

UNIVERZITET U BEOGRADU
HEMIJSKI FAKULTET

Marijana B. Živković

SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST DERIVATA
STEROIDNIH HIDRAZONA

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF CHEMISTRY

Marijana B. Živković

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND
BIOLOGICAL ACTIVITY OF
STEROIDAL HYDRAZONE DERIVATIVES

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

KOMISIJA:

Mentori:

dr Dušan Sladić,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Natalija Krstić,
naučni savetnik IHTM-CH
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Katarina Anđelković,
redovni profesor Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Irena Novaković,
viši naučni saradnik IHTM-CH
Univerziteta u Beogradu

dr Ivana Matić,
naučni saradnik Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije

Datum odbrane:

Naslov: „Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost derivata steroidnih hidrazona“

Sažetak: U potrazi za biološki aktivnim jedinjenjima, počev od progesterona i 3-okso- α,β -nezasićenih androstenskih steroida, u okviru ove disertacije sintetisano je i potpuno okarakterisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona, od kojih po jedanaest tiosemikarbazona, tijadiazolina i semikarbazona, dvanaest tiazolidin-4-ona i pet karbazatnih estara.

Po prvi put je urađena detaljna analiza stereochemije steroidnih hidrazona u položajima C-3/17 androstenskih, odnosno C-3/20 progesteronskih derivata. Struktura i stereochemija potvrđene su rezultatima rendgenske strukturne analize za tijadiazolin **7a**, prvo okarakterisano steroidno jedinjenje koje sadrži šestočlani ugljenični prsten kondenzovan sa spiro-tijadiazolinskim prstenom, i tiazolidinon **9b-E**, prvi steroidni derivat sa poznatom konfiguracijom dvostruke veze u položaju C-3 hidrazono-tiazolidin-4-onskog fragmenta.

Sintetisana jedinjenja su ispoljila najjaču citotoksičnost prema HeLa ćelijama adenokarcinoma cerviksa i prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije, a po svojoj aktivnosti istakli su se tiosemikarbazoni **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, tijadiazolini **8a** i **8e** i tiazolidin-4-oni **9a** i **10a**. Pritom su koeficijenti selektivnosti u antikancerskom dejstvu prema malignim ćelijama u odnosu na normalne humane PBMC, kako na nestimulisane tako i na mitogenom stimulisane, bili daleko veći od vrednosti 2,5 što ova jedinjenja svrstava u potencijalne kandidate za *in vivo* ispitivanja. Sumporni derivati bili su daleko aktivniji od kiseoničnih. Najaktivniji derivati indukovali su apoptozu posredstvom kaspaza-3, -8 i -9 i inhibirali angiogezu *in vitro* zbog čega se smatra da poseduju značajan antikancerski potencijal.

Ključne reči: 3-okso- α,β -nezasićeni steroidi, hidrazoni, tiosemi/semi-karbazoni, tijadiazolini, tiazolidin-4-oni, karbazatni estri, citotoksičnost, apoptoza, angiogeneza, antimikrobna aktivnost

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Organska hemija, Medicinska hemija

UDK brojevi:

Title: „Synthesis, characterization and biological activity of the steroidal hydrazone derivatives“

Summary: Searching for biologically active compounds, within this doctoral dissertation fifty new steroidal hydrazone derivatives, of which 11 thiosemicarbazones, 11 thiadiazolines, 12 thiazolidin-4-ones, 11 semicarbazones and 5 carbazate esters, were synthesized starting with progesterone and 3-oxo- α,β -unsaturated androstene steroids, and fully characterized.

For the first time, detailed stereochemistry analyses of steroidal hydrazones in the C-3/17 positions of androstene derivatives, or C-3/20 positions of progesterone derivatives was done. Structure and stereochemistry were confirmed by the results of X-ray analyses for thiadiazoline **7a**, the first characterized steroid compound that contains six-membered carbon ring condensed with the spiro-thiadiazoline ring, and thiazolidinone **9b-E**, the first steroidal derivative with known configuration of double bond in C-3 position of the hydrazone-thiazolidin-4-one fragment.

Synthesised compounds manifested the best cytotoxicity towards HeLa cervix adenocarcinoma cells, and K562 cells of chronic myeloid leukemia, the best activity being showed by thiosemicarbazones **2a**, **2b**, **2c** and **2f**, thiadiazolines **8a** and **8e**, and thiazolidin-4-ones **9a** and **10a**. All of these compounds exhibited considerably higher intensities of cytotoxic action against malignant cells when compared with normal human PBMC, both resting and mitogen-stimulated, with coefficient of selectivity higher than 2.5, which makes these compounds potential candidates for *in vivo* experiments. Sulfur derivatives were much more active than oxygen derivatives. The most active derivatives induced apoptosis mediated by caspase-3, -8 and -9, and they inhibited angiogenesis *in vitro*, because of what they are considered to have significant anticancer potential.

Keywords: 3-oxo- α,β -unsaturated steroids, hydrazones, thiosemi/semi-carbazones, thiadiazolines, thiazolidin-4-ones, carbazate esters, cytotoxicity, apoptosis, angiogenesis, antimicrobial activity

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Organic Chemistry, Medicinal Chemistry

UDC numbers:

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opšti deo	3
2.1. Steroidni molekuli	3
2.2. Heterosteroidi	8
2.2.1. Heterosteroidi sa biološkom aktivnošću	8
2.3. Hidrazoni	12
2.3.1. Steroidni hidrazoni sa biološkom aktivnošću	12
2.4. Tiosemikarbazoni i semikarbazoni	14
2.4.1. Tiosemikarbazoni i semikarbazoni sa antibakterijskom aktivnošću	15
2.4.2. Tiosemikarbazoni i semikarbazoni kao antikancerski agensi	16
2.5. Kompleksna jedinjenja sa tiosemikarbazonomima	17
2.6. Tijadiazolini	19
2.7. 1,3-Tiazolidin-4-oni	20
3. Rezultati i diskusija	21
3.1. Hemija	21
3.1.1. Reakcije steroidnih derivata sa tiosemi/semi-karbazidom	22
3.1.1.1. Dobijanje tiosemikarbazona	22
3.1.1.2. Dobijanje semikarbazona	23
3.1.1.3. Određivanje strukture 3-mono-karbazona na primeru molekula 2a i 4a	24
3.1.1.4. Određivanje strukture bis(karbazona) na primeru jedinjenja 3a i 5a	28
3.1.2. Reakcije tiosemi/semi-karbazona sa anhidridom sirćetne kiseline	33
3.1.2.1. Dobijanje 1,3,4-tijadiazolina	33
3.1.2.2. Određivanje strukture mono-1,3,4-tijadiazolina na primeru 7a	34
3.1.2.3. Molekulska i kristalna struktura 1,3,4-tijadiazolina 7a	35

3.1.2.4. Određivanje strukture bis(1,3,4-tijadiazolina) na primeru jedinjenja 8a	37
3.1.2.5. Pokušaj dobijanja 1,3,4-oksadiazolina, ODA	39
3.1.3. Reakcije sa etil-hloroacetatom	40
3.1.3.1. Dobijanje tiazolidin-4-ona	40
3.1.3.2. Određivanje strukture mono-tiazolidin-4-ona na primeru jedinjenja 9a i 9b	42
3.1.3.3. Rendgenska strukturna analiza mono-tiazolidin-4-ona 9b-E	44
3.1.3.4. Određivanje strukture bis(tiazolidin-4-ona) na primeru jedinjenja 10a	46
3.1.3.5. Dobijanje karbazatnih estara	49
3.1.3.6. Određivanje strukture karbazatnih estara na primeru jedinjenja 11a	51
3.2. Biologija	53
3.2.1. Citotoksična aktivnost.....	53
3.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti na PBMC	62
3.2.3. Promene u distribuciji HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ..	67
3.2.4. Detekcija tipa ćelijske smrti HeLa ćelija	72
3.2.4.1. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti fluorescentnom mikroskopijom	72
3.2.4.2. Detekcija tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom	74
3.2.5. Određivanje ciljnih kaspaza	75
3.2.6. <i>In vitro</i> test za angiogenezu ili test građenja cevi od endotelnih ćelija.....	78
3.2.7. Efekat steroidnih derivata na ekspresiju gena u HeLa ćelijama	80
3.2.8. Antioksidativni test: hvatanje slobodnih radikala (DPPH metoda)	81
3.2.9. „ <i>Brine shrimp</i> ” test toksičnosti	82
3.2.10. Antimikrobna aktivnost	83
3.2.10.1. Antimikrobna aktivnost tiosemikarbazona i tijadiazolina	83
3.2.10.2. Antimikrobna aktivnost semikarbazona i njihovih derivata.....	85
4. Eksperimentalni deo	86
4.1. Hemija	86

4.1.1. Generalne metode	86
4.1.2. Generalna procedura za sintezu tiosemikarbazona	87
4.1.2.1. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2a)	87
4.1.2.2. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (3a)	89
4.1.2.3. Androst-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2b)	90
4.1.2.4. Androst-4-en-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (3b)	91
4.1.2.5. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2c)	92
4.1.2.6. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (3c)	93
4.1.2.7. 11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2d)	93
4.1.2.8. 11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (3d)	94
4.1.2.9. 11 α -Acetoksiandrost-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2e)	95
4.1.2.10. Pregn-4-en-3,20-dion-3-tiosemikarbazon (2f)	96
4.1.2.11. Pregn-4-en-3,20-dion-bis(tiosemikarbazon) (3f)	97
4.1.3. Generalna procedura za sintezu tijadiazolina	98
4.1.3.1. (3 <i>R</i>)- <i>N</i> -(3'-Acetil-17-oksospiro[19-norandrost-4-en-3,2'-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)acetamid (7a)	98
4.1.3.2. (3 <i>R</i>)- <i>N</i> -(3'-Acetil-17-oksospiro[androst-4-en-3,2'-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)acetamid (7b)	99
4.1.3.3. (3 <i>R</i>)- <i>N</i> -(3'-Acetil-17-oksospiro[androsta-4,9(11)-dien-3,2'-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)acetamid (7c)	100
4.1.3.4. (3 <i>R</i>)- <i>N</i> -(11 α -Acetoksi-3'-acetil-17-oksospiro[androst-4-en-3,2'-[1,3,4]-tijadiazolin]-5'-il)acetamid (7e)	101
4.1.3.5. (3 <i>R</i>)- <i>N</i> -(3'-Acetil-11 α -hidroksi-17-oksospiro[androst-4-en-3,2'-[1,3,4]-tijadiazolin]-5'-il)acetamid (7d)	101
4.1.3.6. (3 <i>R</i>)- <i>N</i> -(3'-Acetil-20-oksospiro[pregn-4-en-3,2'-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)-acetamid (7f)	102
4.1.3.7. (3 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- <i>N,N</i> '-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-19-norandrost-4-en-17',2''-5'-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8a)	103
4.1.3.8. (3 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- <i>N,N</i> '-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-androst-4-en-17',2''-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8b)	103
4.1.3.9. (3 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- <i>N,N</i> '-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-androsta-4,9(11)-dien-17',2''-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8c)	104

4.1.3.10. (3 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)- <i>N,N'</i> -(11 α -Acetoksi-3,3"-diacetildispiro-[1,3,4]tjadiazolin-2,3'-androst-4-en-17',2"-[1,3,4]tjadiazolin-5,5"-diil)bis[acetamid] (8e)	105
4.1.3.11. (3 <i>R</i> ,20 <i>R/S</i>)- <i>N,N'</i> -(3,3"-Diacetildispiro-[1,3,4]tjadiazolin-2,3'-pregn-4-en-20',2"-[1,3,4]tjadiazolin-5,5"-diil)bis[acetamid] (8f) (<i>R/S</i>)	106
4.1.4. Generalna procedura za dobijanje tiazolidin-4-onskih derivata	107
4.1.4.1. 2,4-Tiazolidindion-2-[(17-oksoestr-4-en-3-iliden)hidrazon] (9a)	107
4.1.4.2. 2,4-Tiazolidindion-2-[(17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazon] (9b)	108
4.1.4.3. 2,4-Tiazolidindion-2-[(17-oksoandrosta-4,9(11)-dien-3-iliden)hidrazon] (9c)	109
4.1.4.4. 2,4-Tiazolidindion,2-[((11 α)-11-hidroksi-17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazon] (9d)	111
4.1.4.5. 2,4-Tiazolidindion-2-[((11 α)-11-acetoksi-17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazon] (9e)	112
4.1.4.6. 2,4-Tiazolidindion-2-[(20-oksopregn-4-en-3-iliden)hidrazon] (9f)	113
4.1.4.7. Estr-4-en-3,17-dion-3,17-bis[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)-hidrazon] (10a)	114
4.1.4.8. Androst-4-en-3,17-dion-3,17-bis[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)-hidrazon] (10b)	115
4.1.4.9. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-3,17-bis[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)-hidrazon] (10c)	116
4.1.4.10. (11 α)-11-Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-3,17-bis-[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10d)	117
4.1.4.11. (11 α)-11-(Acetoksi)androst-4-en-3,17-dion,3,17-bis-[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10e)	118
4.1.4.12. Pregn-4-en-3,20-dion-3,20-bis-[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)-hidrazon] (10f)	119
4.1.5. Generalna procedura za dobijanje mono- i bis(semikarbazona)	120

4.1.5.1. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-3-semikarbazon (4a)	120
4.1.5.2. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-bis(semikarbazon) (5a)	121
4.1.5.3. Androst-4-en-3,17-dion-3-semikarbazon (4b)	122
4.1.5.4. Androst-4-en-3,17-dion-bis(semikarbazon) (5b)	123
4.1.5.5. (<i>E</i>)-Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-3-semikarbazon (4c)	124
4.1.5.6. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-bis(semikarbazon) (5c)	125
4.1.5.7. 11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-3-semikarbazon (4d)	126
4.1.5.8. (<i>E</i>)-11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-17-semikarbazon (6d) ..	127
4.1.5.9. (<i>E</i>)-11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-bis(semikarbazon) (5d) ..	127
4.1.5.10. (<i>E</i>)-Progesteron-3-semikarbazon (4f)	128
4.1.5.11. (<i>E</i>)-Pregn-4-en-3,20-dion-bis(semikarbazon) (5f)	129
4.1.6. Generalna procedura za sintezu etil-hidrazinkarboksilata	130
4.1.6.1. Etil-2-(17-okso-19-norandrost-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilat (11a)	130
4.1.6.2. Etil-2-(17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilat (11b) ...	132
4.1.6.3. (<i>E</i>)-Etil-2-(17-oksoandrosta-4,9(11)-dien-3-iliden)hidrazinkarbo- ksilat (11c)	133
4.1.6.4. (<i>E</i>)-Etil-2-(11 α -hidroksi-17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazin- karboksilat (11d)	133
4.1.6.5. (<i>E</i>)-Etil-2-(20-oksopregn-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilat (11f)	134
4.1.7. Sinteza etil-2-(17-okso-19-norandrost-4-en-3-iliden)hidrazin-karboksilata (11a) bez dodatka etil-hloracetata kao reagensa.....	135
4.1.8. Rendgenska strukturna analiza	136
4.1.8.1. Određivanje kristalne strukture 1,3,4-tijadiazolina 7a	136
4.1.8.2. Određivanje kristalne strukture mono-tiazolidin-4-ona 9b-E	138
4.2. Biologija	139
4.2.1. Citotoksična aktivnost derivata steroidnih hidrazona	139
4.2.1.1. Pripremanje potrebnih rastvora	139
4.2.1.2. Humane ćelijske kulture	139
4.2.1.3. Tretman humanih ćelijskih linija	140
4.2.1.4. Određivanje preživljavanja ćelija (MTT esej)	140

4.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti prema humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi	141
4.2.2.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija periferne krvi	141
4.2.2.2. Tretman PBMC	141
4.2.3. Analiza raspodele HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa	142
4.2.4. Detekcija tipa ćelijske smrti HeLa ćelija	143
4.2.4.1. Morfološka analiza fluorescentnom mikroskopijom	143
4.2.4.2. Detekcija ćelija u apoptozi primenom protočne citometrije	144
4.2.5. Određivanje ciljnih kaspaza	145
4.2.6. <i>In vitro</i> esej angiogeneze ili “ <i>The endothelial cell tube formation</i> ” esej.	146
4.2.7. Analiza ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu u HeLa ćelijama	147
4.2.7.1. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)	148
4.2.8. Antioksidativni esej: hvatanje slobodnih radikala (DPPH) metoda	148
4.2.9. „ <i>Brine shrimp</i> ” test toksičnosti	149
4.2.9.1. Uzgajanje račića	149
4.2.9.2. Tretman račića steroidnim jedinjenjima	149
4.2.10. Antimikrobna aktivnost	150
4.2.10.1. Antibakterijska aktivnost	150
4.2.10.2. Antifungalna aktivnost	150
5. Zaključak	151
6. Literatura	153

Lista skraćenica

[α] _D	ugao optičke rotacije
AK	askorbinska kiselina
ATR	(engl. <i>Attenuated Total Reflection</i>)
AV	aneksin V-FITC, reagens za detekciju apoptoze
A549	humana ćelijska linija adenokarcinoma pluća
CCDC	(engl. <i>Cambridge Crystallographic Data Centre</i>) Kembrička banka strukturnih podataka
cDNK	komplementarna DNK
DMEM	(engl. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>) hranljivi medijum korišćen za održavanje kulture EA.hy926 ćelija
DMSO	dimetil-sulfoksid
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EA.hy926	transformisane humane endotelne ćelije pupčane vene
ESI	(engl. <i>Electrospray Ionisation</i>) jonizacija pomoću elektrospreja
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
FAM TM	fluorescein, fluorescentna boja
FBS	(engl. <i>Fetal bull serum</i>) serum fetusa govečeta
FCC	(engl. <i>flash column chromatography</i>)
FITC	fluorescein-izotiocijanat
FT-IR	engl. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza
HeLa	humana ćelijska linija adenokarcinoma cerviksa
HEPES	4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonska kiselina
HRMS	(engl. <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>) Masena spektrometrija visokog razlaganja
IR	(engl. <i>Infrared</i>) infracrveni
<i>J</i>	konstanta kuplovanja
Jurkat	humana ćelijska linija akutne leukemije T-limfocita
Kaspaze	(engl. <i>caspases, cysteine-aspartic proteases</i>) enzimi koji igraju ključnu ulogu u signalnim putevima apoptoze

K562	humana ćelijska linija hronične mijeloidne leukemije
LS174	humana ćelijska linija adenokarcinoma kolona
MDA-MB-361	humana ćelijska linija adenokarcinoma dojke koji sadrži receptore za estrogen i progesteron
MDA-MB-453	humana ćelijska linija karcinoma dojke koji ne sadrži receptore za estrogen i progesteron
MeOH	metanol
MMP-2 i -9	geni koji kodiraju enzime matriksne metaloproteinaze čija je osnovna uloga, degradacija bazalne membrane, usko povezana sa mogućnošću nastanka metastaza kod mnogih vrsta kancera
MRC-5	normalna humana ćelijska linija fibroblasta pluća
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid
NMR	nuklearno-magnetno-rezonantna
PBMC	(engl. <i>Peripheral Blood Mono-nuclear Cells</i>) mononuklearne ćelije periferne krvi
PBS	(engl. <i>phosphate buffered saline</i>) fosfatni pufer sa natrijum-hloridom
PJ	Propidijum-jodid , fluorescentna boja koja se veže za molekul DNK interkalacijom.
PHA	(engl. Phytohemagglutinin) fitohemaglutinin
PhMe	toluen
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S.D.	standardna devijacija
SDS	(engl. <i>sodium dodecylsulphate</i>) natrijum-dodecil-sulfat
TLC	(engl. <i>Thin Layer Chromatography</i>) tankoslojna hromatografija
TMS	tetrametilsilan
TOF	(engl. <i>Time Of Flight</i>) analizator koji meri vreme preleta jona
UV	(engl. <i>ultraviolet</i>) ultraljubičasta
VEGFA	gen koji kodira protein vaskularnog endotelnog faktora rasta A koji indukuje angiogenezu, potpomaže migraciju ćelija i inhibira apoptozu
Z-DEVD-FMK	fluorometilketon-derivatizovani peptid, inhibitor kaspaze-3

Z-IETD-FMK	fluorometilketon-derivatizovani peptid, inhibitor kaspaze-8
Z-LEHD-FMK	fluorometilketon-derivatizovani peptid, inhibitor kaspaze-9
s	singlet
d	dublet
t	triplet
k	kvartet
m	multiplet
š	širok signal
δ	hemijsko pomeranje
t.t.	tačka topljenja

1. Uvod

Rak zauzima drugo mesto na listi nezaraznih bolesti prema učestalosti pojavljivanja, odmah posle kardiovaskularnih oboljenja, a vodeći je po smrtnosti. Brza mutacija malignih ćelija i pojava rezistencije na postojeće lekove opravdavaju postojanje ogromnog broja istraživanja na polju raka i nastojanje da se pronađu novi lekovi protiv ove opake bolesti.

Problem rezistencije uzima sve više maha i u svetu mikroba pa i tu raste potreba za pronalaženjem novih lekova kako bi se čovečanstvo borilo sa bolestima kojima je u dobroj meri bilo stalo na put pronalaskom antibiotika u prošlom veku.

Steroidi predstavljaju grupu biološki aktivnih molekula široko rasprostranjenih kako u biljnom tako i u životinjskom svetu i igraju veoma važnu ulogu u biološkim sistemima. Zbog toga su transformacije krutog tetracikličnog sistema koje izazivaju promene u njihovim fiziološkim funkcijama i koje vode ka stvaranju novih biološki aktivnih molekula postale jedan od glavnih ciljeva današnje steroidne hemije. U tom pogledu naročito se ističu modifikacije koje uključuju uvođenje heteroatoma (azot, sumpor, kiseonik), novih funkcionalnih grupa i heterocikličnih prstenova.

S tim u vezi cilj ove doktorske disertacije je bio da se polazeći od 3-okso- α,β -nezasićenih steroida sintetišu novi steroidni hetero-derivati koji bi posedovali značajan potencijal za razvijanje novih selektivnih antikancerskih i antimikrobnih agenasa.

Tako je u okviru ove disertacije sintetisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona. Sva jedinjenja su detaljno okarakterisana, uključujući konfiguracionu analizu, ispitana je njihova antikancerska i antimikrobna aktivnost i izvršeno je poređenje reaktivnosti i aktivnosti sumpornih i kiseoničnih analoga.

U *Opštem delu* disertacije dat je kratak uvod o steroidnim molekulima, kao i pregled skorašnje literature o heterosteroidima i steroidnim hidrazonima sa biološkom aktivnošću, sa akcentom na antimikrobnu i antikancersku aktivnost.

Eksperimentalni deo obuhvata procedure za sintezu novih derivata steroidnih hidrazona, njihova fizička svojstva i spektralne podatke na osnovu kojih je izvršena karakterizacija i procedure za ispitivanje biološke aktivnosti sintetisanih jedinjenja.

U *Rezultatima i diskusiji* navedeni su rezultati svih eksperimenata koje obuhvata disertacija i dato je tumačenje eksperimentalnih rezultata.

Spisak literature korišćene za pisanje disertacije dat je na kraju teksta.

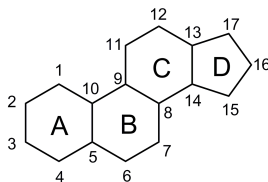
U Prilogu na CD-u su deponovani spektralni podaci na osnovu kojih je izvršena karakterizacija jedinjenja sintetisanih u okviru ove disertacije.

2. Opšti deo

2.1. Steroidni molekuli

Začetkom steroidne hemije smatra se izolovanje kristalne supstance, holesterola, početkom XIX veka. Tokom XX veka intenzivirana su istraživanja steroidnih molekula o čemu svedoči niz Nobelovih nagrada dodeljenih naučnicima za otkrića iz ove oblasti.¹

Steroidi spadaju u klasu lipida sa tetracikličnim jezgrom koje odgovara strukturi heksadekahidro-1H-ciklopenta[a]fenantrena (**Slika 2.1**). Razlikuju se po bočnim nizovima i funkcionalnim grupama koje sadrže.



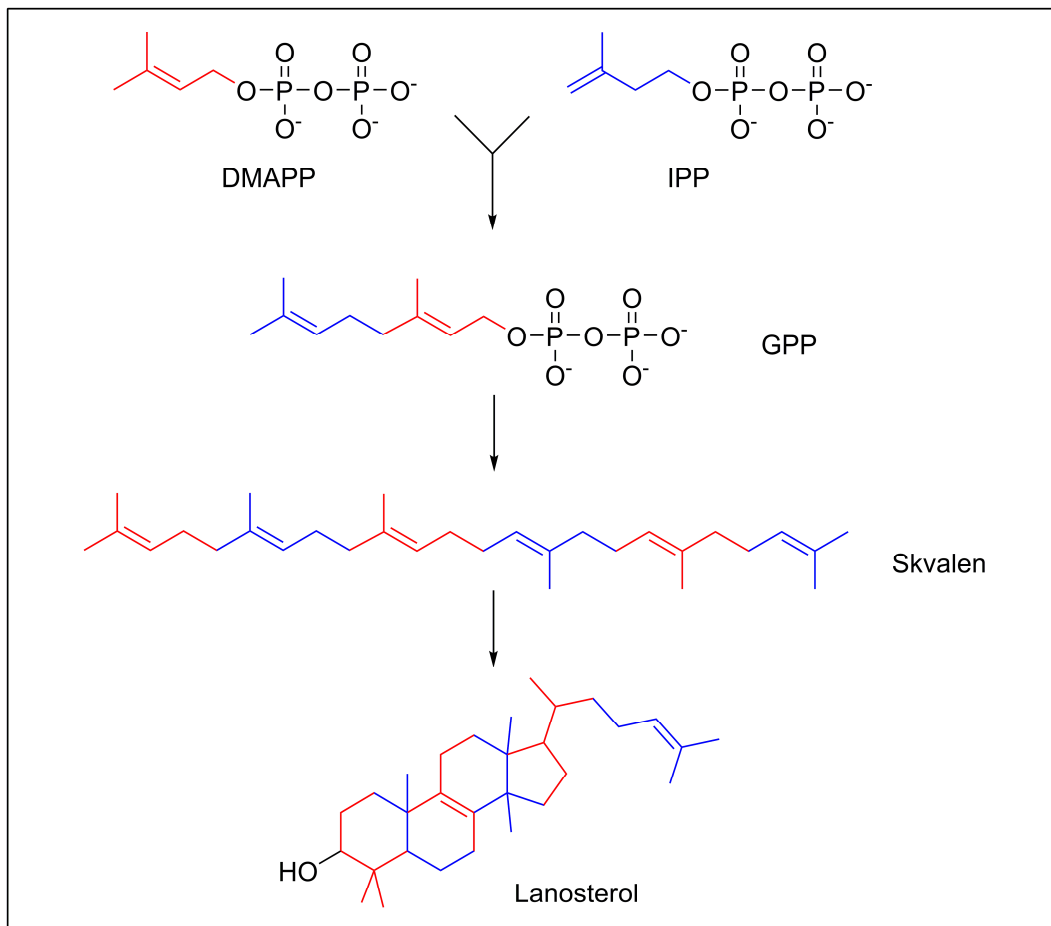
Slika 2.1. Tetraciklično jezgro zajedničko za sve steroidne molekule

Ugljovodonični skelet steroida je hidrofoban što im omogućava neometan prolazak kroz ćelijske membrane. Polarne funkcionalne grupe endogenih steroida, hidroksilna, fenil-ili keto-grupa, od ključnog su značaja za vezivanje steroida za receptore pri čemu njihovo prisustvo ne menja hidrofobnu prirodu steroidnog molekula kao celine.²

Zbog hidrofobnosti koja im omogućava prolazak kroz ćelijske membrane steroidi predstavljaju značajan polazni skelet za dizajniranje antikancerskih lekova. Kako je molekulska masa samog steroidnog skeleta prilično velika ograničen je broj transformacija koje je moguće izvršiti, a da se pritom ispoštuje "pravilo petice" i da relativna molekulska masa molekula ne pređe vrednost 500.³ Relativno rigidna struktura steroidnih molekula omogućava laku identifikaciju aktivne konformacije ovih jedinjenja što je vrlo važno pri razvoju novih lekova.²

U skorije vreme steroidne gradivne jedinice privlače pažnju mnogih istraživačkih grupa iz različitih grana nauke i tehnologije, kao što su medicina i farmakologija, hemija supramolekula i nanotehnologije.

Na **Shemi 2.1** prikazan je uprošćen biosintetski put nastanka steroida lanosterola.



IPP – izopentenil-pirofosfat, DMAPP – dimetilalil-pirofosfat, GPP – geranil-pirofosfat

Shema 2.1. Uprošćen prikaz biosintetskog puta steroida, tetracikličnih triterpena, iz šest izoprenskih jedinica

Autor Risley opisuje transformaciju lanosterola u holesterol (grčki *hole* – žuč, *stereos* – čvrst), prekursora svih ostalih steroidnih molekula,⁴ kao proces koji se odvija u devetnaest koraka.⁵

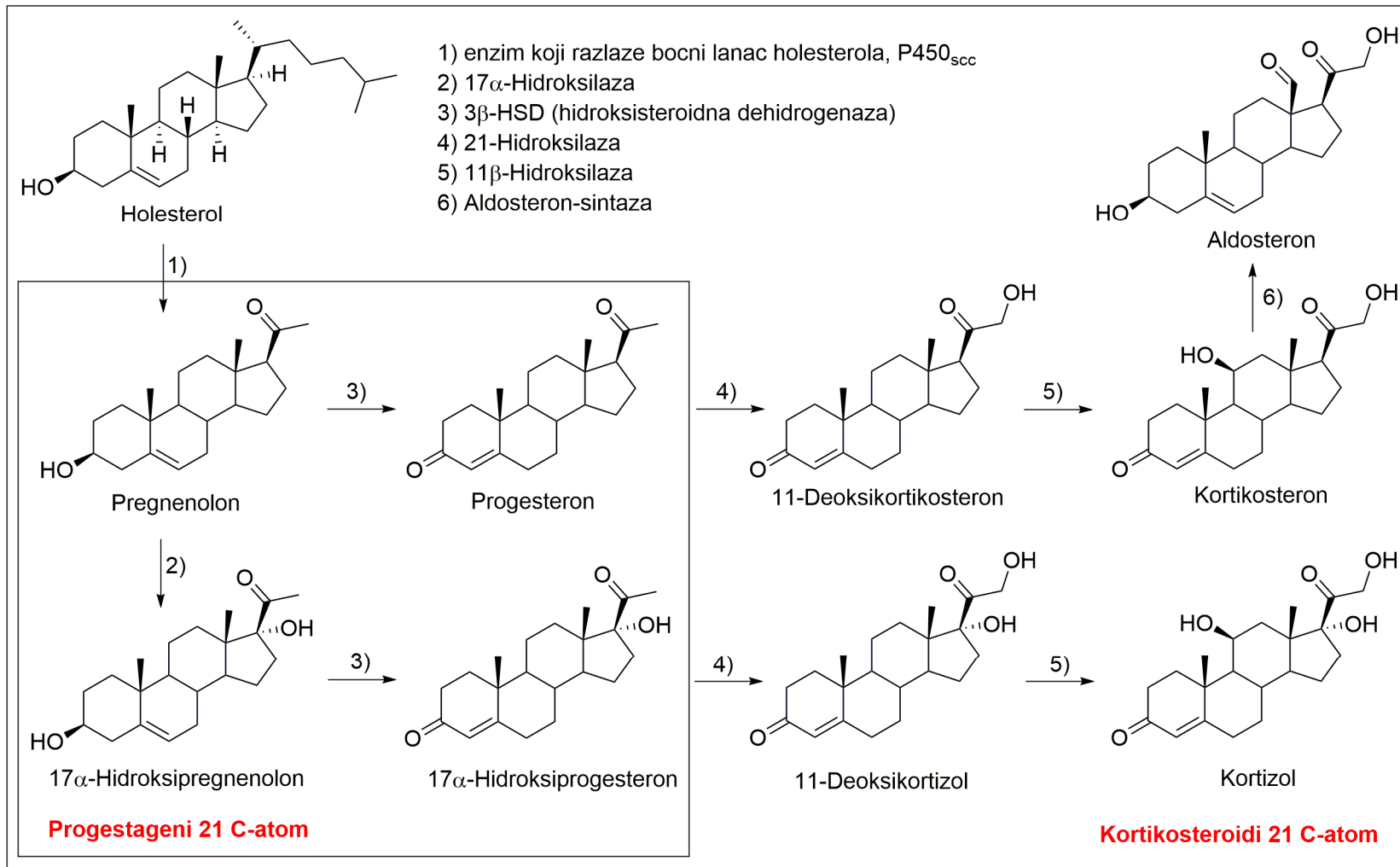
Prema hemijskoj strukturi i fiziološkom dejstvu steroidi se dele na:

- sterole
- žučne kiseline
- steroidne hormone
- srčane glikozide i
- steroidne sapogenine.

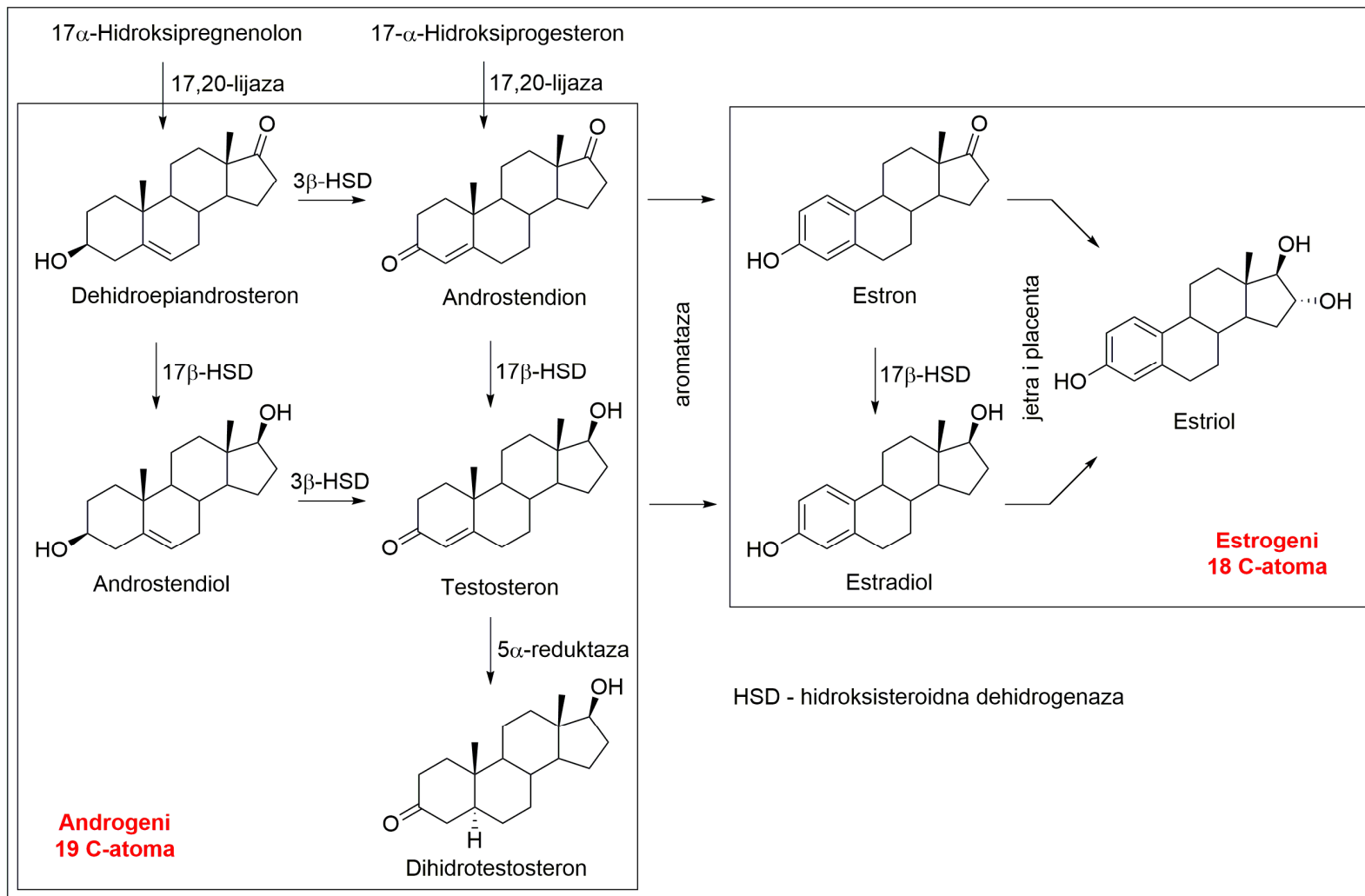
Steroidni molekuli su uglavnom hormoni, osim holesterola koji ima i mnoštvo nehormonskih uloga, te su u telu prisutni u miligramskim količinama.⁴

Ogroman interes naučne zajednice današnjice za steroidne hormone je posledica njihove uloge u kancerogenezi hormonski zavisnih tumora kao što su maligni tumori dojke, jajnika, prostate i testisa. Kako je rak, što po učestalosti pojavljivanja kod ljudi što po broju smrtnih slučajeva, druga nezarazna bolest, odmah posle kardiovaskularnih oboljenja,⁶ postoje značajni naponi naučnika za iznalaženjem novih antikancerskih lekova.

Na **Shemi 2.2** dat je biosintetski put nastanka steroidnih hormona iz univerzalnog steroidnog prekursora, holesterola.



Shema 2.2. Biosinteza steroidnih hormona i njihova podela na grupe



Shema 2.2. Nastavak

2.2. Heterosteroidi

Jedan od najznačajnijih načina za funkcionalizaciju steroidnih molekula, a samim tim i za proširenje već širokog spektra bioloških aktivnosti steroida, jeste uvođenje heteroatoma u steroidni skelet, bočnih nizova koji sadrže heteroatome i/ili heterocikličnih prstenova.

Steroidni molekuli koji sadrže heteroatom, heterosteroidi, obuhvataju aza-, oksa- i tija-steroidne i mogu da se podele u dve grupe:

- nuklearni heterosteroidi - atom ugljenika u položaju 1–17 zamenjen je heteroatomom
- egzonuklearni heterosteroidi - heteroatomi formiraju deo prstena ili spiro kondenzovani sistem, bočni niz ili vezanu grupu.⁷

Najzastupljeniji derivati od svih heterosteroida su azasteroidi, steroidni molekuli koji sadrže jedan ili više atoma azota. To su korisni enzimski inhibitori koji se u današnje vreme mahom racionalno dizajniraju. U najvećem broju radova heteroatomi su uvedeni u A ili u A i D prsten steroida.

