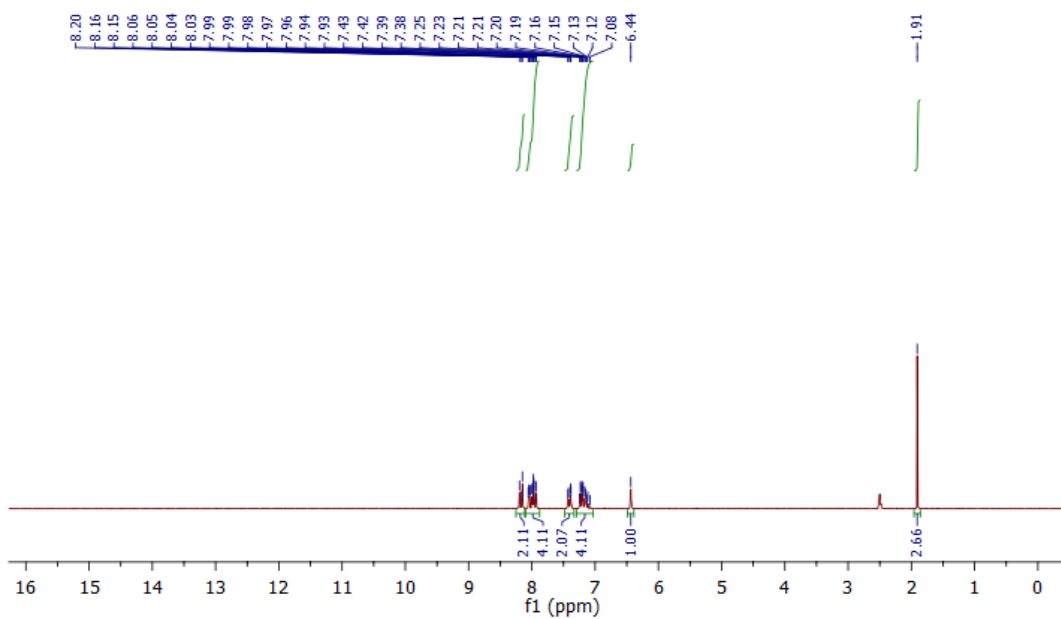
Слика П20. ^{13}C NMR спектар једињења **2И**