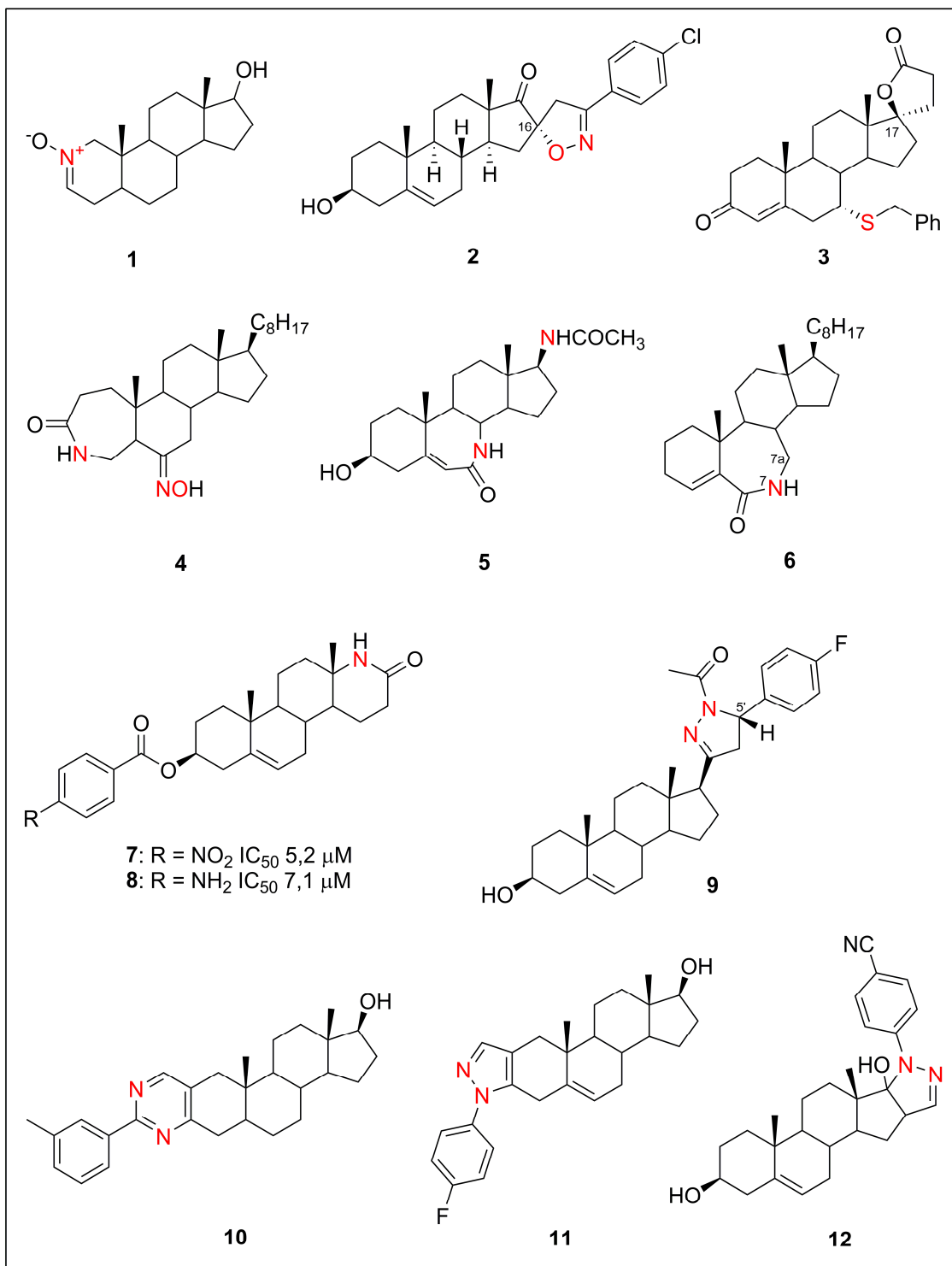
Heterociklični molekuli poseduju donore i akceptore vodoničnih veza u krutom skeletu čime je omogućeno efikasno povezivanje sa ciljnim enzimima i receptorima vodoničnim vezama. Uvođenjem heteroatoma menja se lipofilnost molekula ili povećava rastvorljivost u vodi čime se poboljšavaju farmakokinetička i farmaceutska svojstva molekula.⁸

Kako steroidni molekul neometano prolazi kroz ćelijske membrane on može da nosi sa sobom alkilujućeg agensa.²

2.2.1. Heterosteroidi sa biološkom aktivnošću

Prednosti steroidnih u odnosu na ostale hemioterapeutike je njihova visoka biodostupnost u ćeliji, manja toksičnost od ostalih i manja verovatnoća za razvoj rezistencije na veliki broj lekova (*multidrug resistance*, MDR).⁹

Robinson i saradnici¹⁰ sintetisali su nitron **1** (**Shema 2.3**) za koga se ispostavilo da je značajno bolji inhibitor 5 α -reduktaze od epiandrosterona iz koga je nastao.⁷

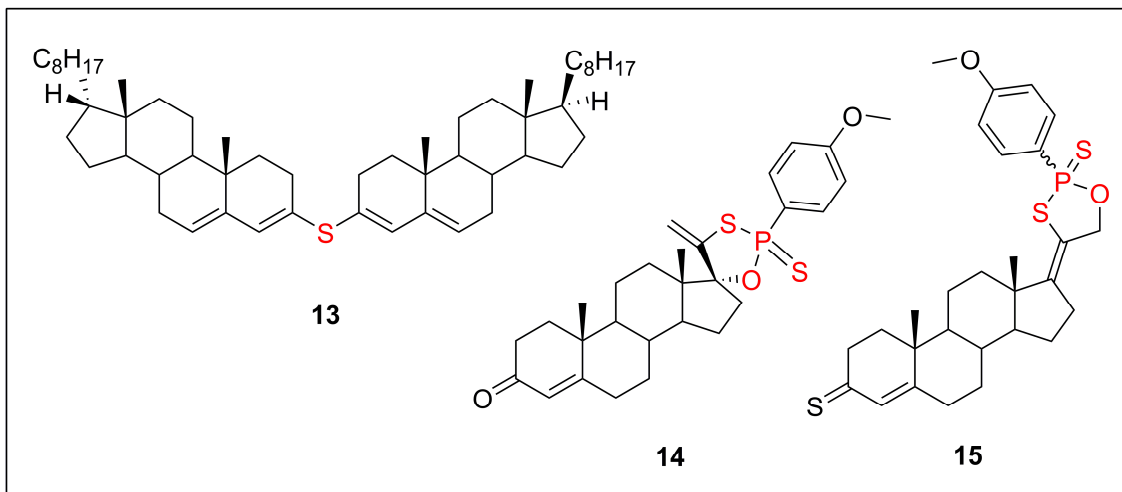


Shema 2.3. Heterosteroidi sa antikancerskom aktivnošću

Ukoliko se u položaj C-17 ili C-16 uvede voluminozni heterociklični prsten to značajno menja stereostrukturu tog dela molekula, a samim tim utiče i na biološka svojstva nastalih molekula. Spirosteroidi generalno ispoljavaju značajne biološke aktivnosti pa je

tako 16-spiroizoksazolin **2** autorke Frank i saradnika pokazao značajnu antikancersku aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma cerviksa HeLa (IC₅₀ 7,4 μM).¹¹ Za 17-spiro-γ-lakton **3** (Tremblay *et al.*)¹² ispostavilo se da je dobar inhibitor enzima 17β-hidroksisteroidne dehidrogenaze tipa II (17β-HSD II). Huang i saradnici sintetisali su holestanski A-aza-heterosteroid **4** čiji se mehanizam antikancerskog delovanja ogleda u pokretanju unutrašnjeg puta apoptoze u malignim ćelijama prostate.¹³ Počev od 3β-acetoksipregnenolona Koutsourea i saradnici su sinteisali B-laktam **5** koji karakteriše smanjena toksičnost i impresivan antikancerski potencijal prema ćelijskoj liniji leukemije P388. Ovaj heterosteroid dovodi do izlečenja 4/6 miševa podvrgnutih eksperimentu.¹⁴ B-Laktam **6** enamidnog tipa autorke Krstić i saradnika ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama na mikrogramskoj skali pri čemu je aktivacija apoptoze bio jedan od mehanizama citotoksičnog dejstva.¹⁵ 5-Androstenski D-laktami **7** i **8** Dhingre i saradnika ispoljili su dobru aktivnost na humanoj ćelijskoj liniji karcinoma prostate DU-145 u odnosu na lek finasterid kao pozitivnu kontrolu.¹⁶ Iványi i njegovi saradnici sintetisali su aza-egzonuklearne pirazolinil-pregnenolone koji inhibiraju rast malignih ćelija za više od 90% pri čemu se ispostavilo da je 5'S-epimer jedinjenja **9** daleko aktivniji.¹⁷ A-kondenzovani pirimidin **10** Baji-ja i saradnika ispoljio je antikancersku aktivnost prema malignim ćelijskim linijama prostate, od kojih je izuzetno značajna aktivnost prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma prostate PC-3 koja vodi poreklo od metastaza u kostima (IC₅₀ 9,1 μM).¹⁸ Isti autori su ustanovili da uvođenje voluminoznih heteroprstenova kondenzovanih u položaju 2,3 ili 16,17 (jedinjenja **11** i **12**) može da dovede do redukcije ili pak eliminacije hormonskog efekta androgena. Jedinjenje **11** ispoljilo je značajnu antikancersku aktivnost prema trostruko negativnom adenokarcinomu dojke MDA-MB-231 (IC₅₀ 4,5 uM), dok je jedinjenje **12** delovalo približno istim intenzitetom na ćelijsku liniju duktalnog karcinoma dojke T47D.¹⁹

Pored najzastupljenijih aza-heterosteroida koji mahom sadrže prsten pirazola, pirazolina, izoksazolina, piridina, pirimidina i imidazola, postoji značajan broj steroidnih jedinjenja sa uvedenim atomom sumpora ili fosfora.²⁰⁻²³ Od sumpornih heterocikala u prirodnim proizvodima najzastupljeniji su petočlani tiazoli, tiazolidinoni i tijadiazolini.²⁴



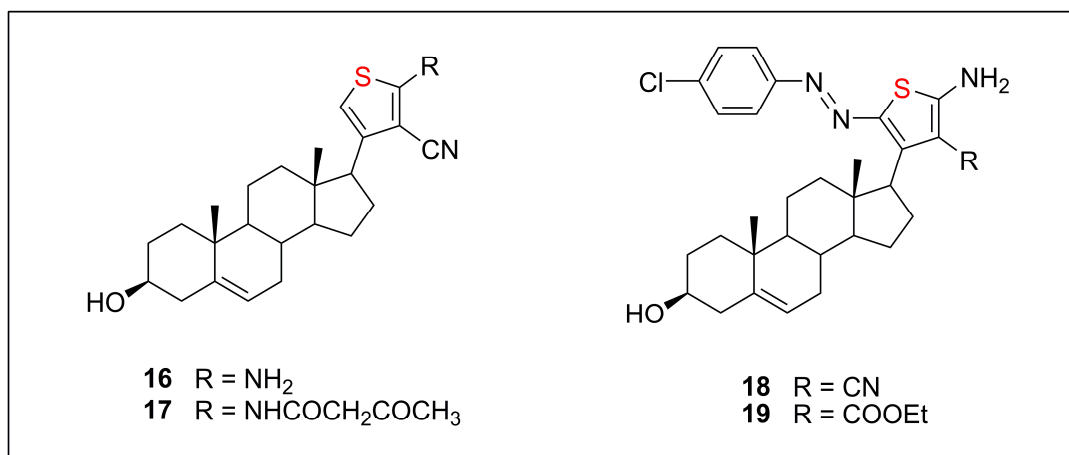
Shema 2.4. Neki sumporni i fosforni heterosteroidi²¹⁻²³

Ukoliko se atom sumpora uvede u steroidni molekul tionovanjem, zamenom kiseonikovog atoma karbonilne grupe atomom sumpora, posledice su izmenjena sposobnost vodoničnog vezivanja i konformacione promene molekula. Povećana reaktivnost tako nastalog molekula koji sadrži tiokarbonilnu grupu čini molekul podobnim za dalje transformacije.²⁰

Holestanski sulfidni dimer **13** (Shema 2.4) pokazao je dobru selektivnost za tumorske u odnosu na normalne ćelije pri čemu je antikancerska aktivnost prema HeLa ćelijama iznosila IC₅₀ 21,2 μM.²³

Kako u prirodi postoji mnoštvo organofosfornih jedinjenja sa značajnim biološkim aktivnostima²¹ to je bio podstrek da autorka Krstić i saradnici sintetišu fosforne heterociklične derivate androst-4-ena, **14** i **15**, i ispituju njihovu antikancersku aktivnost.^{21,22} Ispostavilo se da derivat **15** sa tiokso-grupom u položaju C-3 ispoljava jaču antikancersku aktivnost prema K562 ćelijama od svog 3-okso analoga.²²

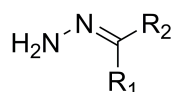
Mohareb i saradnici su, počevši od pregnenolona, sintetisali sumporne egzonuklearne heterosteroide koji sadrže tiofen. Od sintetisanih derivata, jedinjenja **16–19** (Shema 2.5) izdvajaju se po svojoj antikancerskoj aktivnosti većoj od aktivnosti doksorubicina.²⁵



Shema 2.5. Sumporni heterosteroidi sa antikancerskom aktivnošću²⁵

2.3. Hidrazoni

Hidrazoni su klasa organskih jedinjenja koja sadrže strukturni fragment prikazan na **Shemi 2.6**. Oni nastaju zamenom karbonilnog kiseonikovog atoma aldehida i ketona =NNH₂ grupom.²⁶

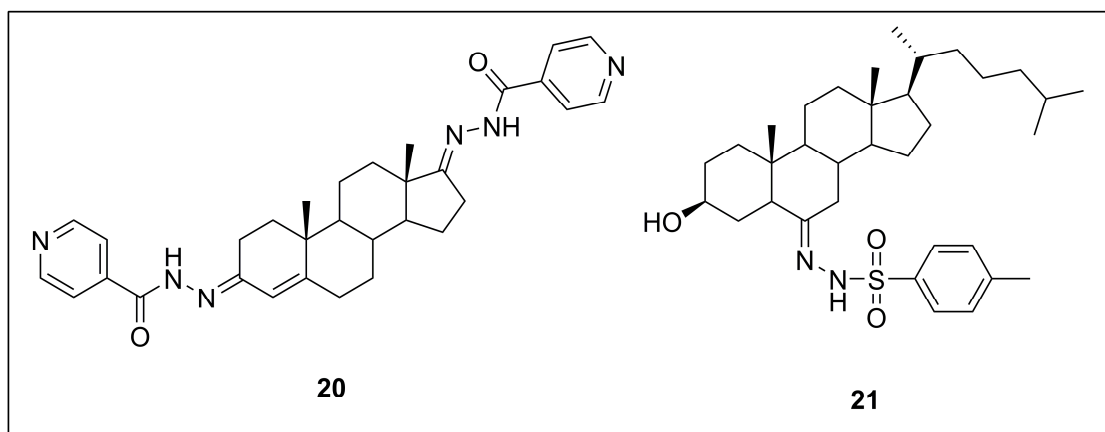


Shema 2.6. Opšta formula hidrazona

Hidrazoni se smatraju značajnim intermedijerima pri sintezi heterocikličnih jedinjenja.²⁷ Ispoljavaju mnoštvo različitih bioloških efekata od kojih su neki antituberkulozni,²⁸ antifungalni²⁹ i antikancerski.^{26,30-32} Dakle, hidrazoni (tačnije njihovi azometinski protoni –NHN=CH–) čine važnu klasu jedinjenja za razvoj lekova čija je toksičnost svedena na minimum. Pored toga, koriste se i kao pesticidi, regulatori rasta biljaka, plastifikatori i stabilizatori za polimere.²⁶

2.3.1. Steroidni hidrazoni sa biološkom aktivnošću

3,17-Bis(izonikotinoilhidrazon) **20** (**Shema 2.7**) koji su sintetisali Sikharulidze i saradnici³³ pokazao je značajno antituberkulozno dejstvo, dok je holestanski 6-tozilhidrazon **21** Loncle-a i saradnika ispoljio antifungalno dejstvo prema gljivi *Candida albicans*.³⁴



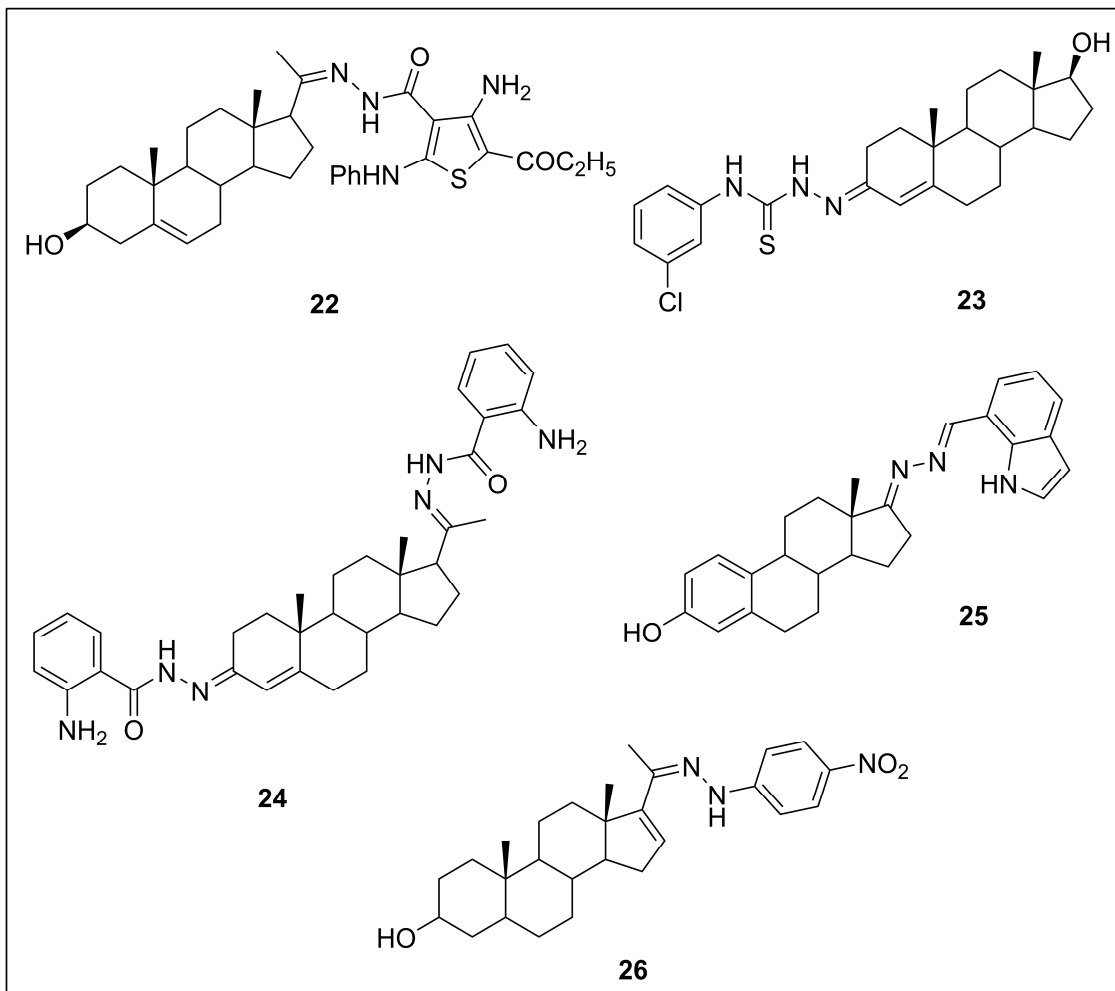
Shema 2.7. Steroidni hidrazon sa antituberkuloznim (**20**) i antifungalnim dejstvom (**21**)

Mohareb i saradnici sintetisali su čitav niz različitih steroidnih hidrazona kojima je potom ispitan antikancerski potencijal. Mnoga od tih jedinjenja, među kojima i jedinjenje **22** prikazano na **Shemi 2.8**, ispoljila su bolju antikancersku aktivnost od doksorubicina prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7 i liniji nesitnoćelijskog karcinoma pluća NCI-H460 (IC_{50} 0,01 μ M).⁹

Jabeen i saradnici ispitali su antikancerska svojstva hidrazona dobijenih iz progesterona i testosterona. Testosteronski tiosemikarbazon **23** bio je aktivan prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke, MCF-7 (IC_{50} 4,8 μ M), dok je progesteronski semikarbazon **24** pokazao značajnu aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma prostate PC-3 (IC_{50} 4 μ M).³⁵

Steroidne 17-hidrazone sa heterocikličnim prstenovima u bočnom nizu sintetisali su Cui i saradnici. Od tih jedinjenja, **25** sa prstenom indola u bočnom lancu ispoljilo je citotoksičnu aktivnost prema HeLa ćelijama (IC_{50} <5 μ M) bolju od kontrolnog citostatika, cisplatina.³⁶

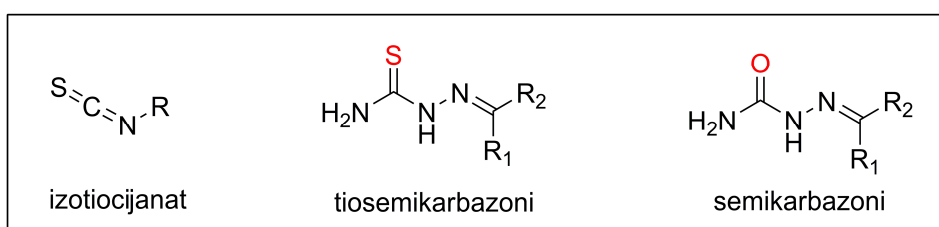
Od serije hidrazona koje su sintetisali Nadaria i saradnici izdvaja se hidrazon **26** koji je prema ćelijskoj liniji karcinoma pluća A549 ispoljio citotoksičnu aktivnost (IC_{50} 17,4 μ M) u rangu kontrole, etoposida.³⁷



Shema 2.8. Steroidni hidrazoni koji poseduju antikancersku aktivnost.^{9,35,36,37}

2.4. Tiosemikarbazoni i semikarbazoni

Tiosemikarbazoni i njihovi kiseonični analozi, semikarbazoni, su derivati hidrazona koji sadrže strukturne fragmente prikazane na **Shemi 2.9**.



Shema 2.9. Opšta formula tiosemi- i semikarbazona

Tiosemikarbazoni su vrlo korisni intermedijeri pri sintezi različitih heterocikličnih jedinjenja i helirajući su ligandi za metalne jone.³⁸⁻⁴⁷ Pored toga, ispoljavaju čitav niz različitih bioloških efekata kao što su: smirujuće⁴⁸, miorelaksantsko, psihoanaleptičko i hipnotičko,⁴⁹⁻⁵¹ antidepresivno,²⁸ antimikrobno,^{29,31,52} antiameboidno,³⁰ analgetičko, antiinflamatorno^{26,32} i citotoksično dejstvo.⁵³ Biološka aktivnost tiosemikarbazona ustanovljena je još šezdesetih godina prošlog veka.³ Farmakofora tiosemikarbazona sadrži izotiocijanatni motiv za koji je poznato da ima hemioprotektivno dejstvo.⁵⁴

Pokazano je da mehanizam delovanja α (N)-heterocikličnih tiosemikarbazona podrazumeva inhibiciju ribonukleozid-difosfat-reduktaze (RDR), enzima potrebnog za sintezu prekursora DNK,⁴⁶ koji ograničava brzinu sinteze DNK i katalizuje konverziju ribonukleotida u dezoksiribonukleotide. Predloženo je da bi tiosemikarbazoni mogli da utiču na različite mehanizme kako bi inhibirali aktivnost RDR-a.⁵³

2.4.1. Tiosemikarbazoni i semikarbazoni kao antibakterijski agensi

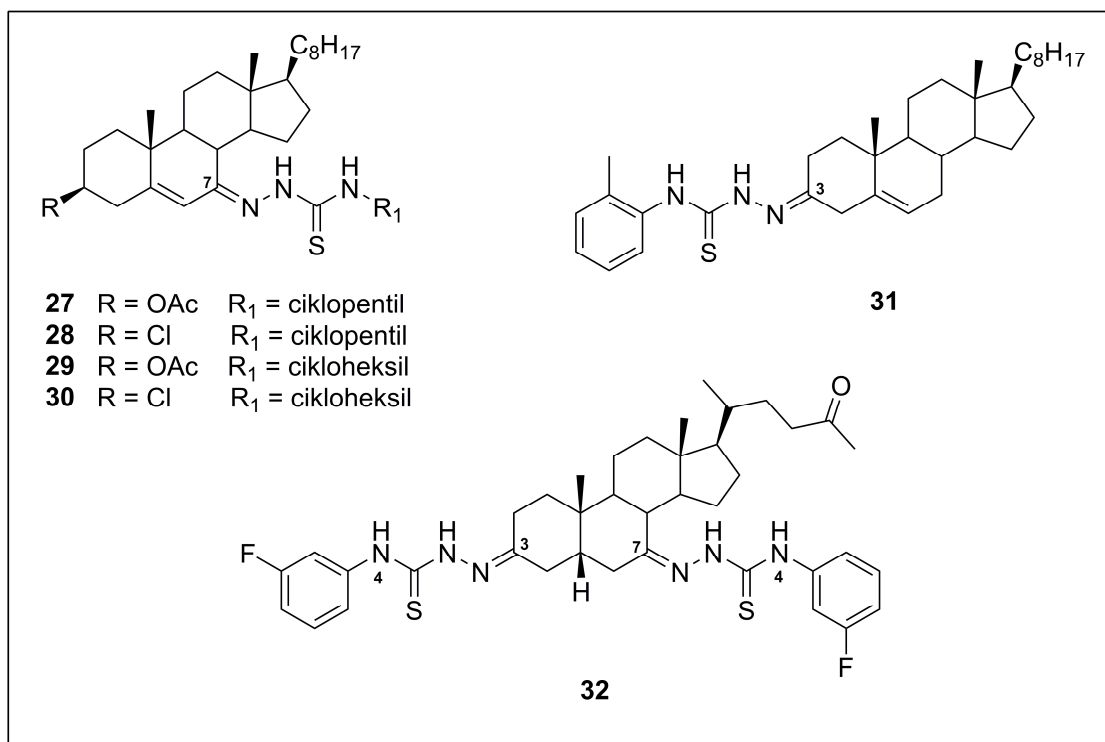
Patogene bakterije imaju značajan uticaj na zdravlje ljudi.^{3,52} Bakterije iz roda *Salmonella*, *Shigella* i *Clostridium* su najčešći uzročnici trovanja hranom koje odnosi milione žrtava godišnje na svetskom nivou.

Patogene bakterije su sposobne da vremenom razviju rezistenciju na postojeće lekove. Moguće rešenje ovog problema jeste razvoj novih antibakterijskih lekova pri čijem dizajniranju je jedan od najvećih izazova smanjenje verovatnoće da patogena bakterija razvije rezistenciju.^{24,29} Neke od meta ove grupe lekova jesu ključni enzimski sistemi bakterija.³

Khan i saradnici sintetisali su 7-tiosemikarbazone⁵² **27–30** i 3-tiosemikarbazon⁵⁵ **31** holestanske serije (**Shema 2.10**) za koje se ispostavilo da ispoljavaju dobro antimikrobno dejstvo kako prema Gram-pozitivnim (*Staphylococcus aureus* i *piogenes*) tako i prema Gram-negativnim (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) patogenim bakterijama.

Zhao i saradnici sintetisali su tiosemikarbazone žučne henodezoksiholne kiseline. Jedinjenje **32** sa tiosemikarbazonskim fragmentom u položajima C-3 i C-7 ispoljilo je antimikrobnu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus* i

Bacillus subtilis, bolju od kontrolnog leka, amoksicilina. Ispostavilo se da je, pored voluminozne grupe prisutne u N-4 položaju tiosemikarbazona za koju je pokazano da pojačava biološku aktivnost derivata, za antibakterijsko dejstvo ovog molekula zaslužan i elektron-privlačan fluoro-supstuent na benzenovom prstenu.³



Shema 2.10. Steroidni tiosemikarbazoni sa antibakterijskom aktivnošću^{3,52,55}

2.4.2. Tiosemikarbazoni i semikarbazoni kao antikancerski agensi

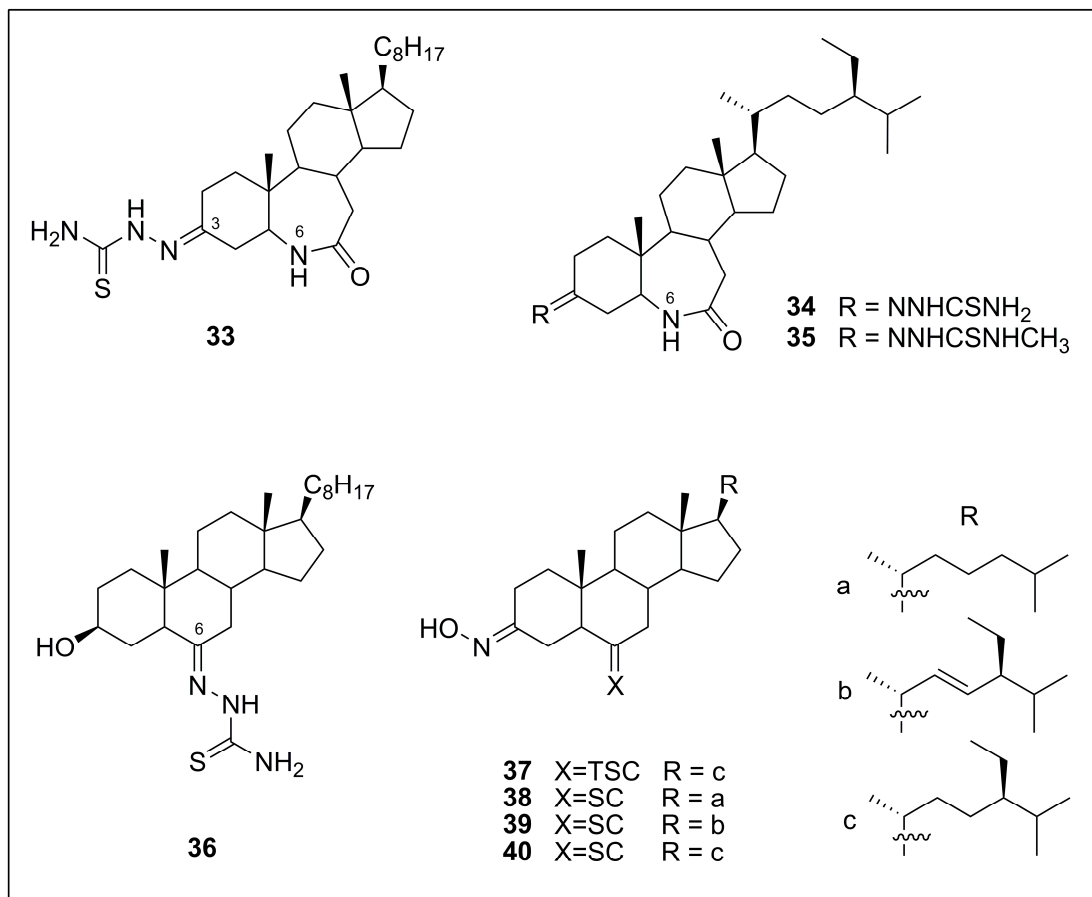
Mnoge istraživačke grupe se intenzivno bave pronalaženjem molekula koji bi mogli da nađu primenu kao antikancerski agensi. Kada su u pitanju steroidni tiosemi- i semikarbazoni, na **Shemi 2.11.** je navedeno nekoliko takvih molekula koji su ispoljili bolju antikancersku aktivnost od hemioterapeutika cisplatina.

6-Aza-7-okso-B-homoholest-3-on-tiosemikarbazon **33** Huang-a i saradnika bio je aktivan prema mnoštvu različitih malignih ćelijskih linija.⁵⁶

Cui i saradnici su, polazeći od sitosterola i stigmasterola, sintetisali B-homosteroidne laktame sa tiosemikarbazonim fragmentom smeštenim u položaj C-3. Derivati sitosterola pokazali su se kao bolji citotoksični agensi od kojih su jedinjenja **34** i **35**

ispoljila su izuzetnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma jetre, Bel-7404 (IC₅₀ 3,9 i 5,6 μM, redom).⁵⁷

Derivati holesterola i stigmasterola, 6-tiosemi/semi-karbazoni **36–40** Gan-a i saradnika takođe su ispoljili jaču citotoksičnu aktivnost prema Bel-7404 ćelijama od cisplatina.⁵⁸



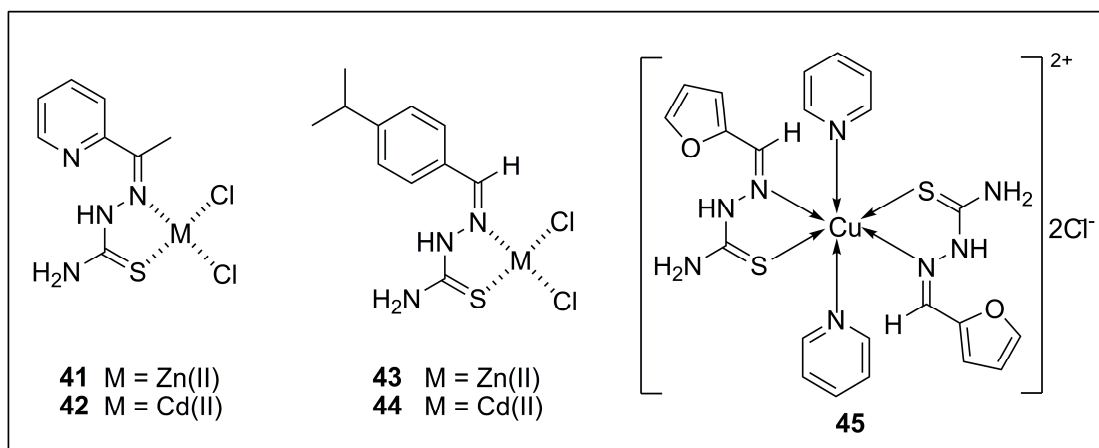
Shema 2.11. Steroidni tiosemikarbazoni sa antikancerskom aktivnošću

2.5. Kompleksna jedinjenja sa tiosemikarbazonima

Do koordinovanja tiosemikarbazona kao helirajućeg liganda za metalni jon može da dođe preko atoma sumpora i jednog od hidrazinskih atoma azota, N-2 ili N-1. Vezivanjem preko N-2 nastaje neuobičajeni četvoročlani helatni prsten, dok koordinacijom preko N-1 nastaje stabilniji petočlani helatni prsten.⁵⁵ Usled koordinovanja nastaju kompleksi koji vrlo često imaju pojačanu biološku aktivnost u odnosu na sam metal i slobodan tiosemikarbazon.^{31,39}

U literaturi se sreću koordinacioni kompleksi tiosemikarbazona sa Pt(II),⁵⁴ Ru(II),³⁰ Pd(II),⁴⁶ Co(II),⁴⁴ Zn(II) i Cd(II),³⁹ Ni(II),^{41,44} Cu(II).^{40-42,44}

Pérez i saradnici sintetisali su komplekse metil-2-piridil-keton-tiosemikarbazona i p-izopropilbenzalhid-tiosemikarbazona sa cinkom(II) i kadmijumom(II) (**Shema 2.12**, jedinjenja **41–44**). Ovi kompleksi ispoljavaju citotoksičnu aktivnost u rangu antikancerskog leka cisplatina. Osim toga, aktivni su na Pam-ras ćelije koje su rezistentne na cisplatin.³⁹

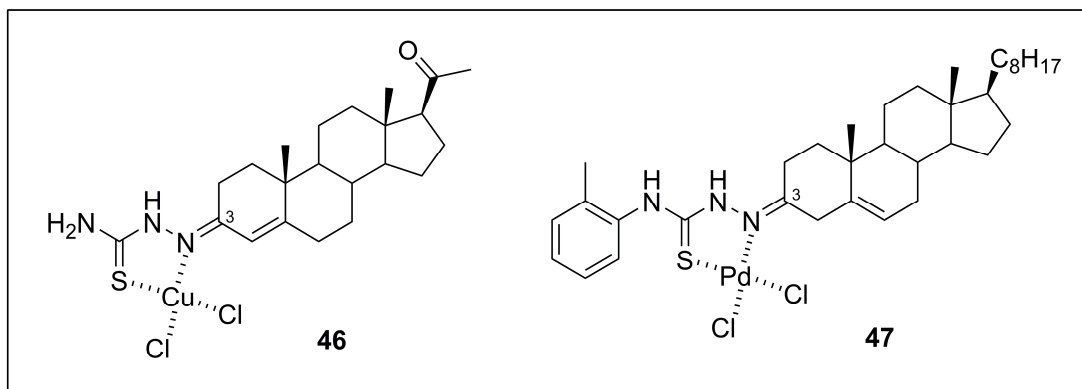


Shema 2.12. Kompleksi sa nesteroidnim tiosemikarbazonomima koji ispoljavaju biološku aktivnost^{39,40}

Kompleksi bakra(II) sa piridinom i heteroaromatičnim tiosemikarbazonomima i semikarbazonomima Reddy-ja i saradnika u koje spada jedinjenje **45** pojačavaju aktivnost nukleaza.⁴⁰

Koristeći cisplatin kao model Adsule i saradnici napravili su kvadratno-planarni kompleks progesteronskog 3-tiosemikarbazona sa bakrom(II) **46**, koji je ispoljio dobru antikancersku aktivnost prema ćelijskoj liniji adenokarcinoma dojke MCF-7 i duktalnog karcinoma dojke T47D (**Shema 2.13**). Ustanovljeno je da je mehanizam antikancerskog delovanja ovog kompleksnog jedinjenja indukcija apoptoze.⁵⁴

Kvadratno-planarni kompleks holestanskog 3-tiosemikarbazona sa Pd(II) **47**, koji su sintetisali Khan i Asiri,⁵⁵ pokazao je jače antibakterijsko dejstvo od amoksicilina.

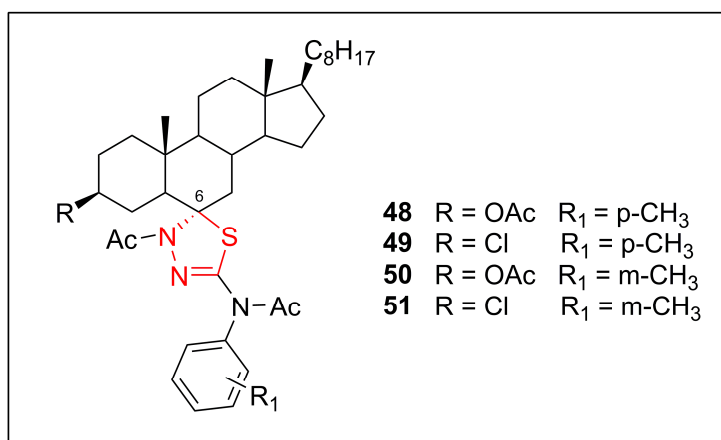


Shema 2.13. Kompleksna jedinjenja steroidnih tiosemikarbazona^{54,55}

2.6. Tijadiazolini

Tijadiazolini su primer heterocikličnih jedinjenja koja nastaju transformacijama tiosemikarbazona. To su petočlani heterocikli koji sadrže sumpor (**Shema 2.14**), tačnije 1,3,4-tijadiazolini, a njihova strukturna podjedinica je sastavni deo prirodnih proizvoda kao što su hormoni, vitamini, antibiotici i alkaloidi. Tijadiazolini nalaze primenu u farmaciji i industriji, a njihova tehnološka primena podrazumeva boje, optički aktivne tečne kristale i fotografske materijale.⁴³ Literaturni podaci ukazuju da ova jedinjenja ispoljavaju mnoštvo različitih bioloških aktivnosti.^{24,43}

Holestanski (6*R*)-spiro-1,3,4-tijadiazolini **48–51** autora Khana-a i Asiri-ja ispoljili su jače antimikrobno dejstvo od amoksicilina prema testiranim Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama.^{24,29}

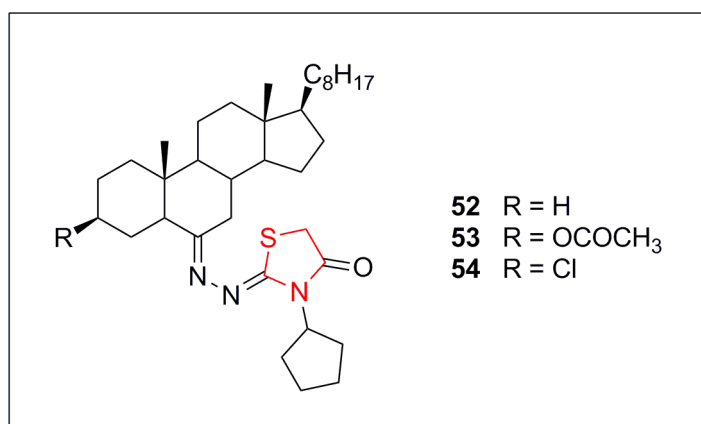


Shema 2.14. Steroidni tijadiazolini sa antibakterijskom aktivnošću^{24,29}

2.7. 1,3-Tiazolidin-4-oni

1,3-Tiazolidin-4-oni, još jedna klasa organskih jedinjenja koja nastaje ciklizacijom tiosemikarbazona, derivati su petočlanog zasićenog tiazolidina koji je u prirodi prisutan u penicilinu.⁵⁹ Vođeni ovom činjenicom istraživači sintetišu tiazolidinone i ispituju njihov biološki profil.

Khan i Yusuf objavili su sintezu steroidnih 1,3-tiazolidin-4-ona **52–54** koji su pokazali bolja antibakterijska svojstva od tiosemikarbazona iz kojih su nastali (**Shema 2.15**). Pritom su jedinjenja **53** i **54** ispoljila bolju antibakterijsku aktivnost od amoksicilina.⁶⁰

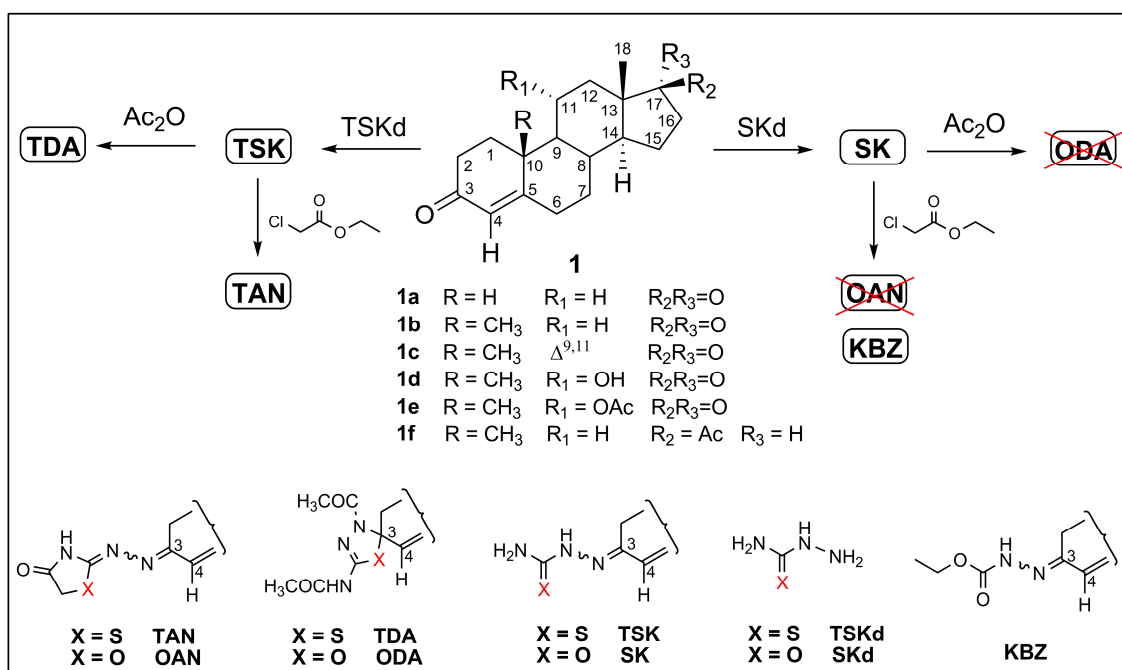


Shema 2.15. Steroidni tiazolidinoni sa antibakterijskom aktivnošću⁶⁰

3. Rezultati i diskusija

3.1. Hemija

Polazeći od 3-okso- α,β -nezasićenih steroidnih derivata, 19-norandrost-4-en-3,17-diona (**1a**), androst-4-en-3,17-diona (**1b**), androsta-4,9(11)-dien-3,17-diona (**1c**), 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-diona (**1d**), 11 α -acetoksiandrost-4-en-3,17-diona (**1e**) i progesterona (**1f**), upotrebom tiosemi/semi-karbazida (TSKd/SKd) kao reagensa, sintetisani su tiosemi/semi-karbazonski derivati (TSK/SK).⁶¹⁻⁶³ Reakcijom tiosemikarbazona sa anhidridom sirćetne kiseline kao ciklizujućim agensom dobijeni su steroidni tijadiazolini (TDA).⁶¹ Nasuprot tome, u slučaju reakcije semikarbazona sa istim reagensom pod istovetnim uslovima nije došlo do formiranja analognih oksadiazolina (ODA). Ciklizacijom tiosemikarbazona sa etil-hloracetatom nastali su tiazolidin-4-oni (TAN)⁶³ dok, suprotno očekivanjima, u reakciji semikarbazona sa etil-hloroacetatom nisu dobijeni oksazolidin-4-oni (OAN) nego karbazatni estri (KBZ)⁶² (Shema 3.1).



Shema 3.1. Prikaz okvira ove disertacije

Karbazatni estri su nastajali i refluktovanjem semikarbazona u etanolu bez prisustva reagensa u trajanju 24–48 h.

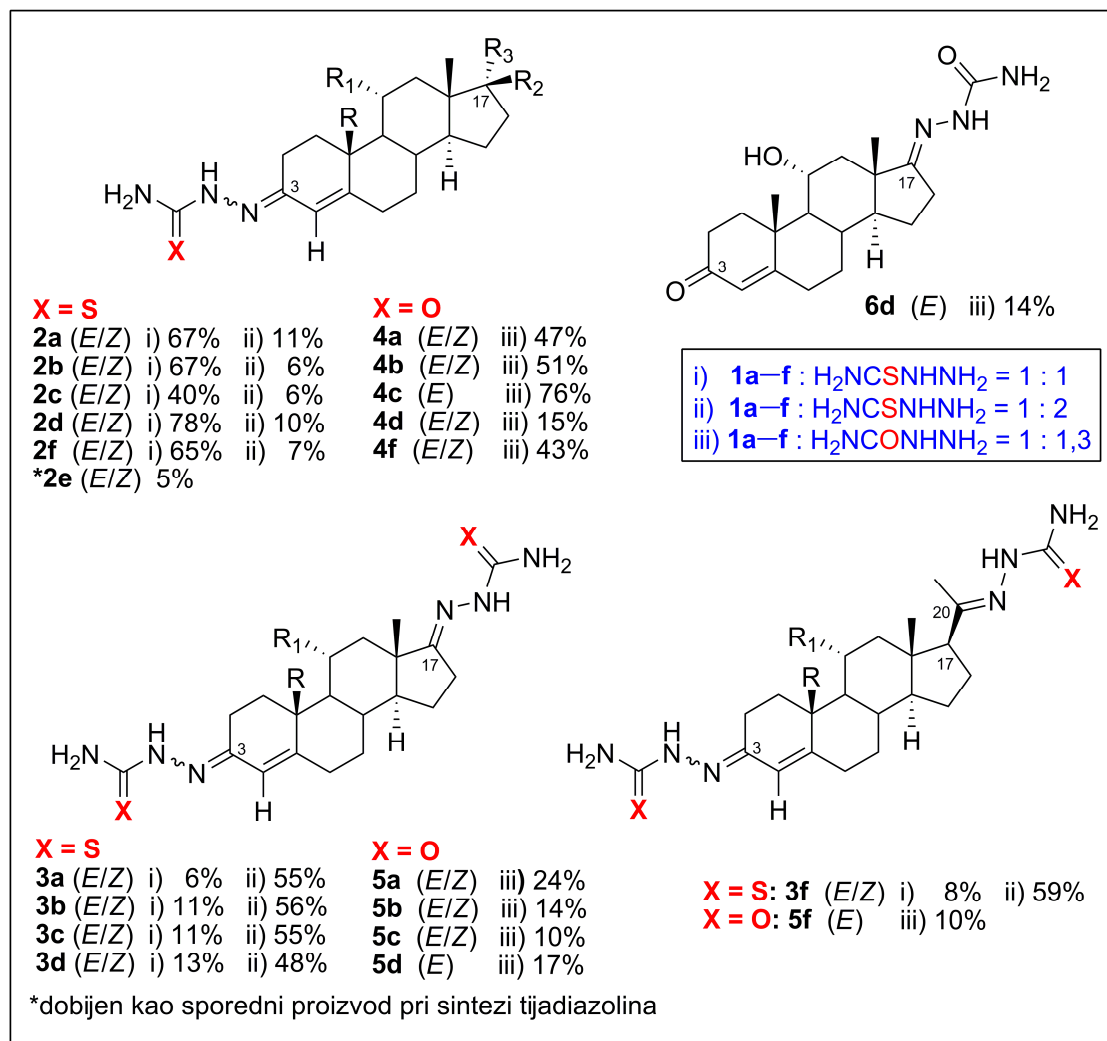
Strukture sintetisanih jedinjenja su određene na osnovu podataka dobijenih elementalnom analizom, masenom spektrometrijom visokog razlaganja i na osnovu detaljne analize IR i NMR spektara prikazanih u **Prilozima**. Radi asignacije ^1H i ^{13}C signala dobijenih derivata steroidnih hidrazona kao i njihovih *E/Z* izomera (tamo gde su isti dobijeni) snimani su 2D NMR spektri (HSQC, HMBC, NOESY i COSY).