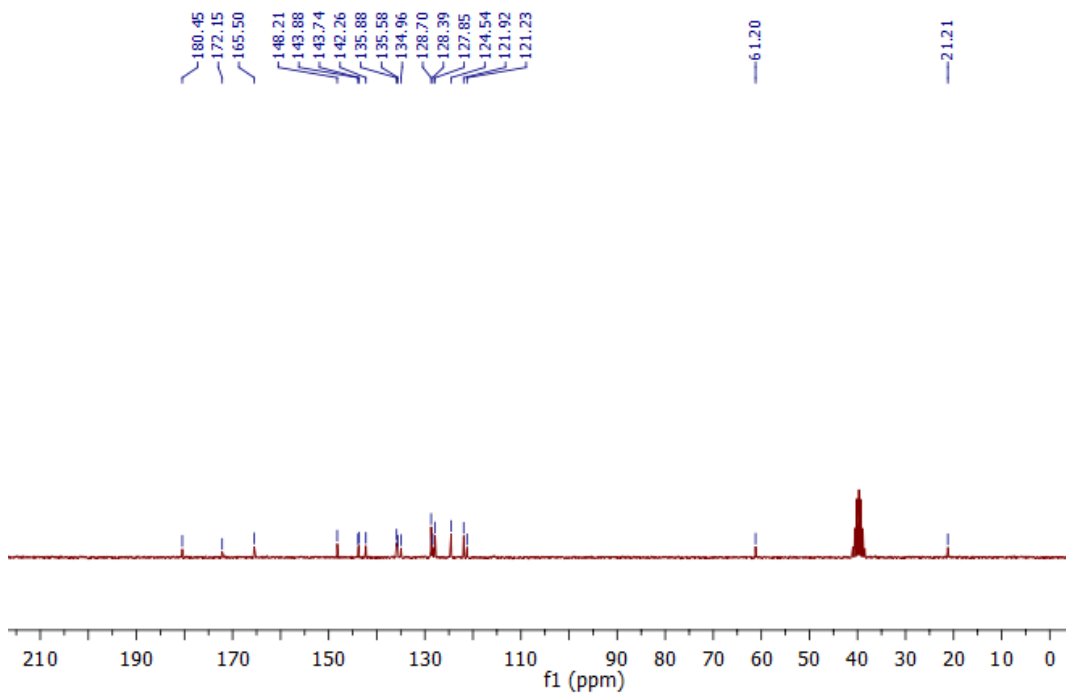
Слика П21. ^1H NMR спектар једињења 4A



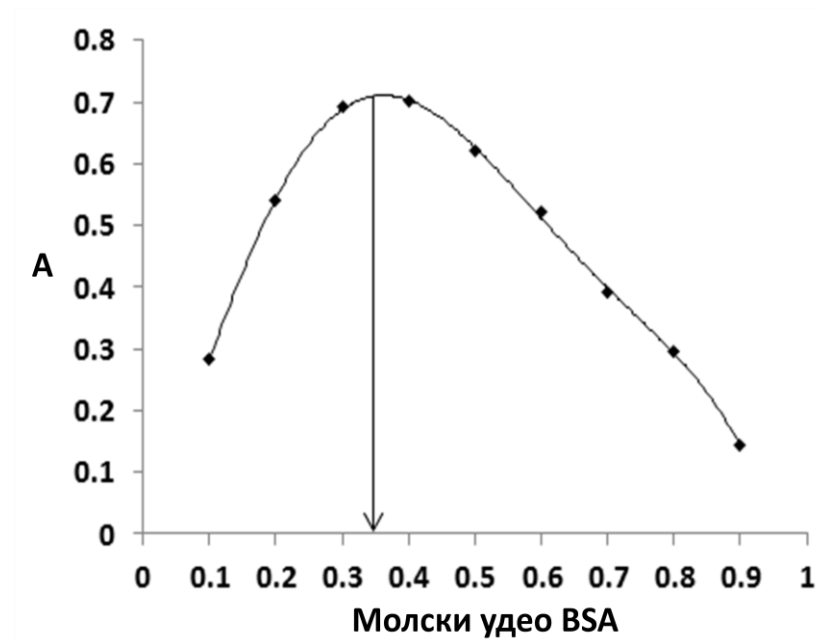
Слика П22. ^{13}C NMR спектар једињења 4A



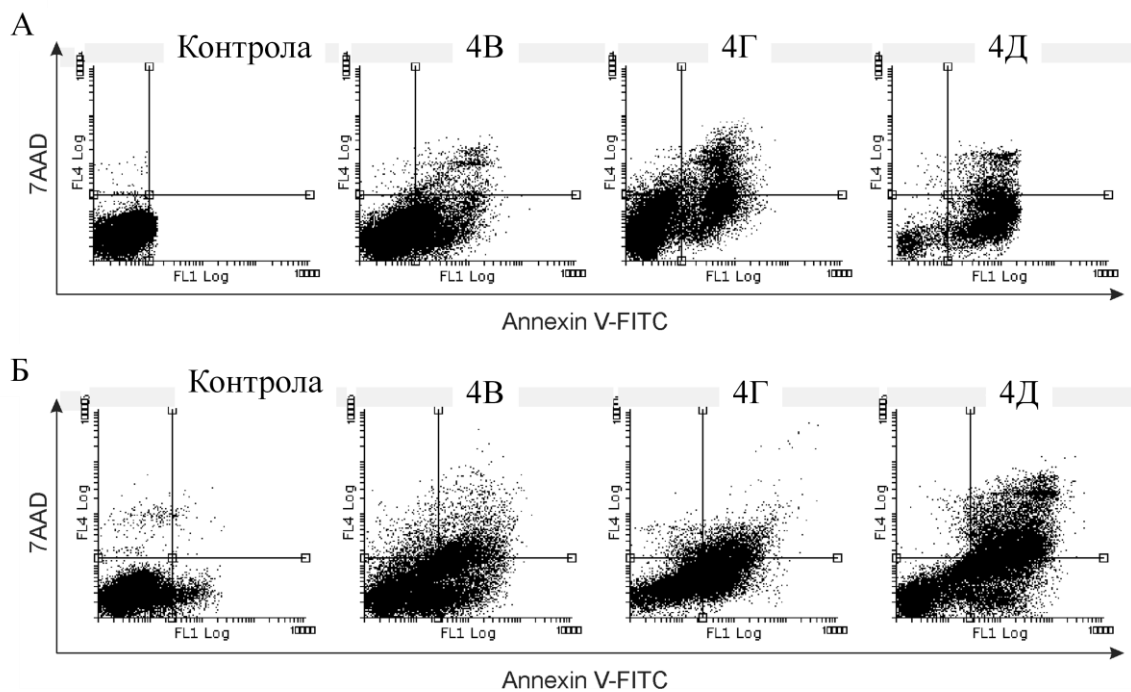
Слика П23. ^1H NMR спектар једињења 5A



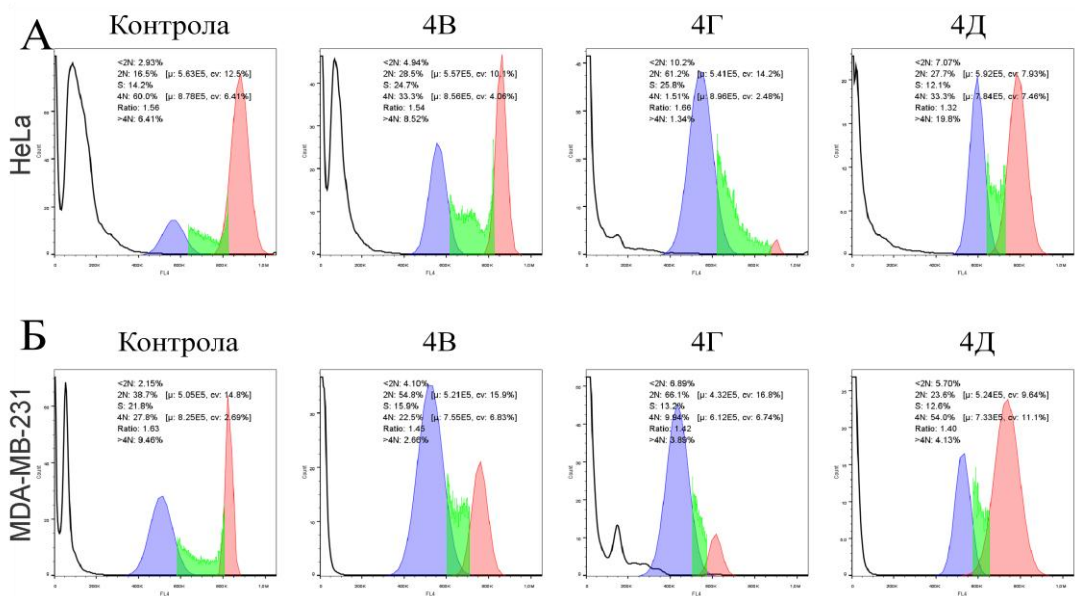
Слика П24. ^{13}C NMR спектар једињења 5A



Слика П25. Жобова крива интеракције једињења 3Г и BSA у PBS пуферу на рН=7,4



Слика П26. Анализа протоцне цитометрије са Annexin V-FITC/7-AAD бојењем. Тачкаста парцела представља проценат одрживих (Annexin V-7-AAD-), раних апоптоличних (Annexin V+7-AAD-), касних апоптоличних (Annexin V+7-AAD+) и некротичних ћелија (Annexin V-7-AAD+) у нетретираним (контрола) и третираним HeLa (А) и МВА-МВ 231 (Б) ћелијама.



Слика П27. *Анализа ћелијског циклуса. Хистограми који представљају расподелу ћелија по фазама ћелијског циклуса у нетретираним (контрола) и третираним HeLa (А) и MDA-MB 231 (Б) ћелијама.*

Табела П1. Дужине (\AA) и углови ($^\circ$) веза за једињење 3А

Веза	А	Б
Cu1–O3	1,920(2)	1,927(2)
Cu1–O4	1,926(2)	1,914(2)
Cu1–O1w	2,371(2)	
C3–O1	1,312(4)	1,323(3)
C3–O2	1,188(4)	1,194(3)
C4–O3	1,271(3)	1,273(3)
C6–O4	1,267(3)	1,275(3)
C4–C5	1,386(4)	1,382(3)
C5–C6	1,411(3)	1,401(4)
Угао	А	Б
O3–Cu1–O4	91,64(8)	93,06(8)
O3–Cu1–O1w	91,11(8)	95,32(7)
O4–Cu1–O1w	91,81(8)	94,33(8)
O3a–Cu1–O4b	173,92(8)	
O3b–Cu1–O4a	172,81(8)	
O1–C3–O2	124,0(3)	124,7(3)
C4–C5–O6	122,6(2)	123,3(2)