3.1.1. Reakcije steroidnih derivata sa tiosemi/semi-karbazidom

3.1.1.1. Dobijanje tiosemikarbazona

Refluktovanjem 3-okso- α,β -nezasićenih steroida **1a–f** i tiosemikarbazida u apsolutnom etanolu u prisustvu CH_3COOH do potpunog utroška polaznih steroida **1a–f** nastali su mono-tiosemikarbazoni **2a–f** i bis(tiosemikarbazoni) **3a–f**.⁶¹ Molski odnos steroida i tiosemikarbazida pri sintezi bis(tiosemikarbazona) (3,17- ili 3,20-) iznosio je 1 : 2, a pri dobijanju 3-mono-tiosemikarbazona **2a–f** korišćene su ekvimolarne količine steroida i reagensa. Iako je poznato da je α,β -nezasićena karbonilna grupa $\text{C}(3)=\text{O}$ polaznih steroidnih molekula **1a–f** reaktivnija od $\text{C}(17)=\text{O}$ androstenskih steroida **1a–e** odnosno od $\text{C}(20)=\text{O}$ progesterona (**1f**), pri sintezi 3-mono-tiosemikarbazona kao prateći proizvodi (prinos 6–13%) nastajali su 3,17/20-bis(tiosemikarbazoni). Isto tako, tokom sinteze bis(tiosemikarbazona) **3a–f** u malom procentu (6–11%) su dobijani mono-tiosemikarbazoni **2a–f** (**Shema 3.2**).

Analizom ^1H i ^{13}C NMR spektara sintetisanih tiosemikarbazona za svako od jedinjenja **2a–f** i **3a–f** je utvrđeno prisustvo dva skupa signala što je ukazalo na postojanje dijastereoizomernog para koji, uprkos činjenici da je (*E*)-izomer uvek dobijan u višku, nije uspešno razdvojen niti kristalizacijom niti hromatografijom na silika-gelu. Iz tog razloga svaki od snimljenih spektara tiosemikarbazona zapravo je spektar *E/Z* smeše dijastereoizomera.



Shema 3.2. Proizvodi reakcije steroida **1a–f** sa tiosemi/semi-karbazidom u apsolutnom etanolu

3.1.1.2. Dobijanje semikarbazona

Novi steroidni mono- (**4a–f** i **6d**) i bis(semikarbazoni) (**5a–f**) su sintetisani jednočasovnim refluktovanjem smeše steroida **1a–f** i semikarbazida u apsolutnom etanolu (**Shema 3.2**).⁶²

Kako su pri sintezi tiosemikarbazona, bez obzira na molski odnos steroidnog derivata i reagensa (i, ii na **Shemi 3.2**), nastajali i mono- i bis-derivati, u slučaju semikarbazona reakcija je izvođena s malim viškom reagensa (iii, **Shema 3.2**) da bi istovremeno bili dobijeni 3-mono-semikarbazoni **4a–f** (prinos 15,1–76%) i 3,17/20-bis(semikarbazoni) **5a–f** (prinos 10,2–24,2%). Pored toga, iz 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-diona (**1d**) je

dobijen i 17-mono-semikarbazon **6d** u prinosu od 13,6%.

Na osnovu analize NMR spektara utvrđeno je da su svi sintetisani semikarbazoni, osim 17-mono-semikarbazona **6d**, dobijeni u vidu diastereoizomerne smeše (*E* i *Z*) sa različitom konfiguracijom hidrazonskog dela strukture u položaju C-3, dok je u položaju C-17/20 bis(semikarbazona) dobijen samo jedan, *E* izomer. Odnos izomera određivan je poređenjem površina signala za H-4 i H–N–N=C(3) u odgovarajućim ¹H NMR spektrima.

3.1.1.3. Određivanje strukture 3-mono-karbazona na primeru molekula **2a** i **4a**

Spektralna analiza je pokazala da je karbazonski fragment mono-tiosemi/semi-karbazona **2a/4a** smešten u položaj C-3, a u bis(tiosemi/semi-karbazonu) **3a/5a** u položaje C-3 i C-17. Postojanje dva izomera, kako kod sintetisanih mono- tako i kod bis-karbazona, pripisano je upravo karbazonskom fragmentu smeštenom u položaj C-3, u kojem su supstituenti na dvostrukoj vezi C(3)=N glavnih izomera zauzimali *E* konfiguraciju.

Molekulska formula jedinjenja **2a/4a**, (C₁₉H₂₇N₃OS/C₁₉H₂₇N₃O₂) i masa (345,1875/329,2103) određene su pomoću HRMS. Molekulska masa mono-karbazona **2a** i **4a** je za 73 odnosno 57 Da veća od mase polaznog steroida, 19-norandrost-4-en-3,17-diona (**1a**, C₁₈H₂₄O₂, 272,1776) čime je dokazano da jedinjenja sadrže tiosemi/semi-karbazonski motiv. Razlika u masi tiosemi- i semikarbazona odgovara razlici atomskih masa sumpora i kiseonika koja iznosi 16 Da.

Tabela 3.1. Karakteristične apsorpcione trake istežućih vibracija mono-tiosemi/semi-karbazona (TSK/SK).

Apsorpciona traka	Talasni broj (cm ⁻¹)	
	TSK 2a	SK 4a
C=S/O ^A	1284	1678
C(3)=N	1586, 1497	1566, 1427
N-H ^A	3246, 3422	3422, 3146

^A strukturni fragment iz karbazona sa steroidnog A-prstena

U IR spektru jedinjenja **2a** i **4a** je izostala apsorpciona traka za karbonil C(3)=O na 1667 cm⁻¹, ali je apsorpciona traka karbonila C(17)=O na oko 1735 cm⁻¹ ostala

neizmenjena. Pored toga, pojavile su se nove apsorpcione trake mono-karbazona navedene u **Tabeli 3.1**.

¹H NMR spektar tiosemikarbazona **2a-E/Z** (**Tabela 3.2**) je pokazao dublet tripleta za H α -2 (δ 2,68/2,40 ppm), singlet za H-4 (δ 5,92/6,19 ppm), široke singlete za H₂N protone (δ 6,36 i 7,24/6,31 i 7,22 ppm) i singlet za H-N (δ 8,71/8,90 ppm).

Tabela 3.2. Karakteristični ¹H NMR signali mono-tiosemikarbazona **2a–f**.

mono-TSK	δ (ppm)					
	CH ₃ -19	H α -2	H β -2	H-4	NH ₂ ^A	NH ^A
^a 2a-E	/	2,68 dt	2,08	5,92	6,36 i 7,24	8,71
^a 2a-Z	/	2,40 dt	2,28	6,19	6,31 i 7,22	8,90
^b 2a-E	/	2,82 dt	1,76–1,92	5,87	7,51 i 8,03	10,07
^b 2a-Z	/	2,31 dt	1,96–2,05	6,70	7,51 i 7,95	10,32
^a 2b-E	1,10	2,63 dt	2,18	5,82	6,41 i 7,25	8,74
^a 2b-Z	1,15	2,42 dt	2,34	6,11	6,35 i 7,17	8,95
^b 2c-E	1,20	2,88 dt	2,20–2,37	5,81	7,54 i 8,07	10,09
^b 2c-Z	1,20	2,47 dt	2,25	6,65	7,53 i 7,98	10,36
^c 2d-E	1,24	n.o.	n.o.	5,85	7,24 i 7,39	9,31
^c 2d-Z	1,29	n.o.	n.o.	6,22	7,24 i 7,35	9,55
^a 2e-E	1,19	2,59 t	1,90–2,02	5,86	6,44 i 7,25	8,70
^a 2e-Z	1,24	2,40 m	2,25–2,31	6,16	6,39 i 7,16	8,93
^a 2f-E	1,09	2,80 dt	2,07	5,81	6,88 i 7,30	9,15
^a 2f-Z	1,13	2,36 dt	2,22	6,15	6,82 i 7,19	9,40

^a Uzorci snimljeni u CDCl₃, ^b uzorci snimljeni u DMSO-*d*₆, ^c uzorci snimljeni u CDCl₃/CD₃OD-*d*₄

^A strukturni fragment iz tiosemikarbazona sa steroidnog A-prstena

n.o.- nije određivano

¹H NMR spektar mono-semikarbazona **4a-E/Z** (**Tabela 3.3**) je pokazao signal za proton H α -2 (*E*)-izomera na značajno višem hemijskom pomeranju (dt, δ 2,68 ppm) u odnosu na ostale protone iz steroidnog A-prstena, singlet za olefinski proton H-4 (δ 5,83/6,52 ppm), širok singlet za H₂N protone (δ 6,20/6,15 ppm) i singlet za amidni NH proton (δ 9,11/9,33 ppm).

Tabela 3.3. Karakteristični ^1H NMR signali sintetisanih mono-semikarbazona **4a–4f** i **6d**.

mono-SK	δ (ppm)					
	$\text{CH}_3\text{-19}$	$\text{H}\alpha\text{-2}$	$\text{H}\beta\text{-2}$	H-4	NH_2^{A}	NH^{A}
^b 4a-E	/	2,68	1,9	5,83	6,20	9,11
^b 4a-Z	/	1,94–2,29	1,94–2,29	6,52	6,15	9,33
^b 4b-E	1,01	2,65	1,92–2,03	5,73	6,19	9,06
^b 4b-Z	1,07	2,29	2,19	6,43	6,12	9,30
^b 4c-E	1,18	2,73	2,06–2,17	5,74	6,24	9,18
ND 4c-Z	/	/	/	/	/	/
^b 4d-E	1,01	2,66	/	5,83	6,20	8,31
^b 4d-Z	1,06	2,40–2,59	/	6,15	6,08	8,09
^b 4f-E	1,21	2,68	1,94–2,05	5,73	6,21	9,01
^b 4f-Z	1,26	2,35	2,23	6,43	6,14	9,32
^a 6d-E	1,25	2,58	1,93	5,61	6,08	8,73

^a Uzorci snimljeni u CDCl_3 , ^b uzorci snimljeni u $\text{DMSO-}d_6$, ND – nije dobijen
^A strukturni fragment iz semikarbazona sa steroidnog A-prstena

Tabela 3.4. Karakteristični ^{13}C NMR signali mono-tiosemikarbazona **2a–f**.

mono-TSK	δ (ppm)						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-19	C=S^A
^a 2a-E	25,8	22,7	150,5	121,4	153,2	/	178,4
^a 2a-Z	25,5	30,1	149,5	111,2	158,6	/	178,3
^b 2a-E	25,3	23,3	150,9	121,6	152,0	/	178,2
^b 2a-Z	25,1	27,1	148,2	113,2	156,2	/	178,0
^a 2b-E	34,5	20,4	150,1	120,5	157,9	17,7	178,3
^a 2b-Z	36,2	27,3	148,9	110,3	163,0	17,0	178,4
^b 2c-E	32,6	21,2	150,0	121,0	154,5	26,2	178,3
^b 2c-Z	34,2	27,5	147,5	112,6	158,7	26,5	178,3
^c 2d-E	34,4	20,5	158,2	120,8	151,4	18,0	177,3
^c 2d-Z	34,2	27,4	162,8	112,2	150,3	18,3	177,2
^a 2e-E	34,9	20,7	156,6	121,7	149,6	18,7	178,6
^a 2e-Z	33,9	27,3	161,2	112,1	147,4	18,9	178,6
^c 2f-E	34,4	20,4	150,8	120,1	158,3	17,6	177,4
^c 2f-Z	34,4	27,4	149,7	110,2	163,5	17,4	177,6

^a Uzorci snimljeni u CDCl_3 , ^b uzorci snimljeni u $\text{DMSO-}d_6$, ^c uzorci snimljeni u $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD-}d_4$, ^A tiokarbonilni C-atom iz tiosemikarbazona sa steroidnog A-prstena

Karakteristični ^{13}C NMR signali jedinjenja **2a-E/Z** (Tabela 3.4) su dobijeni za atome C-1 (δ 25,8/25,5 ppm), C-2 (δ 22,7/30,1 ppm), C-3 (δ 150,5/149,5 ppm), C-4 (δ 121,4/111,2 ppm), C-5 (δ 153,2/158,4 ppm) kao i za tiokarbonil $\text{C}=\text{S}^{\text{A}}$ (δ 178,4/178,3

ppm).

U ^{13}C spektru semikarbazona **4a-E/Z** (Tabela 3.5) izgubljen je signal za karbonilni $\text{C}(3)=\text{O}$ (δ 199,3 ppm), a zabeleženo je prisustvo novog, semikarbazonskog karbonila $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$ (δ 157,3 ppm za oba izomera). Za atome ugljenika koji izgrađuju A-prsten steroida pojavili su se karakteristični udvojeni ^{13}C NMR signali jedinjenja **4a-E/Z**: C-1 (δ 25,8/27,3 ppm), C-2 (δ 22,6/30,0 ppm), C-3 (δ 147,2/144,5 ppm), C-4 (δ 121,9/112,9 ppm) i C-5 (δ 148,5/153,7 ppm).

Tabela 3.5. Karakteristični ^{13}C NMR signali sintetisanih mono-semikarbazona.

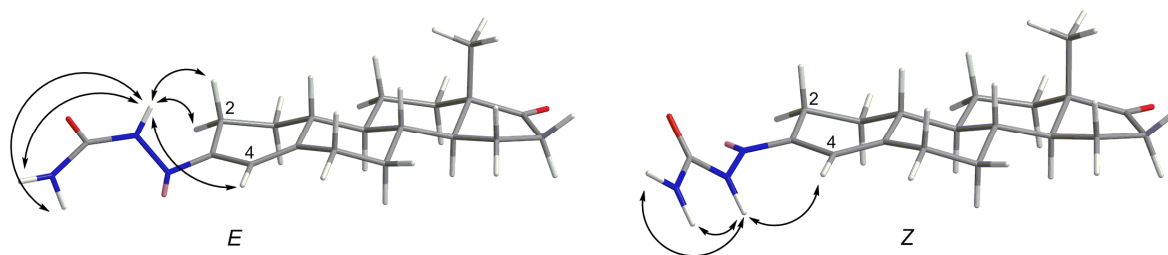
mono-SK	δ (ppm)						
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-19	$\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$
^b 4a-E	25,8	22,6	147,2	121,9	148,5	/	157,3
^b 4a-Z	27,3	30,0	144,5	112,9	153,7	/	157,3
^b 4b-E	34,5	20,3	146,8	121,2	152,8	17,5	157,2
^b 4b-Z	36,1	27,3	143,9	112,0	157,8	17,8	157,2
^b 4c-E	33,1	20,8	146,6	121,3	151,1	26,3	157,2
ND 4c-Z	/	/	/	/	/	/	/
^b 4d-E	34,5	20,6	148,8	121,7	155,0	18,5	157,9
^b 4d-Z	34,5	27,7	148,8	111,8	155,0	18,5	157,9
^b 4f-E	34,5	20,4	146,8	121,1	153,0	17,5	157,2
^b 4f-Z	36,2	27,4	144,2	111,9	158,1	17,8	157,2
^a 6d-E	33,9	36,9	198,6	123,6	171,5	18,0	/

^a Uzorci snimljeni u CDCl_3 , ^b uzorci snimljeni u $\text{DMSO}-d_6$, ND – nije dobijen

^A karbonilni C-atom iz semikarbazona sa steroidnog A-prstena

Hemijska pomeranja atoma u ^1H i ^{13}C spektrima ostalih sintetisanih 3-mono-tiosemi/semi-karbazona bila su vrlo slična hemijskim pomeranjima navedenim za iste atome jedinjenja **2a** i **4a**.

E/Z konfiguracija dvostruke veze $\text{C}(3)=\text{N}$ tiosemi- i semikarbazona određena je na osnovu prisustva/odsustva NOESY korelacija amidnog NH protona sa $\text{H}\alpha,\beta$ -2. *E*-konfiguracija jedinjenja **4a** je utvrđena na osnovu NOESY korelacije amidnog NH protona (δ 9,11 ppm) sa $\text{H}\alpha/\beta$ -2 (δ 2,68/1,90 ppm) i, iako slabe, korelacije istog protona sa H-4 na δ 5,83 ppm i H_2N na δ 6,20 ppm, dok je *Z*-konfiguracija utvrđena na osnovu korelacija N-H/H-4 (δ 9,33/6,52 ppm) i NH/ H_2N (δ 9,33/6,15 ppm) kao i na osnovu odsustva korelacija NH sa $\text{H}\alpha/\beta$ -2 (Slika 3.1).



Slika 3.1. 3D prikaz postojecih konfiguracija C(3)=N veze mono-semikarbazona **4a** sa ključnim NOESY (↔) korelacijama.

Ovo razmatranje može da se primeni na sve nastale mono-karbazonske derivate.

3.1.1.4. Određivanje strukture bis(karbazona) na primeru jedinjenja **3a** i **5a**

Molekulska formula ($C_{20}H_{30}N_6S_2/C_{20}H_{30}N_6O_2$) i molekulska masa (418,1973/386,2430) 3,17-bis-karbazona **3a** i **5a** su određene pomoću HRMS. Molekulske mase bis-karbazona su bile za 73/57 Da veće od molekularskih masa odgovarajućih mono-karbazona **2a** i **4a**, odnosno za 146/114 Da veće od mase polaznog steroida **1a**, što je dokaz da bis-karbazoni **3a** i **5a** sadrže jedan tiosemi/semi-karbazonski fragment više u odnosu na mono-tiosemi/semi-karbazone **2a** i **4a**.

U IR spektru su izostale apsorpcione trake za karbonile C(3)=O i C(17)=O na 1670 i 1730 cm^{-1} . Umesto njih su se pojavile apsorpcione trake prikazane u **Tabeli 3.6**.

Tabela 3.6. Karakteristične apsorpcione trake bis(tiosemi/semi-karbazona).

Apsorpciona traka	Talasni broj (cm^{-1})	
	bis(TSK) 3a	bis(SK) 5a
C=S/O ^{A,D}	1282	1688
C(3/17)=N	1583, 1496	1572, 1467, 1420
N-H ^{A,D}	3421, 3240	3461, 3199

^{A, D} strukturni fragment iz karbazona sa steroidnog A- odnosno D-prstena

U 1H NMR spektru bis(tiosemikarbazona) **3a-E/Z** (**Tabela 3.7**) se pojavio dublet za H α -2 (δ 2,67/2,40 ppm), singlet za H-4 (δ 5,91/6,22 ppm), široki singleti za H $_2$ N^A protone iz hidrazonskog dela molekula sa steroidnog A-prstena (δ 6,50 i 7,26/6,45 i 7,23 ppm), široki singleti za H $_2$ N^D iz tiosemikarbazonskog motiva sa steroidnog D-prstena (δ 6,53 i 7,18 ppm za oba izomera), singlet za NH proton sa A-prstena (δ 8,83/9,05 ppm) i singlet za NH proton tiosemikarbazona sa D-prstena (δ 8,49 ppm za oba

izomera).

Tabela 3.7. Karakteristični ^1H NMR signali bis(tiosemikarbazona) (bis(TSK)) **3a–f**.

bis(TSK)	δ (ppm)								
	H α -2	H-4	H α -16	H β -16	CH ₃ -18	NH ^A	NH ^D	NH ₂ ^A	NH ₂ ^D
^a 3a-E	2,67	5,91	2,17–2,34	2,41–2,54	0,94	8,83	8,49	6,50 i 7,26	6,53 i 7,18
^a 3a-Z	2,40	6,22	2,17–2,34	2,41–2,54	0,94	9,05	8,49	6,45 i 7,23	6,53 i 7,18
^b 3b-E	/	5,76	/	/	/	10,03	9,81	7,53 i 8,02	7,35 i 7,98
^b 3b-Z	/	6,61	/	/	/	10,34	9,81	7,50 i 7,93	7,35 i 7,98
^b 3c-E	2,88	5,80	/	/	0,82	10,09	9,89	7,42 i 8,07	7,57 i 8,07
^b 3c-Z	/	6,64	/	/	0,82	10,38	9,89	7,42 i 8,07	7,57 i 8,00
^c 3d-E	/	5,84	/	/	0,96	9,28	8,89	7,19 i 7,38	7,19 i 7,38
^c 3d-Z	/	6,20	/	/	0,96	9,51	9,89	7,19 i 7,38	7,19 i 7,38
^b 3f-E	2,80	5,75	1,56	2,24–2,34	0,55	10,04	9,79	7,52 i 8,04	7,38 i 8,07
^b 3f-Z	2,09	6,61	1,52	2,24–2,37	0,55	10,33	9,79	7,50 i 7,94	7,38 i 8,07

^a Uzorci snimljeni u CDCl_3 , ^b uzorci snimljeni u $\text{DMSO}-d_6$, ^c uzorci snimljeni u $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$
ND – nije dobijen, ^{A,D} tiosemikarbazoni fragmenti sa steroidnog A odnosno D-prstena

Tabela 3.8. Karakteristični ^1H NMR signali bis(semikarbazona) (bis(SK)) **5a–f**.

bis(SK)	δ (ppm)								
	H α -2	H-4	H α -16	H β -16	CH ₃ -18	NH ₂ ^A	NH ₂ ^D	NH ^A	NH ^D
^b 5a-E	2,69 dt	5,83 s	2,11–2,19	2,33–2,42	0,85 s	6,14 šs	6,09 šs	9,06 s	8,71 s
^b 5a-Z	2,29 dt	6,51 s	2,11–2,19	2,33–2,42	0,85 s	6,20 šs	6,09 šs	9,29 s	8,71 s
^c 5b-E	2,60 dt	5,83 s	2,22 dd	2,42 dd	0,94 s	/	/	/	/
^c 5b-Z	2,43 m	6,15 s	2,22 dd	2,42 dd	0,94 s	/	/	/	/
^b 5c-E	2,74 dt	5,75 s	2,18 dd	2,44 dd	0,79 s	6,24 šs	6,14 s	9,15 s	8,81 s
^b 5c-Z	2,38 m	6,45 s	2,18 dd	2,44 dd	0,79 s	6,18 šs	6,14 s	9,35 s	8,81 s
^c 5d-E	/	5,65 s	/	/	0,76 s	/	/	8,39 s	8,10 s
ND 5d-Z	/	/	/	/	/	/	/	/	/
^b 5f-E	2,67 dt	5,72 s	1,50–1,58	2,19–2,25	0,55 s	6,14 šs	6,20 s	9,06 s	8,78 s

^b uzorci snimljeni u $\text{DMSO}-d_6$, ^c uzorci snimljeni u $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$
ND – nije dobijen, ^{A,D} semikarbazoni fragmenti sa steroidnog A- odnosno D-prstena

^1H NMR spektar bis(semikarbazona) **5a** (Tabela 3.8) sadrži dublet tripleta za H α -2 (δ 2,69/2,29 ppm) singlet za olefinski proton H-4 (δ 5,83/6,51 ppm), širok singlet za H₂N protone iz semikarbazonoskog motiva sa steroidnog A-prstena (δ 6,14/6,20 ppm), singlet za H–N proton iz semikarbazonoskog motiva smeštenog na C-3 (δ 9,06/9,29 ppm), širok singlet za H₂N iz semikarbazonoskog motiva sa steroidnog D-prstena (δ 6,09 ppm za oba izomera), kao i singlet za H–N proton istog semikarbazonoskog motiva (δ 8,71 ppm za oba izomera).

¹³C NMR spektar bis(tiosemikarbazona) **3a** je potvrdio prisustvo 20 signala za ugljenikove atome podjeljenih na dva skupa signala (**Tabela 3.9**). Glavna razlika u spektralnim podacima bis(tiosemikarbazona) **3a** u odnosu na spektar monotiosemikarbazona **2a** (**Tabela 3.4**) je bila izostanak signala za karbonil C(17)=O (δ 222,4 ppm). Ovaj signal zamenjen je signalom za C(17)=N (δ 167,0 ppm). Novi signal na δ 178,7 ppm za oba izomera je odgovarao još jednom tiokarbonilu, C=S^D. Ostali karakteristični signali jedinjenja **3a-E/Z** su pripisani atomima C-1 (δ 25,8/25,7 ppm), C-2 (δ 22,8 ppm za oba izomera), C-3 (δ 150,7/149,7 ppm), C-4 (δ 121,3/111,4 ppm), C-5 (δ 153,1/158,4 ppm) i C-16 (δ 26,2 ppm za oba izomera).

Tabela 3.9. Karakteristični ¹³C NMR signali bis(tiosemikarbazona) bis(TSK) **3a-f**.

bis(TSK)	δ (ppm)									
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-16	C-19	C-17/20	C=S ^A	C=S ^D
^a 3a-E	25,8	22,8	150,7	121,3	153,1	26,2	/	167,0	178,3	178,7
^a 3a-Z	25,7	22,8	149,7	111,4	158,4	26,2	/	167,0	178,2	178,7
^b 3b-E	34,4	20,5	150,6	120,8	156,5	26,8	17,4	167,3	178,2	178,4
^b 3b-Z	36,1	20,2	148,0	112,2	160,6	26,8	17,7	167,3	178,3	178,4
^b 3c-E	32,8	21,5	150,5	121,2	155,1	27,5	26,4	167,3	178,5	178,6
^b 3c-Z	34,4	22,5	147,9	113,0	159,1	27,5	26,5	167,3	178,3	178,6
^c 3d-E	34,4	20,6	158,1	120,9	151,5	25,9	18,1	166,5	177,3	177,8
^c 3d-Z	34,2	21,4	162,9	111,2	150,3	25,9	18,4	166,5	177,3	177,8
^b 3f-E	34,5	20,9	150,4	120,7	156,4	22,7	17,4	153,9 s	178,3	178,5
^b 3f-Z	36,0	20,8	147,8	112,1	160,7	22,7	17,6	154,9 s	178,0	178,5

^a Uzorci snimljeni u CDCl₃, ^b uzorci snimljeni u DMSO-*d*₆, ^c uzorci snimljeni u CDCl₃/CD₃OD-*d*₄
^{A, D} tiosemikarbazoni fragment sa A- odnosno D-prstena

U ¹³C NMR spektru bis(semikarbazona) **5a-E/Z** (**Tabela 3.10**) umesto signala za karbonil C(3)=O (δ 199,3 ppm) polaznog steroida **1a** pojavio se signal za C(3)=N (δ 147,3/144,6 ppm), a umesto signala za C(17)=O (δ 220,1 ppm) pojavio se signal za C(17)=N (δ 163,0/162,9 ppm). Pored signala za semikarbazoni karbonil na steroidnom A-prstenu, C=O^A (δ 157,3/157,2 ppm), pojavio se i novi signal za C=O^D (δ 157,4 ppm za oba izomera). Preostali karakteristični signali ovog bis(semikarbazona) dobijeni su za C-1 (δ 25,9/27,3 ppm), C-2 (δ 22,6/30,1 ppm), C-4 (δ 121,8/112,8 ppm), C-5 (δ 148,7/153,9 ppm) i C-16 (δ 163,0/162,9 ppm).

Postojanje dva izomera na dvostrukoj C(3)=N vezi (*E* i *Z*) i samo jednog (*E*) na C(17)=N vezi kod bis(semikarbazona) **5a** utvrđeno je na osnovu NOESY i HMBC

korelacija amidnih protona (Slika 3.2).⁶²

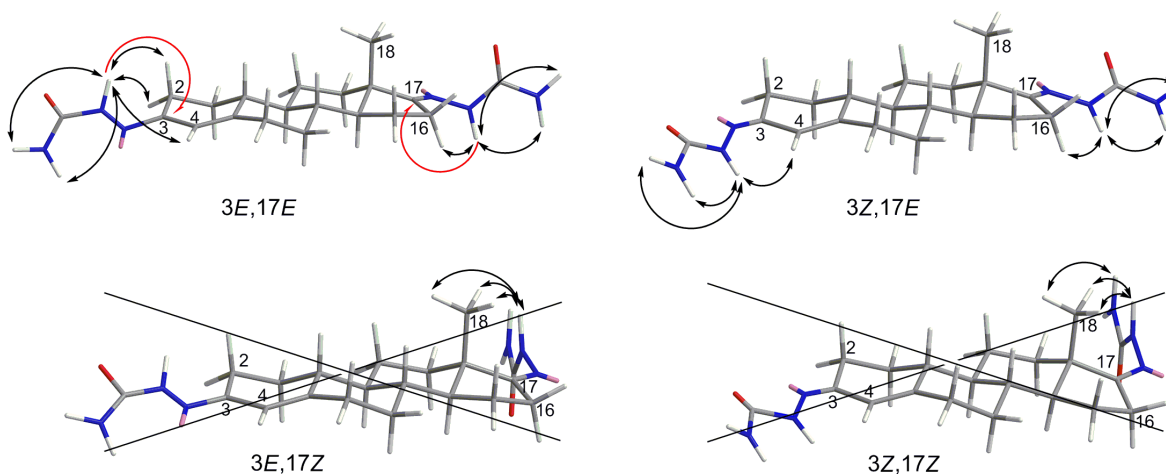
Tabela 3.10. Karakteristični ¹³C NMR signali sintetisanih bis(semikarbazona) **5a–f**.

bis(SK)	δ (ppm)									
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-16	C-19	C-17/20	C=O ^A	C=O ^D
^b 5a-E	25,9	22,6	147,3	121,8	148,7	26,2	/	163,0	157,3	157,4
^b 5a-Z	27,3	30,1	144,6	112,8	153,9	26,2	/	162,9	157,2	157,4
^c 5b-E	34,3	19,8	149,1	120,3	154,9	25,2	17,0	165,0	158,5	158,3
^c 5b-Z	36,0	27,2	147,5	110,2	160,6	25,2	17,5	164,8	162,2	158,3
^b 5c-E	32,6	20,8	146,6	121,3	151,4	26,6	26,2	162,6	157,3	157,4
^b 5c-Z	34,4	27,6	144,2	112,3	156,4	26,6	26,6	162,6	157,3	157,4
^c 5d-E	34,4	20,3	149,6	121,1	155,7	25,6	18,1	163,9	158,5	158,6
ND 5d-Z	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
^b 5f-E	34,5	20,4	146,8	120,9	153,0	22,7	17,5	148,8	157,1	157,4

^b uzorci snimljeni u DMSO-*d*₆, ^c uzorci snimljeni u CDCl₃/CD₃OD-*d*₄

^{A,D} semikarbazoni fragment sa A odnosno D-prstena; ND – nije dobijen

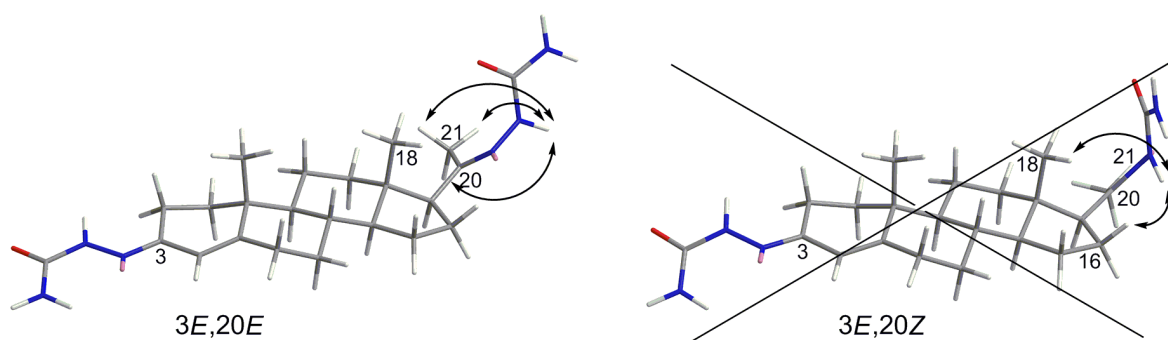
Kao i u slučaju mono-karbazonских derivata, konfiguracija dvostruke C(3)=N veze je utvrđena na osnovu NOESY korelacija amidnog H–N protona sa H_{α,β}-2 dok je *E* geometrija na C(17)=N utvrđena na osnovu NOESY korelacije NH/H_α-16 (δ 8,71/2,14 ppm), kao i na osnovu nepostojanja korelacije NH/CH₃-18. Detaljnim ispitivanjem Dreiding-ovih modela je zaključeno da dolazi do značajnog sternog odbijanja između metil-grupe CH₃-18 i hidrazonskog motiva u položaju C-17 što onemogućava nastanak 17*Z*-izomera.



Slika 3.2. 3D prikaz mogućih i postojećih konfiguracija C(3)=N i C(17)=N veza bis(semikarbazona) **5a** sa ključnim HMBC (H/C) i NOESY () korelacijama.

Dato tumačenje važi za sve ostale sintetisane 3,17-bis(karbazonske) derivate (**3a–d** i **5b–e**).

U slučaju progesteronskih bis-derivata **3f** i **5f** treba imati u vidu s jedne strane mogućnost rotacije oko ose C(17)–C(20), a sa druge prisustvo metil-grupe na C-20. Na osnovu moguće rotacije oko pomenute ose vrlo je verovatan nastanak oba izomera na dvostrukoj C(20)=N vezi. Međutim, usled jakog sternog zaklanjanja metil-grupe C-21 nastanak (*Z*)-izomera na C(20)=N je nemoguć (**Slika 3.3**).



Slika 3.3. 3D prikaz apsolutne konfiguracije na dvostrukoj vezi C(20)=N u progesteronskom bis(semikarbazonu) **5f** s ključnim NOESY korelacijama.

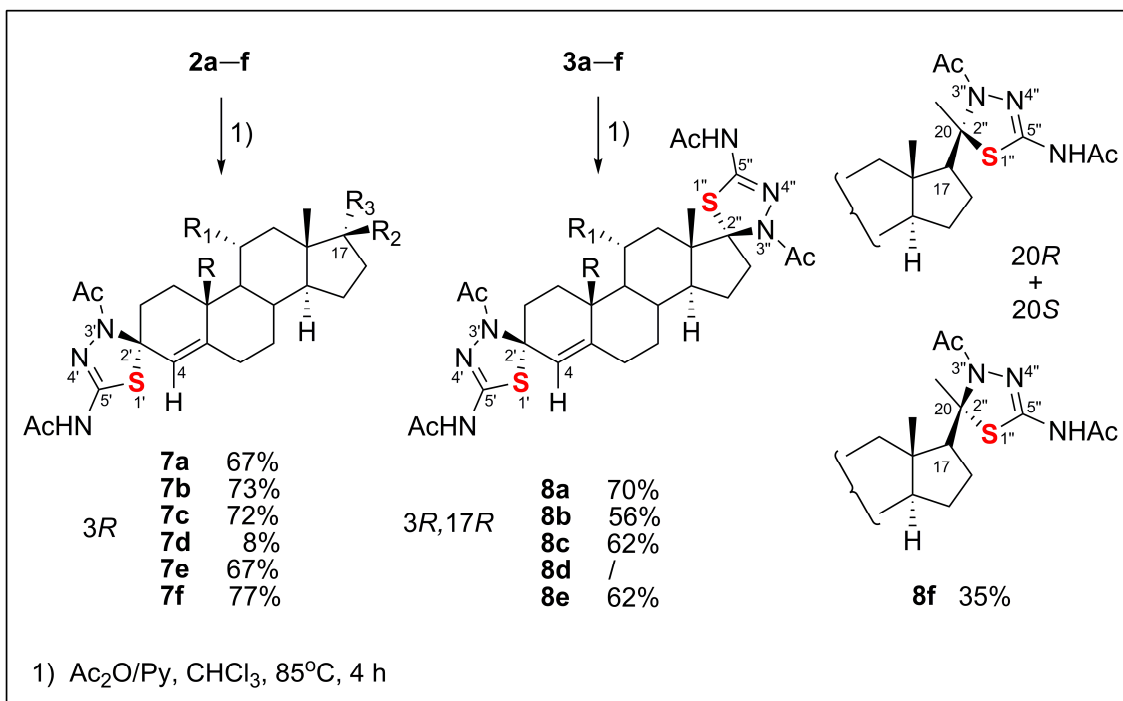
E-Konfiguracija dvostruke veze C(20)=N progesteronskog 3,20-bis(semikarbazona) **5f** je utvrđena i na osnovu NOESY korelacije amidnog H–N protona i protona iz metil-grupe CH₃-21 (δ 8,78/1,76 ppm) kao i na osnovu odsustva korelacija istog protona sa protonima iz metil-grupe CH₃-18 ili sa H α,β -16 (**Slika 3.3**). I na kraju, pažljivim ispitivanjem Dreiding-ovih modela jedinjenja **5f** je dokazano da su pomenute NOESY korelacije, uprkos mogućoj rotaciji oko C(17)–C(20) ose, moguće isključivo kada je geometrija C(20)=N dvostruke veze *E*.

Isto tumačenje može da se primeni na progesteronski 3,20-bis(tiosemikarbazon) **3f**.

Hemijska pomeranja atoma vodonika i ugljenika u ¹H i ¹³C NMR spektrima ostalih bis(karbazona) su vrlo slična hemijskim pomeranjima istih atoma navedenim za bis(tiosemikarbazon) **3a** i bis(semikarbazon) **5a**.

3.1.2. Reakcije tiosemi/semi-karbazona sa anhidridom sirćetne kiseline

3.1.2.1. Dobijanje 1,3,4-tijadiazolina



Shema 3.3. Proizvodi reakcije tiosemikarbazona (**2a–f**, **3a–f**) sa anhidridom sirćetne kiseline

Dobijeni tiosemikarbazoni **2a–f** i **3a–f** su podvrgnuti zatvaranju prstena pomoću anhidrida sirćetne kiseline kao acetilujućeg agensa^{23,29,64} u prisustvu piridina pri čemu su nastali odgovarajući 1,3,4-tijadiazolini **7a–f** i **8a–f** u dobrim prinosima (56–73%) (**Shema 3.3**).⁶¹

Pretpostavka o mehanizmu heterociklizacije steroidnih 1,3,4-tijadiazolina je opisana u literaturi.^{29,64,65} Smatra se da do zatvaranja tijadiazolinskog prstena dolazi napadom tiokarbonilnog atoma sumpora (koji je bolji nukleofil) na steroidni sp² hibridizovan C-3/17/20 atom ugljenika preferencijalno sa aksijalne strane što omogućava voluminoznoj NHAc grupi da zauzme ekvatorijalni položaj i da se minimizuju sterne smetnje.⁶⁵ Dakle, više je verovatan nastanak 3*R* mono-tijadiazolina odnosno 3*R*,17*R* bis(tijadiazolina) u odnosu na ostale moguće izomere.

Potpuna asignacija ¹H i ¹³C NMR signala za atome tijadiazolina **7a** i **8a** urađena je

kombinovanom upotrebom 2D NMR metoda, HSQC, HMBC, COSY i NOESY (ROESY) (Prilozi).

3.1.2.2. Određivanje strukture mono-1,3,4-tijadiazolina na primeru 7a

Tretmanom *E/Z* smeše mono-tiosemikarbazona **2a** anhidridom sirćetne kiseline kao acetilujućim agensom u baznoj sredini dobijeno je spiro-heterociklično jedinjenje, mono-tijadiazolin **7a**, sa *R* apsolutnom konfiguracijom atoma C-3.

Molekulska formula (C₂₃H₃₁N₃O₃S) i molekulska masa (429,2086) jedinjenja **7a** su određene pomoću HRMS. Masa nastalog mono-tijadiazolina **7a** je za 84 Da veća od mase mono-tiosemikarbazona **2a** (345,1875).

U IR spektru su se pojavile nove apsorpcione trake na 1618 $\nu(\text{C}=\text{N})$ i 756 $\nu(\text{C}-\text{S})$ cm⁻¹.

U ¹H NMR spektru mono-tijadiazolina **7a** (Tabela 3.11) su izostali signali za NH₂ protone mono-tiosemikarbazona **2a-E/Z** (δ 6,36 i 7,24/6,31 i 7,22 ppm). Pojavili su se singleti za protone N-acetil-grupa, ^{C-5'}CH₃ (δ 2,11 ppm) i ^{N-3'}CH₃ (δ 2,19 ppm). Signal alkenilnog H-4 protona se pojavio na nižem hemijskom pomeranju (δ 5,67 ppm) u odnosu na signal istog protona u spektru tiosemikarbazona **2a-E/Z** (δ 5,92/6,19 ppm) što je dokaz nestanka tiosemikarbazonoskog konjugovanog imina.

Tabela 3.11. Karakteristični ¹H NMR signali sintetisanih mono-tijadiazolina (mono-TDA) **7a-f**.

mono-TDA	δ (ppm)						
	H α -2	H β -2	H-4	CH ₃ -19	^{C-5'} CH ₃	^{N-3'} CH ₃	^{C-5'} NH
^c 7a	2,59 td	2,04–2,16	5,67 s	/	2,11 s	2,19 s	10,57 s
^c 7b	2,80 td	2,03 šd	5,54 s	1,12 s	2,11 s	2,19 s	10,50 s
^a 7c	2,90 t	n.o.	5,56 s	1,25 s	2,15 s	2,21 s	9,65 s
^c 7d	2,84 td	1,97 m	5,57 s	1,26 s	2,10 s	2,20 s	/
^a 7e	2,78 td	1,93–1,99	5,64 s	1,17 s	2,16 s	2,21 s	9,83 s
^c 7f	2,62 td	n.o.	5,32 s	0,90 s	1,95 s	2,00 s	/

^a uzorci snimljeni u CDCl₃, ^c uzorci snimljeni u CDCl₃/CD₃OD-*d*₄, n.o. – nije određeno

Došlo je do pomeranja ¹³C NMR signala tiokarbonilnog C-atoma C=S^A tiosemikarbazona **2a-E/Z** sa δ 178,4/178,3 ppm na δ 144,5 ppm, kao i do pomeranja signala za sp² hibridizovan C-3 atom tiosemikarbazona (δ 150,5/149,5 ppm) na niže hemijsko pomeranje (δ 79,9 ppm) za sp³ hibridizovan C-3 atom mono-tijadiazolina **7a**

(Tabela 3.12).

Tabela 3.12. Karakteristični ^{13}C NMR signali sintetisanih mono-tijadiazolina **7a–f**.

TDA	δ (ppm)										
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-19	C-5'	N-3' C=O	N-3' CH ₃	C-5' C=O	C-5' CH ₃
^c 7a	25,1	33,4	79,9	121,6	141,1	/	144,5	169,2	23,3	169,6	22,4
^c 7b	35,1	30,8	80,1	120,6	144,4	17,4	145,4	169,2	23,2	169,5	22,5
^a 7c	33,2	31,5	80,3	120,9	144,0	26,4	144,8	169,2	23,7	168,9	23,1
^c 7d	36,6	30,8	79,8	121,5	145,2	17,7	144,6	169,1	22,2	169,1	23,1
^a 7e	35,7	31,0	79,5	122,5	144,1	18,4	144,6	169,2	23,6	169,2	23,0
^c 7f	34,9	30,7	79,9	120,0	144,4	17,1	145,6	169,2	23,0	169,7	22,3

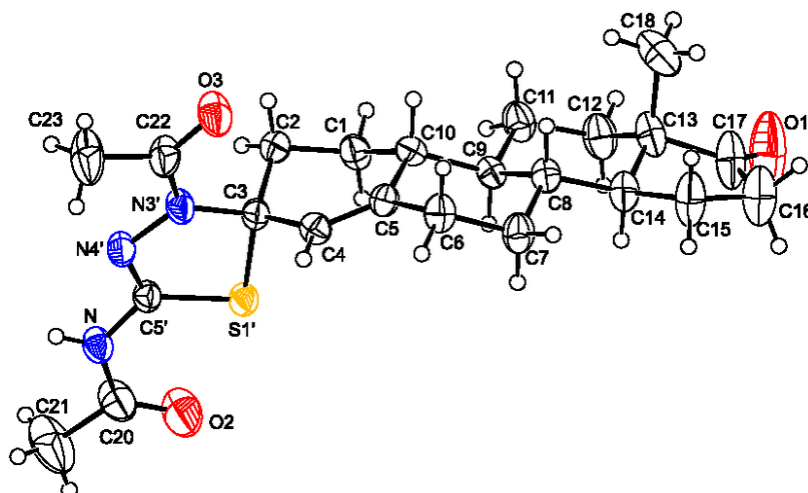
^a uzorci snimljeni u CDCl_3 , ^c uzorci snimljeni u $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, n.o. – nije određeno

Hemijska pomeranja signala za atome ostalih mono-tijadiazolina u ^1H i ^{13}C NMR spektrima vrlo su bliska hemijskim pomeranjima signala navedenim za jedinjenje **7a** (Tabele 3.11 i 3.12).