Табела П2. Геометрија водоничних веза (\AA , $^\circ$)

D–H...A	D–H	D...A	H...A	D–H...A
O1w–H1w...O2a ⁱ	0,97	2,945(3)	2,03	159
O1w–H2w...O1b ⁱ	0,83	3,212(3)	2,55	137
O1w–H1w...O3b ⁱ	0,97	2,986(3)	2,20	158
O1w–H2w...O3a ⁱ	0,83	2,999(3)	2,38	122

Код симетрије: (i) $-x+1, -y+1, -z+1$

Табела ПЗ. Геометријски параметри за једињење 4Б

Веза	Расстојање (Å)
Pd1—O1	1,971 (2)
Pd1—O1 ¹	1,971 (2)
Pd1—O2	1,973 (2)
Pd1—O2 ¹	1,973 (2)
O2—C3	1,275 (4)
O1—C1	1,280 (4)
O4—C12	1,321 (4)
O4—C13	1,446 (4)
O3—C12	1,191 (4)
Угао везе	(°)
O1—Pd1—O1 ¹	180,0
O1—Pd1—O2	94,95 (9)
O1 ¹ —Pd1—O2	85,05 (9)
O1—Pd1—O2 ¹	85,05 (9)
O1 ¹ —Pd1—O2 ¹	94,95 (9)
O2—Pd1—O2 ¹	180,0
C3—O2—Pd1	124,0 (2)
C1—O1—Pd1	121,7 (2)
C12—O4—C13	116,4 (3)
O1—C1—C2	128,3 (3)
O1—C1—C12	114,3 (3)
Торзиони угао	(°)
Pd1—O1—C1—C2	2,1 (5)
Pd1—O1—C1—C12	-177,8 (2)
Pd1—O2—C3—C2	-0,9 (5)
Pd1—O2—C3—C4	-179,1 (2)
C13—O4—C12—O3	-3,7 (6)
C13—O4—C12—C1	175,3 (3)
O1—C1—C12—O3	-176,3 (3)
C2—C1—C12—O3	3,8 (5)
O1—C1—C12—O4	4,6 (4)
C2—C1—C12—O4	-175,3 (3)
O1—C1—C2—C3	-2,8 (6)
C12—C1—C2—C3	177,0 (3)
O2—C3—C2—C1	2,1 (5)

Код симетрије: (1) $-x+1, -y+2, -z+1$.

Табела П4. Дужине (\AA) и углови ($^\circ$) веза за једињење **5Б**.

S1–C9	1,695(3)
S1–C6	1,724(2)
N1–C1	1,369(3)
N1–C16	1,418(3)
N1–C4	1,474(3)
O1–C1	1,219(3)
O2–C2	1,321(3)
O3–C5	1,227(3)
C1–C2	1,493(3)
C2–C3	1,341(3)
C3–C5	1,475(3)
C3–C4	1,509(3)
C4–C10	1,522(3)
C5–C6	1,462(3)
C6–C7	1,373(4)
C7–C8	1,420(4)
C8–C9	1,346(5)
C1–N1–C16	126,4(2)
C1–N1–C4	111,0(2)
C16–N1–C4	122,5(2)

Табела П5. IC_{50} (μM) вредности одређене SRB и MTT тестовима након 24h/48h третмана HeLa ћелија једињењима 5И, 5Л, 5Љ и 5М.