Struktura novih mono-tijadiazolina i *R* apsolutna konfiguracija atoma C-3 su utvrđene rendgenskom strukturnom analizom jedinjenja **7a**.

3.1.2.3. Molekulska i kristalna struktura 1,3,4-tijadiazolina **7a**

Molekulska struktura jedinjenja **7a** zajedno sa relevantnim strukturnim podacima prikazana je na Slici 3.4. Jedinjenje kristališe u necentrosimetričnoj prostornoj grupi *I4*, a njegova apsolutna konfiguracija nedvosmisleno odgovara poznatoj konfiguraciji steroidnih atoma. Steroidno jezgro ima uobičajenu strukturu sa B i C prstenovima u konformaciji stolice, dok je petočlani prsten D u konformaciji koverta u položaju C-14. Posledica prisustva C4–C5 dvostruke veze (1,321 (5) Å) u prstenu A je zauzimanje konformacije polustolice (torzioni ugao C3–C4–C5–C10 = $-1,5$ (5)°). Tijadiazolinski prsten vezan je za steroidno jezgro u položaju C-3 gradeći na taj način spiro-sistem. Rendgenska strukturna analiza potvrdila je *R* konfiguraciju novonastalog stereocentra C-3, sa S1' u aksijalnom i N3' u ekvatorijalnom položaju u odnosu na prsten A.

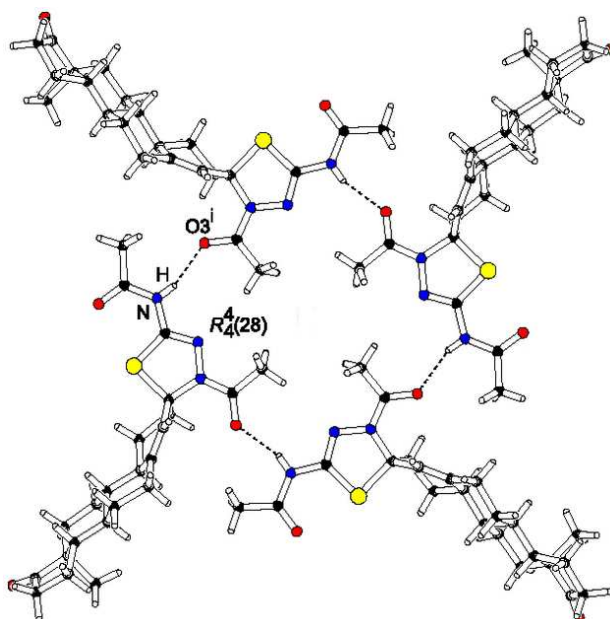


Slika 3.4. Molekulska struktura jedinjenja **7a** sa numeracijom atoma.

Termalni elipsoidi su predstavljeni sa 30% verovatnoće. Atomi vodonika su prikazani kao sfere proizvoljnog radijusa. Dužine veza (Å): S1'–C5' = 1,739 (3), S1'–C3 = 1,852 (3), N4'–N3' = 1,397 (3), N3'–C3 = 1,487 (4), N4'–C5' = 1,282 (4), C4–C5 = 1,321 (5), N–C5' = 1,377 (4), N–C20 = 1,342 (4), N3'–C22 = 1,345 (4), O1–C17 = 1,192 (7), O2–C20 = 1,210 (5), O3–C22 = 1,234 (4). Valencioni uglovi (°): C5'–S1'–C3 = 89,86 (13), N3'–C3–S1' = 102,01 (17), C4–C3–C2 = 111,2 (3). Torzioni uglovi (°): C5'–N4'–N3'–C22 = -176,3 (4), N3'–N4'–C5'–N = 178,5 (3), C3–C4–C5–C10 = -1,5 (5).

Postoji nekoliko strukturno okarakterisanih jedinjenja koja sadrže šestočlane ugljenične prstenove kondenzovane sa tijadiazolinskim prstenom u spiro-sistem,^{45,64,66} ali nijedno od njih nije derivat steroida. Generalno uzevši, 1,3,4-tijadiazolinski prsten jedinjenja **7a** karakterišu prividno isti strukturni parametri kao i prstenove ovog tipa opisane u literaturi.^{45,64,66,67} Blago odstupa od planarnosti i zauzima konformaciju koverte sa atomom C-3 kao čvornim. Atom sumpora S-1' asimetrično je vezan za dva atoma ugljenika tako da je veza sa sp²-hibridizovanim C-5' kraća (1,739 (3) Å) od veze sa sp³-hibridizovanim C-3 (1,852 (3) Å). Rastojanje N4'–C5' (1,282 (4) Å) odgovara lokalizovanoj dvostrukoj vezi. Nasuprot sličnim strukturama do sada opisanim u literaturi kod kojih acetil-grupe značajno odstupaju od koplanarnosti s prstenom ($121^\circ < |\tau(\text{C5}'\text{-N4}'\text{-N3}'\text{-C22})| < 170^\circ$), usled odsustva bilo kakvih sternih smetnji u jedinjenju **7a** acetil-grupa na N-3' i acetilamino-grupa na C-5' koplanarne su sa

tijadiazolinskim fragmentom ($\tau(\text{C5}'\text{-N4}'\text{-N3}'\text{-C22}) = -176,3 (4)^\circ$; $\tau(\text{N3}'\text{-N4}'\text{-C5}'\text{-N}) = 178,5 (4)^\circ$).



Slika 3.5. Četvorostruki simetrični molekularni prsten povezan vodoničnim vezama, način kristalnog pakovanja jedinjenja **7a**. Podaci o vodoničnom vezivanju: N–H = 0,78 (4) Å, H \cdots O3i = 2,05 (4) Å, N \cdots O3i = 2,801 (4) Å, $\angle(\text{N-H}\cdots\text{O3i}) = 159 (4)^\circ$.

Simetrijski kod (i): $-y + 2, x, z$.

Sa kristalografske tačke gledišta kristalno pakovanje molekula otkriva zanimljivu karakteristiku. Naime, acetilamino NH grupa ponaša se kao donor vodonične veze kiseonikovom atomu iz acetil-grupe susednog molekula u geometrijskom uređenju gde četiri udružena molekula formiraju molekularni prsten sa četvorostrukom kristalografskom simetrijom (**Slika 3.5**). Na ovaj način formira se supramolekulski tetramer koji se opisuje $R_4^4(28)$ deskriptorom.⁶⁸ Centralna šupljina nastalog uređenja ispunjena je neuređenim molekulima DMSO.

3.1.2.4. Određivanje strukture bis(1,3,4-tijadiazolina) na primeru jedinjenja **8a**

Tretiranjem tiosemikarbazona **3a-E/Z** anhidridom sirćetne kiseline u baznoj sredini dobijen je *3R,17R*-bis(tijadiazolin) **8a**.

Na osnovu HRMS određena je molekulska formula bis(tijadiazolina) **8a** ($\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$) i utvrđeno je da je njegova molekulska masa (586,2396) veća od mase

bis(tiosemikarbazona) **3a** (418,1973) za 168 Da.

U IR spektru jedinjenja **8a** su se pojavile nove apsorpcione trake istežućih vibracija $\nu(\text{C}=\text{N})$ na 1642 i 1615 cm^{-1} , kao i traka istežućih vibracija $\nu(\text{C}-\text{S})$ na 722 cm^{-1} .

U ^1H NMR spektru evidentirano je odsustvo signala za NH_2 protone sa A-prstena (δ 6,50 i 7,26/6,45 i 7,23 ppm) i sa D-prstena (δ 6,53 i 7,18 ppm za oba izomera) polaznog tiosemikarbazona **3a-E/Z**. Pojavili su se singleti za N-acetil protone $^{\text{C}5'/5''}\text{CH}_3$ (δ 2,09/2,12 ppm) i $^{\text{N}3'/3''}\text{CH}_3$ (δ 2,18/2,22 ppm) (Tabela 3.13). Kao i kod mono-tijadiazolina **7a**, signal za H-4 proton se pojavio na δ od 5,61 ppm. Visoko hemijsko pomeranje aksijalnog protona H β -16 (dtd, δ 4,35 ppm) je posledica jakog anizotropnog efekta karbonila $^{\text{N}3''}\text{C}=\text{O}$.

Tabela 3.13. Karakteristični ^1H NMR signali sintetisanih bis(tijadiazolina) **8a-f**.

bis(TDA)	δ (ppm)								
	H α -2	H-4	H α -16	H β -16	H-18	H-19	$^{\text{N}3'/3''}\text{CH}_3$	$^{\text{C}5'/5''}\text{CH}_3$	$^{\text{C}5'/5''}\text{NH}$
^d 8a	2,54	5,61	2,01–2,16	4,35	0,95	/	2,18/2,22	2,09/2,12	/
^d 8b	2,78	5,48	2,02–2,08	4,35	0,94	1,10	2,18/2,22	2,09/2,12	/
^d 8c	2,89	5,48	2,06–2,16	4,32	0,85	1,25	2,19/2,23	2,09/2,12	/
^c 8e	2,80	5,58	2,11	4,37	1,00	1,16	2,19/2,22	2,11/2,14	/
^b 8f-20R	2,69	5,40	1,53–1,70	1,71–1,83	0,85	0,99	2,09/2,07	2,01/2,01	11,42/11,44
^b 8f-20S	2,69	5,41	1,09–1,51	1,71–1,83	0,73	1,01	2,09/2,05	2,01/2,01	11,35/11,45

^b uzorci snimljeni u DMSO- d_6 , ^c uzorci snimljeni u $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, ^d uzorci snimljeni u $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$

Pored premeštanja ^{13}C NMR signala pomenutih kod mono-tijadiazolina **7a**, u spektru bis(tijadiazolina) **8a** signal za C-5'' (δ 149,4 ppm) i signal za C-17 (δ 94,0 ppm) su premešteni na niže hemijsko pomeranje (Tabela 3.14).

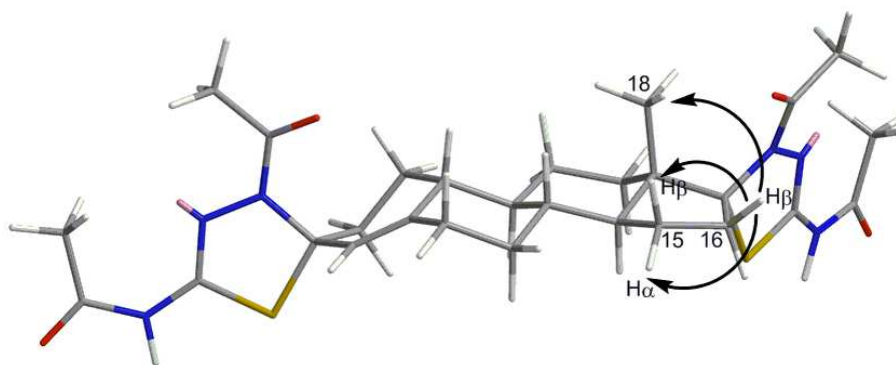
Tabela 3.14. Karakteristični ^{13}C NMR signali sintetisanih bis(tijadiazolina) **8a-f**.

bis-TDA	δ (ppm)							
	C-16	C-17/20	C-19	C-5'/5''	$^{\text{N}3'/3''}\text{C}=\text{O}$	$^{\text{N}3'/3''}\text{CH}_3$	$^{\text{C}5'/5''}\text{C}=\text{O}$	$^{\text{C}5'/5''}\text{CH}_3$
^d 8a	31,0	94,0	/	146,4/149,4	171,2/173,5	24,0/23,1	171,7/171,9	23,0/25,1
^d 8b	31,0	93,9	18,3	146,2/149,3	171,3/173,5	24,0/25,1	171,7/171,9	23,0/23,1
^d 8c	31,4	93,5	26,9	146,2/149,1	171,3/173,4	23,9/24,9	171,9/172,0	22,9/23,0
^c 8e	29,9	91,5	17,9	144,3/146,7	170,5/171,6	22,9/21,5	169,6/169,7	22,2/22,3
^b 8f-20R	24,6	83,8	17,3	143,1/143,4	167,3/168,2	23,6/24,6	169,2/169,1	22,5/22,5
^b 8f-20S	25,4	82,0	17,3	143,1/143,5	167,3/168,1	23,6/24,5	169,2/169,2	22,5/22,6

^b uzorci snimljeni u DMSO- d_6 , ^c uzorci snimljeni u $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$, ^d uzorci snimljeni u $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$

Kako je rendgenskom strukturnom analizom mono-tijadiazolina **7a** utvrđena *R* apsolutna konfiguracija atoma C-3, pretpostavljeno je da isto važi i za bis(tijadiazolin) **8a**. Apsolutna konfiguracija stereocentra C-17 je određena detaljnom analizom NMR spektara, a potvrđena je ispitivanjem Dreiding-ovog modela molekula. Na osnovu NOESY korelacija aksijalnog H β -16 protona (δ 4,35 ppm) sa protonima H α / β -15 (δ 1,76/1,42 ppm), kao i sa protonima metil-grupe CH₃-18 (δ 0,95 ppm) utvrđena je *R* apsolutna konfiguracija atoma C-17 (**Slika 3.6**).

Na opisani način potvrđene su strukture preostalih 3,17-bis(tijadiazolina), **8b–e**.



Slika 3.6. 3D-prikaz pretpostavljene strukture jedinjenja **8a** i apsolutne konfiguracije na atomu C-17 utvrđene na osnovu NOESY korelacije.

U slučaju progesteronskog 3,20-bis(tijadiazolina) **8f** prsten formiran na atomu C-20 ne spada u spiro-prstenove i dovoljno je udaljen od steroidnog skeleta tako da ne dolazi do sternog odbijanja steroidnog jezgra sa voluminoznom NHAc grupom. Dakle, do zatvaranja tijadiazolinskog prstena na C-20 dolazi napadom tiokarbonilnog atoma sumpora na sp² hibridizovan atom ugljenika C-20 kako sa aksijalne tako i sa ekvatorijalne strane što omogućava nastanak 20*R* i 20*S* diastereoizomera derivata **8f**. Približan odnos 20*R*/20*S* diastereoizomera (1,2/1) je utvrđen poređenjem površina signala za atome H-4, H₃C-18 i H₃C-19 u ¹H NMR spektru.

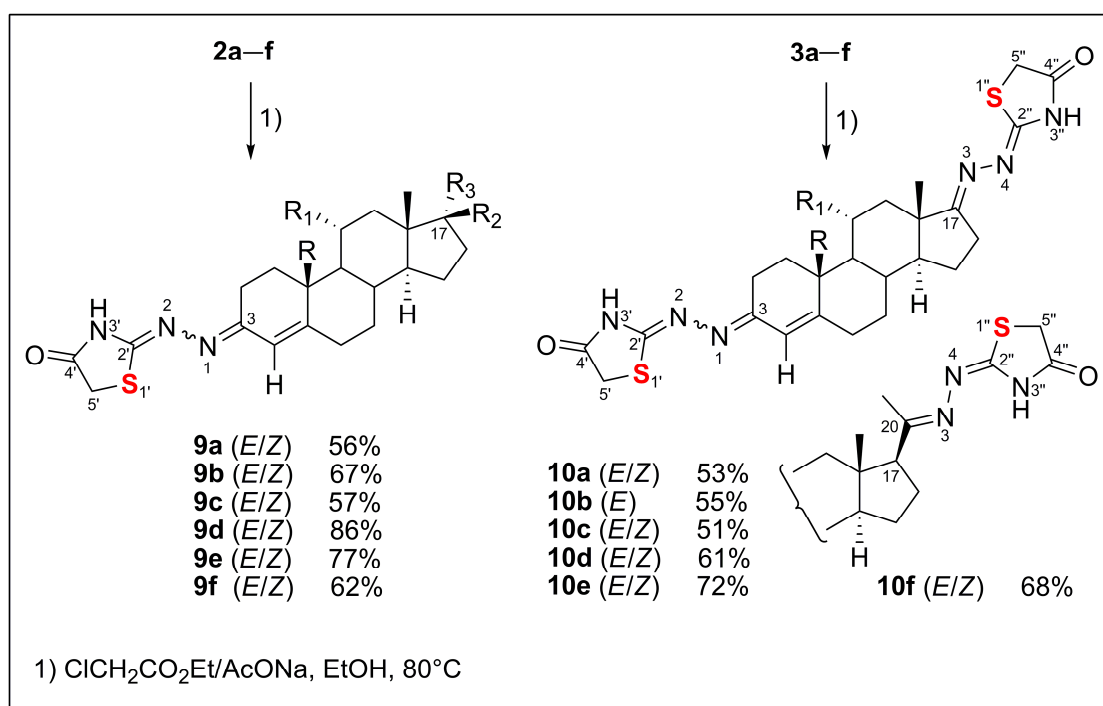
3.1.2.5. Pokušaj dobijanja 1,3,4-oksadiazolina, ODA

Semikarbazon **4b** je podvrgnut istovetnim uslovima pod kojima su dobijani 1,3,4-tijadiazolini međutim nije usledilo zatvaranje prstena analognog 1,3,4-oksadiazolina (**Shema 3.1**).

3.1.3. Reakcije sa etil-hloroacetatom

3.1.3.1. Dobijanje tiazolidin-4-ona

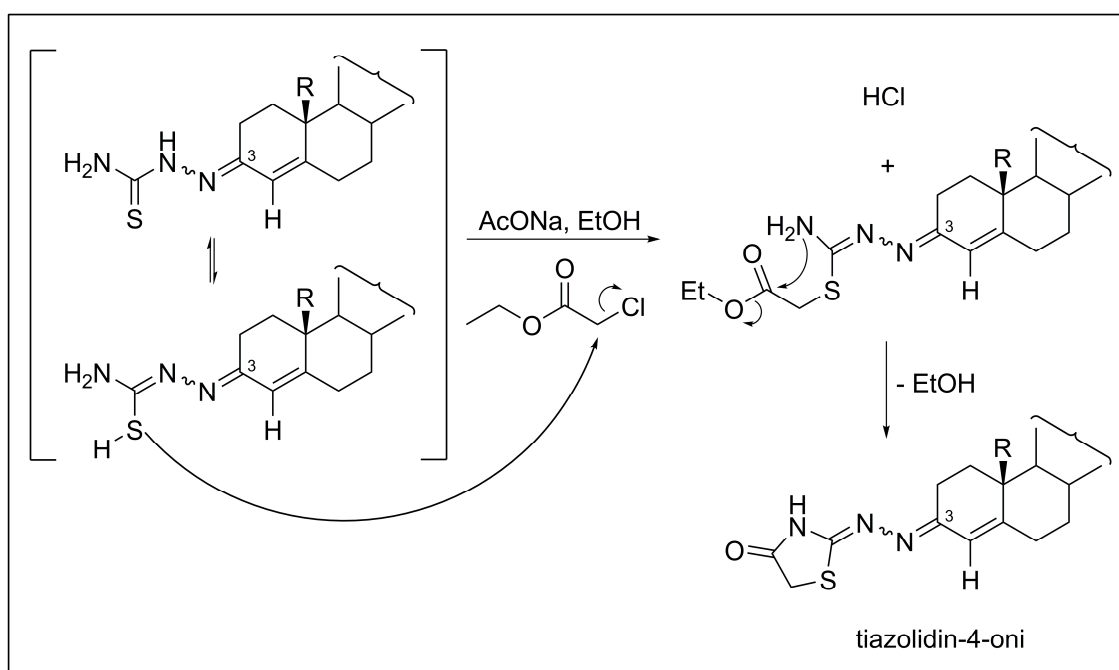
Novi steroidni mono- i bis(tiazolidin-4-oni) **9a–f** i **10a–f** su dobijeni u dobrim prinosima (51–86%) prema **Shemi 3.4**⁶³ intermolekulskom kondenzacijom tiosemikarbazona **2a–f** i **3a–f** sa etil-hloroacetatom u ključalom etanolu koji sadrži anhidrovani natrijum-acetat.⁶⁹



Shema 3.4. Proizvodi reakcije tiosemikarbazona (**2a–f**, **3a–f**) sa etil-hloroacetatom

Reakcioni uslovi su optimizovani variranjem količine etil-hloroacetata i anhidrovanog natrijum-acetata, kao i promenom dužine trajanja reakcije. Najviši prinosi mono-tiazolidin-4-ona **9a–f** su dobijeni pri upotrebi ekvimolarne količine tiosemikarbazona i ciklizacionog reagensa u prisustvu viška anhidrovanog natrijum-acetata (1,5 mol Na-acetata na 1 mol tiosemikarbazona) pri čemu je reakciona smeša refluktovana 24 h. Najbolji prinosi bis(1,3-tiazolidin-4-ona) **10a–f** su dobijeni upotrebom dvostruke količine Na-acetata i etil-hloroacetata u odnosu na količine potrebne za dobijanje mono(tiazolidinona), a refluks je trajao 45 h.

Pretpostavljeni mehanizam nastajanja novih steroidnih tiazolidin-4-ona prikazan je na **Shemi 3.5**. Prvi korak podrazumeva S-alkilovanje tiosemikarbazona **2a-f** i **3a-f** koji su, zahvaljujući upotrebi natrijum-acetata, u rastvoru prisutni u entiolnoj formi. Sledi nukleofilni napad NH_2 -grupe na ugljenikov atom karbonilne grupe i oslobađanje etanola što rezultuje formiranjem tiazolidin-4-ona **9a-f** i **10a-f**. Višak natrijum-acetata je korišćen za sakupljanje oslobođenog hlorovodonika, dok etil-hloracetat ima ulogu ciklizujućeg agensa.



Shema 3.5. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja novih steroidnih tiazolidin-4-ona.

Kako opisana reakcija ciklizacije (*E/Z*) tiosemikarbazona nema uticaja na dvostruku vezu $\text{C}(3/17/20)=\text{N}$, svi mono- i bis(tiazolidin-4-oni), **9a-f** i **10a-f**, dobijeni su u vidu (*E/Z*) smeše stereoizomera u položaju C-3.

3.1.3.2. Određivanje strukture mono-tiazolidin-4-ona na primeru jedinjenja 9a i 9b

Kristalizacijom su dobijeni diastereoizomerno čisti glavni *E*-izomeri jedinjenja 9a–f, a strukture sporednih *Z*-izomera su određene na osnovu spektralnih podataka (*E/Z*) smeša.

Molekulska formula (C₂₁H₂₇N₃O₂S) i masa (385,1824) jedinjenja 9a su određene pomoću HRMS. Molekulska masa mono-tiazolidin-4-ona 9a je veća od mase mono-tiosemikarbazona 2a (345,1875) za 40 Da.

Pored apsorpcione trake za karbonil C(17)=O na 1731 cm⁻¹ IR spektar jedinjenja 9a je pokazao novu apsorpcionu traku za laktamski karbonil na 1718 cm⁻¹, zatim traku na 1616 cm⁻¹ pripisanu ν(C=N) vibracijama i intenzivnu traku na 1249 cm⁻¹ koja odgovara istežućim vibracijama ν(CH₂-S).

Tabela 3.15. Karakteristični ¹H NMR signali sintetisanih mono-tiazolidin-4-ona 9a–f.

mono-TAN	δ (ppm)							
	Hα-1	Hβ-1	Hα-2	Hβ-2	H-4	CH ₃ -19	^{5'} CH ₂	^{3'} NH
^b 9a- <i>E</i>	1,13–1,33	1,97–2,11	3,04 dt	1,97–2,11	5,95	/	3,79	11,72
^b 9a- <i>Z</i>	1,13–1,33	1,97–2,11	2,33–2,43	2,17–2,27	6,60	/	3,78	11,72
^b 9b- <i>E</i>	1,21–1,40	1,81–1,92	3,03 dt	2,11 td	5,88	1,06	3,80	11,75
^b 9b- <i>Z</i>	/	/	/	/	6,52	1,11	3,78	11,73
^b 9c- <i>E</i>	1,92–2,14	1,71 td	3,08 dt	2,26 dtd	5,91	1,23	3,80	11,78
^a 9c- <i>Z</i>	1,91–2,02	1,91–2,02	2,57–2,63	2,57–2,63	6,52	1,28	3,77	11,78
^b 9d- <i>E</i>	1,56 td	2,58 dt	2,88 dt	2,16 m	5,87	1,16	3,79	11,73
^b 9d- <i>Z</i>	1,72 m	2,53 t	2,39 m	2,26 m	6,50	1,20	3,78	11,73
^a 9e- <i>E</i>	1,69 td	1,73–1,86	2,96 dt	2,30 m	6,05	1,18	3,77	/
^a 9e- <i>Z</i>	1,73–1,86	2,43–2,47	2,43–2,47	1,73–1,86	6,55	1,22	3,77	/
^b 9f- <i>E</i>	1,28–1,42	1,88 m	3,04 dt	2,10 dtd	5,86	1,04	3,80	11,75
^b 9f- <i>Z</i>	1,28–1,42	1,89 m	2,43 dt	2,30 m	6,50	1,07	3,79	11,75

^a uzorci snimljeni u CDCl₃, ^b uzorci snimljeni u DMSO-*d*₆

U ¹H NMR spektru jedinjenja 9a-*E/Z* su nedostajali signali za protone amino-grupe polaznog tiosemikarbazona 2a, a pojavio se novi signal za H₂C-5' (δ 3,79/3,78 ppm) (Tabela 3.15). Ostali karakteristični signali jedinjenja 9a-*E/Z* su singlet za proton H-4 (δ 5,95/6,60 ppm), singlet za NH (δ 11,72 ppm za oba izomera umesto na δ 8,71/8,90 ppm kod tiosemikarbazona) i dublet tripleta za Hα-2 *E*-izomera (δ 3,04 ppm). Više hemijsko pomeranje protona H-4 u *Z*-izomeru mono-tiazolidin-4-ona 9a (δ 6,60 ppm) u odnosu na hemijsko pomeranje istog atoma tiosemikarbazona 2a-*Z* (δ 6,19 ppm)

posledica je anizotropije karbonilne grupe C(4')=O.

U ^{13}C NMR spektru jedinjenja **9a-E/Z** (Tabela 3.16) su se pojavili signali karakteristični za skelet mono-tiazolidin-4-ona: triplet za C-1 (δ 26,1/26,9 ppm), triplet za C-2 (δ 24,3/30,0 ppm), singlet za C-3 (δ 162,3/161,3 ppm), dublet za C-4 (δ 121,9/111,8 ppm), singlet za C-5 (δ 153,6/155,4 ppm), singlet za C(2')=N (δ 161,2/159,5 ppm), singlet za karbonil C(4')=O (δ 173,8/174,0 ppm) i triplet za C-5' (δ 32,7/32,6 ppm).

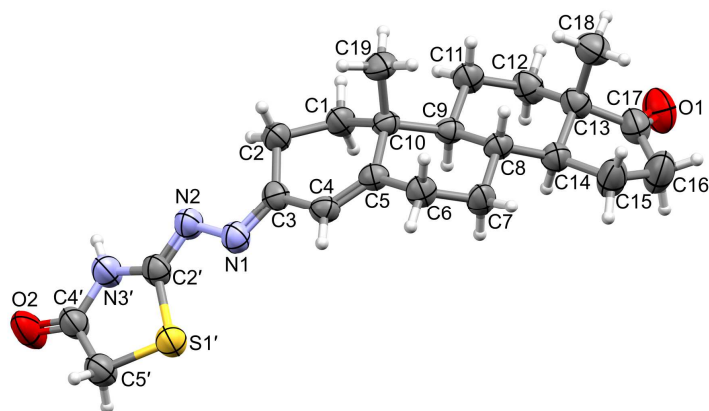
Tabela 3.16. Karakteristični ^{13}C NMR signali sintetisanih mono-tiazolidin-4-ona **9a-f**.

mono-TAN	δ (ppm)								
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-19	C(2')=N	C(4')=O	C-5'
^b 9a-E	26,1	24,3	162,3	121,9	153,6	/	161,2	173,8	32,7
^b 9a-Z	26,9	30,0	161,3	111,8	155,4	/	159,5	174,0	32,6
^b 9b-E	34,8	22,0	161,8	121,2	157,8	17,4	161,3	173,8	32,7
^b 9b-Z	35,8	27,0	159,7	113,8	159,5	17,5	160,7	173,8	32,6
^b 9c-E	33,0	22,3	161,8	121,4	156,3	26,2	161,6	173,8	32,7
^b 9c-Z	34,0	27,4	159,5	114,1	158,0	26,4	161,5	173,8	32,7
^a 9c-Z	34,2	27,8	161,7	111,4	159,4	26,8	159,8	173,8	33,2
^b 9d-E	36,4	22,4	162,3	121,7	158,7	18,2	161,7	173,8	32,5
^b 9d-Z	37,5	27,2	160,1	114,5	160,3	18,4	161,7	173,8	32,5
^a 9e-E	35,9	22,4	163,5	122,6	157,3	18,4	161,4	173,6	33,2
^a 9e-Z	36,9	27,6	161,5	115,2	159,2	18,6	161,4	173,6	33,1
^b 9f-E	34,8	22,0	161,9	121,1	158,0	17,3	161,4	173,8	32,6
^b 9f-Z	35,9	27,1	159,5	113,8	159,7	17,5	161,4	173,8	32,5

^a uzorci snimljeni u CDCl_3 , ^b uzorci snimljeni u $\text{DMSO}-d_6$

NOESY spektar jedinjenja **9a-E/Z** ne sadrži korelacije na osnovu kojih bi bilo moguće utvrđivanje konfiguracije glavnog izomera na dvostrukoj vezi C(3)=N. Stoga je ista utvrđena rendgenskom strukturnom analizom drugog mono-tiazolidin-4-ona, jedinjenja **9b-E**, od koga su dobijeni kristali (Slika 3.7).

3.1.3.3. Rendgenska strukturna analiza mono-tiazolidin-4-ona **9b-E**



Slika 3.7. Molekulska struktura jedinjenja **9b-E** sa numeracijom atoma.

Termalni elipsoidi su prikazani sa 50% verovatnoće.

Atomi vodonika prikazani su kao sfere proizvoljnog radijusa.

Odabrane dužine veza (Å): S1'–C2' = 1,751 (4), S1'–C5' = 1,812 (5), O2–C4' = 1,216 (5), N3'–C2' = 1,367 (5), N3'–C4' = 1,369 (6), C4'–C5' = 1,501 (6), N2–C2' = 1,283 (5), N1–N2 = 1,398 (5), N1–C3 = 1,308 (5), C3–C4 = 1,452 (5), C4–C5 = 1,335 (5).
Odabrani torzioni uglovi (°): C3–C4–C5–C10 = –5,0 (6)°, C4–C3–N1–N2 = –179,9 (3)°, N1–N2–C2'–S1' = –2,7(5)°.

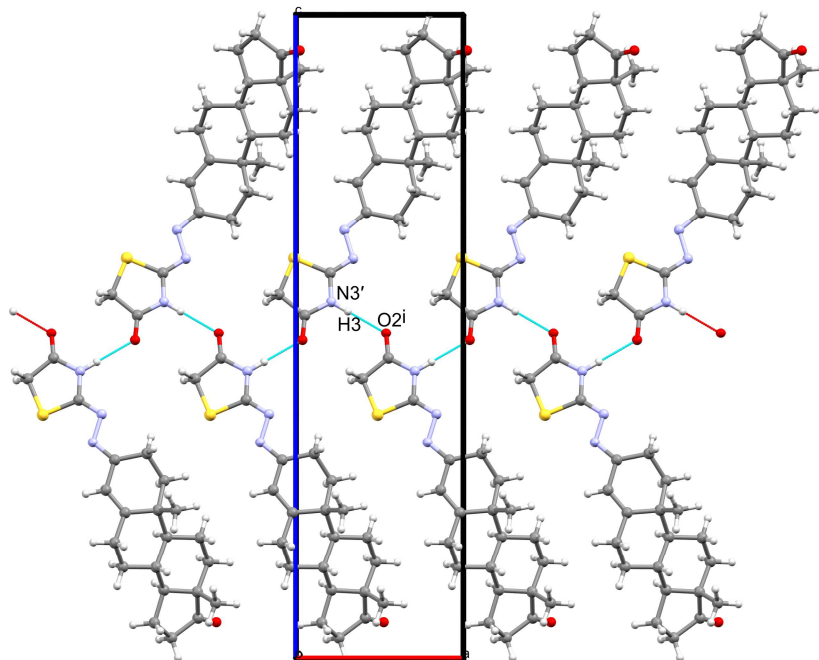
Jedinjenje kristališe u necentrosimetričnoj prostornoj grupi P2₁2₁2₁. Apsolutna struktura jednoznačno je određena na osnovu poznate hiralnosti steroidnih atoma ugljenika, a u skladu je sa apsolutnim strukturnim parametrima Flack $x = 0,02(5)$ određenim pomoću Parson-ove metode koeficijenata.⁷⁰ Steroidno jezgro zauzima očekivanu konformaciju, tj. prstenovi B i C su u konformaciji stolice ^{C5}C_{C8} i ^{C9}C_{C13}, redom, dok petočlani prsten D zauzima konformaciju koverta ^{C14}E.⁷¹ Kao što je očekivano, zahvaljujući sp² hibridizaciji C3, C4, i C5 atoma i prisustvu C4–C5 dvostruke veze (1,335 (5) Å), prsten A je u konformaciji polustolice ^{C2}H_{C1}. Ovo može da se kvantifikuje asimetričnim parametrima⁷² koji imaju vrednosti $c_2(C1-C2) = c_2(C4-C5) = 0,9(5)^\circ$ i torzionim uglom $\tau(C3-C4-C5-C10) = -5,0 (6)^\circ$.

Značajno je da se napomene da je do momenta objavljivanja ove kristalne strukture postojalo samo jedno strukturno okarakterisano jedinjenje sa 2-(3-cikloheksen-1-

ilidenhidrazono)tiazolidin-4-onskim fragmentom.⁷³ Na osnovu pretrage CSD⁷⁴ geometrija tiazolidin-4-onskog prstena u skladu je sa strukturama jedinjenja koja sadrže hidrazono-tiazolidin-4-onski fragment. Atom sumpora S1', slično kao u slučaju sintetisanih tijadiazolina, asimetrično je vezan za dva ugljenikova atoma tako da je veza sa sp² hibridizovanim C2' kraća (1,751 (4) Å) od veze sa sp³ hibridizovanim C5' (1,812 (5) Å). Takođe, dužina veze C4'–O2 (1,216(5) Å) odgovara lokalizovanoj dvostrukoj vezi. Prsten tiazolidin-4-ona je kruto koplanaran sa C5–C4–C3–N1–N2 fragmentom sp² hibridizovanih atoma. Međutim, detaljnije razmatranje pokazuje da je prsten blago nabran malim izmeštanjem atoma S1' iz ravni prstena. Priroda i količina nabiranja se vidi iz Cremer–Pople-ovih parametara Q₂ = 0,100 (4) Å i φ₂ = 2 (3)°. ⁷⁵ Na osnovu ovih podataka i asimetričnih parametara Cs(S1') = Cs(C4'–N3') = 1,5 (5)°, njihova konformacija najbolje se opisuje kao koverta ^{S1'}E.

Dužine veza C3–N1 i C2'–N2 odgovaraju lokalizovanim dvostrukim vezama između odgovarajućih atoma. Strukturni podaci svedoče o *E*-konfiguraciji oko C3–N1, i *Z*-konfiguraciji oko C2'–N2 dvostrukih veza, što može da se izrazi preko sledećih torzionih uglova τ(C4–C3–N1–N2) = –179,9 (3)° i τ(N1–N2–C2'–S1') = –2,7 (5)°, redom. Koliko nam je poznato, ovo je prvi steroidni derivat sa poznatom konfiguracijom dvostruke veze u položaju C-3 hidrazono-tiazolidin-4-on-skog fragmenta.

Dominantna intermolekulska interakcija u kristalnoj strukturi je N3'–H3…O2i vodonična veza, koja povezuje molekule u lance duž kristalografske ose *a* (**Slika 3.8**), sa deskriptorom C₁¹(4)⁶⁸ (podaci o vodoničnom vezivanju: N3'–H3 = 0,86 Å, H3…O2i = 2,05 (4) Å, N3'…O2i = 2,903 (5) Å, <(N–H…O3i) = 170,1°; simetrijski kod (i): 1/2 + x, 1/2–y, 1–z).



Slika 3.8. Lanac vodonično povezanih molekula koji se prostire duž *a* kristalografske ose, kao supramolekulski motiv u kristalnoj strukturi **9b-E**. Podaci o vodoničnom vezivanju: $N3'-H3 = 0,86 \text{ \AA}$, $H3 \cdots O2i = 2,05(4) \text{ \AA}$, $N3' \cdots O2i = 2,903(5) \text{ \AA}$, $\angle(N-H \cdots O3i) = 170,1^\circ$; simetrijski kod (i): $1/2+x, 1/2-y, 1-z$.

3.1.3.4. Određivanje strukture bis(tiazolidin-4-ona) na primeru jedinjenja **10a**

Molekulska formula ($C_{28}H_{38}N_6O_4S_2$) i masa bis(tiazolidin-4-ona) **10a** (498,1872) su određene na osnovu HRMS. Molekulska masa ovog jedinjenja je veća od mase bis(tiosemikarbazona) **3a** (418,1973) za 80 Da odnosno za 113 Da od molekulske mase mono-tiazolidin-4-ona **9a** (385,1824). Dakle, jedinjenje **10a** sadrži jedan tiazolidin-4-onski strukturni motiv više u odnosu na mono-tiazolidin-4-on **9a**.

IR spektar bis(tiazolidin-4-ona) **10a** sadrži sve apsorpcione trake karakteristične za tiazolidin-4-onski prsten prethodno navedene kod mono-tiazolidin-4-ona.

Baš kao i u slučaju bis(tiosemikarbazona) **3a**, NMR spektralni podaci bis(tiazolidin-4-ona) **10a** potvrdili su postojanje dva diastereoizomera koji se razlikuju samo po konfiguraciji dvostruke veze $C(3)=N$ (Tabela 3.17). U položaju C-17 je dobijen samo jedan, *E*-izomer, što je očekivano jer je isto važno i za bis(tiosemikarbazon) iz koga je nastao bis(tiazolidin-4-on) **10a** i potkrepljeno pretpostavljenim mehanizmom ciklizacije prema kome dvostruka veza $C(3/17/20)=N$ ne trpi nikakve promene prilikom zatvaranja

Tabela 3.17. Karakteristični ^1H NMR signali sintetisanih bis(tiazolidin-4-ona) **10a–f**.

^b bis(TAN)	δ (ppm)										
	H α -1	H β -1	H α -2	H β -2	H-4	H α -16	H β -16	H-18	H-19	H-5'/5''	^{3'/3''} NH
10a-E	1,12–1,19	1,96–2,13	3,04 dt	1,96–2,13	5,95	2,35 m	2,47 m	0,89	/	3,79/3,74	11,72 s
10a-Z	1,25 m	2,06–2,13	2,30–2,41	2,27 m	6,57	2,30–2,41	2,47 m	0,89	/	3,78/3,74	11,75 s
10b-E	1,26–1,47	1,72–1,92	3,04 dt	2,11 dtd	5,87	2,47 m	2,35 m	0,88	1,07	3,79/3,74	11,72 s
ND 10b-Z	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10c-E	1,95–2,05	1,72 td	3,08 dt	2,26 m	5,90	2,39 m	2,52–2,60	0,85	1,22	3,80/3,76	11,73 s
10c-Z	1,95–2,05	1,83 td	2,52–2,60	2,42 m	6,52	2,39 m	2,52–2,60	0,85	1,26	3,79/3,76	11,73 s
10d-E	1,52–1,63	2,58 dt	2,88 dt	2,16 dtd	5,86	2,39 dd	2,50 dd	0,88	1,17	3,79/3,76	11,72 šs
10d-Z	1,68–1,85	2,49 m	2,24 m	2,21 m	6,49	2,39 dd	2,50 dd	0,88	1,21	3,79/3,76	11,72 šs
10e-E	1,56 td	1,62–1,88	2,93 dt	2,07–2,21	5,91	2,36–2,45	2,50 m	0,91	1,12	3,80/3,75	11,70 šs
10e-Z	1,62–1,88	2,36–2,45	2,93 dt	2,26–2,34	6,53	2,36–2,45	2,50 m	0,91	1,17	3,79/3,75	11,70 šs
10f-E	1,25–1,35	1,83–1,95	3,01 dt	2,09 m	5,86	2,21–2,28	1,57–1,63	0,61	1,04	3,79/3,76	11,71 s
10f-Z	1,40 m	1,83–1,95	2,41 kd	2,28–2,35	6,50	2,24 m	1,57–1,63	0,61	1,08	3,79/3,76	11,70 s

^b svi uzorci su snimljeni u DMSO-*d*₆; ND – nije dobijen

Tabela 3.18. Karakteristični ^{13}C NMR signali sintetisanih bis(tiazolidin-4-ona) **10a–f**.

^b bis(TAN)	δ (ppm)											
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-16	C-17/20	C-18	C-19	C(2'/2'')=N	C(4'/4'')=O	C-5'/5''
10a-E	26,1	24,4	162,4	121,9	153,6	27,9	178,6	16,9	/	161,3/161,8	173,8/174,0	32,7/32,6
10a-Z	26,9	29,9	160,2	114,8	155,5	27,9	178,6	16,9	/	160,6/161,8	173,9/174,0	32,7/32,6
10b-E	34,8	22,0	162,0	121,1	157,9	27,8	178,5	16,8	17,4	161,4/161,4	173,8/173,8	32,6/32,6
ND 10b-Z	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
10c-E	32,9	22,4	161,8	121,3	156,4	28,4	178,5	17,1	26,2	161,6/161,5	173,8/173,9	32,7/32,6
10c-Z	34,0	27,4	159,5	114,1	158,2	28,4	178,5	17,1	26,4	161,5/161,5	173,9/173,9	32,7/32,6
10d-E	36,4	22,4	162,4	121,7	158,9	28,0	177,9	17,8	18,3	161,4/161,8	173,9/174,0	32,7/32,6
10d-Z	37,6	27,3	160,4	114,4	160,2	28,0	177,9	17,8	18,5	161,4/161,8	173,9/174,0	32,7/32,6
10e-E	35,8	22,3	162,2	122,2	157,1	28,0	173,3	17,5	18,3	161,6/162,2	173,95/174,05	32,8/32,6
10e-Z	36,9	27,2	159,6	115,0	158,6	28,0	173,3	17,5	18,3	161,6/162,2	173,95/174,05	32,8/32,6
10f-E	34,9	22,0	162,0	121,1	158,1	23,1	165,3	13,0	17,4	161,3/161,4	173,8/173,8	32,7/32,6
10f-Z	35,9	27,2	159,8	113,8	159,9	23,1	165,3	13,0	17,6	161,3/161,4	173,9/173,8	32,7/32,6

^b svi uzorci su snimljeni u DMSO-*d*₆; ND – nije dobijen

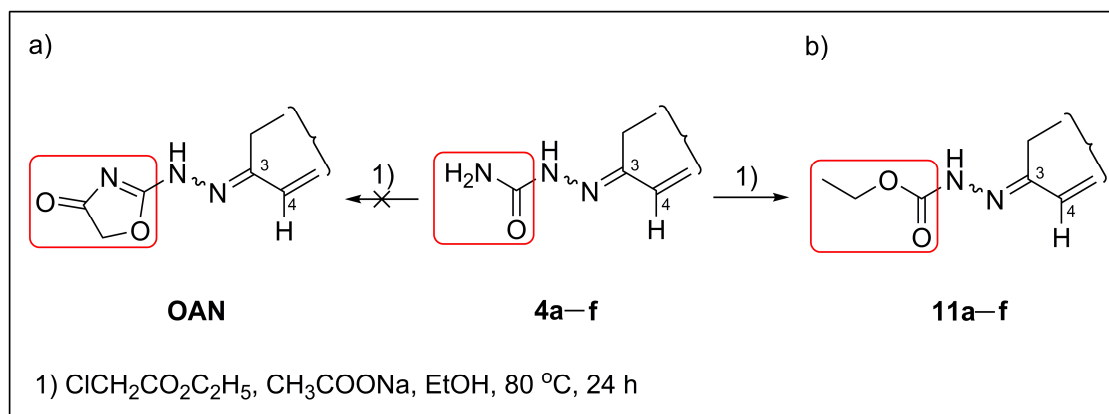
prstena.