IC ₅₀	HeLa			
	SRB		MTT	
	24h	48h	24h	48h
5И	68,8 ± 6,5	40,9±5,9	68,8 ± 6,5	54,35±8,56
5Л	70,6 ± 7,2	41,9±0,8	70.6 ± 7,2	57,32±7,77
5Љ	85,37±4,3	64,2±16,5	89,78±233,96	66,8±12,5
5М	97,9±53,2	86,02 ± 9,05	93,91±58,62	65,7±31,5



Synthesis, characterization, anticancer evaluation and mechanisms of cytotoxic activity of novel 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones bearing thenoyl fragment: DNA, BSA interactions and molecular docking study

Nenad Joksimović^a, Jelena Petronijević^a, Nenad Janković^a, Dejan Baskić^b, Suzana Popović^b, Danijela Todorović^c, Sanja Matic^d, Goran A. Bogdanović^e, Milan Vraneš^f, Aleksandar Tot^f, Zorica Bugarčić^{a,*}

^a University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^c University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Genetics, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^d Doctoral Academic Study, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^e Vinča Institute of Nuclear Science University of Belgrade, P.O. Box 522, 11001 Belgrade, Serbia

^f University of Novi Sad, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

ARTICLE INFO

Keywords:

3-Hydroxy-3-pyrrolin-2-ones
Mechanisms of cytotoxic activity
Antitumor activity
DNA binding study
BSA binding study
Molecular docking

ABSTRACT

In order to make a progress in discovering a new agents for chemotherapy with improved properties and bearing in mind the fact that substituted 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones belong to a class of biologically active compounds, series of novel 1,5-diaryl-4-(2-thienylcarbonyl)-3-hydroxy-3-pyrrolin-2-ones were synthesized and characterized by spectral (UV–Vis, IR, NMR, ESI-MS), X-ray and elemental analysis. All compounds were examined for their cytotoxic effect on human cancer cell lines HeLa and MDA-MB 231 and normal fibroblasts (MRC-5). Four compounds, 3-hydroxy-1-(p-tolyl)-4-(2-thienylcarbonyl)-5-(4-chlorophenyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-one (**D10**), 3-hydroxy-1-(3-nitrophenyl)-4-(2-thienylcarbonyl)-5-(4-(benzyloxy)phenyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-one (**D13**), 3-hydroxy-1-(4-nitrophenyl)-4-(2-thienylcarbonyl)-5-(4-(benzyloxy)phenyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-one (**D14**), and 3-hydroxy-1-(4-chlorophenyl)-4-(2-thienylcarbonyl)-5-(4-(benzyloxy)phenyl)-2,5-dihydro-1H-pyrrol-2-one (**D15**), that showed the highest cytotoxicity against malignant cells and the best selectivity towards normal cells were selected for further experiments. Results obtained by investigating mechanisms of cytotoxic activity suggest that selected 3-hydroxy-3-pyrrolin-2-one derivatives in HeLa cells induce apoptosis that is associated with S phase arrest (**D13**, **D15**, and **D10**) or unrelated to cell cycle distribution (**D14**). Additionally, to better understand their suitability for potential use as anticancer medicaments we studied the interactions between biomacromolecules (DNA or BSA) and **D13** and **D15**. The results indicated that **D13** and **D15** have great affinity to displace EB from the EB-DNA complex through intercalation [$K_{sv} = (3.7 \pm 0.1)$ and $(3.4 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectively], an intercalative mode also confirmed through viscosity measurements. K_a values, obtained as result of fluorescence titration of BSA with **D13** and **D15** [$K_a = (4.2 \pm 0.2)$ and $(2.6 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}$, respectively], support the fact that a significant amount of the tested compounds could be transported and distributed through the cells. In addition, by DNA and BSA molecular docking study for **D13**, **D14** and **D15** is determined and predicted the binding mode and the interaction region.

1. Introduction

One of the biggest health problem in our society and one of the primary targets in medicinal chemistry nowadays is cancer. Since the discovery of cisplatin and its use in clinical therapy, scientists have made a lot of effort to synthesize many platinum-based drugs that could

be less toxic to healthy tissue [1–3] and to overcome the resistance of some tumors to cisplatin [4,5]. The main goal for developing non-platinum anticancer drugs is to overcome the limits of platinum drugs: severe toxicity on healthy tissue, narrow range of activity and after treatment acquired resistance [1–5]. The discovery of new nonplatinum drugs with less side effects is of the major interest in pharmaceutical

* Corresponding author.

E-mail address: zoricab@kg.ac.rs (Z. Bugarčić).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102954>

Received 28 January 2019; Received in revised form 3 April 2019; Accepted 25 April 2019

Available online 27 April 2019

0045-2068/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.