Pored prethodno navedenih ^1H NMR signala karakterističnih za mono-tiazolidin-4-one, u spektru bis(tiazolidin-4-ona) **10a** se pojavio singlet za metilenske $\text{H}_2\text{-5''}$ protone (δ 3,74 ppm) i došlo je do promene hemijskih pomeranja prostorno bliskih protona, protona iz metil-grupe $\text{CH}_3\text{-18}$ (sa δ 0,94 na 0,89 ppm) i $\text{H}\alpha/\beta\text{-16}$ (sa δ 2,17/2,41 na 2,35/2,47 ppm).

Karakteristični novi signali u ^{13}C NMR spektru bis(tiazolidinona) **10a** su bili signali za C-2'' (δ 161,8 ppm), karbonil C(4'')=O (δ 174,4 ppm) i za C-5'' (δ 32,6 ppm) (**Tabela 3.18**). Pored toga, signal za atom ugljenika C-17 (δ 178,6 ppm) je premešten na značajno više hemijsko pomeranje u odnosu na pomeranje signala odgovarajućeg bis(tiosemikarbazona) **3a** (δ 167,0 ppm).

Hemijska pomeranja atoma ostalih bis(tiazolidin-4-ona) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima su bila vrlo slična hemijskim pomeranjima signala za iste atome jedinjenja **10a**.

3.1.3.5. Dobijanje karbazatnih estara

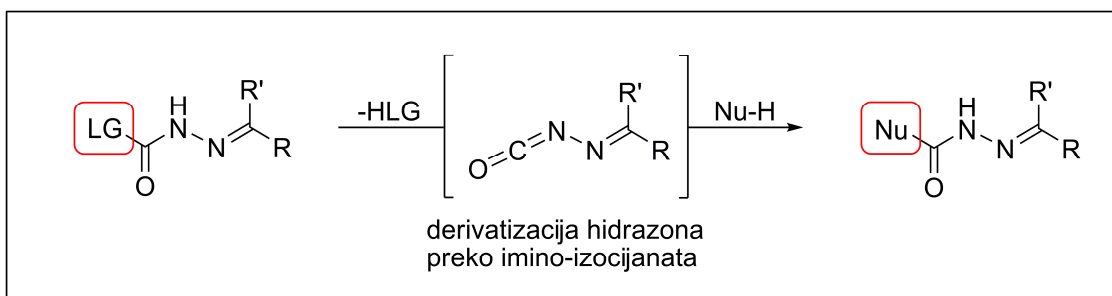


Shema 3.6. a) Očekivani (**OAN**) i b) dobijeni proizvodi (**11a-f**) reakcije mono-semikarbazona (**4a-f**) sa etil-hloracetatom.

Kako je jedan od postavljenih ciljeva ove disertacije bio poređenje reaktivnosti i biološke aktivnosti sumpornih i kiseoničnih derivata steroidnih hidrazona, sintetisani semikarbazoni su podvrgnuti uslovima pod kojima su iz tiosemikarbazona dobijeni tiazolidin-4-oni. Refluksovanjem mono-semikarbazona **4a-f** u ključalom apsolutnom

etanolu u prisustvu etil-hloracetata kao ciklizujućeg reagensa i anhidrovanog natrijum-acetata nisu dobijeni očekivani 1,3-oksazolidin-4-oni. Umesto njih su dobijeni karbazatni estri **11a–f** (Shema 3.6).⁶²

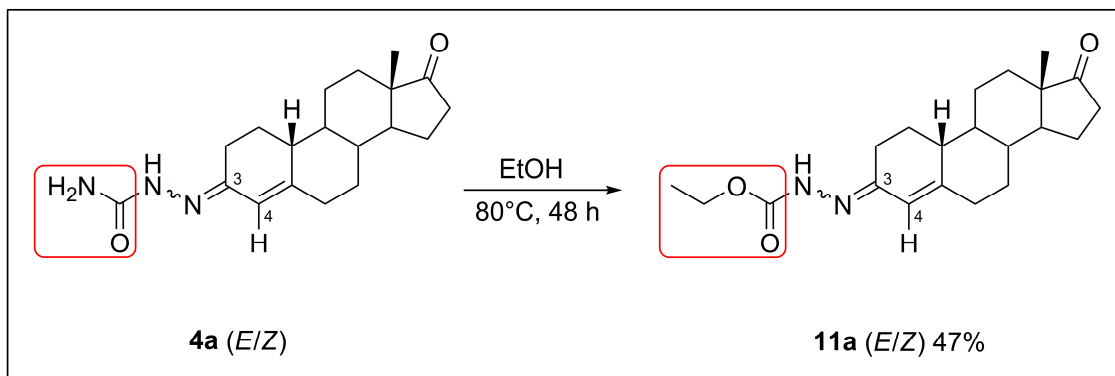
Mehanizam nastanka karbazatnih estara je opisan u literaturi⁷⁶ kao jednostavna reakcija supstitucije do koje dolazi kod semihidrazona u prisustvu alkohola pri zagrevanju na temperaturama 60–150 °C (Shema 3.7).



Shema 3.7. Mehanizam nastanka karbazatnih derivata iz semihidrazona prema podacima objavljenim u literaturi.

S ciljem da se ovo dokaže urađen je eksperiment sa 19-norandrost-4-en-3,17-dion 3-semikarbazonom (**4a**) u ključalom apsolutnom etanolu bez prisustva etil-hloracetata i natrijum-acetata. Nakon 48 h refluktovanja reakcione smeše i uparavanja rastvarača dobijeno je jedinjenje **11a** u prinosu od 47% pri čemu je izgled reakcione smeše bio daleko manje komplikovan tj. reakcija je bila čistija i derivat **11a** je dobijen u višem prinosu (Shema 3.8).

Strukture jedinjenja **11a–f** su određene analizom NMR spektara u kojima je pojava dva seta signala, osim u slučaju jedinjenja **11c** i **11f** gde nisu dobijeni *Z*-izomeri, ukazala na to da su karbazatni estri, u skladu sa očekivanjima, dobijeni u vidu smeše *E* i *Z* izomera na dvostrukoj vezi C(3)=N.



Shema 3.8. Sinteza karbazatnog estra **11a** refluktovanjem u etanolu u trajanju od 48 h bez dodatka etil-hloracetata.

3.1.3.6. Određivanje strukture karbazatnih estara na primeru jedinjenja **11a**

Molekulska formula jedinjenja **11a** je određena elementalnom analizom. U IR spektru karbazatnog estra **11a** su izostale apsorpcione trake za primarnu amino-grupu semikarbazona **4a** na oko 3450 cm^{-1} , a traka za karbonil $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$ se pomerila sa 1678 na 1689 cm^{-1} .

Hemijska pomeranja za većinu atoma steroidnog skeleta u ^1H i ^{13}C spektrima semikarbazona **4a** (*E* i *Z*) (Tabele 3.3 i 3.5) i karbazatnog estra **11a** (*E* i *Z*) (Tabele 3.19 i 3.20) snimljenih u $\text{DMSO-}d_6$ nisu se značajno razlikovala. Međutim, značajnu razliku u izgledu njihovih spektara čine izostanak signala za amino-grupu semikarbazonskog motiva NH_2^{A} u jedinjenju **4a-E/Z** (δ 6,20/6,15 ppm), pojava novih ^1H tripleta/ ^{13}C kvarteta za metil-grupu CH_3^{A} (δ 1,31/14,6 ppm) i ^1H kvarteta/ ^{13}C tripleta za metilensku grupu CH_2^{A} (δ 4,09/60,2 ppm), kao i premeštanje signala za semikarbazonski karbonil $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$ (δ 157,3 ppm) na niže hemijsko pomeranje (δ 154,1 ppm). Navedeni podaci ukazuju na uvođenje novog $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCO}$ strukturnog motiva.

Pored navedenih, karakteristični ^1H NMR signali jedinjenja **11a-E/Z** su dublet tripleta za $\text{H}\alpha\text{-2}$ (δ 2,71/2,29 ppm), singlet za H-4 (δ 5,86/6,51 ppm), kao i singlet za NH^{A} (δ 9,78/9,98 ppm).

Ostali karakteristični ^{13}C NMR signali karbazatnog estra **11a-E/Z** su triplet za C-1 (δ 27,1 ppm za oba izomera), triplet za C-2 (δ 23,0/30,0 ppm), singlet za C-3 (δ 151,8/154,4 ppm) i dublet za C-4 (δ 121,7/112,9 ppm).

Tabela 3.19. Karakteristični ^1H NMR signali sintetisanih karbazatnih estara **11a–f**.

KBZ	δ (ppm)								
	H α -1	H β -1	H α -2	H β -2	H-4	H-19	NH ^A	CH ₂ ^A	CH ₃ ^A
^a 11a-E	1,22–1,36	2,14–2,22	2,56	1,86–2,00	6,09	/	7,86	4,26	1,22–1,36
^a 11a-Z	1,22–1,36	2,16	2,56	2,27	6,12	/	8,05	4,28	1,22–1,36
^b 11a-E	1,14	1,95–2,09	2,71	1,92	5,86	/	9,78	4,09	1,18–1,23
^b 11a-Z	1,18–1,23	1,95–2,09	2,29	2,18	6,51	/	9,98	4,09	1,18–1,23
^a 11b-E	1,40–1,48	1,94–2,02	2,54	2,04–2,12	6,00	1,08	7,83	4,28	1,31
^a 11b-Z	1,40–1,48	1,88–1,93	2,49	2,40	6,05	1,14	7,83	4,28	1,31
^a 11c-E	2,03–2,09	2,11	2,58	2,24	6,02	1,24	7,72	4,28	1,32
ND 11c-Z	/	/	/	/	/	/	/	/	/
^a 11d-E	2,67	1,715	2,39–2,51	2,13	6,00	1,21	7,83	4,27	1,28–1,35
^a 11d-Z	2,49	1,82	2,39–2,47	2,13	6,05	1,27	8,03	4,27	1,28–1,35
^b 11f-E	1,25–1,48	1,86	2,70	1,94–2,03	5,75	1,00	9,78	4,10	1,21

^a uzorci su snimljeni u CDCl₃, ^b uzorci su snimljeni u DMSO-*d*₆; ND – nije dobijen

^A strukturni fragment iz karbazatnog estara sa steroidnog A-prstena

Tabela 3.20. Karakteristični ^{13}C NMR signali sintetisanih karbazatnih estara **11a–f**.

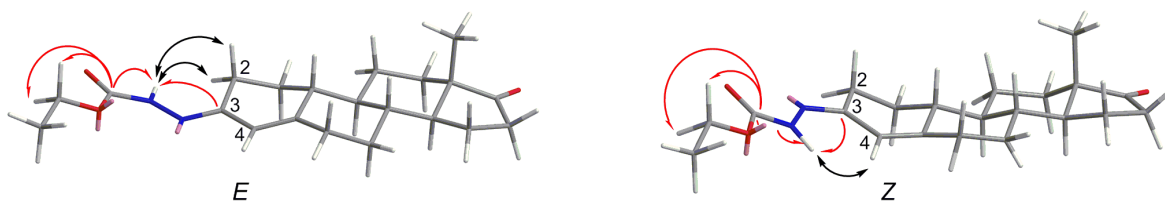
KBZ	δ (ppm)								
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-19	C=O ^A	CH ₂ ^A	CH ₃ ^A
^a 11a-E	26,0	22,2	151,5	122,2	150,3	/	154,2	61,9	14,6
^a 11a-Z	27,4	30,5	156,7	111,1	150,5	/	154,2	61,9	14,6
^b 11a-E	27,1	23,0	151,8	121,7	149,9	/	154,1	60,2	14,6
^b 11a-Z	27,1	30,0	154,4	112,9	148,9	/	154,1	60,1	14,6
^a 11b-E	34,7	20,1	150,9	121,3	154,9	17,8	154,4	61,9	14,6
^a 11b-Z	36,5	27,8	154,3	110,2	161,1	18,2	154,4	61,9	14,6
^a 11c-E	33,6	20,5	150,7	121,5	153,5	26,8	150,8	61,9	14,7
ND 11c-Z	/	/	/	/	/	/	/	/	/
^a 11d-E	36,0	20,5	151,2	122,1	155,2	18,6	163,4	61,9	14,7
^a 11d-Z	38,1	27,8	15,03	111,1	161,0	19,0	163,4	61,9	14,7
^b 11f-E	34,5	20,7	151,3	120,9	154,2	17,4	154,2	60,2	14,6



^a uzorci su snimljeni u CDCl₃, ^b uzorci su snimljeni u DMSO-*d*₆; ND – nije dobijen

^A strukturni fragment iz karbazatnog estara sa steroidnog A-prstena

Razdvajanje signala *E/Z* diastereoizomerne smeše jedinjenja **11a** na dva skupa je urađeno poređenjem spektralnih podataka dobijenim za ovaj karbazatni estar sa podacima za mono-semikarbazon **4a** iz kojeg je nastao, naročito za atome HC-4, H₂C-2 i NH, na osnovu prisustva/odsustva (*E/Z*) NOESY korelacija amidnog protona (δ 9,78 ppm) sa protonima na atomu C-2 (δ 23,0/30,0 ppm) kao i na osnovu odsustva/prisustva (*E/Z*) NOESY korelacija istog protona sa H-4 (δ 9,78/6,51 ppm) (**Slika 3.9**). HMBC

korelacija atoma ugljenika iz karbonila C=O^A sa amidnim NH protonom (δ 154,1/9,78 ppm) kao i sa metilenskim protonima (δ 154,1/4,09 ppm) potvrđuje pretpostavljenu strukturu.



Slika 3.9. 3D prikaz postojećih konfiguracija dvostruke veze C(3)=N karbazatnog estra **11a** s ključnim HMBC (H/C ) i NOESY () korelacijama.

Dato tumačenje spektroskopskih podataka jedinjenja **11a** može da se primeni na preostale sintetisane karbazatne estre, jedinjenja **11b–f**.

3.2. Biologija

3.2.1. Citotoksična aktivnost

In vitro citotoksična aktivnost sintetisanih steroidnih tiosemikarbazona i njihovih derivata, tijadiazolina i tiazolidin-4-ona, ispitana je na humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), K562 (hronična mijeloidna leukemija), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-453 (karcinom dojke), LS174 (adenokarcinom kolona) i A549 (karcinom pluća). Pored toga, citotoksičnost ovih jedinjenja ispitana je i na normalnim humanim fibroblastima pluća, MRC-5 (**Tabele 3.21 i 3.22**).^{61,63}

Za razliku od tiosemikarbazona, citotoksičnost njihovih kiseoničnih analoga, semikarbazona, kao i karbazatnih estara dobijenih iz mono-semikarbazona ispitana je na HeLa, K562 i na još jednoj ćelijskoj liniji leukemije – Jurkat (akutnoj leukemiji T-limfocita) (**Tabela 3.23**).⁶² Razlog za to je najbolja citotoksična aktivnost prethodno sintetisanih tiosemikarbazona i njihovih derivata upravo prema ćelijskoj liniji leukemije, K562. Kako semikarbazoni i njihovi derivati nisu ispoljili značajnu citotoksičnu aktivnost prema ispitanim malignim ćelijskim linijama, osim antimikrobnih testova za njih nisu vršena dalja ispitivanja mehanizama njihove antikancerske aktivnosti.

Tabela 3.21. *In vitro* citotoksična aktivnost novih steroidnih tiosemikarbazona **2a–3f** i njihovih derivata, tijadiazolina **7a–8f**.

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)						
	HeLa	K562	MDA-MB-361	MDA-MB-453	LS174	A549	MRC-5
2a	18,1 ± 3,3	11,3 ± 2,2	144,1 ± 36,6	44,4 ± 2,9	61,3 ± 13,0	10,3 ± 0,7	7,7 ± 1,1
2b	7,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2	20,7 ± 6,0	6,8 ± 0,2	35,2 ± 11,6	8,9 ± 0,5	6,5 ± 0,1
2c	17,3 ± 6,8	6,7 ± 0,3	18,7 ± 8,9	6,9 ± 0,3	26,2 ± 6,0	9,5 ± 0,5	7,2 ± 1,3
2d	≈ 200	51,1 ± 15,4	183,4 ± 5,2	154,3 ± 28,1	176,7 ± 40,3	178,8 ± 25,5	173,6 ± 45,8
2e	43,9 ± 4,9	10,7 ± 1,5	≈ 200	43,7 ± 5,9	≈ 200	51,2 ± 7,7	48,1 ± 2,7
2f	8,9 ± 1,6	6,6 ± 0,2	8,7 ± 3,1	6,9 ± 0,3	9,2 ± 3,9	8,6 ± 0,8	6,7 ± 0,5
3a	42,5 ± 1,9	11,2 ± 0,4	> 200	193,0 ± 12,1	> 200	> 200	> 200
3b	31,5 ± 3,3	28,1 ± 1,5	≈ 200	110,8 ± 16,5	> 200	≈ 200	> 200
3c	14,3 ± 7,3	30,3 ± 7,5	> 200	78,5 ± 21,6	> 200	≈ 200	> 200
3d	131,4 ± 6,2	90,5 ± 13,4	197,4 ± 3,6	183,7 ± 17,1	194,8 ± 4,5	> 200	> 200
3f	182,3 ± 25,0	158,9 ± 23,5	195,5 ± 6,3	191,5 ± 25,0	191,7 ± 11,6	187,4 ± 12,6	186,4 ± 23,6
7a	199,2 ± 1,3	75,7 ± 17,2	> 200	> 200	163,8 ± 49,3	> 200	> 200
7b	> 200	192,8 ± 12,4	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
7c	185,2 ± 20,9	181,2 ± 32,6	> 200	178,2 ± 34,9	> 200	> 200	> 200
7d	> 200	195,6 ± 7,7	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
7e	121,6 ± 10,7	80,5 ± 9,9	170,4 ± 41,9	141,4 ± 24,4	> 200	195,6 ± 7,7	> 200
7f	108,2 ± 18,3	195,8 ± 7,2	> 200	167,9 ± 34,9	> 200	187,4 ± 1,0	> 200
8a	7,8 ± 0,3	8,8 ± 1,3	> 200	11,0 ± 1,9	12,6 ± 3,8	20,6 ± 1,3	12,7 ± 2,0
8b	21,2 ± 1,5	163,6 ± 51,4	> 200	18,0 ± 1,7	> 200	175,3 ± 32,5	145,8 ± 31,5
8c	27,7 ± 11,6	157,2 ± 60,5	> 200	29,0 ± 9,3	182,5 ± 30,3	121,0 ± 34,3	26,2 ± 8,7
8e	37,2 ± 3,0	36,4 ± 2,0	54,1 ± 13,1	30,4 ± 7,1	42,6 ± 3,0	35,6 ± 5,0	38,6 ± 8,8
8f	151,8 ± 28,7	136,5 ± 46,9	> 200	102,8 ± 2,9	200 ± 0,0	132,4 ± 37,2	159,3 ± 40,5
cisplatin	2,1 ± 0,2	5,4 ± 0,3	17,1 ± 1,2	3,6 ± 0,5	17,8 ± 0,6	14,4 ± 0,7	9,2 ± 0,2

Tabela 3.22. *In vitro* citotoksična aktivnost reagensa tiosemikarbazida (TSKd), polaznih steroidnih derivata **1a–f** i novih steroidnih tiazolidin-4-ona **9a–10f**.

Jedinjenje	*IC ₅₀ ± SD (μM)						
	HeLa	K562	MDA-MB-361	MDA-MB-453	LS174	A549	MRC5
TSKd	176,8 ± 9,2	18,0 ± 0,6	23,2 ± 2,6	37,7 ± 39,7	44,5 ± 11,4	176,3 ± 6,2	93,9 ± 16,6
1a	194,2 ± 8,2	190,5 ± 16,5	> 200	133,2 ± 39,7	180,5 ± 27,6	> 200	> 200
1b	76,7 ± 7,5	177,1 ± 6,5	188,7 ± 16,0	109,2 ± 39,7	≈ 200	165,1 ± 1,1	191,0 ± 9,6
1c	95,5 ± 18,8	≈ 200	≈ 200	128,3 ± 8,1	≈ 200	191,8 ± 14,1	> 200
1d	≈ 200	197,8 ± 3,8	> 200	199,1 ± 1,6	> 200	> 200	> 200
1f	21,2 ± 1,6	64,3 ± 7,8	124,6 ± 39,4	43,7 ± 9,3	158,8 ± 58,3	186,4 ± 11,8	157,2 ± 15,2
9a-E	9,2 ± 2,3	8,5 ± 0,9	10,7 ± 0,4	22,2 ± 2,4	49,5 ± 6,7	22,0 ± 5,0	60,9 ± 6,8
9a-E/Z	8,9 ± 1,9	8, 8 ± 1,1	12,7 ± 2,0	23,7 ± 2,7	48,2 ± 4,9	22,3 ± 4,7	62,7 ± 6,2
9b-E	10,8 ± 1,9	9,1 ± 1,3	22,0 ± 0,8	24,9 ± 0,2	48,2 ± 2,5	48,6 ± 1,9	55,7 ± 8,0
9b-E/Z	10,7 ± 2,5	8,7 ± 1,1	25,6 ± 4,6	23,8 ± 1,7	49,7 ± 0,5	49,5 ± 0,6	44,8 ± 7,3
9c-E	9,8 ± 1,1	9,4 ± 1,7	19,1 ± 2,3	27,1 ± 0,1	51,8 ± 9,0	42,1 ± 3,8	53,2 ± 7,0
9c-E/Z	9,5 ± 0,9	8,8 ± 1,2	19, 6 ± 2,2	26,2 ± 2,7	51,3 ± 3,2	40,4 ± 7,5	49,9 ± 9,3
9d-E/Z	51,4 ± 10,5	11,3 ± 2,9	134,0 ± 7,9	116,0 ± 11,8	119,9 ± 25,9	176,1 ± 9,5	111,4 ± 20,1
9e-E/Z	28,0 ± 5,2	19,2 ± 0,4	29,6 ± 1,6	29,4 ± 4,1	104,5 ± 8,7	77,7 ± 26,8	88,4 ± 17,2
9f-E	8,9 ± 1,7	8,7 ± 0,3	14,5 ± 5,3	21,5 ± 2,8	49,1 ± 2,8	18,6 ± 6,6	42,8 ± 2,2
10a-E/Z	13,5 ± 0,1	8,9 ± 1,1	36,0 ± 6,3	30,9 ± 6,2	42,6 ± 6,4	25,3 ± 4,0	58,1 ± 2,6
10b-E/Z	12,9 ± 2,9	10,5 ± 1,3	30,2 ± 7,3	37,3 ± 2,5	21,8 ± 5,1	27,6 ± 7,2	53,4 ± 9,0
10c-E/Z	11,2 ± 1,6	9,6 ± 1,7	24,6 ± 0,4	33,5 ± 6,3	47,8 ± 3,9	24,9 ± 0,2	48,8 ± 1,6
10d-E/Z	41,2 ± 2,7	11,6 ± 2,1	86,8 ± 2,6	77,1 ± 4,1	73,0 ± 10,0	76,2 ± 4,0	91,1 ± 9,9
10e-E/Z	31,3 ± 3,8	21,9 ± 5,1	39,5 ± 5,3	46,7 ± 9,0	36,4 ± 5,6	39,8 ± 3,3	67,9 ± 9,5
10f-E/Z	15,1 ± 6,1	14,9 ± 3,8	20,6 ± 1,0	23,9 ± 0,2	11,0 ± 1,3	17,2 ± 4,6	31,4 ± 4,9
cisplatin	5,2 ± 0,5	5,7 ± 0,6	21,5 ± 1,5	6,5 ± 0,5	18,6 ± 2,0	17,4 ± 1,8	13,0 ± 1,7

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti semikarbazona i njihovih derivata prema Jurkat ćelijskoj liniji ukazuju na isti trend kao i za K562 ćelije: kao najaktivnije jedinjenje pokazao se progesteronski karbazatni estar **11f** (IC_{50} : 31,8 μ M), a kao najmanje aktivna jedinjenja **2d**, **3d** i **7d** (IC_{50} : 126,3–180,1 μ M). Semikarbazonski derivati ispoljili su nešto višu citotoksičnu aktivnost prema Jurkat ćelijama T-limfocitne leukemije, u odnosu na aktivnost prema K562 ćelijama hronične mijeloidne leukemije (IC_{50} vrednosti u opsegu od 51,2 μ M do 119,6 μ M).

Kada je u pitanju ćelijska linija adenokarcinoma dojke, MDA-MB-361, velika većina sintetisanih jedinjenja je bila slabo aktivna ili praktično neaktivna prema ovoj ćelijskoj liniji. Najjaču citotoksičnu aktivnost je ispoljio progesteronski mono-tiosemikarbazon **2f** čija je IC_{50} vrednost iznosila 8,7 μ M. Tiazolidin-4-oni **9a**, **9c**, **9f-E**, **10c** i **10f** pokazali su dobro citotoksično dejstvo na MDA-MB-361 ćelijama (IC_{50} vrednosti u opsegu od 12,7 μ M do 20,6 μ M). Ova jedinjenja su ispoljavala zapravo bolju citotoksičnu aktivnost od hemioterapeutika cisplatina (21,5 μ M).

Po svojoj jakoj citotoksičnoj aktivnosti prema drugoj ispitivanoj ćelijskoj liniji karcinoma dojke, MDA-MB-453, izdvojili su se tiosemikarbazoni **2b**, **2c** i **2f** sa IC_{50} vrednostima od 6,8 μ M do 6,9 μ M, dok su tiazolidin-4-oni imali niže citotoksično dejstvo (devet od ukupno petnaest uzoraka tiazolidinona, **9a–c**, **9e–f** i **10f**, imalo je IC_{50} vrednosti u opsegu od 21,5 do 29,4 μ M).

Jedinjenja koja su ispoljila najjaču citotoksičnu aktivnost prema ćelijama adenokarcinoma debelog creva, LS174, su mono-tiosemikarbazon **2f** (IC_{50} 9,2 μ M) i bis(tijadiazolin) **8a** (IC_{50} 12,6 μ M). Jedinjenja **2b**, **2c** i **8e** su pokazala umereno citotoksično dejstvo (IC_{50} vrednosti: 35,2, 26,2, 42,6 μ M), dok je jedinjenje **2a** imalo slabije citotoksično dejstvo (IC_{50} vrednost 61,3 μ M). Od svih ispitivanih malignih ćelijskih linija ćelije kolorektalnog adenokarcinoma LS174 su se pokazale kao najmanje osetljive na citotoksično delovanje sintetisanih tiazolidin-4-ona. Ipak, tiazolidin-4-on **10f** (IC_{50} 11,0 μ M) ispoljavao je čak bolju citotoksičnost od cisplatina (IC_{50} 18,6 μ M), a jedinjenje **10b** (IC_{50} 21,8 μ M) aktivnost vrlo blisku cisplatinu.

Mono-tiosemikarbazoni **2a**, **2b**, **2c** i **2f** (IC_{50} : 8,6–10,3 μ M) su pokazali jako citotoksično dejstvo na A549 ćelijama karcinoma pluća, koje je bilo nešto bolje u

poređenju sa dejstvom cisplatina (IC_{50} : 14,4 μ M). Međutim, ono što svakako ne ide u prilog pomenutom rezultatu je činjenica da je citotoksična aktivnost navedenih jedinjenja bila još izražajnije prema normalnim humanim fibroblastima pluća MRC-5 (IC_{50} : 6,5–7,7 μ M). Ipak, i cisplatin, hemioterapeutik koji se decenijama koristi za lečenje mnogih tipova malignih tumora, uključujući i karcinom pluća, bio je jednako neselektivan prema A549 ćelijama u odnosu na MRC-5 ćelije.

A549 ćelije su se pokazale kao osetljive na citotoksično delovanje tiazolidin-4-ona **9a**, **9f**, **10a–c** i **10f** (IC_{50} : 17,2–27,6 μ M) s citotoksičnim aktivnostima u nivou cisplatina (IC_{50} : 17,4 μ M). Nasuprot tiosemikarbazona koji nemaju dobru selektivnost u citotoksičnom dejstvu prema A549 ćelijama u odnosu na normalne MRC-5 ćelije, citotoksičnost najaktivnijih tiazolidin-4-ona bila je dva do tri puta niža prema normalnim fibroblastima pluća MRC-5 sa IC_{50} vrednostima 31,4–62,7 μ M.

Rezultati ispitivanja su pokazali da su ćelije hronične mijeloidne leukemije K562 i adenokarcinoma cerviksa HeLa bile najosetljivije na citotoksično delovanje novodobijenih tiosemikarbazona i njihovih derivata, dok su MDA-MB-361 ćelije adenokarcinoma dojke i LS174 ćelije adenokarcinoma kolona bile najmanje osetljive. Iako su MDA-MB-361 ćelije gotovo za trećinu ispitivanih tiazolidin-4-ona bile osetljivije u odnosu na cisplatin, pokazale su se kao najmanje osetljive na dejstvo novih tiosemikarbazona i tijadiazolina, izuzev progesteronskog mono-tiosemikarbazona **2f**.

Gotovo svi semikarbazoni i njihovi derivati (**Tabela 3.21.**) su, suprotno očekivanjima, ispoljili vrlo slabu citotoksičnu aktivnost prema K562 ćelijama, a nešto značajniju prema Jurkat ćelijama. HeLa ćelije su bile najosetljivije na citotoksično delovanje šest semikarbazona i karbazatnih estara. Najaktivnija jedinjenja prema testiranim malignim ćelijskim linijama bila su **4f**, **5c** i **11f**, a koja su pokazala umereni intenzitet citotoksične aktivnosti.

HeLa ćelije su se pokazale kao najosetljivije na citotoksično delovanje mono-tiosemikarbazona **2b** i **2f**, bis(tijadiazolina) **8a** i mono-tiazolidinona **9a**, **9c** i **9f**. K562 ćelije su bile najosetljivije na mono-tiosemikarbazone **2b–c** i **2f**, bis(tijadiazolin) **8a** i tiazolidin-4-one **9a–c**, **9f**, **10a** i **10c**. Ćelijska linija karcinoma dojke MDA-MB-453 je bila najosetljivija na citotoksično dejstvo mono-tiosemikarbazona **2b–c** i **2f**, dok su

MDA-MB-361 ćelije adenokarcinoma dojke bile najviše osetljive na progesteronski mono-tiosemikarbazon **2f** i tiazolidin-4-one **9a**, **9c**, **9f** i **10f**, aktivnije i od cisplatina. LS174 ćelije su bile najosetljivije na jedinjenja **2f**, **8a** i **10f**, aktivnija od cisplatina i bis(tiazolidin-4-on) **10b** sa aktivnošću u rangu cisplatina. A549 ćelije karcinoma pluća su bile najosetljivije na mono-tiosemikarbazone **2a–c** i **2f** i tiazolidin-4-one **9f** i **10f** aktivnije od cisplatina. Pomenuti tiosemikarbazoni bili su još aktivniji prema normalnim fibroblastima pluća, a tiazolidin-4-oni su bili dva–tri puta aktivniji prema A549 ćelijama u odnosu na MRC-5 ćelije. Na Jurkat ćelijama je ispitano samo dejstvo semikarbazona i njihovih derivata, pri čemu je jedinjenje **11f** imalo najviši intenzitet citotoksičnog dejstva u odnosu na ostala testirana jedinjenja (IC₅₀: 31,8 μM), mada gotovo deset puta niži od cisplatina.

Poređenjem IC₅₀ vrednosti dobijenih za tiosemikarbazone (**Tabela 3.21**) može da se dođe do zaključka da su najviše citotoksične aktivnosti prema svim ispitivanim ćelijskim linijama, a iste su daleko više u poređenju sa aktivnostima polaznih steroida **1a–f** ili samog tiosemikarbazida, ispoljavali mono-tiosemikarbazoni **2a–c** i **2f**. Bis(tiosemikarbazoni) **3a–f** su ispoljavali daleko niže aktivnosti od analognih mono-tiosemikarbazona što je pokazalo da uvođenje drugog tiosemikarbazonskog fragmenta nije dovelo do boljeg citotoksičnog dejstva jedinjenja. Ovim je potvrđena činjenica da je, pored α,β-nezasićenog tiosemikarbazona u položaju C-3, za aktivnost steroidnih tiosemikarbazona odgovoran i supstituent u položaju C-17. Dakle, 17-okso grupa u androstanskim mono-tiosemikarbazonima **2a**, **2b** i **2c**, odnosno 17-acetil grupa u progesteronskom derivatu **2f**, značajno su pojačavale aktivnosti tiosemikarbazona. Međutim, treba imati u vidu da aktivnost novosintetisanih jedinjenja ne zavisi isključivo od prisustva određenih funkcionalnih grupa, nego i od prostornog rasporeda istih. Kako su eksperimenti rađeni sa *E/Z* smešama stereoizomernih tiosemikarbazona, u ovom slučaju nije bilo moguće da se sa sigurnošću tvrdi koji od izomera je u većoj meri doprinosa citotoksičnom delovanju jedinjenja, naročito iz razloga što do danas ne postoji dovoljno literaturnih podataka na ovu temu. Jedina dostupna literatura o izomerima koji bi mogli da se primene na steroidne tiosemikarbazone zapravo govori o razlikama u citotoksičnom delovanju *E*- i *Z*-steroidnih oksima^{44,57} i, prema navedenim referencama, nisu utvrđene bitne razlike po pitanju citotoksične aktivnosti.

Međusobnim poređenjem citotoksičnosti derivata sa spiro-1,3,4-tijadiazolinskim

prstenom kao sastavnim delom strukture zaključeno je da je serija jedinjenja koja sadrže dva spiro-prstena (**8a–e**) ispoljavala bolju aktivnost u odnosu na seriju sa jednim spiro-prstenom (**7a–f** i **8f**), koja je bila praktično neaktivna prema gotovo svim testiranim malignim ćelijskim linijama. Imajući u vidu ovaj rezultat, nameće se zaključak da je upravo spiro-heterociklični supstituent u položaju C-17 taj koji pozitivno utiče na citotoksičnu aktivnost sintetisanih tijadiazolina.

Zahvaljujući činjenici da su uspešno izolovani diastereomerno čisti glavni, (*E*)-izomeri većine mono-tiazolidin-4-ona (**9a–c** i **9f**), u ovoj seriji derivata steroidnih hidrazona bilo je moguće da se uporede aktivnosti čistih (*E*)-izomera sa aktivnostima (*E/Z*)-smeša. Poređenjem IC₅₀ vrednosti prikazanih u **Tabeli 3.22** utvrđeno je da nije bilo značajne razlike u citotoksičnosti (*E/Z*)-smeša i čistih (*E*)-izomera, iz čega može da se zaključi da konfiguracija oko C(3)=N1 dvostruke veze nema uticaja na aktivnost tiazolidin-4-ona. Upravo iz ovog razloga, kao i radi boljeg poređenja aktivnosti mono-tiazolidin-4-ona sa aktivnostima bis(tiazolidin-4-ona) **10a–f** i tiosemikarbazona izolovanih u vidu (*E/Z*)-smeša, svi eksperimenti su rađeni sa smešama izomera.

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti tiazolidin-4-ona su pokazali da mono-tiazolidin-4-oni **9a**, **9b**, **9c** i **9f** ispoljavaju najvišu citotoksičnu aktivnost prema svim testiranim ćelijskim linijama, u nekim slučajevima višu od aktivnosti tiosemikarbazona iz kojih su nastali, **2a–c** i **2f**.⁶¹ Aktivnosti bis(tiazolidin-4-ona) **10a–f**, iako nešto niže u odnosu na seriju mono-tiazolidin-4-ona **9a–f**, bile su znatno više od aktivnosti odgovarajućih bis(tiosemikarbazona) **3a–f** koji su se pokazali kao praktično neaktivni prema skoro svim ispitivanim malignim ćelijskim linijama.⁶¹ Štaviše, i najmanje aktivni 11 α -supstituisani derivati **9d**, **9e**, **10d** i **10e**, ispoljili su daleko višu aktivnost od tiosemikarbazona iz kojih su nastali. Dobijeni rezultati navode nas na zaključak da tip heterociklizacije tiosemikarbazonoskog jezgra zastupljen u tiazolidin-4-onima u položaju C-3, a naročito u položaju C-17 ili C-20, povećava antikancersku aktivnost dobijenih derivata.

Semikarbazoni i karbazatni estri⁶² su se pokazali kao najmanje citotoksična jedinjenja od svih derivata steroidnih hidrazona sintetisanih u ovoj disertaciji. U većini slučajeva, naročito kod HeLa ćelija, mono-semikarbazoni **4a**, **4b** i **4c** su bili manje aktivni od bis(semikarbazona) **5a**, **5b** i **5c**. Karbazatni estri **11a** i **11f** bili su aktivniji od mono-

semikarbazona iz kojih su nastali. U skladu sa očekivanjima, sintetisani semikarbazoni bili su znatno manje aktivni od njihovih sumpornih analoga, tiosemikarbazona. Očigledno je da zamena tiokso-grupe karbonilnom u derivatima steroidnih hidrazona dovodi do dramatičnog smanjenja citotoksične aktivnosti.

Razmatranjem tipa steroidnog jezgra postaje jasno da članovi serija sumpornih 3-supstituisanih steroidnih derivata (3-tiosemikarbazoni **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, 3-tijadiazolini **7a**, **7b**, **7c** i **7f** i 3-tiazolidin-4-oni **9a**, **9b**, **9c** i **9f**) ispoljavaju međusobno sličnu aktivnost prema većini testiranih malignih ćelijskih linija. Primećeno je da ni izostanak metil-grupe CH₃-19 ni supstituent u položaju C-17 (bilo da je u pitanju 17-okso ili 17-COCH₃) niti stepen nezasićenja polaznih steroida ne igraju značajnu ulogu u meri ispoljavanja citotoksične aktivnosti. Isti trend je postojao i kod bis(tiazolidin-4-ona) **10a**, **10b**, **10c** i **10f**.

Što se tiče 3,17-bis(tijadiazolina), evidentno je da su jedinjenja **8b** sa androstenskom strukturom i **8c** sa Δ^{9-11} nezasićenjem pokazala dobru citotoksičnu aktivnost, ali samo prema HeLa i MDA-MB-453 ćelijskim linijama. Jedinjenje **8e** sa 11 α -OCOCH₃ grupom pokazalo je umerenu citotoksičnu aktivnost prema svim testiranim ćelijskim linijama, dok je jedinjenje **8a** sa 19-norandrostenskom strukturom ispoljilo vrlo dobru aktivnost prema svim malignim ćelijskim linijama, osim prema MDA-MB-361 ćelijama.

Kada je reč o semikarbazonomima uočen je interesantan trend za njihovu citotoksičnost prema HeLa ćelijama. Naime, bilo da su u pitanju mono- ili bis(semikarbazoni) ili pak karbazatni estri dobijeni iz mono-semikarbazona, najnižu citotoksičnost su ispoljavali derivati 19-norandrostendiona, sledili su derivati androstendiona, zatim Δ^{9-11} -androstendiona, dok su najvišu aktivnost imali derivati progesterona. Ono što je takođe evidentno na osnovu IC₅₀ vrednosti dobijenih za K562 i Jurkat ćelijske linije, ponovo su se derivati progesterona, tačnije njegov mono-semikarbazon i karbazatni estar, pokazali kao najaktivniji. Podatak o citotoksičnosti progesteronskog bis(semikarbazona) **5f** nažalost izostaje jer je jedinjenje izuzetno slabo rastvorno, pa nije bilo moguće izvođenje eksperimenta.

Međutim, ono što je definitivno uticalo na citotoksičnost steroidnih derivata bila je supstitucija 11 α -vodonikovog atoma proton-donorskom OH grupom koja je za posledicu imala drastičan pad aktivnosti derivata. Semikarbazoni sa ovom vrstom supstitucije u položaju 11 α , **4d**, **5d** i **6d**, bili su najmanje aktivni. Aktivnost karbazatnog

estra **11d** nažalost nije određena zbog slabe rastvorljivosti jedinjenja u DMSO-u. Dalje, 11 α -hidroksi tiosemikarbazon **2d**, tijadiazolin **7d** i tiazolidin-4-oni **9d** i **10d**, ispoljili su najniže aktivnosti unutar svojih serija prema svim testiranim malignim ćelijskim linijama, osim prema K562 ćelijskoj liniji za koju su progesteronski derivati imali niže aktivnosti od 11 α -hidroksi derivata. Bis(tiosemikarbazon) **3d** takođe je imao lošu aktivnost. Nasuprot tome, uvođenje OCOCH₃ umesto OH-grupe u 11 α -položaj, što je slučaj kod jedinjenja **2e**, **7e**, **9e** i **10e**, znatno je poboljšavalo aktivnost ovih jedinjenja.

Sumiranjem prikazanih rezultata može da se dođe do zaključka da su α,β -nezasićeni supstituenti u C-3 položaju tiosemikarbazona ili tiazolidin-4-ona, spiro-heterociklični prsten ili okso- ili acetil-grupa u položaju C-17 i tiazolidin-4-onski prsten u poziciji C-17 ili C-20 strukturni fragmenti koji su u najvećoj meri odgovorni za citotoksičnu aktivnost novosintetisanih steroidnih hidrazona i njihovih derivata.

3.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti na PBMC

Derivati steroidnih hidrazona koji su ispoljili najviši intenzitet citotoksične aktivnosti prema ispitivanim malignim ćelijskim linijama, mono-tiosemikarbazoni **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, bis(tijadiazolini) **8a** i **8e**, kao i svi tiazolidin-4-oni osim 11 α -supstituisanih, odabrani su za dalja ispitivanja citotoksičnosti na normalnim humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi (PBMC), kako na nestimulisanim, tako i na ćelijama stimulisanim da proliferišu pomoću mitogena fitohemaglutinina (PHA) (PBMC, odnosno PBMC+PHA). Kao pozitivna kontrola je korišćen hemioterapeutik cisplatin (**Tabela 3.24**).

Svi ispitivani derivati steroidnih hidrazona, osim tiosemikarbazona **2c**, pokazali su slabiju citotoksičnu aktivnost prema nestimulisanim PBMC nego prema stimulisanim PBMC.

Tabela 3.24. *In vitro* citotoksična aktivnost prema PBMC za: a) najaktivnije tiosemikarbazone, jedinjenja **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, i tijadiazoline, **8a** i **8e**, i b) odabrane tiazolidin-4-one, jedinjenja **9a–c**, **9f**, **10a–c** i **10f**.

a)

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)	
	PBMC ^a	PBMC+PHA ^a
2a	44,1 ± 13,7	40,1 ± 13,8
2b	15,7 ± 3,0	14,3 ± 4,5
2c	24,9 ± 14,8	26,9 ± 22,7
2f	20,0 ± 14,3	13,1 ± 6,1
8a	> 200	197,3 ± 3,8
8e	> 200	159,5 ± 56,3
Cisplatin	60,8 ± 12,6	23,6 ± 4,7

^aIz četiri nezavisna eksperimenta (zdravi donori krvi)

b)

Jedinjenje	IC ₅₀ ± SD (μM)	
	PBMC ^a	PBMC+PHA ^a
9a	145,8 ± 2,5	92,1 ± 14,3
9b	> 200	155,7 ± 13,3
9c	123,4 ± 4,4	64,4 ± 7,1
9f	88,6 ± 11,6	64,7 ± 8,0
10a	188,8 ± 15,9	88,1 ± 8,6
10b	87,1 ± 0,5	59,8 ± 14,0
10c	> 200	188,7 ± 16,0
10f	123,8 ± 12,1	62,3 ± 7,6
Cisplatin	71,3 ± 8,20	32,9 ± 3,7

^aIz dva nezavisna eksperimenta (zdravi donori krvi)

Izračunati koeficijenti selektivnosti (Ks), odnosi IC₅₀ vrednosti za normalne PBMC i maligne ćelijske linije, prikazani su u **Tabelama 3.25** i **3.26**.