Journal Name

ARTICLE

Synthesis, characterization, biological activity, DNA and BSA binding study: novel copper(II) complexes with 2-hydroxy-4-aryl-4-oxo-2-butenate

Received 00th January 20xx,
Accepted 00th January 20xx

DOI: 10.1039/x0xx00000x

www.rsc.org/

Nenad Joksimović,^a Dejan Baskić,^b Suzana Popović,^b Milan Zarić,^c Marijana Kosanić,^d Branislav Ranković,^d Tatjana Stanojković,^e Sladjana B. Novaković,^f Goran Davidović,^g Zorica Bugarčić,^a Nenad Janković^{*a}

A series of novel square pyramidal copper(II) complexes $[\text{Cu}(\text{L})_2\text{H}_2\text{O}]$ (**3a-d**) with *O,O* bidentate ligands [L = ethyl 2-hydroxy-4-aryl-4-oxo-2-butenate; aryl = 3-methoxyphenyl-**2a**, (*E*)-2-phenylvinyl-**2b**, (*E*)-2-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)vinyl-**2c**, 3-nitrophenyl-**2d**, 2-thienyl-**2e**] were synthesized and characterized by spectral (UV-Vis, IR, ESI-MS and EPR), elemental and X-ray analysis. The antimicrobial activity was estimated by determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) using the broth microdilution method. The most active antibacterial compounds were **3c** and **3d**, while the best antifungal activity showed complexes **3b** and **3e**. The lowest MIC value (0.048 mg mL⁻¹) was measured for **3c** against *Proteus mirabilis*. The cytotoxic activity was tested using MTT method on the human epithelial carcinoma Hela cells, human lung carcinoma A549 cells and human colon carcinoma LS174 cells. All complexes showed extremely better cytotoxic activity compared to cisplatin at all tested concentrations. Compound **3d** expressed the best activity against all tested cell lines with IC₅₀ values ranging from 7.45 to 7.91 μg mL⁻¹. The type of cell death and the impact on cell cycle for **3d** and **3e** were evaluated by flow cytometry. Both compounds induced apoptosis and S phase cell cycle arrest. The interactions between selected complexes (**3d** and **3e**) and CT-DNA or bovine serum albumin (BSA) were investigated by fluorescence spectroscopic method. Competitive experiments with ethidium bromide (EB) indicated that **3d** and **3e** have affinity to displace EB from the EB-DNA complex through intercalation and suggesting strong competition with EB [$K_{sv} = (1.4 \pm 0.2)$ and $(2.9 \pm 0.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively]. K_{sv} values indicate that these complexes bind to DNA covalently and non-covalently. Achieved results in fluorescence titration of BSA with **3d** and **3e** [$K_a = (2.9 \pm 0.2) \times 10^6$ and $(2.5 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}$, respectively] showed that the fluorescence quenching of BSA is a result of the formation of the **3d**- and **3e**-BSA complex. Obtained K_a values are high enough to ensure that a significant amount of **3d** and **3e** gets transported and distributed through the cells.

Introduction

The one of the fundamental goals in medicinal chemistry is development of new anticancer and antimicrobial therapeutic agents. The use of metal containing compounds presents one

of the most important strategies in development of new anticancer and antimicrobial agents.¹⁻⁵

One of the main health problems in our society, and one of the primary targets in medicinal chemistry is cancer. Long-time platinum complexes had been in centre of researches as chemotherapy agents.⁶⁻⁸ However, the treatment with platinum drugs is limited by several side effects such as nephrotoxicity and neurotoxicity.⁹⁻¹³ The major interests in medicinal chemistry was to develop and synthesize different non-platinum agents, with less side effects and/or lower cytotoxicity than platinum-based drugs.¹⁴ A wide variety of metal complexes based on cobalt,¹⁵ gold,¹⁶ palladium,¹⁷ ruthenium,¹⁸⁻²¹ osmium,^{19,22,23} titanium,²⁴ molybdenum,²⁴ iridium,²⁵ rhodium,²⁶ tin²⁷ and copper,²⁸ were intensively studied as potential platinum replacements. One of the most investigated non-Pt compounds as potentially attractive anticancer agents were copper complexes.²⁹⁻³¹ Many years, a lot of researches have actively investigated copper compounds based on the assumption that endogenous metals may be less toxic.^{32,33} A different copper complexes with ligands such as: salicylaldehyde benzoylhydrazone,³⁴ 2-oxo-quinoline-3-

^a Faculty of Science, University of Kragujevac, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: nenad.jankovic@kg.ac.rs

^b Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia.

^c Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia.

^d Faculty of Science, University of Kragujevac, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia.

^e Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia.

^f Vinča Institute of Nuclear Science, University of Belgrade University of Belgrade, P.O. Box 522, 11001, Belgrade, Serbia

^g Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia.

† Footnotes relating to the title and/or authors should appear here.

Electronic Supplementary Information (ESI) available: Copies of ¹H and ¹³C NMR spectrums of ligands (**2b** and **2c**) and crystallographic data of **3a** (CCDC 1481900). See DOI: 10.1039/x0xx00000x

RESEARCH ARTICLE

Synthesis, Characterization, Antioxidant Activity of β -diketonates, and Effects of Coordination to Copper(II) ion on Their Activity: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study

Nenad Joksimović¹, Jelena Petronijević¹, Nenad Janković¹, Marijana Kosanić², Dušan Milivojević³, Milan Vranes⁴, Aleksandar Tot⁴ and Zorica Bugarić^{1,*}

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac;

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; ³Vinča Institute of Nuclear Science University of Belgrade, P.O. Box 522, 11001, Belgrade, Serbia;

⁴University of Novi Sad, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

ARTICLE HISTORY

Received: July 10, 2019
Revised: September 02, 2019
Accepted: September 18, 2019

DOI:
10.2174/1573406415666191024102520

Abstract: Background: In order to make some progress in discovering the more effective way to eliminate ROS which cause the oxidative stress in organism in humans and bearing in mind the fact that ethyl-2-hydroxy-4-aryl(alkyl)-4-oxo-2-butenates (β -diketonates) belong to a class of biologically active compounds, series of β -diketonates were synthesized, characterized, and tested to evaluate their antioxidant activity. Further, to investigate how coordination to copper(II) ion affects the activity of β -diketonates, appropriate complexes were synthesized and characterized.

Methods: All complexes were characterized by UV-Vis, IR, and EPR spectroscopy, MS spectrometry, and elemental analysis. Fluorescence spectroscopic method was used for investigations of the interactions between biomacromolecules (DNA or BSA) and compound **2E**. Viscosity measurements and molecular docking study were performed to confirm the mode of interactions between DNA and BSA and compound **2E**.

Results: Scavenging activity on DPPH radical revealed that compounds **2A**, **2B**, and **2E** possess largest free radical scavenging, comparable to standard while results of superoxide anion scavenging activities of tested samples showed that maximum scavenging activity ($IC_{50}=168.92 \mu\text{g/mL}$) was found for **2E**, very similar to standard ascorbic acid, followed by **2B** and **2G**. Results of the interactions between biomacromolecules and **2E** indicated that **2E** has the affinity to displace EB from the EB-DNA complex through intercalation [$K_{sv} = (3.7 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$], while K_a value obtained via titration of BSA with **2E** [$K_a = (4.2 \pm 0.2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$], support the fact that the significant amount of the drug could be transported and distributed through the cells.

Conclusions: All β -diketonates exhibited better scavenging activities than their corresponding copper complexes. Among all the tested compounds, **2E** gave the highest reducing power, even higher than standard ascorbic acid, while reducing power for compounds **2A** and **2B** was also good but lower than standard. DNA and BSA binding study for **2E** showed that this compound has the potential to be used as medicament.

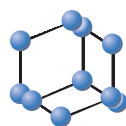
Keywords: β -diketonates, antioxidant activity, copper complexes, DNA binding study, BSA binding study, molecular docking.

1. INTRODUCTION

The human body has a complex system of natural enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses that protect the organism from the harmful effects of free radicals and other oxidants. Free radicals are responsible for causing a

large number of diseases such as cancer [1], Alzheimer's disease [2, 3], Parkinson's disease [4], neuronal disorders [5], cardiovascular disease [6], ulcerative colitis [7], atherosclerosis [8], liver disease [9] and many other. Imbalance of ROS (reactive oxygen species) and antioxidants in the human body leads to the creation of free radicals. Therefore, the intake of antioxidants through nutrition is necessary and important for balancing the state of the antioxidants that would reduce pathological changes caused by free radicals [10]. When endogenous antioxidants enzymes, such as su-

* Address correspondence to this author at the University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac; E-mail: zoricab@kg.ac.rs