Testirani mono-tiosemikarbazoni su pokazali višu citotoksičnu aktivnost prema K562, HeLa, MDA-MB-453 i A549 ćelijama u odnosu na normalne nestimulisane i PHA-stimulisane PBMC, dok za LS174 ćelije to važi samo za mono-tiosemikarbazon **2f**. Jedinjenje **2a** je pokazalo primetno višu citotoksičnu aktivnost prema K562 i A549 ćelijama u odnosu na normalne PBMC, **2c** prema K562 i MDA-MB-453 u odnosu na nestimulisane i stimulisane PBMC, a **2f** prema K562 i MDA-MB-453 u odnosu na nestimulisane PBMC. Vrednosti dobijenih Ks iznad 2,5 svrstavaju pomenuta jedinjenja

u grupu jedinjenja koja imaju potencijal da se, u cilju dalje procene njihove antikancerske efikasnosti, ispituju *in vivo*.

Ks dobijeni za testirane bis(tijadiazoline) **8a** i **8e** ukazuju na višu citotoksičnu aktivnost prema svim ispitanim malignim ćelijskim linijama u odnosu na normalne PBMC, osim za odnos stimulisanih PBMC i MDA-MB-361 za jedinjenje **8a** (Tabela 3.25). Ks ovih jedinjenja za sve ćelijske linije osim za MDA-MB-361 veći je od 2,5, tačnije kreću se u intervalu od 4,7 do 25,5, što ubraja ova jedinjenja u grupu potencijalnih kandidata za *in vivo* ispitivanja antikancerske aktivnosti. Pored toga, Ks za jedinjenje **8a** (9,7–25,5) su značajno veći od Ks za jedinjenje **8e** (4,7–6,6).

Kada su u pitanju tiazolidin-4-oni,⁶³ sva ispitivana jedinjenja ispoljila su viši intenzitet citotoksične aktivnosti prema svim malignim ćelijskim linijama, naročito prema HeLa, K562, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, kako u odnosu na nestimulisane (Tabela 3.26a) tako i u odnosu na fitohemaglutininom-stimulisane PBMC (Tabela 3.26b). Selektivnost pri antikancerskoj aktivnosti tiazolidin-4-ona bila je veoma visoka, u velikom broju slučajeva bolja nego za cisplatin, pri čemu su HeLa i K562 ćelijske linije bile najosetljivije na citotoksične efekte ove klase jedinjenja. Pored toga, jedinjenja **9a**, **9b**, **10a**, **10c** i **10f** su takođe ispoljila vrlo dobru selektivnost pri antikancerskom delovanju na humane ćelijske linije kancera dojke, MDA-MB-361 i MDA-MB-453, kao i na ćelije karcinoma pluća A549. Bis(tiazolidin-4-on) **10f** je pokazao i daleko veći intenzitet citotoksične aktivnosti prema LS174 ćelijama nego prema normalnim imunokompetentnim PBMC.

Efikasno i selektivno ubijanje malignih ćelija uz ispoljavanje minimalne toksičnosti prema normalnim netransformisanim ćelijama, a naročito prema ćelijama imunskog sistema koje učestvuju u antikancerskom imunskom odgovoru, izuzetno su važna svojstva pri razvoju novih antikancerskih lekova. Stoga, vrlo dobra selektivnost pri citotoksičnom delovanju ispitivanih derivata steroidnih hidrazona prema humanim malignim ćelijskim linijama (posebno prema K562 i HeLa ćelijama) u poređenju sa normalnim humanim PBMC, ukazuje na značajan antikancerski potencijal ovih jedinjenja, koji bi trebalo dalje da se ispituje *in vivo*.

Tabela 3.25. Koeficijent selektivnosti (Ks) u antikancerskom dejstvu mono-tiosemikarbazona **2a**, **2b**, **2c**, **2f** i bis(tijadiazolina) **8a** i **8e** u odnosu na a) nestimulisane i b) stimulisane PBMC.⁶¹

a)

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC/ HeLa	PBMC/ K562	PBMC/ MDA-MB-361	PBMC/ MDA-MB-453	PBMC/ LS174	PBMC/ A549
2a	2,4	3,9	0,3	1,0	0,7	4,3
2b	2,1	2,4	0,8	2,3	0,5	1,8
2c	1,4	3,7	1,3	3,6	1,0	2,6
2f	2,3	3,0	2,3	2,9	2,2	2,3
8a	> 25,5	> 22,8	> 1	> 18,1	> 15,9	> 9,7
8e	> 5,4	> 5,5	> 1	> 6,6	> 4,7	> 5,6
Cisplatin	28,9	11,3	3,6	16,9	3,4	4,2

b)

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC+ PHA/ HeLa	PBMC+ PHA/ K562	PBMC+PHA/ MDA-MB-361	PBMC+ PHA/ MDA-MB-453	PBMC+ PHA/ LS174	PBMC+ PHA/ A549
2a	2,2	3,6	0,3	0,9	0,7	3,9
2b	1,9	2,2	0,7	2,1	0,4	1,6
2c	1,6	4,0	1,4	3,9	1,0	2,8
2f	1,5	2,0	1,5	1,9	1,4	1,5
8a	25,2	22,5	< 1	17,9	15,7	9,6
8e	4,3	4,4	2,9	5,3	3,7	4,5
Cisplatin	11,4	4,4	1,4	6,5	1,3	1,4

Tabela 3.26. Koeficijent selektivnosti (Ks) u antikancerskom dejstvu odabranih tiazolidin-4-ona, jedinjenja **9a–c**, **9f**, **10a–c** i **10f**, u odnosu na a) nestimulisane i b) stimulisane PBMC.⁶³

a)

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC/ HeLa	PBMC/ K562	PBMC/ MDA-MB-361	PBMC/ MDA-MB-453	PBMC/ LS174	PBMC/ A549
9a	16,3	16,6	11,5	6,2	3	6,5
9b	> 18,6	> 23	> 7,8	> 8,4	> 4	> 4,0
9c	13	14	6,3	4,7	2,4	3,1
9f	10	10,2	6,1	4,1	1,8	4,8
10a	14	21,3	5,2	6,1	4,4	7,5
10b	6,7	8,3	2,9	2,3	4,0	3,2
10c	> 17,8	> 20,8	> 8,1	> 6	> 4,2	> 8,0
10f	8,2	8,3	6	5,2	11,3	7,2
Cisplatin	13,6	12,6	3,3	11,1	3,8	4,1

b)

Jedinjenje	Koeficijent selektivnosti (Ks)					
	PBMC+PHA/ HeLa	PBMC+PHA/ K562	PBMC+PHA/ MDA-MB-361	PBMC+PHA/ MDA-MB-453	PBMC+PHA/ LS174	PBMC+PHA/ A549
9a	10,3	10,5	7,3	3,9	1,9	4,1
9b	14,5	17,9	6,1	6,6	3,1	3,1
9c	6,8	7,3	3,3	2,5	1,3	1,6
9f	7,3	7,5	4,5	3,0	1,3	3,5
10a	6,5	9,9	2,4	2,8	2,1	3,5
10b	4,6	5,7	2,0	1,6	2,7	2,2
10c	16,8	19,6	7,7	5,6	3,9	7,6
10f	4,1	4,2	3,0	2,6	5,7	3,6
Cisplatin	6,3	5,8	1,5	5,1	1,8	1,9

3.2.3. Promene u distribuciji HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

S ciljem da se rasvetle mehanizmi citotoksičnog delovanja novih steroidnih derivata ispitivane su promene u raspodeli HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa nastale kao posledica tretiranja ćelija IC_{50} i dvostrukim IC_{50} koncentracijama jedinjenja **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, **8a** i **8e**, **9a** i **10a** u trajanju od 24 i 48 h.^{61,63}

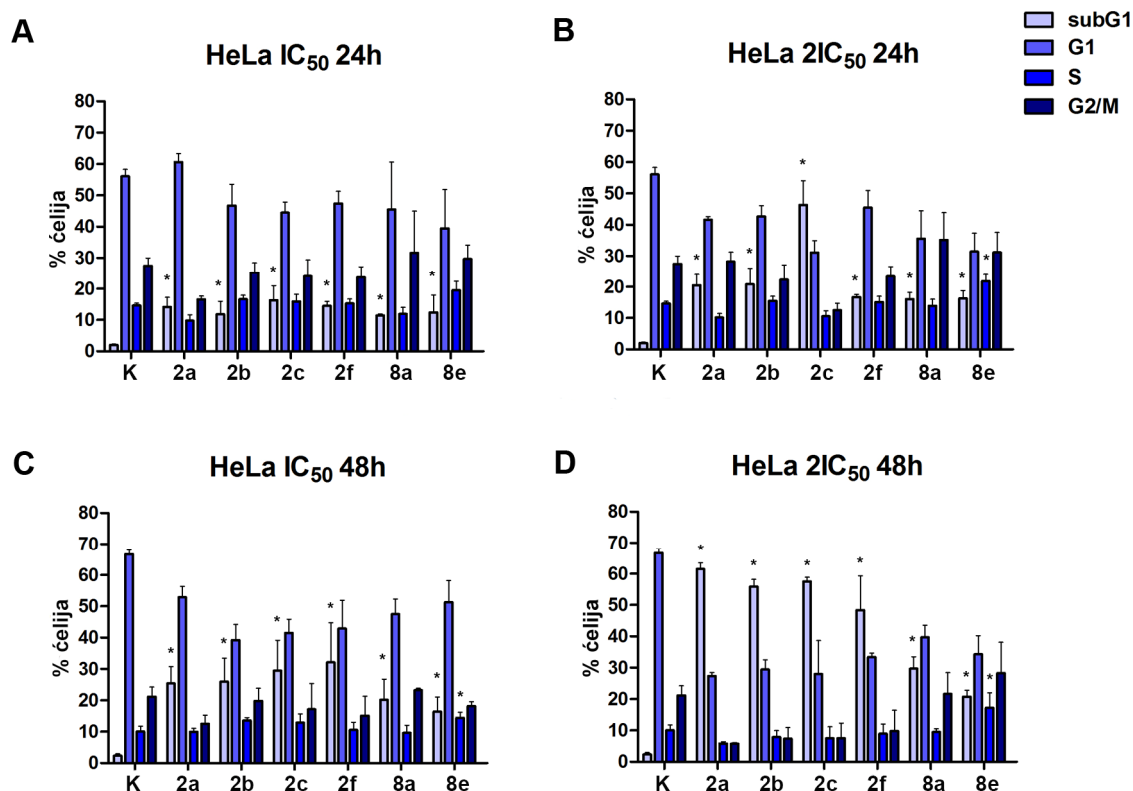
Svi ispitani derivati steroidnih hidrazona, bilo da su primenjeni u IC_{50} ili $2IC_{50}$ koncentracijama pri periodu inkubiranja od 24 ili 48 h, doveli su do promena u distribuciji ćelija po određenim fazama ćelijskog ciklusa HeLa i K562 ćelija.

Poređenjem raspodele tretiranih HeLa ćelija sa kontrolnim ćelijama utvrđeno je statistički značajno povećanje procenta ćelija u subG1 fazi, zavisno od primenjene doze testiranih jedinjenja i od vremena inkubiranja (**Slika 3.10**). Pritom su monotiosemikarbazoni **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, naročito pri $2IC_{50}$ koncentraciji i inkubacionom periodu od 48 h, doveli do značajnijeg povećanja procenta apoptotskih ćelija u sub-G1 fazi, u odnosu na procente HeLa ćelija u sub-G1 fazi koje su bile tretirane tijadiazolinima, **8a** i **8e**. Do značajne akumulacije HeLa ćelija u S fazi dolazilo je usled tretiranja $2IC_{50}$ koncentracijom jedinjenja **8e** kako nakon 24 h tako i nakon 48 h delovanja ili IC_{50} koncentracijom jedinjenja **8e** pri inkubaciji u trajanju od 48 h.

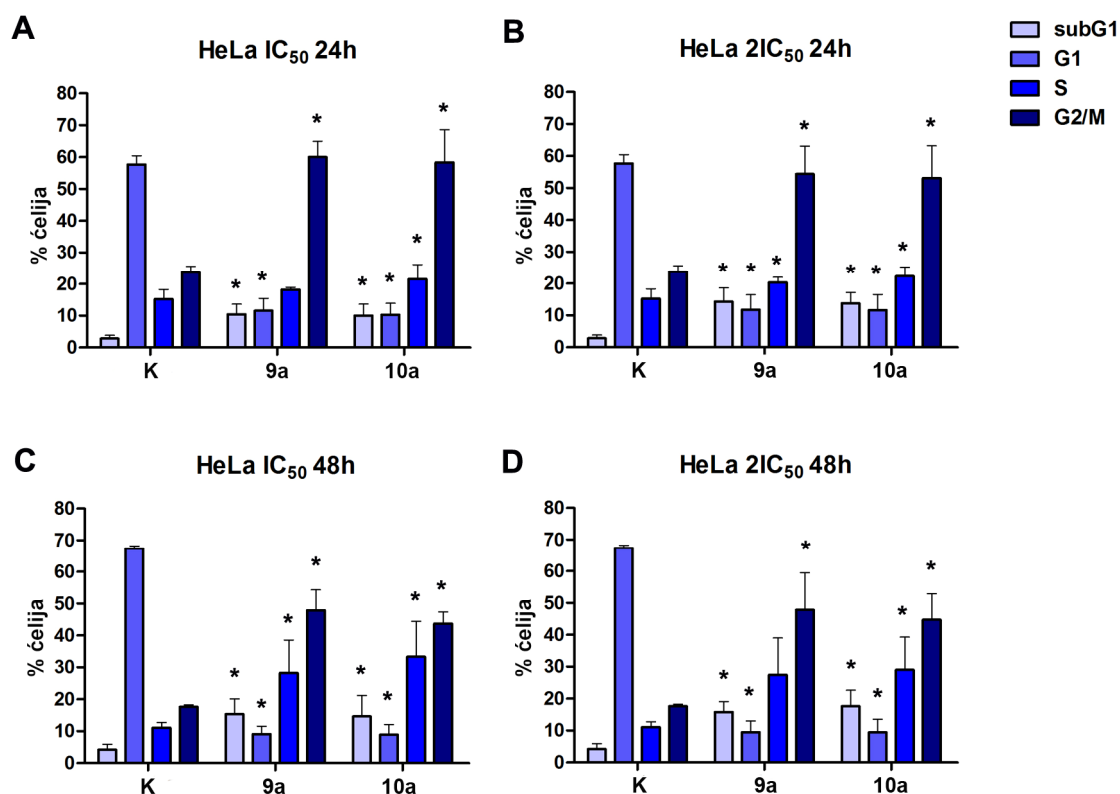
Tiazolidin-4-oni **9a** i **10a** primenjeni pri IC_{50} i dvostrukim IC_{50} koncentracijama u trajanju od 24 h ili 48 h indukovali su statistički značajno povećanje HeLa ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim uzorkom ćelija (**Slika 3.10**). Ove promene su praćene značajnim smanjenjem procenta tretiranih HeLa ćelija u G1 fazi. Pored toga, izloženost jedinjenju **9a** u $2IC_{50}$ koncentraciji u trajanju od 24 h i IC_{50} koncentraciji u trajanju od 48 h dovela je do značajne akumulacije HeLa ćelija u S fazi, dok je statistički značajno povećanje procenta ćelija u S fazi primećeno u HeLa ćelijama tretiranim sa obe koncentracije jedinjenja **10a** u trajanju od 24 h ili 48 h. Tretman K562 ćelija IC_{50} koncentracijama ispitivanih tiosemikarbazona i tijadiazolina dovodio je do značajnog vremenski-zavisnog povećanja broja ćelija u subG1 fazi u odnosu na uzorak kontrolnih ćelija (izuzetak su jedinjenja **2a** i **8a** posle inkubacije u trajanju od 24 h). Pored toga, sva ispitivana jedinjenja primenjena pri $2IC_{50}$ koncentraciji dovela su do statistički značajnog povećanja procenta K562 ćelija u subG1 fazi pri inkubaciji u trajanju od 24 h kao i 48 h (**Slika 3.11**).

U ćelijama humane mijeloidne leukemije K562 tretman IC_{50} i $2IC_{50}$ koncentracijama mono-tiazolidin-4-ona **9a** u trajanju od 24 h i 48 h prouzrokovao je statistički značajno povećanje procenta ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa, kao i do značajnog povećanja u G2/M fazi ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim ćelijama (**Slika 3.11**). Takođe je evidentirano i značajno smanjenje procenta K562 ćelija u fazama G1 i S. Bis(tiazolidin-4-on) **10a** u obe primenjene koncentracije doveo je do značajne akumulacije K562 ćelija u subG1 i G2/M fazama ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Pored toga, primećen je i statistički značajan pad procenta K562 ćelija u G1 fazi, dok je redukovano broj ćelija u S fazi bio statistički značajan samo ukoliko je tretman trajao 24 h.

a)



b)



Slika 3.10. Promene u distribuciji HeLa ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

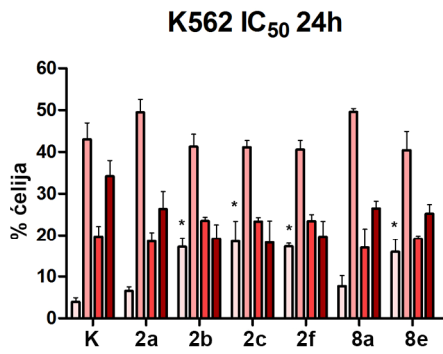
Analiza ćelijskog ciklusa je vršena na HeLa ćelijama koje su bile tretirane IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama a) mono-tiosemikarbazona **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, bis(tijadiazolina) **8a** i **8e**⁶¹ i

b) tiazolidin-4-ona **9a** i **10a**⁶³ u trajanju od 24 ili 48 h. Rezultati eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta.

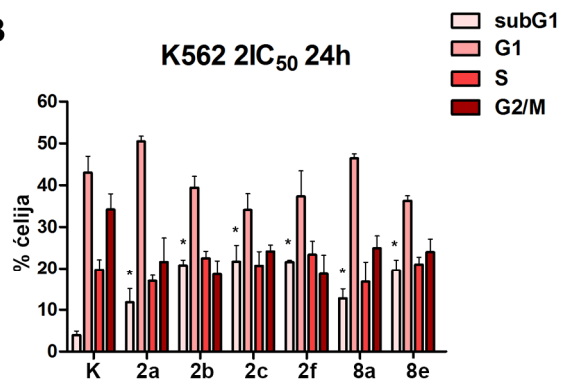
Za statističku obradu podataka je korišćen program ANOVA pri čemu su statistički značajne vrednosti ($p < 0,05$) označene zvezdicom (*).

a)

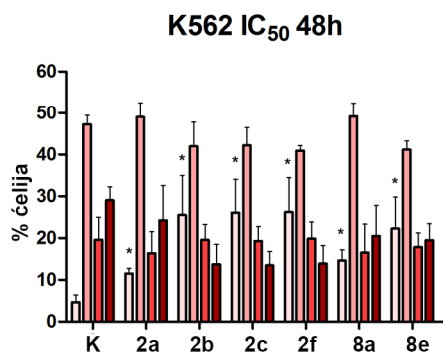
A



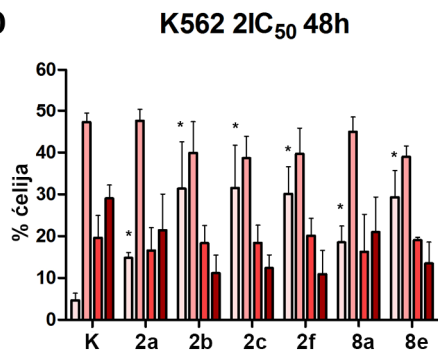
B



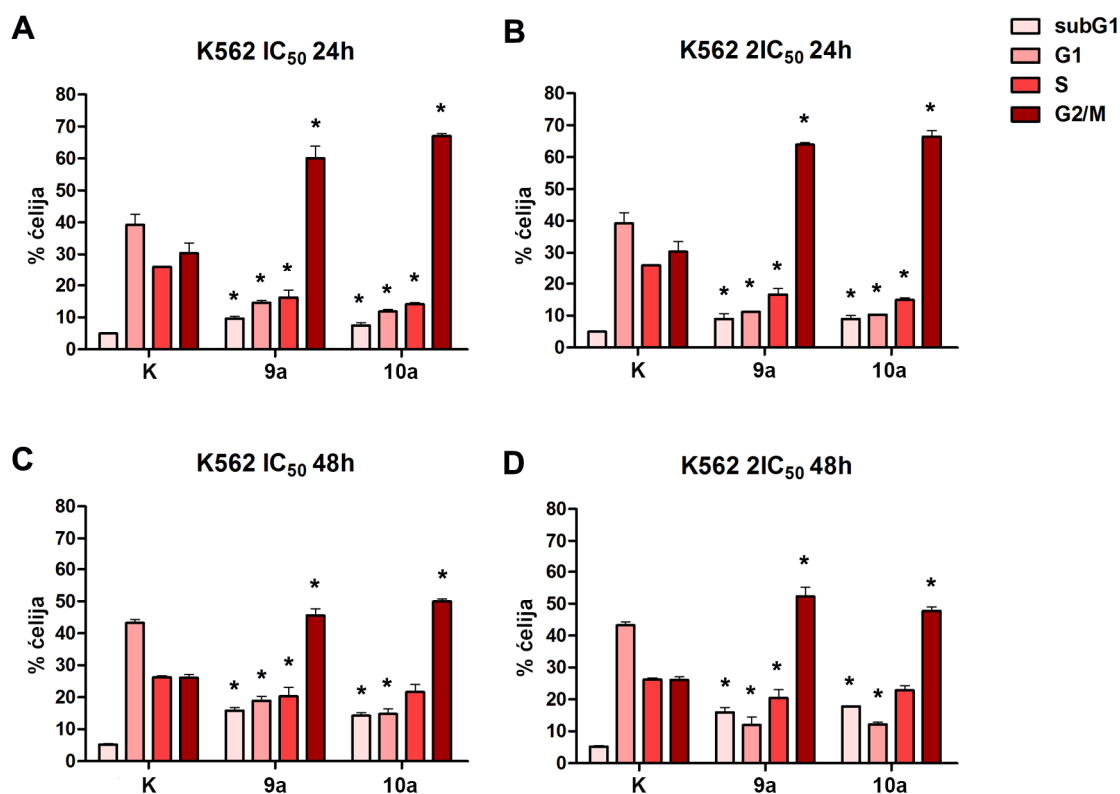
C



D



b)



Slika 3.11. Promene u distribuciji K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa.

Analiza ćelijskog ciklusa je vršena na K562 ćelijama tretiranim IC₅₀ ili 2IC₅₀ koncentracijama a) mono-tiosemikarbazona **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, bis(tijadiazolina) **8a** i **8e**⁶¹ i b) tiazolidin-4-ona **9a** i **10a**⁶³ u trajanju od 24 ili 48 h. Rezultati eksperimenta su predstavljeni kao srednja vrednost ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Program ANOVA je korišćen za statističku obradu podataka pri čemu su statistički značajne vrednosti (p < 0,05) označene zvezdicom (*).

3.2.4. Detekcija tipa ćelijske smrti HeLa ćelija

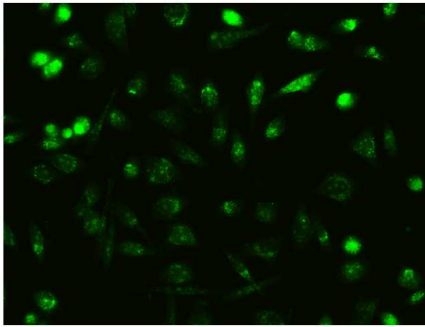
3.2.4.1. Morfološka analiza tipa ćelijske smrti fluorescentnom mikroskopijom

Tip ćelijske smrti koju indukuju jedinjenja **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, **8a** i **8e**, **9a** i **10a** na HeLa ćelijama ispitana je morfološkom analizom fluorescentnom mikroskopijom ciljnih ćelija obojenih smešom boja akridin-oranž i etidijum-bromid (**Slika 3.12**). Kao pozitivna kontrola korišćen je hemioterapeutik cisplatin.

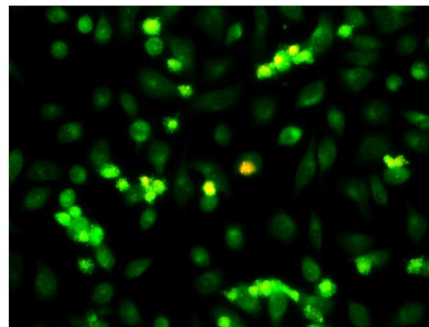
Na fotomikrografijama HeLa ćelija koje su bile tretirane $2IC_{50}$ koncentracijama (određene MTT testom nakon 72 h delovanja) steroidnih jedinjenja u trajanju od 24 h mogla su da se uoče tipična morfološka obeležja apoptoze - skupljanje ćelija, kondenzacija hromatina, smanjivanje i fragmentacija nukleusa, prisustvo narandžasto-crveno obojenih ćelija u kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze. Kružni oblik HeLa ćelija koji je zapažen pri tretmanu jedinjenjima **9a** i **10a** jednim delom je uzrokovan i zaustavljanjem u G2/M fazi ćelijskog ciklusa o čemu svedoči eksperiment analize ćelijskog ciklusa.

a)

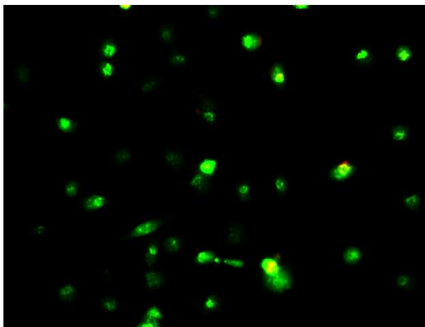
kontrola



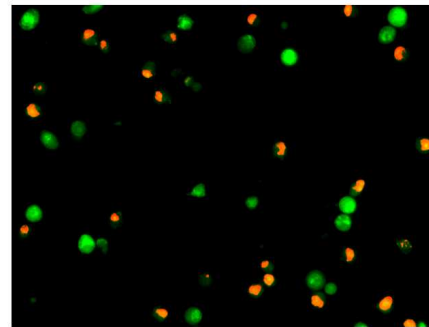
cisplatin



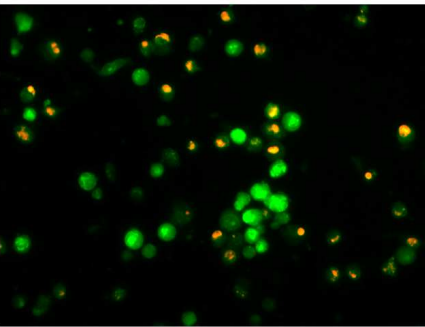
2a



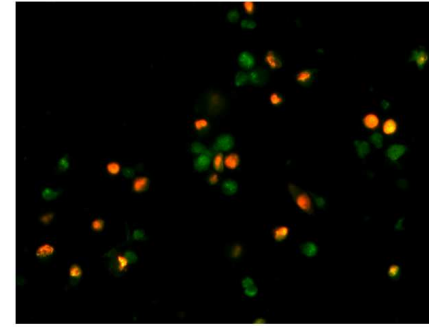
2b



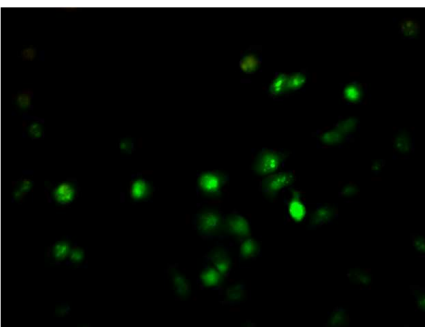
2c



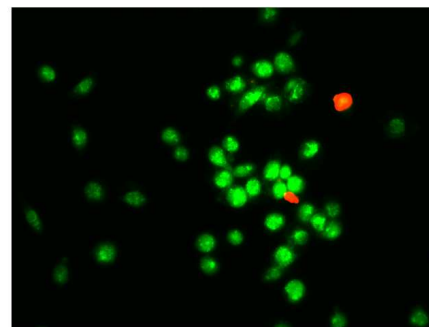
2f



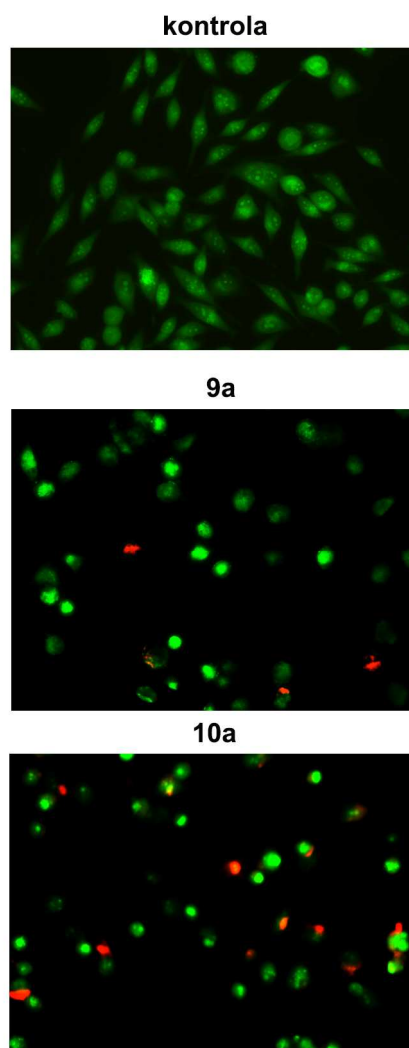
8a



8e



b)

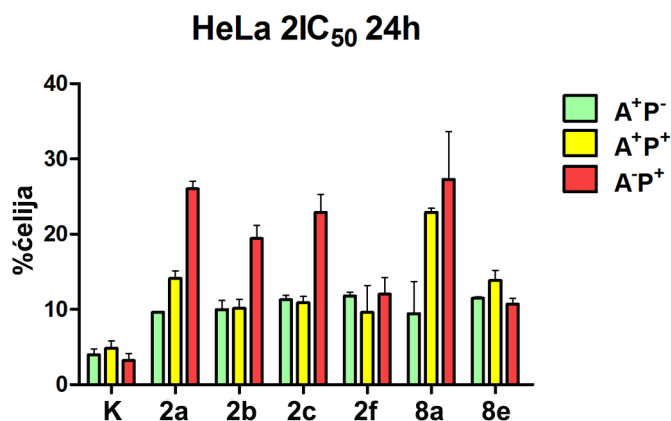


Slika 3.12. Indukovanje apoptoze HeLa ćelija mono-tiosemikarbazonima **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, bis(tijadiazolinima) **8a** i **8e**⁶¹ i tiazolidin-4-onima **9a** i **10a**.⁶³

3.2.4.2. Detekcija tipa ćelijske smrti protočnom citometrijom

Identifikacija HeLa ćelija u različitim stadijumima apoptoze indukovane ispitivanim steroidnim derivatima **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, **8a** i **8e** urađena je protočnom citometrijom nakon bojenja ćelija smešom boja aneksin V–FITC (A) i propidijum-jodid (P).⁶¹ Frakcija živih ćelija (A^-/P^-) koja nije prikazana na **Slici 3.13**. najzastupljenija je u netretiranim kontrolnim ćelijama. Tretman HeLa ćelija $2IC_{50}$ koncentracijama ovih steroidnih derivata je doveo do povećanja procenta ćelija u ranoj fazi apoptoze (A^+/P^-), ćelija u

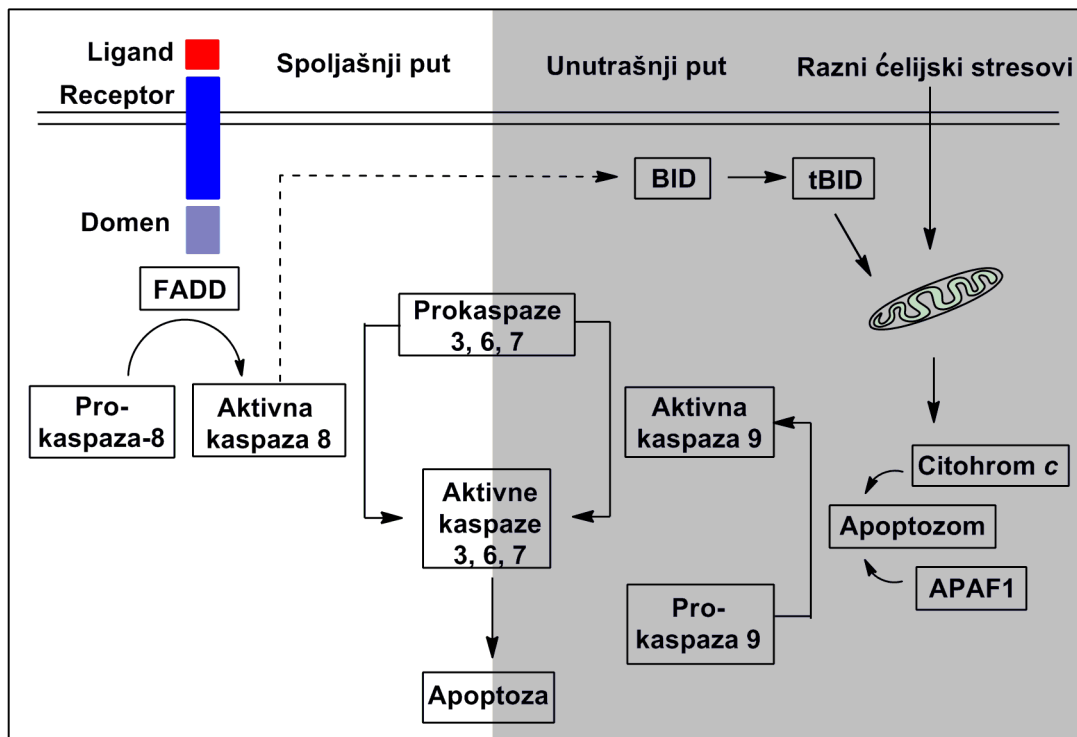
kasnoj fazi apoptoze ili sekundarne nekroze, (A^+/P^+), kao i mrtvih ćelija (A^-/P^+). Dakle, ovaj eksperiment je pokazao da novosintetisana jedinjenja prouzrokuju apoptozu HeLa ćelija.



Slika 3.13. Analiza protočnom citometrijom kontrolnih i tretiranih HeLa ćelija obojenih aneksin V–FITC-om i propidijum-jodidom. HeLa ćelije su bile tretirane 2IC₅₀ koncentracijama steroidnih tiosemikarbazona **2a**, **2b**, **2c**, **2f** i tijadiazolina **8a** i **8e** u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D. dva nezavisna eksperimenta.

3.2.5. Određivanje ciljnih kaspaza

Kaspaze, aspartat-specifične cistein-proteaze, izuzetno su značajni učesnici signalnih puteva apoptoze. Proizvode se u obliku neaktivnih monomernih prokaspaza koje zahtevaju dimerizaciju i razlaganje za aktivaciju. Od apoptotskih kaspaza -3, -8 i -9, kaspaze -8 i -9 su inicijatorske, dok je kaspaza-3 jedna od glavnih egzekutorskih (efektorskih) kaspaza. Kaspaza-8 je učesnik spoljašnjeg puta apoptoze koji pokreću ligandi koji se vezuju za receptore smrti. Kao posledica raznih ćelijskih stresova mitohondrije otpuštaju citohrom *c*, formira se apoptozom i na taj način se pokreće unutrašnji ili mitohondrijski put apoptoze posredstvom kaspaze-9 (**Slika 3.14**).^{77,78}

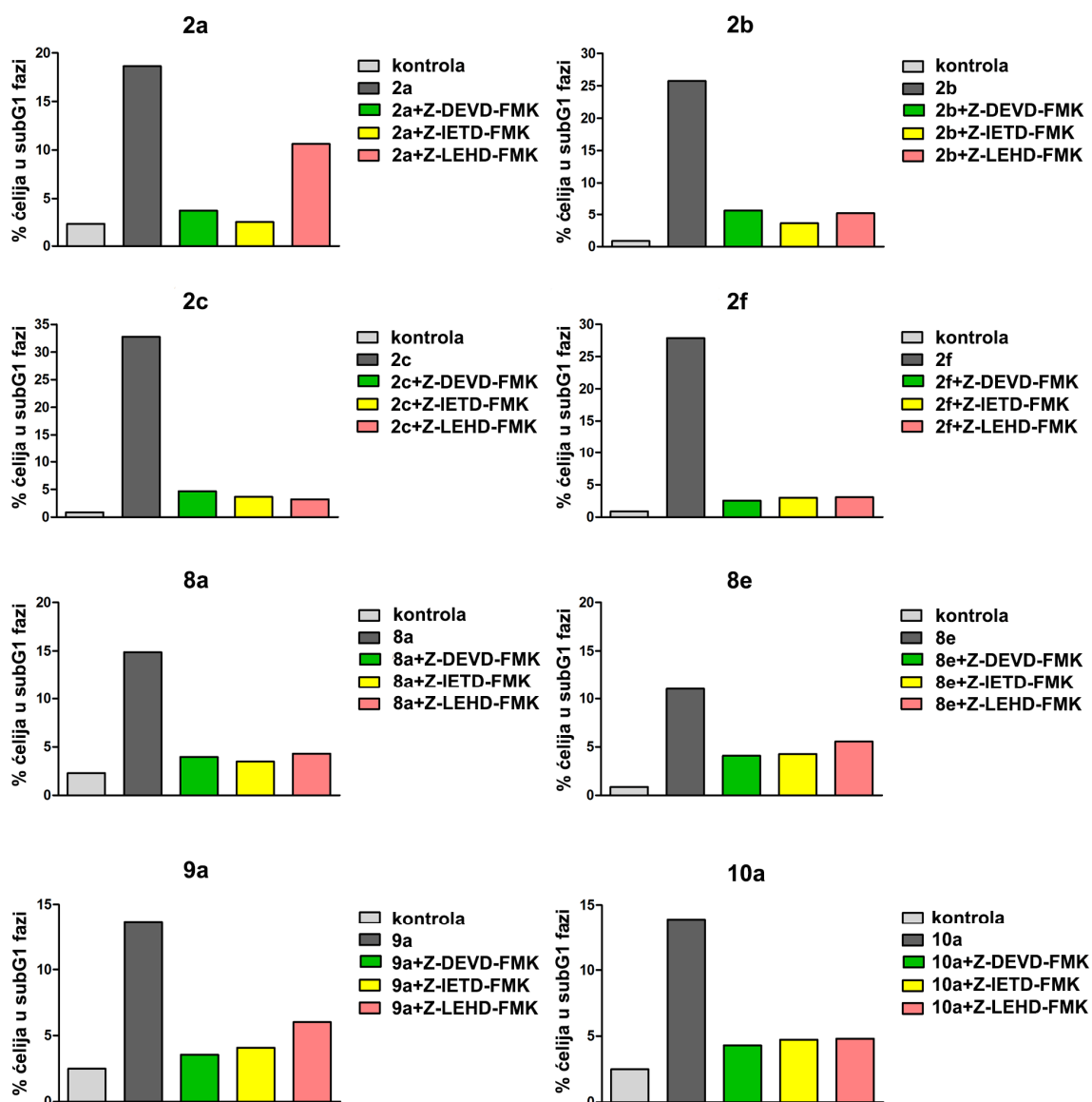


FADD – domen smrti povezan sa ligandom Fas; APAF1 – apoptotski proteazno aktivirajući faktor 1; BID – proapoptotski Bcl-2 protein koji sadrži samo BH₃ domen; tBID – kaspazom-8 aktivirani BID

Slika 3.14. Spoljašnji i unutrašnji put apoptoze

Odgovor na pitanje koje od apoptotskih kaspaza -3, -8 i -9 učestvuju u indukciji apoptoze HeLa ćelija izloženih dejstvu sintetisanih derivata steroidnih hidrazona dobijen je upotrebom specifičnih inhibitora tih kaspaza, fluormetilketoni derivatizovanih peptida, Z-DEVD-FMK (inhibitor kaspaze-3), Z-IETD-FMK (inhibitor kaspaze-8) i Z-LEHD-FMK (inhibitor kaspaze-9) pri čemu je meren procenat HeLa ćelija u subG1 fazi, odnosno procenat apoptotskih ćelija (**Slika 3.15**).

Za svako od ispitivanih steroidnih jedinjenja, pokazano je značajno smanjenje procenta HeLa ćelija u subG1 fazi u uzorcima koji su pretretirani specifičnim inhibitorom kaspaze-3, inhibitorom kaspaze-8, ili kaspaze-9, a zatim tretirani 2IC₅₀ koncentracijom jedinjenja, u odnosu na procenat HeLa ćelija u subG1fazi u uzorcima koji su tretirani samo jedinjenjem. Dakle, upotrebom bilo kojeg od tri korišćena inhibitora kaspaza povećano je preživljavanje HeLa ćelija što je dokaz da su ispitivana jedinjenja sposobna da posredstvom kaspaza aktiviraju kako spoljašnji tako i unutrašnji put apoptoze.



Slika 3.15. Određivanje ciljnih kaspaza, učesnika u signalnim putevima apoptoze, indukovanog najaktivnijim derivatima steroidnih hidrazona.

Efekat primene specifičnih inhibitora kaspaza (Z-DEVD-FMK – inhibitor kaspaze-3; Z-IETD-FMK – inhibitor kaspaze-8; Z-LEHD-FMK – inhibitor kaspaze-9) na procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa nakon tretiranja $2IC_{50}$ koncentracijama tiosemikarbazona **2a–c** i **2f**, tijadiazolina **8a** i **8e**⁶¹ kao i tiazolidin-4-ona **9a** i **10a**.⁶³

3.2.6. *In vitro* test za angiogenezu ili test građenja cevi od endotelnih ćelija

Kako bi maligna ćelija neometano dopremila nutrijente i kiseonik potrebne za opstanak ona teži da proširi i razgrana mrežu krvnih sudova odnosno započinje proces angiogeneze. Novonastali krvni sudovi su strukturno neorganizovani, prošireni i propustljivi tako da povećavaju verovatnoću metastaziranja tumora. Pored toga, luče materije koje sprečavaju proces apoptoze. Stoga je jedna od strategija borbe protiv malignih tumora upravo inhibiranje procesa angiogeneze. Inhibitori angiogeneze su manje toksični od standardno korišćenih hemioterapeutika i koriste se paralelno uz operaciju, hemioterapiju ili zračenje.²

Kada se humane endotelne ćelije pupčane vene, EA.hy926 ćelije, zaseju na površinu matriksnog matrigela one počinju da se šire, povezuju i reorganizuju tako da formiraju tubularne strukture nalik na kapilare i poligonalne strukture.⁷⁹ Ovaj esej primenjuje se za ispitivanje sposobnosti jedinjenja da inhibira proces angiogeneze *in vitro* odnosno za ispitivanje antiangiogenetskog potencijala jedinjenja.

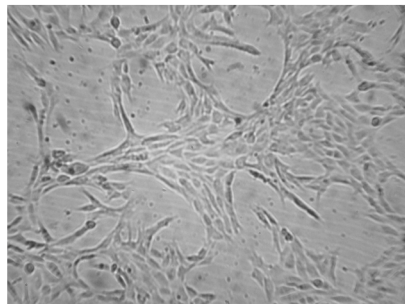
Reprezentativne fotomikrografije kontrolnih EA.hy926 ćelija i ćelija izloženih dvadesetočasovnom delovanju suptoksičnih IC₂₀ koncentracija novih najaktivnijih i najselektivnijih steroidnih derivata, tiosemikarbazona **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, tijadiazolina **8a** i **8e**⁶¹ i tiazolidin-4-ona **9a** i **10a**,⁶³ prikazane su na **Slici 3.16**.