Synthesis, Anticancer Evaluation and Synergistic Effects with *cisplatin* of Novel Palladium Complexes: DNA, BSA Interactions and Molecular Docking Study



Nenad Joksimović¹, Nenad Janković¹, Jelena Petronijević¹, Dejan Baskić², Suzana Popović², Danijela Todorović², Milan Zarić², Olivera Klisurić³, Milan Vraneš⁴, Aleksandar Tot⁴ and Zorica Bugarić^{1,*}

¹Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; ²Faculty of Medical Sciences, Centre for Molecular Medicine and Stem Cell Research, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia; ³Faculty of Sciences, Department of Physics, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 4, 21000 Novi Sad, Serbia; ⁴Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

Abstract: Background: In order to discover new agents for chemotherapy with improved properties compared to the existing agents and bearing in mind the fact that some Pd complexes possess better antitumor activity and exhibit less kidney toxicity compared to *cisplatin*, a series of novel square-planar palladium(II) complexes [Pd(L)₂] (**3a-f**) with *O,O* bidentate ligands [L = ethyl 2-hydroxy-alkyl(aryl)-4-oxo-2-butenate] were synthesized.

Methods: All complexes were characterized by spectral (UV-Vis, IR, NMR, ESI-MS) and X-ray analysis and examined for their cytotoxic effect on human cancer cell lines HeLa and MDA-MB 231 and normal fibroblasts (MRC-5). Fluorescence spectroscopic method was used for investigations of the interactions between CT-DNA or bovine serum albumin (BSA) and complex **3c**. Viscosity measurements and molecular docking study were performed to confirm the mode of interactions between DNA and BSA and complex **3c**.

Results: Complexes that showed the best results, **3c**, **3d**, and **3e**, were placed under further investigations. Selected complexes induced apoptosis and cell cycle arrest in HeLa and MDA-MB 231 cells. Low concentrations of **3c** and **3e** showed strong to moderate synergism with low concentrations of *cisplatin*. The interaction of **3d** with *cisplatin* was antagonistic in all used concentrations, but low IC₅₀ value indicates its usefulness as a single cytotoxic agent. It was also noted that the change of viscosity is more pronounced in DNA solution after addition of complex **3c**.

Conclusion: Obtained results indicate that the novel palladium(II) complexes have the potential to become candidates for treatment in anticancer therapy.

Keywords: Palladium complexes, antitumor activity, biological activity, DNA binding study, BSA binding study, molecular docking.

1. INTRODUCTION

Since the discovery of *cisplatin*, which entered into the clinical trials in 1971, it has been used in chemotherapy, metal-based complexes have gained importance in medicine [1, 2]. Even though Pt(II)-based drugs have been used widely as anticancer agents, they have several disadvantages such as acute nephrotoxicity, neurotoxicity, and drug resis-

tance problems [3-8]. Besides side effects, limited applicability of Pt complexes on some types of tumor cells (small cell lung or *i.e.* ovarian cancers), that have shown a resistance after initial treatment with *cisplatin*, was an additional reason for the development of new anticancer agents with improved properties [9, 10]. The search for anticancer agents with improved properties has been focused on the synthesis of other metal-based drugs. A wide variety of other drugs based on iron [11], copper [12], cobalt [13], tin [14], gold [15, 26], ruthenium [16-19], rhodium [20], osmium [21, 22], titanium [23], iridium [24], molybdenum [23] and palladium [25-29] were studied as potential platinum replacements.

*Address correspondence to this author at the Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia; E-mail: zorocab@kg.ac.rs

ARTICLE HISTORY

Received: July 20, 2018
Revised: December 13, 2018
Accepted: December 19, 2018

DOI:
10.2174/1573406415666190128095732



CrossMark

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ненад Јоксимовић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

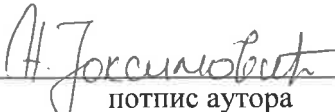
„Ацилпирувати као прекурсори у синтези неких биолошки активних једињења”

која је одбрањена на **Природно-математичком факулету**, Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 03.03.2020. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ненад Јоксимовић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Ацилпирувати као прекурсори у синтези неких биолошки активних једињења”

која је одбрањена на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

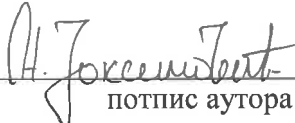
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- ⑥ Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 03.03.2020. године,


потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>