Svi ispitivani tiosemikarbazoni i tijadiazolini su pokazali sposobnost da inhibiraju angiogenezu EA.hy926 ćelija *in vitro*. Najjaču antiangiogenetsku aktivnost među pomenutim jedinjenjima ispoljio je bis(tijadiazolin) **8a**. Mono-tiosemikarbazon **2a** takođe je pokazao izuzetan antiangiogenetski efekat, dok su preostala jedinjenja, mono-tiosemikarbazoni **2b**, **2c**, **2f** i naročito bis(tijadiazolin) **8e**, bila manje efikasna u inhibiranju angiogeneze.

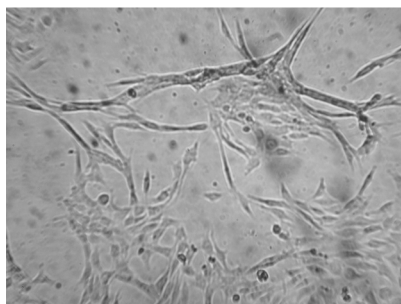
In vitro esej angiogeneze ukazao je na antiangiogenetske efekte tiazolidin-4-ona **9a** i **10a** primenjenih pri niskim suptoksičnim koncentracijama. Oba tiazolidin-4-ona inhibirala su širenje i povezivanje EA.hy926 ćelija kao i formiranje tubularnih struktura što svedoči o njihovom antiangiogenetskom potencijalu.

a)

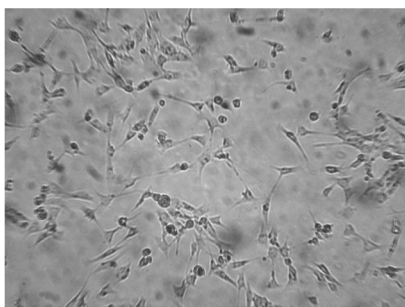
kontrola



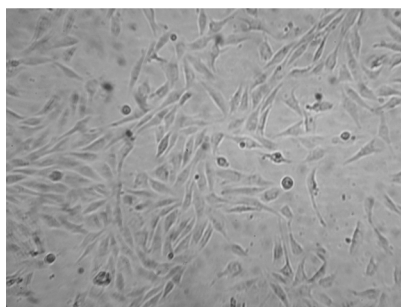
kontrola



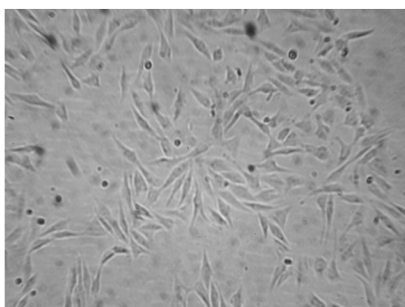
2a



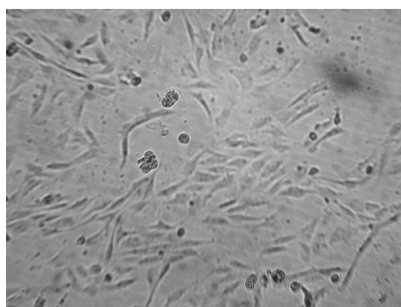
2b



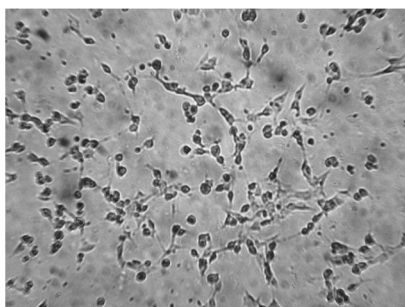
2c



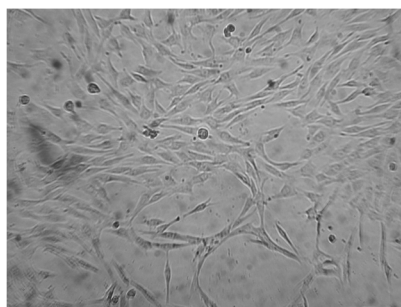
2f



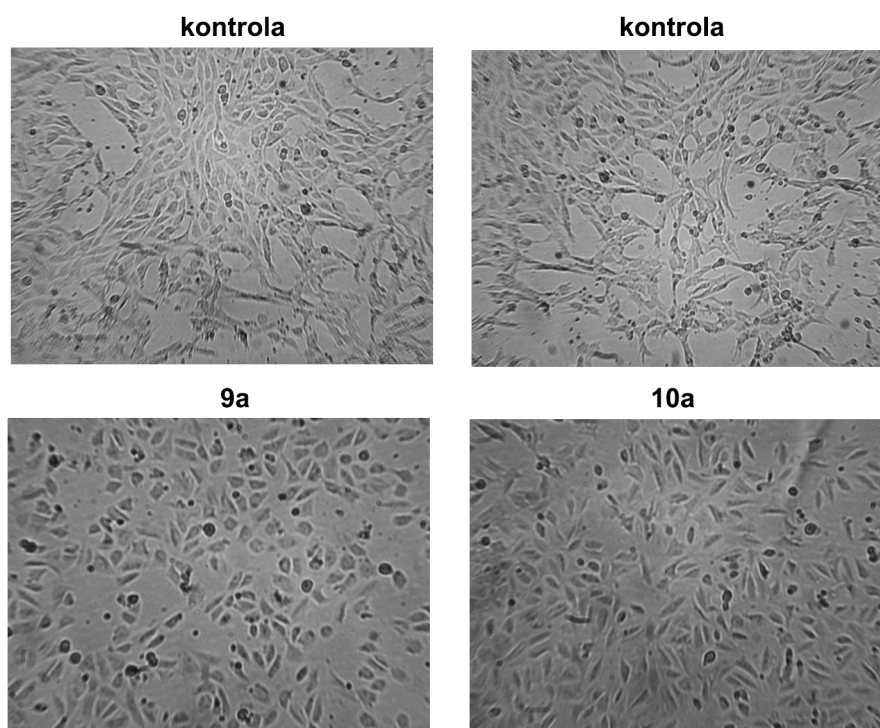
8a



8e



b)



Slika 3.16. Efekti derivata steroidnih hidrazona na *in vitro* angiogenezu EA.hy926 ćelija. Fotomikrografije kontrolnih EA.hy926 ćelija i ćelija izloženih suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama a) mono-tiosemikarbazona (**2a**, **2b**, **2c**, **2f**) i tijadiazolina (**8a**, **8e**) i b) tiazolidin-4-ona (**9a**, **10a**) u trajanju od 20 h.

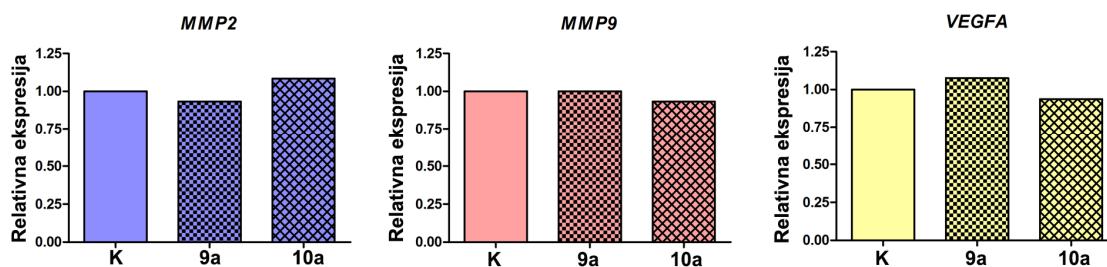
3.2.7. Efekat steroidnih derivata na ekspresiju gena u HeLa ćelijama

Matriksne metaloproteinaze (MMP) su familija cink-zavisnih proteinaza čiji su predstavnici MMP-2 i MMP-9. Ovi proteini se aktiviraju hidrolizom. Geni *MMP-2* i *MMP-9* kodiraju enzime koji vrše degradaciju kolagena tipa IV, glavne strukturne komponente bazalne membrane, i samim tim utiču na svojstva bazalne membrane da ometa pokretljivost malignih ćelija. Istraživanja su pokazala da MMP-2 i MMP-9 igraju ključnu ulogu u degradaciji ekstracelularnog matriksa kao i u promovisanju invazije tumora i metastaziranja.⁸⁰

Kako bi maligna ćelija obezbedila kiseonik i nutrijente neophodne za opstanak i rast, ona formira mrežu kapilara iz postojećih krvnih sudova odnosno aktivira proces angiogeneze. *VEGFA* je gen koji kodira protein vaskularnog endotelnog faktora rasta A.

Spada u najmoćnije specifične angiogene faktore, a aktivan je u formi glikozilovanog homodimernog proteina. *VEGFA* inhibira apoptozu i dovodi do proliferacije endotelnih ćelija, njihove migracije, organizovanja u tubule i povećanja permeabilnosti što su sastavni delovi angiogene kaskade.⁸¹

U cilju istraživanja antimetastatskih i antiangiogenetskih svojstava novih steroidnih tiazolidin-4-onskih derivata **9a** i **10a**, ispitan je njihov uticaj na ekspresiju gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u HeLa ćelijama. Poređen je nivo ekspresije kontrolnih gena kod HeLa ćelija tretiranim steroidnim tiazolidin-4-onima (Slika 3.17). Tretman jedinjenjima **9a** i **10a** jedva da je uticao na nivoe ekspresije gena *MMP2* i *MMP9*. Pored toga, ova jedinjenja nisu uzrokovala značajne izmene ekspresije gena proangiogenog faktora rasta *VEGFA* u HeLa ćelijama. Dakle, ispitivani tiazolidin-4-oni ne podstiču angiogenezu niti povećavaju verovatnoću nastanka metastaza.



Slika 3.17. Nivo ekspresije gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u kontrolnim HeLa ćelijama (K) i HeLa ćelijama izloženim suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **9a** i **10a** u trajanju od 24 h.

3.2.8. Antioksidativni test: hvatanje slobodnih radikala (DPPH metoda)

Sposobnost sintetisanih tiazolidin-4-ona da hvataju radikale je ispitana DPPH testom (Tabela 3.27). Rezultati eksperimenta su pokazali da jedinjenja **9a**, **9e**, **9f**, **10a**, **10d** i **10e** ispoljavaju izvesnu antioksidativnu aktivnost, iako daleko slabiju od askorbinske kiseline (AK) koja je služila kao pozitivna kontrola.⁶³

Tabela 3.27. Antioksidativna aktivnost (IC₅₀/mM) sintetisanih tiazolidin-4-ona ispitana DPPH testom.

Jedinjenje	IC ₅₀ (mM)
9a	18,83
9b	/
9c	/
9d	/
9e	4,33
9f	40,48
10a	17,54
10b	/
10c	/
10d	10,06
10e	42,48
10f	/
AK	0,08

AK – askorbinska kiselina

3.2.9. „Brine shrimp” test toksičnosti

Ovaj eksperiment je poznat kao siguran, praktičan i ekonomski isplativ metod za *in vivo* određivanje bioaktivnosti sintetičkih jedinjenja⁸² za čije rezultate se smatra da su u dobroj korelaciji sa rezultatima testova za određivanje citotoksičnosti.⁸³

Opšta toksičnost odabranih derivata steroidnih hidrazona je ispitana na jedinkama račića *Artemia salina* u odnosu na lek cisplatin kao pozitivnu kontrolu.^{23,83} Kako su jedinjenja **5f** i **11d** izuzetno slabo rastvorna nije bilo moguće ispitivanje njihove toksičnosti ovim testom. Prema rezultatima navedenim u **Tabeli 3.28** sva ispitivana jedinjenja su manje toksična od cisplatina. Najvišu toksičnost prema račićima ispoljili su karbazatni estri (**11a–f**, LC₅₀ 0,027–0,151 mM), za njima su sledili semikarbazoni (**4a–f**, **6d** i **5a–f**, LC₅₀ 0,094–0,196 mM) i bis-tijadiazolini (**8a–f**, LC₅₀ 0,213–0,380 mM), dok su se kao manje toksični pokazali mono-tijadiazolini (**7a–f**, LC₅₀ 0,299–0,874 mM) i tiosemikarbazoni (**2a–f** i **3a–f**, LC₅₀ 0,300–0,670 mM). Karbazatni estri **11b** i **11c** (0,027 i 0,032 mM) i bis(semikarbazon) **5d** (0,094 mM) su pokazali najznačajniju toksičnost u ovom testu.^{62,63}

Tabela 3.28. Rezultati „*Brine shrimp*” testa toksičnosti za sva ispitivana jedinjenja.

Jedinjenje	LC ₅₀ (mM)	Jedinjenje	LC ₅₀ (mM)
2a	0,597	8c	0,327
2b	0,439	8e	0,224
2c	0,663	8f	0,380
2d	0,551	4a	0,124
2e	0,386	4b	0,172
2f	0,670	4c	0,196
3a	0,599	4d	0,134
3b	0,465	4f	0,135
3c	0,420	5a	0,179
3d	0,481	5b	0,120
3f	0,300	5c	0,158
7a	0,601	5d	0,094
7b	0,579	5f	n.o.
7c	0,874	6d	0,147
7d	0,561	11a	0,122
7e	0,299	11b	0,027
7f	0,430	11c	0,032
8a	0,213	11d	n.o.
8b	0,273	11f	0,151
Cisplatin	0,006	Cisplatin	0,006

n.o. – nije određivano

U skladu sa očekivanjima, ispostavilo se da postoji dobra korelacija između rezultata „*brine shrimp*” testa sa jedne strane i visoke citotoksičnosti bis(tijadiazolina) **8a–f** prema HeLa i MDA-MB-453 ćelijskim linijama sa druge strane. Takođe, dobri rezultati „*brine shrimp*” testa za semikarbazone i njihove derivate u korelaciji su sa antimikrobnom aktivnošću najaktivnijih jedinjenja, **11b**, **11c**, **5d**.

3.2.10. Antimikrobna aktivnost

3.2.10.1. Antimikrobna aktivnost tiosemikarbazona i tijadiazolina

In vitro antimikrobna aktivnost dobijenih tiosemikarbazona i tijadiazolina je testirana na Gram-pozitivnim bakterijama (*Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Clostridium sporogenes* i *Bacillus subtilis*), Gram-negativnim bakterijama (*Escherichia coli*, *Proteus hauseri*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis) kao i na gljivicama (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Aspergillus brasiliensis*) metodom difuzije u bunaru u agaru (**Tabela 3.29**).⁸⁴

Tabela 3.29. Antimikrobna aktivnost tiosemikarbazona (**2a–f**, **3a–f**) i tijadiazolina (**7a–f**, **8a–f**)⁶¹

Jed.	Zona inhibicije (mm)										
	Gram-pozitivne bakterije				Gram-negativne bakterije				Gljivice i kvasci		
	<i>S. a.</i>	<i>K. r.</i>	<i>C. s.</i>	<i>B. s.</i>	<i>E. c.</i>	<i>P. h.</i>	<i>P. a.</i>	<i>S. e.</i>	<i>C. a.</i>	<i>S. c.</i>	<i>A. b.</i>
2a	/	12	10	/	/	/	10	10	/	/	10
2b	/	10	10	/	/	10	10	/	10	/	12
2c	/	/	10	/	/	10	10	/	/	/	10
2d	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10
2f	10	12	12	12	10	12	12	12	12	10	12
3a	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10
3b	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	12
3c	/	/	/	/	/	/	/	/	12	12	10
3d	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10
3f	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
7a	/	/	10	/	/	/	10	/	/	/	12
7b	/	12	10	/	10	10	10	/	10	12	10
7c	10	10	/	/	/	/	10	/	10	10	9
7d	/	10	/	/	/	/	10	/	9	10	10
7e	12	10	12	10	10	10	12	12	10	10	10
7f	/	10	/	/	/	10	/	/	9	9	10
8a	/	10	10	/	/	/	10	10	/	/	12
8b	/	10	/	/	/	12	10	/	12	10	10
8c	14	/	10	12	/	10	10	12	/	/	12
8e	/	10	10	12	10	10	/	10	10	12	10
8f	14	10	/	/	/	10	10	10	10	10	10
Amikacin	32	22	20	22	42	24	20	24	n.o.	n.o.	n.o.
Nistatin	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	n.o.	34	56	32

n.o. – nije određivano

S. a. - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *K. r.* - *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341); *C. s.* - *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404); *B. s.* - *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); *E. c.* - *Escherichia coli* (ATCC 25922); *P. h.* - *Proteus hauseri* (ATCC 13315); *P. a.* - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027); *S. e.* - *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076); *C. a.* - *Candida albicans* (ATCC 10231); *S. c.* - *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763); *A. b.* - *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)

Sintetisani tiosemikarbazoni i tijadiazolini, osim bis(tiosemikarbazona) **3a–f**, ispoljili su inhibitornu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama *K. rhizophila* i *C. sporogenes* kao i prema Gram-negativnoj bakteriji *P. aeruginosa*. U svim slučajevima zone inhibicije bile su daleko manje od zona izmerenih za amikacin.

Sva ispitivana jedinjenja, osim bis(tiosemikarbazona) **3f**, ispoljila su izvesnu aktivnost prema gljivici *A. brasiliensis*. Jedinjenja **2b**, **2f**, **3c**, **7b–f**, **8b**, **8e** i **8f** ispoljila su inhibitornu aktivnost, iako slabu, prema dve preostale testirane vrste gljiva, *C. albicans* i *S. cerevisiae*.

3.2.10.2. Antimikrobna aktivnost semikarbazona i njihovih derivata

Rezultati *in vitro* ispitivanja antimikrobne aktivnosti novih semikarbazona i karbazatnih estara izvedenih iz mono-semikarbazona metodom difuzije u bunaru u agaru prema Gram-pozitivnoj bakteriji *Clostridium sporogenes*, Gram-negativnoj bakteriji *Pseudomonas aeruginosa* i prema gljivici *Aspergillus brasiliensis* su prikazani u **Tabeli 3.30.**⁶²

Tabela 3.30. Antimikrobna aktivnost semikarbazona i njihovih derivata

Jedinjenje	Zona inhibicije (mm)		
	<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
4a	/	/	/
4b	/	/	/
4c	/	/	/
4d	12	10	10
4f	/	/	/
5a	10	10	10
5b	/	/	/
5c	/	/	/
5d	16	14	10
5f	n.o.	n.o.	n.o.
6d	10	10	10
11a	10	10	12
11b	18	16	30
11c	12	14	28
11d	n.o.	n.o.	n.o.
11f	12	10	10
Amikacin	22	20	n.o.
Nistatin	n.o.	n.o.	30

n.o. – nije određivano

Razlog što antimikrobna aktivnost bis(semikarbazona) **5f** i karbazatnog estera **11d** nije određivana je njihova izuzetno slaba rastvorljivost. Amikacin je korišćen kao pozitivna kontrola za bakterije, a nistatin za gljivice. Koncentracija rastvora pozitivnih kontrola su bile 33 puta niže od koncentracije rastvora ispitivanih jedinjenja.

Svi testirani karbazatni estri (**11a–f**) kao i semikarbazoni **4d**, **5a**, **5d** i **6d** ispoljili su izvesnu inhibitornu aktivnost prema testiranim bakterijama. Najznačajniju antifungalnu aktivnost su ispoljili karbazatni estri **11b** i **11c**. Ipak, njihova aktivnost naizgled u nivou kontrolnog antimikotika nistatina zapravo je 33 puta niža jer su rastvori ispitivanih jedinjenja toliko puta razblaženiji.

4. Eksperimentalni deo

4.1. Hemija

4.1.1. Generalne metode

Sve korišćene hemikalije i rastvarači su bili analitičke čistoće i komercijalno dostupni. Rastvarači su za upotrebu bili pripremljeni prema standardnim procedurama. Polazni steroidni derivati (Galenika, Beograd), 19-norandrost-4-en-3,17-dion (**1a**), androst-4-en-3,17-dion (**1b**), androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion (**1c**), 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-dion (**1d**) i progesteron (**1f**), pre upotrebe su prekrystalisani iz odgovarajućih rastvarača. Acetilovanjem jedinjenja **1d** dobijen je 11 α -acetoksiandrost-4-en-3,17-dion (**1e**).

Uklanjanje rastvarača je izvedeno pod sniženim pritiskom. Tok reakcija je praćen hromatografijom na tankom sloju (TLC) na aluminijumskim pločama presvučenim slojem silika-gela 60 F₂₅₄ (Merck) uz dvostruko razvijanje u različitim sistemima rastvarača. Hromatogrami su posmatrani pod ultraljubičastom (UV) lampom na talasnoj dužini od 254 nm, a zatim su TLC mrlje detektovane izazivanjem pomoću 50%-tnog vodenog rastvora sumporne kiseline posle kojeg je sledilo zagrevanje. Flash hromatografija (FCC) je rađena na stubu silika-gela dimenzija 0,04–0,063 mm (Merck) uz upotrebu različitih eluenata.

Tačke topljenja (t.t.) su određene pomoću digitalnog uređaja WRS-1B i nisu korigovane. Ugao optičke rotacije ($[\alpha]_D$) je određen na automatskom polarimetru Rudolph Research Analytical Autopol IV na 20 °C. Infracrveni (IR) spektri su snimljeni na PerkinElmer 1725X FT-IR spektrometru ATR tehnikom u opsegu talasnih brojeva 4000–400 cm⁻¹. Nuklearno-magnetno-rezonantni (NMR) spektri su snimljeni na Varian Gemini-200 MHz spektrometru (¹H na 200 MHz, ¹³C na 50 MHz) ili na Bruker Avance-500 MHz spektrometru (¹H na 500 MHz, ¹³C na 125 MHz) na sobnoj temperaturi uz korišćenje tetrametilsilana (TMS) kao internog standarda. Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm, konstante kuplovanja (J) u MHz, a multiplicitet spina predstavljen je simbolima: s (singlet), d (dublet), t (triplet), k (kvartet), m (multiplet), š (širok signal). Maseni spektri visokog razlaganja (HRMS) su snimljeni na Agilent 6210 LC ESI-TOF-MS ili Thermo Scientific HESI-LTQ Orbitrap XL spektrometru, pri čemu dobijeni

signali predstavljaju odnos mase i naelektrisanja nastalih jona (m/z). Elementalna analiza je urađena na GmbH Elementar Analysensysteme aparatu VARIO EL III C.H.N.O.S.

4.1.2. Generalna procedura za sintezu tiosemikarbazona

U rastvor 3-okso- α,β -nezasićenih steroida (**1a-f**) (3,16 mmol) u suvom etanolu (150 ili 300 mL) dodat je tiosemikarbazid (3,16 ili 6,3 mmol). Reakciona smeša je refluktovala 5 h uz mešanje i praćena je TLC-om. pH vrednost reakcione smeše je održavana na približno 4,5 dodatkom glacijalne sirćetne kiseline (oko 5 mL). Po završetku reakcije rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Ostatak je kristalisan ili hromatografisan FCC tehnikom upotrebom različitih eluenata. U svim slučajevima reakcioni proizvodi su dobijeni u vidu smeše dva diastereoizomera (*E* i *Z*) koji nisu razdvojeni. Svi spektralni podaci su snimljeni korišćenjem tako dobijenih smeša.⁶¹

4.1.2.1. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2a)

Polazeći od 860 mg 19-norandrost-4-en-3,17-diona (**1a**), eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 80 : 20 izolovan je proizvod **2a** (*E* : *Z* = 2 : 1, 727 mg, 66,7%). R_f = 0,66 (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). t.t. > 218 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3422, 3246 (NH^A), 1732 (C(17)=O), 1586, 1497 (C(3)=N), 1285 (C=S^A). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₁₉H₂₇N₃OS izračunata m/z vrednost jona [M+H]⁺ je bila 346,1948, a nađena 346,1939.

(**2a-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,82 (m, 1H, H-9), 0,93 (s, 3H, H₃C-18), 1,09 (m, 1H, H α -7), 1,23–1,41 (m, 4H, H α -11, H β -11, H α -12, H-14), 1,46 (dk, J = 3, 12 Hz, 1H, H-8), 1,56 (m, 1H, H β -15), 1,77–2,14 (m, 7H, H α -1, H β -2, H β -7, H-10, H β -12, H α -15, H α -16), 2,19–2,31 (m, 2H, H β -1, H α -6), 2,47 (dd, J = 19,0, 9,0 Hz, 1H, H β -16, delimično preklopljen sa H β -6), 2,50 (m, 1H, H β -6), 2,65 (dt, J = 16,0, 4,0 Hz, 1H, H α -2), 5,92 (s, 1H, H-4), 6,36 i 7,24 (2šs, 2H, NH₂^A), 8,71 (s, 1H, NH^A).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,72 (m, 1H, H-9), 0,86 (s, 3H, H₃C-18), 0,98 (kd, J = 12, 4 Hz, 1H, H α -7), 1,12–1,33 (m, 4H, H α -1, H α -11, H α -12, H-14), 1,42–1,56 (m, 2H, H-8, H α -15), 1,64 (d, J = 11,5 Hz, 1H, H β -12), 1,76–1,92 (m, 4H, H β -1, H β -2, H β -7, H α -15), 1,96–2,05 (m, 2H, H β -11, H α -16), 2,21 (dsd, J = 4 Hz, 1H, H α -6), 2,37–2,45

(m, 2H, H β -6, H β -16), 2,50 (m, 1H, H β -6), 2,82 (dt, $J = 16,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 5,87 (s, 1H, H-4), 7,51 i 8,03 (2 šs, 2H, NH $_2^A$), 10,07 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl $_3$): 220,6 (s, C-17), 178,4 (s, C=S A), 153,2 (s, C-5), 150,5 (s, C-3), 121,4 (d, C-4), 50,2 (d, C-14), 49,4 (d, C-9), 47,7 (s, C-13), 41,6 (d, C-10), 39,9 (d, C-8), 35,7 (t, C-16), 34,6 (t, C-6), 31,3 (t, C-12), 29,9 (t, C-7), 25,9 (t, C-11), 25,8 (t, C-1), 22,7 (t, C-2), 21,5 (t, C-15), 13,7 (k, C-18).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 219,7 (s, C-17), 178,2 (s, C=S A), 152,0 (s, C-5), 150,9 (s, C-3), 121,6 (s, C-4), 49,5 (d, C-14), 49,1 (d, C-9), 47,2 (s, C-13), 40,9 (d, C-10), 39,2 (d, C-8, preklopljen signalom za DMSO), 35,3 (t, C-16), 34,3 (t, C-6), 31,2 (t, C-12), 29,7 (t, C-7), 25,8 (t, C-11), 25,3 (t, C-1), 23,3 (t, C-2), 21,3 (t, C-15), 13,5 (k, C-18).

(**2a-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl $_3$): 0,84 (m, 1H, H-9), 0,93 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 1,12 (m, 1H, H α -7), 1,23–1,41 (m, 4H, H α -11, H β -11, H α -12, H-14), 1,46 (dk, $J = 3,0, 12,0$ Hz, 1H, H-8), 1,56 (m, 1H, H β -15), 1,77–2,14 (m, 7H, H α -1, H β -2, H β -7, H-10, H β -12, H α -15, H α -16), 2,19–2,31 (m, 2H, H β -1, H α -6), 2,40 (dt, $J = 15,0, 4,0$ Hz, 1H, H α -2), 2,47 (dd, $J = 19,0, 9,0$ Hz, 1H, H β -16), 2,50 (m, 1H, H β -6), 6,19 (s, 1H, H-4), 6,31 i 7,22 (2 šs, 2H, NH $_2$), 8,90 (s, 1H, NH).

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,72 (m, 1H, H-9), 0,86 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 0,98 (kd, $J = 12, 4$ Hz, 1H, H α -7), 1,12–1,33 (m, 4H, H α -1, H α -11, H α -12, H-14), 1,42–1,56 (m, 2H, H-8, H α -15), 1,64 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H, H β -12), 1,76–1,92 (m, 3H, H β -1, H β -7, H α -15), 1,96–2,05 (m, 3H, H β -2, H β -11, H α -16), 2,21 (dsd, $J = 4$ Hz, 1H, H α -6), 2,31 (dt, $J = 15, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 2,37–2,45 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,50 (m, 1H, H β -6), 6,70 (s, 1H, H-4), 7,51 i 7,95 (2 šs, 2H, NH $_2^A$), 10,32 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl $_3$): 220,5 (s, C-17), 178,3 (s, C=S A), 158,6 (s, C-5), 149,5 (s, C-3), 111,2 (d, C-4), 50,1 (d, C-14), 50,0 (d, C-9), 47,7 (s, C-13), 43,2 (d, C-10), 40,0 (d, C-8), 35,8 (t, C-6), 35,7 (t, C-16), 31,3 (t, C-12), 30,4 (t, C-7), 30,1 (t, C-2), 25,9 (t, C-11), 25,5 (t, C-1), 21,5 (t, C-15), 13,7 (k, C-18).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 219,7 (s, C-17), 178,0 (s, C=S A), 156,2 (s, C-5), 148,2 (s, C-3), 113,2 (s, C-4), 49,4 (d, C-14), 48,9 (d, C-9), 47,2 (s, C-13), 42,1 (d, C-10), 39,2 (d, C-8, preklopljen signalom za DMSO), 35,3 (t, C-16), 34,9 (t, C-6), 31,2 (t, C-12), 30,0 (t, C-7), 27,1 (t, C-2), 25,8 (t, C-11), 25,1 (t, C-1), 21,3 (t, C-15), 13,5 (k, C-18).

Daljim eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 60 : 40 je izolovano jedinjenja **3a** (79,4 mg, 12%).

4.1.2.2. 19-Norandrosteron-4-en-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (3a)

Polazeći od 860 mg 19-norandrosteron-4-en-3,17-diona (**1a**), eluiranjem reakcione smeše sistemom PhMe : EtOAc = 80 : 20 izolovan je proizvod **2a** (*E* : *Z* = 2 : 1, 115,5 mg, 10,6%). Daljim eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 60 : 40 izolovano je jedinjenje **3a** (723 mg, 55,0%). $R_f = 0,46$ (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). t.t. > 127 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3421, 3240 (NH^{A,D}), 1583, 1496 (C(3/17)=N), 1282 (C=S^{A,D}). ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulska formulu C₂₀H₃₀N₆S₂ izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ je bila 419,2046, a nađena 419,2034.

(**3a-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,81 (m, 1H, H-9), 0,94 (s, 3H, H₃C-18), 1,08 (m, 1H, H α -7), 1,20 (m, 1H, H-14), 1,24–1,46 (m, 4H, H-8, H α -11, H β -11, H α -12), 1,51 (m, 1H, H β -15), 1,81–2,12 (m, 6H, H α -1, H β -2, H β -7, H-10, H β -12, H α -15), 2,17–2,34 (m, 3H, H β -1, H α -6, H α -16), 2,41–2,54 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,67 (dt, *J* = 16,0, 4,0 Hz, 1H, H α -2), 5,91 (s, 1H, H-4), 6,50 i 7,26 (2 šs, 2H, NH₂^A), 6,53 i 7,18 (2 šs, 2H, NH₂^D), 8,49 (s, 1H, NH^D), 8,83 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 178,7 (s, C=S^D), 178,3 (s, C=S^A), 167,0 (s, C-17), 153,1 (s, C-5), 150,7 (s, C-3), 121,3 (d, C-4), 52,1 (d, C-14), 49,5 (d, C-9), 44,8 (s, C-13), 41,6 (d, C-10), 39,7 (d, C-8), 34,8 (t, C-6), 33,7 (t, C-12), 30,4 (t, C-7), 26,2 (t, C-16), 26,0 (t, C-11), 25,8 (t, C-1), 23,2 (t, C-15), 22,8 (t, C-2), 17,0 (k, C-18).

(**3a-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,83 (m, 1H, H-9), 0,94 (s, 3H, H₃C-18), 1,10 (m, 1H, H α -7), 1,20 (m, 1H, H-14), 1,24–1,46 (m, 4H, H-8, H α -11, H β -11, H α -12), 1,51 (m, 1H, H β -15), 1,81–2,12 (m, 6H, H α -1, H β -2, H β -7, H-10, H β -12, H α -15), 2,17–2,34 (m, 3H, H β -1, H α -6, H α -16), 2,40 (dt, *J* = 14,5, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 2,41–2,54 (m, 2H, H β -6, H β -16), 6,22 (s, 1H, H-4), 6,45 i 7,23 (2 šs, 2H, NH₂^A), 6,53 i 7,18 (2 šs, 2H, NH₂^D), 8,49 (s, 1H, NH^D), 9,05 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 178,7 (s, C=S^D), 178,2 (s, C=S^A), 167,0 (s, C-17), 158,4 (s, C-5), 149,7 (s, C-3), 111,4 (d, C-4), 52,0 (d, C-14), 50,0 (d, C-9), 44,8 (s, C-13), 43,2 (d, C-10), 39,8 (d, C-8), 35,8 (t, C-6), 33,7 (t, C-12), 30,2 (t, C-7), 26,2 (t, C-16), 26,0 (t, C-11), 25,7 (t, C-1), 23,2 (t, C-15), 22,8 (t, C-2), 17,0 (k, C-18).

4.1.2.3. Androst-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2b)

Polazeći od 860 mg androst-4-en-3,17-diona (**1b**), eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 80 : 20 izolovan je proizvod **2b** (*E* : *Z* = 3 : 1, 727 mg, 67,4%). R_f = 0,60 (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). t.t. > 208 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 3418, 3252 (NH^A), 3149, 2939, 1731 (C(17)=O), 1599, 1504 (C(3)=N), 1266 (C=S^A), 735. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{OS}$ izračunata m/z vrednost jona $[\text{M}+\text{H}]^+$ je bila 360,2104, a nađena 360,2115.

(**2b-E**). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 0,91 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,93 (m, 1H, H-9, delimično prekriven signalom za $\text{H}_3\text{C-18}$), 1,05 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,10 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,23–1,33 (m, 2H, H-14, $\text{H}\alpha\text{-12}$), 1,40–1,50 (m, 2H, $\text{H}\beta\text{-11}$, $\text{H}\alpha\text{-1}$), 1,56 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-15}$), 1,62–1,76 (m, 2H, H-8, $\text{H}\alpha\text{-11}$), 1,82–2,03 (m, 4H, $\text{H}\beta\text{-1}$, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\beta\text{-7}$, $\text{H}\alpha\text{-15}$), 2,09 (dd, $J = 9,0, 19,0$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 2,17 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-2}$), 2,30–2,38 (m, 2H, $\text{H}\alpha\text{-6}$, $\text{H}\beta\text{-6}$), 2,48 (dd, $J = 8,5, 19,0$ Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-16}$), 2,62 (dt, $J = 16,0, 3,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-2}$), 5,82 (s, 1H, H-4), 6,41 i 7,25 (šs i m, 2H, NH_2^A), 8,74 (s, 1H, NH^A).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): 220,5 (s, C-17), 178,3 (s, C=S^A), 157,9 (s, C-5), 150,1 (s, C-3), 120,5 (d, C-4), 53,6 (d, C-9), 50,9 (d, C-14), 47,4 (s, C-13), 37,9 (s, C-10), 35,7 (t, C-16), 35,2 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 32,2 (t, C-6), 31,3 (t, C-12), 30,8 (t, C-7), 21,7 (t, C-15), 20,6 (t, C-11), 20,4 (t, C-2), 17,7 (k, C-19), 13,6 (k, C-18).

(**2b-Z**). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 0,91 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,93 (m, 1H, H-9, delimično prekriven signalom za $\text{H}_3\text{C-18}$), 1,05 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,15 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,23–1,33 (m, 2H, H-14, $\text{H}\alpha\text{-12}$), 1,46 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-11}$), 1,50 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-1}$), 1,56 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-15}$), 1,62–1,76 (m, 2H, H-8, $\text{H}\alpha\text{-11}$), 1,82–2,03 (m, 4H, $\text{H}\beta\text{-1}$, $\text{H}\beta\text{-7}$, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\alpha\text{-15}$), 2,09 (dd, $J = 9,0, 19,0$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 2,17 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-2}$), 2,30–2,38 (m, 2H, $\text{H}\alpha\text{-6}$, $\text{H}\beta\text{-6}$), 2,48 (dd, $J = 8,5, 19,0$ Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-16}$), 2,18 (dt, $J = 16,0, 3,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-2}$), 6,11 (s, 1H, H-4), 6,35 i 7,17 (šs i m, 2H, NH_2^A), 8,95 (s, 1H, NH^A).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): 220,4 (s, C-17), 178,4 (s, C=S^A), 163,0 (s, C-5), 148,9 (s, C-3), 110,3 (d, C-4), 54,0 (d, C-9), 50,8 (d, C-14), 47,5 (s, C-13), 39,3 (s, C-10), 35,7 (t, C-16), 36,2 (t, C-1), 35,2 (d, C-8), 33,1 (t, C-6), 31,3 (t, C-12), 31,2 (t, C-7), 27,3 (t, C-2), 21,7 (t, C-15), 20,6 (t, C-11), 17,0 (k, C-19), 13,6 (k, C-18).

Daljim eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 60 : 40 : 1 izolovano je jedinjenje **3b** (79,4 mg, 6,1%).

4.1.2.4. Androst-4-en-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (3b)

Polazeći od 860 mg androst-4-en-3,17-diona (**1b**), eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 80 : 20 izolovan je proizvod **2b** (115,5 mg, 10,6%). Daljim eluiranjem sistemom (PhMe : EtOAc : MeOH = 60 : 40 : 1) izolovano je jedinjenje **3b** (*E* : *Z* = 3 : 1, 723 mg, 55,7%). $R_f = 0,22$ (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). $t.t > 146$ °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3498, 3272 (NH), 2941, 1565, 1487 (C=N), 1276 (C=S), 1080, 878. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₁H₃₂N₆S₂ izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ bila je 433,2203, a nađena 433,2191.

(**3b-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,95 (m, 1H, H-9), 1,04 (s, 3H, H₃C-19), 1,20–1,32 (m, 2H), 1,33–1,45 (m, 2H), 1,51–1,67 (m, 2H), 1,74–1,96 (m, 4H), 2,17–2,43 (m, 4H), 2,53 (dd, *J* = 9,0, 19,5 Hz, 1H, H β -16), 2,79 (dt, *J* = 17,0, 3,0 Hz, 1H, H α -2), 5,76 (s, 1H, H-4), 7,35 i 7,98 (2 šs, 2H, NH₂^D), 7,53 i 8,02 (2 šs, 2H, NH₂^A), 9,81 (s, 1H, NH^D), 10,03 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,4 (s, C=S^D), 178,2 (s, C=S^A), 167,3 (s, C-17), 156,5 (s, C-5), 150,6 (s, C-3), 120,8 (d, C-4), 53,4 (d, C-9), 52,4 (d, C-14), 44,2 (s, C-13), 37,4 (s, C-10), 34,7 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 33,6 (t, C-6), 31,7 (t, C-7), 31,3 (t, C-12), 26,8 (t, C-16), 23,1 (t, C-15), 21,0 (t, C-11), 20,5 (t, C-2), 17,4 (k, C-19), 16,8 (k, C-18).

(**3b-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,95 (m, 1H, H-9), 1,08 (s, 3H, H₃C-19), 1,20–1,32 (m, 2H), 1,33–1,45 (m, 2H), 1,51–1,67 (m, 2H), 1,74–1,96 (m, 4H), 2,17–2,43 (m, 5H), 2,53 (dd, *J* = 9,0, 19,5 Hz, 1H, H β -16), 6,61 (s, 1H, H-4), 7,35 i 7,98 (2 šs, 2H, NH₂^D), 7,50 i 7,93 (2 šs, 2H, NH₂^A), 9,81 (s, 1H, NH^D), 10,34 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,4 (s, C=S^D), 178,3 (s, C=S^A), 167,3 (s, C-17), 160,6 (s, C-5), 148,0 (s, C-3), 112,2 (d, C-4), 53,7 (d, C-14), 52,3 (d, C-9), 44,3 (s, C-13), 38,5 (s, C-10), 36,1 (t, C-1), 34,6 (d, C-8), 33,5 (t, C-6), 32,2 (t, C-7), 31,3 (t, C-12), 26,8 (t, C-16), 23,1 (t, C-15), 21,0 (t, C-11), 20,2 (t, C-2), 17,7 (k, C-19), 16,8 (k, C-18).

4.1.2.5. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (2c)

Polazeći od 860 mg androst-4,9(11)-dien-3,17-diona (**1c**), eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 85 : 15 dobijen je proizvod **2c** (*E* : *Z* = 4 : 1, 430 mg, 39,9%). R_f = 0,44 (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). t.t. > 198 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3425, 3256 (NH^A), 3142, 2928, 1737 (C(17)=O), 1585, 1502 (C(3)=N), 1297 (C=S^A), 1087,877. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₀H₂₇N₃OS izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ je bila 358,1948, a nađena 358,1935.

(**2c-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,79 (s, 3H, H₃C-18), 0,98 (kd, *J* = 13, 3 Hz, 1H, H α -7), 1,20 (s, 3H, H₃C-19), 1,45 (m, 1H, H-14), 1,58 (dšsd, *J* = 11Hz, 1H, H α -15), 1,69 (td, *J* = 13,5, 4,5 Hz, 1H, H β -1), 1,91 (dd, *J* = 17, 5 Hz, 1H, H α -12), 1,96–2,05 (m, 4H, H α -1, H β -7, H β -12, H β -15), 2,11 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H β -16), 2,25 (m, 1H, H β -2), 2,20–2,37 (m, 2H, H β -6, H-8), 2,41 (dd, *J* = 20, 11 Hz, 1H, H α -16), 2,51 (m, 1H, H α -6), 2,88 (dt, *J* = 17,4, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 5,49 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H, H-11), 5,81 (s, 1H, H-4), 7,54 i 8,07 (šs i m, 2H, NH₂^A), 10,09 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 220,3 (s, C-17), 178,3 (s, C=S^A), 154,5 (s, C-5), 150,0 (s, C-3), 146,1 (s, C-9), 121,0 (d, C-4), 116,5 (d, C-11), 47,3 (d, C-14), 45,2 (s, C-13), 39,9 (s, C-10, preklopljen sa DMSO), 36,5 (d, C-8), 35,8 (t, C-16), 33,1 (t, C-12), 32,6 (t, C-1), 31,6 (t, C-6), 31,1 (t, C-7), 26,2 (k, C-19), 22,3 (t, C-15), 21,2 (t, C-2), 13,6 (k, C-18).

(**2c-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,79 (s, 3H, H₃C-18), 0,98 (kd, *J* = 13, *J* = 3 Hz, 1H, H α -7), 1,20 (s, 3H, H₃C-19), 1,56 (m, 1H, H-14), 1,58 (dšsd, *J* = 11Hz, 1H, H α -15), 1,80 (td, *J* = 13,5, *J* = 4 Hz, 1H, H β -1), 1,91 (dd, *J* = 17, 5 Hz, 1H, H α -12), 1,96–2,05 (m, 4H, H α -1, H β -7, H β -12, H β -15), 2,11 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H β -16), 2,20–2,35 (m, 3H, H β -2, H β -6, H-8), 2,41 (dd, *J* = 20, 11 Hz, 1H, H α -16), 2,47 (m, 1H, H α -2), 2,51 (m, 1H, H α -6), 5,47 (m, 1H, H-11), 6,65 (s, 1H, H-4), 7,53 i 7,98 (šs i s, 2H, NH₂^A), 10,36 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 220,3 (s, C-17), 178,3 (s, C=S^A), 158,7 (s, C-5), 147,5 (s, C-3), 146,1 (s, C-9), 116,6 (d, C-11), 112,6 (d, C-4), 47,3 (d, C-14), 45,2 (s, C-13), 41,1 (d, C-10), 36,2 (d, C-8), 35,8 (d, C-16), 34,2 (t, C-1), 33,1 (t, C-12), 32,0 (t, C-6), 31,5 (t, C-7), 27,5 (t, C-2), 26,5 (k, C-19), 22,3 (t, C-15), 13,8 (k, C-18).

Dalje eluiranje sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 60 : 40 : 1 omogućilo je izolovanje

3c (77,4 mg, 5,9%).

4.1.2.6. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (**3c**)

Polazeći od 860 mg androst-4,9(11)-dien-3,17-diona (**1c**), eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 85 : 15 dobijen je proizvod **2c** ($E : Z = 4 : 1$, 115,5 mg, 10,6%). Dalje eluiranje sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 85 : 15 : 2 dalo je jedinjenje **3c** (723 mg, 55%). $R_f = 0,56$ (CHCl₃ : MeOH = 95 : 5, dvostruko razvijanje). t.t. > 146 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3503, 3359, 3257, 3148 (NH^{A,D}), 2941, 1587, 1501 (C(3/17)=N), 1280 (C=S^{A,D}), 1088, 753. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₁H₃₀N₆S₂ izračunata m/z vrednost jona [M+H]⁺ je bila 431,2046, a nađena 431,2034.

(**3c-E**). ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 0,82 (s, 3H, H₃C-18), 1,19 (s, 3H, H₃C-19), 2,88 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, H α -2), 5,51 (šs, 1H, H-11), 5,80 (s, 1H, H-4), 7,42 i 8,07 (šs i m, 2H, NH₂^A), 7,57 i 8,07 (2 šs, 2H, NH₂^D), 9,89 (s, 1H, NH^D), 10,09 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 178,6 (s, C=S^D), 178,5 (s, C=S^A), 167,3 (s, C-17), 155,1 (s, C-5), 150,5 (s, C-3), 146,1 (s, C-9), 121,2 (d, C-4), 117,4 (d, C-11), 49,7 (d, C-14), 43,0 (s, C-13), 40,1 (s, C-10), 36,6 (t, C-12), 36,2 (d, C-8), 32,8 (t, C-1), 31,9 (t, C-6), 31,8 (t, C-7), 27,5 (t, C-16), 26,4 (k, C-19), 24,3 (t, C-15), 21,5 (t, C-2), 17,2 (k, C-18).

(**3c-Z**). ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 0,82 (s, 3H, H₃C-18), 1,25 (s, 3H, H₃C-19), 5,51 (šs, 1H, H-11), 6,64 (s, 1H, H-4), 7,42 i 8,07 (2 šs, 2H, NH₂^A), 7,57 i 8,00 (2 šs, 2H, NH₂^D), 9,89 (s, 1H, NH^D), 10,38 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 178,6 (s, C=S^D), 178,3 (s, C=S^A), 167,3 (s, C-17), 159,1 (s, C-5), 147,9 (s, C-3), 146,1 (s, C-9), 117,4 (d, C-11), 113,0 (d, C-4), 49,7 (d, C-14), 43,0 (s, C-13), 41,3 (s, C-10), 36,6 (t, C-12), 36,3 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 31,9 (t, C-6), 31,8 (t, C-7), 27,5 (t, C-16), 26,5 (k, C-19), 24,3 (t, C-15), 22,5 (t, C-2), 17,2 (k, C-18).

4.1.2.7. 11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (**2d**)

Polazeći od 910 mg 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-diona (**1d**), eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc : MeOH = 100 : 100 : 0,2 dobijen je proizvod **2d** ($E : Z = 5 : 1$, 876 mg, 78,2%). $R_f = 0,53$ (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1). t.t. > 218 °C (raspada se). IR

(ATR/cm⁻¹): 3419, 3257 (NH^A), 2927, 1736 (C(17)=O), 1587, 1503 (C(3)=N), 1024 (C=S^A), 737. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₀H₂₉N₃O₂S izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ je bila 376,2053, a nađena 376,2045; za [M+Na]⁺ izračunata 398,1873, a nađena 398,1869; za [M+K]⁺ izračunata 414,1612, a nađena 414,1616.

(**2d-E**). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 0,95 (s, 3H, H₃C-18), 1,24 (s, 3H, H₃C-19), 3,97 (dt, *J* = 4,5, 10,2 Hz, 1H, Hβ-11), 5,85 (s, 1H, H-4), 7,24 i 7,39 (2m, 2H, NH₂^A), 9,31 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 220,8 (s, C-17), 177,3 (s, C=S^A), 158,2 (s, C-3), 151,4 (s, C-5), 120,8 (d, C-4), 67,8 (d, C-11), 58,4 (d, C-9), 49,8 (d, C-14), 47,8 (s, C-13), 41,7 (t, C-12), 38,9 (s, C-10), 35,5 (t, C-16), 35,4 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 32,8 (t, C-6), 30,1 (t, C-7), 21,3 (t, C-15), 20,5 (t, C-2), 18,0 (k, C-19), 14,1 (k, C-18).

(**2d-Z**). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 0,95 (s, 3H, H₃C-18), 1,29 (s, 3H, H₃C-19), 3,97 (dt, *J* = 4,5, 10,2 Hz, 1H, Hβ-11), 6,22 (s, 1H, H-4), 7,24 i 7,35 (2m, 2H, NH₂^A), 9,55 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 220,4 (s, C-17), 177,2 (s, C=S^A), 162,8 (s, C-3), 150,3 (s, C-5), 112,2 (d, C-4), 67,8 (d, C-11), 58,4 (d, C-9), 49,7 (d, C-14), 47,1 (s, C-13), 41,7 (t, C-12), 40,2 (s, C-10), 35,5 (t, C-16), 37,4 (d, C-8), 34,2 (t, C-1), 33,5 (t, C-6), 30,5 (t, C-7), 27,4 (t, C-2), 21,3 (t, C-15), 18,3 (k, C-19), 14,1 (k, C-18).

Daljim eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 2 izolovano je jedinjenja **3d** (88 mg, 10%).

4.1.2.8. 11α-Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-bis(tiosemikarbazon) (**3d**)

Polazeći od 910 mg 11α-hidroksiandrost-4-en-3,17-diona (**1d**), eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 0,1 dobijen je proizvod **2d** (151 mg, 13,3%). Daljim eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 2 dobijeno je jedinjenje **3d** (*E* : *Z* = 4 : 1, 640 mg, 47,6%). *R*_f = 0,40 (CHCl₃ : MeOH = 90 : 10). t.t. > 176 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3510, 3414 (NH^{A,D}), 2925, 1586, 1501 (C(3/17)=N), 1299 (C=S^{A,D}), 1086, 867. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₁H₃₂N₆OS₂ izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ bila je 449,2152, a nađena 449,2145.

(**3d-E**). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 0,96 (s, 3H, H₃C-18), 1,24 (s, 3H,

H₃C-19), 3,90 (preklopljen sa CD₃OD, 1H, H β -11), 5,84 (s, 1H, H-4), 7,19 i 7,38 (2m, 4H, NH₂^{A,D}), 8,89 (s, 1H, NH^D), 9,28 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 177,8 (s, C=S^D), 177,3 (s, C=S^A), 166,5 (s, C-17), 158,1 (s, C-3), 151,5 (s, C-5), 120,9 (d, C-4), 68,0 (d, C-11), 58,6 (d, C-9), 51,8 (d, C-14), 44,7 (t, C-12), 44,3 (s, C-13), 38,9 (s, C-10), 35,5 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 32,8 (t, C-6), 30,8 (t, C-7), 25,9 (t, C-16), 23,0 (t, C-15), 20,6 (t, C-2), 18,1 (k, C-19), 17,4 (k, C-18).

(**3d-Z**). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 0,96 (s, 3H, H₃C-18), 1,29 (s, 3H, H₃C-19), 3,70 (m, 1H, H β -11), 6,20 (s, 1H, H-4), 7,19 i 7,38 (2m, 4H, NH₂^{A,D}), 8,89 (s, 1H, NH^D), 9,51 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 177,8 (s, C=S^D), 177,3 (s, C=S^A), 166,5 (s, C-17), 162,9 (s, C-3), 150,3 (s, C-5), 111,2 (d, C-4), 68,0 (d, C-11), 59,0 (d, C-9), 51,7 (d, C-14), 44,7 (t, C-12), 44,3 (s, C-13), 40,3 (s, C-10), 37,5 (d, C-8), 34,2 (t, C-1), 33,6 (t, C-6), 31,2 (t, C-7), 25,9 (t, C-16), 23,0 (t, C-15), 21,4 (t, C-2), 18,4 (k, C-19), 17,4 (k, C-18).

4.1.2.9. 11 α -Acetoksiandrost-4-en-3,17-dion-3-tiosemikarbazon (**2e**)

Mono-tiosemikarbazon **2e** (*E* : *Z* = 4 : 1, 20,8 mg, 5%) je dobijen kao sporedni proizvod pri sintezi mono-tijadiazolina iz tiosemikarbazona **2d** sa anhidridom sirćetne kiseline (Vidite odeljak **4.1.3.4**). Proizvod je izolovan FCC tehnikom eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 70 : 30. *R*_f = 0,56 (PhMe : EtOAc : MeOH = 5 : 5 : 0,5). t.t. > 218 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3224, 3168 (NH^A), 1732 (C(17)=O), 1690, 1667 (C=O), 1613 (C=N), 1373, 1292, 1240, 1023 (C=S^A), 736.

(**2e-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,98 (s, 3H, H₃C-18), 1,19 (s, 3H, H₃C-19), 1,20 (m, 1H, H α -7), 1,29 (m, 1H, H α -12), 1,41 (m, 1H, H-9), 1,55 (m, 1H, H β -15), 1,59 (m, 1H, H-14), 1,66–1,74 (m, 2H, H α -1, H-8), 1,90–2,02 (m, 4H, H β -1, H β -2, H β -7, H α -15), 2,03 (s, 3H, ¹¹ α H₃C), 2,16 (m, 1H, H α -16), 2,22 (m, 1H, H β -12), 2,25–2,31 (m, 2H, H α -6, H β -6), 2,50 (m, 1H, H β -16), 2,59 (št, *J* = 13,5, 1H, H α -2), 5,22 (m, 1H, H β -11), 5,86 (s, 1H, H-4), 6,44 i 7,25 (2m, 2H, NH₂^A), 8,70 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 218,2 (s, C-17), 178,6 (s, C=S^A), 174,7 (s, ¹¹_αC=O), 156,6 (s, C-3), 149,6 (s, C-5), 121,7 (d, C-4), 70,6 (d, C-11), 55,6 (d, C-9), 49,7 (d, C-14), 47,5 (s, C-13), 39,2 (s, C-10), 38,3 (t, C-12), 35,7 (t, C-16), 35,3 (d, C-8), 34,9 (t, C-1), 32,9 (t, C-6), 30,7 (t, C-7), 21,8 (k, ¹¹_αCH₃), 21,7 (t, C-15), 20,7 (t, C-2), 18,7 (k, C-19), 14,4 (k, C-18).

(**2e-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,98 (s, 3H, H₃C-18), 1,24 (s, 3H, H₃C-19), 1,20 (m, 1H, H_α-7), 1,29 (m, 1H, H_α-12), 1,41 (m, 1H, H-9), 1,55 (m, 1H, H_β-15), 1,59 (m, 1H, H-14), 1,66–1,74 (m, 2H, H_α-1, H-8), 1,90–2,02 (m, 3H, H_β-1, H_β-7, H_α-15), 2,03 (s, 3H, ¹¹_αH₃C), 2,16 (m, 1H, H_α-16), 2,22 (m, 1H, H_β-12), 2,25–2,31 (m, 3H, H_β-2, H_α-6, H_β-6), 2,40 (m, 1H, H_α-2), 2,50 (m, 1H, H_β-16), 5,22 (m, 1H, H_β-11), 6,16 (s, 1H, H-4), 6,39 i 7,16 (2m, 2H, NH₂^A), 8,93 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 218,1 (s, C-17), 178,6 (s, C=S^A), 174,7 (s, ¹¹_αC=O), 161,2 (s, C-3), 147,4 (s, C-5), 112,1 (d, C-4), 70,6 (d, C-11), 55,6 (d, C-9), 49,7 (d, C-14), 47,5 (s, C-13), 39,9 (s, C-10), 38,3 (t, C-12), 35,7 (t, C-16), 35,3 (d, C-8), 34,9 (t, C-1), 33,3 (t, C-6), 31,5 (t, C-7), 27,3 (t, C-2), 21,8 (k, ¹¹_αCH₃), 21,7 (t, C-15), 18,9 (k, C-19), 14,4 (k, C-18).

4.1.2.10. Pregn-4-en-3,20-dion-3-tiosemikarbazon (**2f**)

Polazeći od 940 mg progesterona (**1f**), posle filtracije proizvod reakcije prekrystalisan je iz etanola pri čemu su nastali svetložuti kristali jedinjenja **2f** (*E* : *Z* = 3 : 1, 765 mg, 65%). *R*_f = 0,48 (PhMe : EtOAc = 6 : 4, dvostruko razvijanje). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3430, 3328 (NH^A), 2939, 1696 (C(20)=O), 1589, 1503 (C(3)=N), 1291 (C=S^A), 1048, 735. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₂H₃₃N₃OS izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ je bila 388,2417, a nađena 388,2410; za [M+Na]⁺ izračunata 410,2237, a nađena 410,2238.

(**2f-E**). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 0,66 (s, 3H, H₃C-18), 1,09 (s, 3H, H₃C-19), 2,14 (s, 3H, H₃C-21), 2,32 (dt, *J* = 15,4, 3,6 Hz, 1H, H_α-2), 2,55 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H, H-17), 5,81 (s, 1H, H-4), 6,88 i 7,30 (2m, 2H, NH₂^A), 9,15 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 210,3 (s, C-20), 177,4 (s, C=S^A), 158,3 (s, C-5), 150,8 (s, C-3), 120,1 (d, C-4), 63,4 (d, C-17), 55,9 (d, C-14), 53,2 (d, C-9), 43,8 (s, C-13), 38,5

(s, C-10), 37,6 (t, C-12), 35,5 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 32,2 (t, C-6), 31,8 (t, C-7), 31,3 (k, C-21), 24,2 (t, C-16), 22,6 (t, C-15), 21,1 (t, C-11), 20,4 (t, C-2), 17,6 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

(**2f-Z**). ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): 0,66 (s, 3H, H₃C-18), 1,13 (s, 3H, H₃C-19), 2,14 (s, 3H, H₃C-21), 2,55 (t, *J* = 9,0 Hz, 1H, H-17), 6,15 (s, 1H, H-4), 6,82 i 7,19 (2m, 2H, NH₂^A), 9,40 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 210,3 (s, C-20), 177,6 (s, C=S^A), 163,5 (s, C-5), 149,7 (s, C-3), 110,2 (d, C-4), 63,4 (d, C-17), 55,9 (d, C-14), 53,7 (d, C-9), 43,8 (s, C-13), 39,0 (s, C-10), 37,6 (t, C-12), 36,1 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 33,2 (t, C-6), 31,8 (t, C-7), 31,3 (k, C-21), 27,4 (t, C-2), 24,2 (t, C-16), 22,6 (t, C-15), 21,1 (t, C-11), 17,4 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

Ostatak posle kristalizacije prečišćen je FCC tehnikom gde je eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 1 izolovano jedinjenja **3f** (114 mg, 8,3%).

4.1.2.11. Pregn-4-en-3,20-dion-bis(tiosemikarbazon) (**3f**)

Polazeći od 940 mg progesterona (**1f**), posle filtracije proizvod reakcije prekrystalisan je iz etanola. Dobijeni su žuti kristali *E/Z* (4 : 1) smeše jedinjenja **3f** (*E* : *Z* = 4 : 1, 808 mg, 59%) koji nisu dalje razdvojeni. *R*_f = 0,29 (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). t.t. > 201 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3427, 3374, 3232, 2146 (NH^{A,D}), 2938, 1590, 1507 (C(3/20)=N), 1296 (C=S^{A,D}), 1108, 866. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₃H₃₆N₆S₂ izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ je bila 461,2516, a nađena 461,2513. Elementalna analiza računata za C₂₃H₃₆N₆S₂: C 59,96; H 7,88; N 18,24; S 13,92, nađeno C 59,64; H 7,69; N 17,97; S 13,87.

(**3f-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,55 (s, 3H, H₃C-18), 0,82 (m, 1H, H-9), 0,90 (m, 1H, H α -7), 1,00 (s, 3H, H₃C-19), 1,08–1,19 (m, 2H, H-14, H α -15), 1,25–1,39 (m, 3H, H α -1, H β -11, H β -12), 1,44 (šd, *J* = 10,5 Hz, 1H, H-8), 1,48–1,56 (m, 2H, H α -11, H α -16), 1,60 (t, *J* = 7,0 Hz, 1H, H β -15), 1,73 (m, 1H, H β -7), 1,79 (m, 1H, H α -12), 1,88 (s, 3H, H₃C-21), 2,05–2,20 (2m, 2H, H β -2, H α -6), 2,24–2,34 (m, 3H, H β -6, H β -16, H α -17), 2,80 (šd, *J* = 17,6 Hz, 1H, H α -2), 5,75 (s, 1H, H-4), 7,38 i 8,07 (2 šs, 2H, NH₂^D), 7,52 i 8,04 (2 šs, 2H, NH₂^A), 9,79 (s, 1H, NH^D), 10,04 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,5 (s, C=S^D), 178,3 (s, C=S^A), 156,4 (s, C-5),

153,9 (s, C-20), 150,4 (s, C-3), 120,7 (d, C-4), 58,38 (d, C-17), 55,2 (d, C-14), 53,2 (d, C-9), 43,6 (s, C-13), 38,2 (t, C-12), 37,2 (s, C-10), 35,5 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 31,8 (t, C-6), 31,8 (t, C-7), 23,8 (t, C-15), 22,7 (t, C-16), 21,0 (t, C-11), 20,9 (t, C-2), 18,4 (k, C-21), 17,4 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

(**3f-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,55 (s, 3H, H₃C-18), 0,82 (m, 1H, H-9), 0,90 (m, 1H, H α -7), 1,06 (s, 3H, H₃C-19), 1,13 (m, 2H, H-14, H α -15), 1,32 (m, 3H, H α -1, H β -11, H β -12), 1,44 (šd, $J = 10,5$ Hz, 1H, H-8), 1,52 (m, 2H, H α -11, H α -16), 1,60 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, H β -15), 1,73 (m, 1H, H β -7), 1,79 (m, 1H, H α -12), 1,88 (s, 3H, H₃C-21), 2,04–2,22 (2m, 2H, H β -2, H α -16), 2,24–2,37 (m, 3H, H β -6, H β -16, H α -17), 6,61 (s, 1H, H-4), 7,38 i 8,07 (2 šs, 2H, NH₂^D), 7,50 i 7,94 (2 šs, 2H, NH₂^A), 9,79 (s, 1H, NH^D), 10,33 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,5 (s, C=S^D), 178,0 (s, C=S^A), 160,7 (s, C-5), 154,9 (s, C-20), 147,8 (s, C-3), 112,1 (d, C-4), 58,34 (d, C-17), 55,1 (d, C-14), 53,6 (d, C-9), 43,5 (s, C-13), 38,1 (t, C-12), 38,3 (s, C-10), 36,0 (t, C-1), 35,4 (d, C-8), 32,3 (t, C-6), 32,2 (t, C-7), 23,8 (t, C-15), 22,7 (t, C-16), 21,0 (t, C-11), 20,8 (t, C-2), 18,4 (k, C-21), 17,6 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

Ostatak posle kristalizacije hromatografisan je FCC tehnikom pri čemu je eluiranjem sistemom rastvarača PhMe : EtOAc = 70 : 30 izolovan proizvod **2f** (86 mg, 7,4%).

4.1.3. Generalna procedura za sintezu tijadiazolina

Tijadiazolini **7a–f** i **8a–f** su pripremljeni prema literaturi.²⁹ U rastvor steroidnih tiosemikarbazona (**2a–f** i **3a–f**) (1 mmol) u hloroformu (25 mL) dodat je sveže destilovan anhidrid sirćetne kiseline (2,3 i 4,6 mL, redom) i piridin (1,2 i 2,4 mL, redom). Reakciona smeša refluktovana je 4 h na 85 °C uz mešanje na uljanom kupatilu i praćena TLC-om. Po završetku reakcije rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Ostatak je prečišćen FCC tehnikom.⁶¹

4.1.3.1. (3R)-N-(3'-Acetil-17-oksospiro[19-norandrost-4-en-3,2'-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)acetamid (**7a**)

Polazeći od 340 mg smeše **2a** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 50 : 50 nakon kojeg je sledila kristalizacija iz DMSO dobijeno je jedinjenje **7a** (285 mg, 67%). $R_f =$

0,45 (CHCl₃ : MeOH = 95 : 5, dvostruko razvijanje). t.t. 194,5–195,4 °C. [α]_D +58 (c = 1,0 · 10⁻³ u CHCl₃ : MeOH = 3 : 1). IR (ATR/cm⁻¹): 2928 (C-H), 1736 (C=O), 1618 (⁵C=N), 756 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₃H₃₁N₃O₃S izračunata m/z vrednost jona [M+H]⁺ je bila 430,2159, a nađena 430,2152; za jon [M+Na]⁺ izračunata 452,1978, a nađena 452,1979. Elementalna analiza: izračunato za C₂₃H₃₁N₃O₃S · 0,5 CH₃SOCH₃: C 61,51; H 7,31; N 8,97; S 10,26, a nađeno C 61,18; H 7,16; N 8,99; S 10,85.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 0,66 (m, 1H, H-9), 0,91 (s, 3H, H₃C-18), 0,99 (m, 1H, H α -7), 1,16–1,47 (m, 5H, H α -1, H-8, H β -11, H α -12, H-14), 1,56 (m, 1H, H β -15), 1,74–2,00 (m, 5H, H β -1, H β -7, H-10, H β -12, H α -15), 2,04–2,16 (m, 4H, H β -2, H α -6, H α -11, H α -16 preklapljeni sa ^{C-5'}CH₃), 2,11 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,19 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,32 (dt, *J* = 14,5, 3,0 Hz, 1H, H β -6), 2,46 (dd, *J* = 19,5, 8,5 Hz, 1H, H β -16), 2,59 (td, *J* = 13,5, 2,5 Hz, 1H, H α -2), 5,67 (s, 1H, H-4), 10,57 (s, 1H, ^{C-5'}NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 222,4 (s, C-17), 169,6 (s, ^{C-5'}C=O), 169,2 (s, ^{N-3'}C=O), 144,5 (s, C-5'), 141,1 (s, C-5), 121,6 (d, C-4), 79,9 (s, C-3), 50,1 (d, C-9), 50,0 (d, C-14), 47,8 (s, C-13), 40,3 (d, C-10), 39,8 (d, C-8), 35,6 (t, C-16), 34,1 (t, C-6), 33,4 (t, C-2), 31,1 (t, C-12), 29,8 (t, C-7), 25,8 (t, C-11), 25,1 (t, C-1), 23,3 (k, ^{N-3'}CH₃), 22,4 (k, ^{C-5'}CH₃), 21,4 (t, C-15), 13,5 (k, C-18).

4.1.3.2. (3*R*)-*N*-(3'-Acetil-17-oksospiro[androst-4-en-3,2'-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)acetamid (7b)

Polazeći od 360 mg smeše **2b** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 1 : 1 dobijeno je jedinjenje **7b** (321 mg, 73%). *R*_f = 0,58 (CHCl₃ : MeOH = 95 : 5, dvostruko razvijanje). t.t. 221,1–222,8 °C. [α]_D +109 (c = 1,05 · 10⁻³ u CHCl₃ : MeOH = 3 : 1). IR (ATR/cm⁻¹): 3233, 2948 (C-H), 2926, 1710 (C=O), 1661, 1386 (⁵C=N). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₄H₃₃N₃O₃S izračunata m/z vrednost jona [M+H]⁺ je bila 444,2315, a nađena 444,2311; za jon [M+Na]⁺ izračunata 466,2135, a nađena 466,2131. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 0,80 (td, *J* = 3,5, 12,5 Hz, 1H, H-9), 0,90 (s, 3H, H₃C-18), 0,95 (m, 1H, H α -7), 1,12 (s, 3H, H₃C-19), 1,20–1,32 (m, 2H, H α -12, H-14), 1,39 (dk, *J* = 13,0, 3,0 Hz, 1H, H β -11), 1,53 (m, 2H, H α -1, H β -15), 1,60–1,68 (m, 2H, H-8, H α -11), 1,78–1,89 (m, 3H, H β -1, H β -7, H β -12), 1,96 (m, 1H, H α -15), 2,03 (šd, *J* = 13,5 Hz, 1H, H β -2), 2,09–2,12 (m, 2H, H α -6, H α -16, preklapljeni sa ^{C-5'}CH₃),

2,11 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,19 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,32 (dt, *J* = 14,5, 3,0 Hz, 1H, H_β-6), 2,60 (dd, *J* = 19,5, 8,5 Hz, 1H, H_β-16), 2,80 (td, *J* = 14,0, 2,5 Hz, 1H, H_α-2), 5,54 (s, 1H, H-4), 10,50 (s, 1H, ^{C-5'}NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 222,2 (s, C-17), 169,5 (s, ^{C-5'}C=O), 169,2 (s, ^{N-3'}C=O), 145,4 (s, C-5'), 144,4 (s, C-5), 120,6 (d, C-4), 80,1 (s, C-3), 54,1 (d, C-9), 50,8 (d, C-14), 47,6 (s, C-13), 36,7 (s, C-10), 35,7 (t, C-16), 35,2 (d, C-8), 35,1 (t, C-1), 31,4 (t, C-6), 31,1 (t, C-12), 30,9 (t, C-7), 30,8 (t, C-2), 25,8 (t, C-11), 23,2 (k, ^{N-3'}CH₃), 22,5 (k, ^{C-5'}CH₃), 21,5 (t, C-15), 17,4 (k, C-19), 13,5 (k, C-18).

4.1.3.3. (3R)-N-(3'-Acetil-17-oksospiro[androsta-4,9(11)-dien-3,2'-[1,3,4]tjadiazolin]-5'-il)acetamid (7c)

Polazeći od 360 mg smeše **2c** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 50 : 50 dobijeno je jedinjenje **7c** (318 mg, 72%). *R*_f = 0,35 (PhMe : EtOAc = 6 : 4, dvostruko razvijanje). t.t. 219,1–220,2 °C. [α]_D +135 (c = 1,01 · 10⁻³ u CHCl₃). IR (ATR/cm⁻¹): 3216, 3075, 2928 (C-H), 1738 (C=O), 1612, 1411 (⁵C=N), 1240, 1035, 754 (C-S). ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₄H₃₁N₃O₃S izračunata *m/z* vrednost jona [M+H]⁺ je bila 442,2159, a nađena 442,2158; za jon [M+Na]⁺ izračunata 464,1978, a nađena 464,1980. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 1,01 (dk, *J* = 4,0, 12,5 Hz, 1H, H_α-7), 1,25 (s, 3H, H₃C-19), 1,48 (m, 1H, H-14), 1,57 (dtd, *J* = 3, 3, 3 Hz 1H, H_β-15), 1,87 (td, *J* = 3,0, 13,5, 1H, H_α-1), 1,94–2,02 (m, 2H, H_β-1, H_β-7), 2,04 (m, 1H, H_α-12), 2,08–2,12 (m, 2H, H_β-12, H_α-15), 2,12–2,17 (m, 3H, H_α-6, H_β-12, H_α-16, delimično prekriven signalom za ^{C-5'}CH₃), 2,15 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,21 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,27 (t, *J* = 11 Hz, 1H, H-8), 2,36 (t, *J* = 13 Hz, 1H, H_β-6), 2,47 (dd, *J* = 18,5, 9,0 Hz, 1H, H_β-16), 2,90 (t, *J* = 13,5 Hz, 1H, H_α-2), 5,44 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, H-11), 5,56 (s, 1H, H-4), 9,65 (s, 1H, ^{C-5'}NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 221,9 (s, C-17), 169,2 (s, ^{N-3'}C=O), 168,9 (s, ^{C-5'}C=O), 144,8 (s, C-5'), 146,4 (s, C-9), 144,0 (s, C-5), 120,9 (d, C-4), 116,9 (d, C-11), 80,3 (s, C-3), 48,0 (d, C-14), 45,9 (s, C-13), 39,4 (d, C-10), 36,9 (t, C-16), 36,2 (d, C-8), 33,2 (t, C-1), 33,0 (t, C-12), 31,8 (t, C-6), 30,9 (t, C-7), 31,5 (t, C-2), 26,4 (k, C-19), 23,7 (k, ^{N-3'}CH₃), 23,1 (k, ^{C-5'}CH₃), 22,7 (t, C-15), 13,9 (k, C-18).

4.1.3.4. (3R)-N-(11 α -Acetoksi-3'-acetil-17-oksospiro[androst-4-en-3,2'-[1,3,4]tija-diazolin]-5'-il)acetamid (7e)

Polazeći od 375 mg 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-diona-3-tiosemikarbazona (**2d**, C₂₀H₂₉N₃O₂S, 375,1981) u reakciji sa anhidridom sirćetne kiseline eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 70 : 30 izolovan je proizvod **2e** (vidite odeljak 4.1.2.9.).

Daljim eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 65 : 35 dobijeno je jedinjenje **7e** (335 mg, 67%). $R_f = 0,60$ (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1). t.t. 162,3–164,8 °C. $[\alpha]_D^{+90}$ (c = 0,97 · 10⁻³ u CHCl₃). IR (ATR/cm⁻¹): 3235, 3174, 2971, 2935 (C-H), 1730 (C=O), 1703, 1642, 1613 (^δC=N), 1240, 733 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulska formulu C₂₆H₃₅N₃O₅S izračunata m/z vrednost jona [M+H]⁺ je bila 502,2370, a nađena 502,2368; za jon [M+Na]⁺ izračunata 524,2190, a nađena 524,2194.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,96 (s, 3H, H₃C-18), 1,05 (dk, $J = 4,0, 14,0$ Hz, 1H, H α -7), 1,17 (s, 3H, H₃C-19), 1,22–1,31 (m, 2H, H-9 i H α -12), 1,40 (m, 1H, H-14), 1,55 (m, 1H, H β -15), 1,66–1,74 (m, 2H, H α -1 i H-8), 1,82–1,91 (m, 2H, H β -1, H β -7), 1,93–1,99 (m, 2H, H β -2, H α -15), 2,01 (s, 3H, ^{11 α} CH₃), 2,11–2,20 (m 4H, H α -6, H β -6, H β -12, H α -16), 2,16 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,21 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,49 (dd, $J = 19,0, 9,0$ Hz, 1H, H β -16), 2,78 (td, $J = 13,5, 2,5$ Hz, 1H, H α -2), 5,22 (m, 1H, H β -11), 5,64 (s, 1H, H-4) 9,83 (s, 1H, ^{C-5'}NH).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 218,5 (s, C-17), 169,2 (s, ^{11 α} C=O), 169,2 (2s, ^{N-3'}C=O i ^{C-5'}C=O), 144,6 (s, C-5'), 144,1 (s, C-5), 122,5 (d, C-4), 79,5 (s, C-3), 70,5 (d, C-11), 56,4 (d, C-9), 49,6 (d, C-14), 47,4 (s, C-13), 38,2 (d, C-10), 38,1 (t, C-12), 35,7 (t, C-1), 35,6 (t, C-16), 34,8 (d, C-8), 32,3 (t, C-6), 31,0 (t, C-2), 30,7 (t, C-7), 23,6 (k, ^{N-3'}CH₃), 23,0 (k, ^{C-5'}CH₃), 21,8 (k, ^{11 α} CH₃), 21,6 (t, C-15), 18,4 (k, C-19), 14,2 (k, C-18).

4.1.3.5. (3R)-N-(3'-Acetil-11 α -hidroksi-17-oksospiro[androst-4-en-3,2'-[1,3,4]tija-diazolin]-5'-il)acetamid (7d)

Nastavkom eluiranja sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 4 dobijeno je jedinjenje **7d** (38 mg, 8%). $R_f = 0,45$ (CHCl₃ : MeOH = 9 : 1). t.t. 215,8–220,0 °C. $[\alpha]_D^{+102}$ (c = 0,96 · 10⁻³ u CHCl₃ : MeOH = 3 : 1). IR (ATR/cm⁻¹): 3518, 3320, 2927 (C-H), 1717 (C=O), 1690, 1663, 1605, 1337 (^δC=N), 1238, 1012, 721 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulska formulu C₂₄H₃₃N₃O₅S izračunata m/z vrednost jona [M+H]⁺ je

bila 460,2264, a nađena 460,2256; za jon $[M+Na]^+$ izračunata 482,2084, a nađena 482,2078.

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3/CD_3OD-d_4$): 0,93 (s, 3H, H_3C-18), 0,97 (m, 1H, H-9), 1,00 (m, 1H, $H\alpha-7$), 1,26 (s, 3H, H_3C-19), 1,31 (m, 1H, $H\alpha-12$), 1,39 (m, 1H, H-14), 1,51–1,66 (m, 2H, H-8 i $H\beta-15$), 1,74 (t, $J = 13,5$ Hz, 1H, $H\alpha-1$), 1,85 (m, 1H, $H\beta-7$), 1,97 (m, 2H, $H\beta-2$ i $H\alpha-15$), 2,05 (m, 1H, $H\beta-12$), 2,10 (s, 3H, $^{C-5'}CH_3$), 2,12–2,18 (m 2H, $H\alpha-6$, $H\alpha-16$), 2,20 (s, 3H, $^{N-3'}CH_3$), 2,26 (m, 1H, $H\beta-6$), 2,49 (dd, $J = 19,0, 9,0$ Hz, 1H, $H\beta-16$), 2,55 (dt, $J = 13,5, 3$ Hz, 1H, $H\beta-1$), 2,84 (td, $J = 13,5, 2,5$ Hz, 1H, $H\alpha-2$), 3,95 (td, $J = 10,5, 5$ Hz, 1H, $H\beta-11$), 5,57 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, $CHCl_3/CD_3OD-d_4$ (3:1)): 220,7 (s, C-17), 169,1 (2s, $^{N-3'}C=O$ i $^{C-5'}C=O$), 145,2 (s, C-5), 144,6 (s, C-5'), 121,5 (d, C-4), 79,8 (s, C-3), 68,1 (d, C-11), 59,5 (d, C-9), 49,9 (d, C-14), 47,8 (s, C-13), 41,9 (t, C-12), 37,9 (d, C-10), 36,6 (t, C-1), 35,6 (t, C-16), 34,8 (d, C-8), 32,2 (t, C-6), 30,8 (t, C-2), 30,3 (t, C-7), 23,1 (k, $^{C-5'}CH_3$), 22,2 (k, $^{N-3'}CH_3$), 21,4 (t, C-15), 17,7 (k, C-19), 14,2 (k, C-18).

4.1.3.6. (3R)-N-(3'-Acetil-20-oksospiro[*pregn-4-en-3,2'*-[1,3,4]tijadiazolin]-5'-il)-acetamid (7f)

Polazeći od 387 mg smeše **2f** nakon uparavanja rastvarača proizvod je kristalisan iz sistema $CHCl_3/MeOH$ pri čemu je nastao čist **7f** (363 mg, 77%). $R_f = 0,40$ (PhMe : EtOAc = 60 : 40, dvostruko razvijanje). t.t. 213,4–214,9 °C. $[\alpha]_D +108$ ($c = 1,03 \cdot 10^{-3}$ u $CHCl_3 : MeOH = 3 : 1$). IR (ATR/ cm^{-1}): 3229, 3169, 2929, 2846 (C-H), 1693 (C=O), 1657, 1612, 1379 ($\delta^{13}C=N$), 1237, 721 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu $C_{26}H_{37}N_3O_3S$ izračunata m/z vrednost jona $[M+H]^+$ je bila 472,2628, a nađena 472,2619; za jon $[M+Na]^+$ izračunata 494,2448, a nađena 494,2444; za jon $[M+K]^+$ izračunata 510,2187, a nađena 510,2192.

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3/CD_3OD-d_4$): 0,44 (s, 3H, H_3C-18), 0,90 (s, 3H, H_3C-19), 1,92 (s, 3H, H_3C-21), 1,95 (s, 3H, $^{C-5'}CH_3$), 2,00 (s, 3H, $^{N-3'}CH_3$), 2,39 (t, $J = 9$ Hz, 1H, H-17), 2,62 (td, $J = 13,8, 2,2$ Hz, 1H, $H\alpha-2$), 5,32 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3/CD_3OD-d_4$): 211,0 (s, C-20), 169,7 (s, $^{C-5'}C=O$), 169,2 (s, $^{N-3'}C=O$), 145,6 (s, C-5'), 144,4 (s, C-5), 120,0 (d, C-4), 79,9 (s, C-3), 63,3 (d, C-17), 55,8 (d, C-14), 53,7 (d, C-9), 43,8 (s, C-13), 38,4 (s, C-10), 36,4 (t, C-12), 35,4 (d, C-8), 34,9 (t, C-1), 31,8 (t, C-6), 31,4 (k, C-21), 30,9 (t, C-7), 30,7 (t, C-2), 23,9 (t, C-16),

23,0 (k, $N\text{-}3'\text{CH}_3$), 22,3 (k, $C\text{-}5'\text{CH}_3$), 22,0 (t, C-15), 20,7 (t, C-11), 17,1 (k, C-19), 12,8 (k, C-18).

4.1.3.7. (3R,17R)-N,N'-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-19-norandrost-4-en-17',2''-5'-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8a)

Polazeći od 420 mg smeše **3a** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 1 nakon koga je usledila kristalizacija iz metanola nastao je proizvod **8a** (410 mg, 70%). $R_f = 0,24$ (CHCl₃ : MeOH = 95 : 5, dvostruko razvijanje). t.t. 197,5–202,6 °C. $[\alpha]_D^{+290}$ ($c = 1,0 \cdot 10^{-3}$ u MeOH). IR (ATR/cm⁻¹): 2939 (C-H), 1642, 1615 ($C\text{-}5''\text{C}=\text{N}$), 1401, 722 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₈H₃₈N₆O₄S₂ izračunata m/z vrednost jona $[M+2H]^{2+}$ je bila 294,1271, a nađena 294,1270; za jon $[M+H]^+$ izračunato je 587,2469, a nađeno 587,2470; za jon $[M+Na]^+$ izračunato je 609,2288, a nađeno 609,2288. Elementalna analiza za C₂₈H₃₈N₆O₄S₂ · 2 MeOH: izračunato C 55,36; H 7,12; N 12,91; S 9,85, nađeno C 55,64; H 7,32; N 13,31; S 9,63.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄): 0,59 (m, 1H, H-9), 0,94 (m, 1H, H α -7 preklapljen sa H β -18), 0,95 (s, 3H, H β -18), 1,16–1,34 (m, 4H, H β -1, H-8, H β -11, H-14), 1,37–1,50 (m, 2H, H β -12, H β -15), 1,68–1,90 (m, 5H, H α -1, H β -7, H-10, H α -12, H α -15), 2,01–2,16 (m, 4H preklapljena sa dve CH₃-grupe, H β -2, H α -6, H α -11, H α -16), 2,09 (s, 3H, $C\text{-}5'\text{CH}_3$), 2,12 (s, 3H, $C\text{-}5''\text{CH}_3$), 2,18 (s, 3H, $N\text{-}3'\text{CH}_3$), 2,22 (s, 3H, $N\text{-}3''\text{CH}_3$), 2,28 (dt, $J = 14, 3$ Hz, 1H, H β -6), 2,54 (td, $J = 13,5, 3,0$ Hz, 1H, H α -2), 4,35 (dtd, $J = 13,5, 13,25, 3,0$ Hz, 1H, H β -16), 5,61 (s, 1H, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD-*d*₄): 173,5 (s, $N\text{-}3''\text{C}=\text{O}$), 171,9 (s, $C\text{-}5''\text{C}=\text{O}$), 171,7 (s, $C\text{-}5'\text{C}=\text{O}$), 171,2 (s, $N\text{-}3'\text{C}=\text{O}$), 149,4 (s, C-5''), 146,4 (s, C-5'), 143,1 (s, C-5), 122,8 (d, C-4), 94,0 (s, C-17), 81,3 (s, C-3), 53,3 (s, C-13), 51,4 (d, C-9), 47,8 (d, C-14), 42,2 (d, C-8), 41,9 (d, C-10), 35,6 (t, C-6), 34,9 (t, C-2), 33,1 (t, C-12), 32,3 (t, C-7), 31,0 (t, C-16), 27,4 (t, C-11), 27,0 (t, C-1), 25,1 (k, $C\text{-}5''\text{CH}_3$), 24,3 (t, C-15), 24,0 (k, $N\text{-}3'\text{CH}_3$), 23,1 (k, $N\text{-}3''\text{CH}_3$), 23,0 (k, $C\text{-}5'\text{CH}_3$), 16,0 (k, C-18).

4.1.3.8. (3R,17R)-N,N'-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-androst-4-en-17',2''-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8b)

Polazeći od 432 mg smeše **3b** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 1 nakon koga je usledila kristalizacija iz metanola izolovan je proizvod **8b** (336 mg,

56%). $R_f = 0,24$ (CHCl₃ : MeOH = 95 : 5, dvostruko razvijanje). t.t. 200,2–202,3 °C. $[\alpha]_D +62$ ($c = 1,02 \cdot 10^{-3}$ u MeOH). IR (ATR/cm⁻¹): 2938 (C-H), 2853, 1665, 1610 (^{5'/5''}C=N), 1380, 1254. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₉H₄₀N₆O₄S₂ izračunata m/z vrednost jona $[M+2H]^{2+}$ je bila 301,1349, a nađena 301,1354; za jon $[M+H]^+$ izračunato je 601,2625, a nađeno 601,2627; za jon $[M+Na]^+$ izračunato je 623,2445, nađeno 623,2446.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄): 0,72 (td, $J = 11, 3,5$ Hz, 1H, H-9), 0,91 (m, 1H, H α -7 preklapljen sa H₃C-18), 0,94 (s, 3H, H₃C-18), 1,10 (s, 3H, H₃C-19), 1,23 (m, 1H, H-14), 1,31–1,60 (m, 6H, H β -11, H α -15, H β -12, H-8, H β -1, H α -11), 1,69–1,90 (m, 4H, H β -15, H α -1, H α -12, H β -7), 1,98 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H, H β -2), 2,02–2,08 (m, 2H preklapljen sa dve CH₃-grupe, H α -6, H α -16), 2,09 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,12 (s, 3H, ^{C-5''}CH₃), 2,18 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,22 (s, 3H, ^{N-3''}CH₃), 2,45 (m, 1H, H β -6), 2,78 (td, $J = 13,3, 2,5$ Hz, 1H, H α -2), 4,35 (dtd, $J = 2,5, 13,25$ Hz, 1H, H β -16), 5,48 (s, 1H, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD-*d*₄): 173,5 (s, ^{N-3''}C=O), 171,9 (s, ^{C-5''}C=O), 171,7 (s, ^{C-5'}C=O), 171,3 (s, ^{N-3'}C=O), 149,3 (s, C-5''), 147,3 (s, C-5), 146,2 (s, C-5'), 121,9 (d, C-4), 93,9 (s, C-17), 81,3 (s, C-3), 55,5 (d, C-9), 53,0 (s, C-13), 48,5 (d, C-14), 38,0 (s, C-10), 37,6 (d, C-8), 36,7 (t, C-2), 33,4 (t, C-7), 33,1 (t, C-12), 33,0 (t, C-1), 32,9 (t, C-6), 31,0 (t, C-16), 25,1 (k, ^{N-3''}CH₃), 24,4 (t, C-15), 24,0 (k, ^{N-3'}CH₃), 23,1 (k, ^{C-5''}CH₃), 23,0 (k, ^{C-5'}CH₃), 21,9 (t, C-11), 18,3 (k, C-19), 15,8 (k, C-18).

4.1.3.9. (3R,17R)-N,N'-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-androsta-4,9(11)-dien-17',2''-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8c)

Polazeći od 430 mg smeše **3c** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 1 izolovan je proizvod **8c** (371 mg, 62%). $R_f = 0,19$ (CHCl₃ : MeOH = 95 : 5, dvostruko razvijanje). t.t. 199,2–201,1 °C. $[\alpha]_D +178$ ($c = 1,05 \cdot 10^{-3}$ u MeOH). IR (ATR/cm⁻¹): 3240, 3071, 2931 (C-H), 1670, 1644, 1613 (^{5'/5''}C=N), 1378, 1293, 1237, 1030, 724 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₉H₃₈N₆O₄S₂ izračunata m/z vrednost jona $[M+2H]^{2+}$ je bila 300,1271, a nađena 300,1273; za jon $[M+H]^+$ izračunato je 599,2469, a nađeno 599,2466; za jon $[M+Na]^+$ izračunato je 621,2288, nađeno 621,2286.

¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD-*d*₄): 0,85 (s, 3H, H₃C-18), 0,94 (m, 1H, H α -7), 1,25 (s, 3H, H₃C-19), 1,39 (šk, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-14), 1,53 (m, 1H, H α -15), 1,78 (m, 1H, H β -

12), 1,86–1,93 (m, 3H, H α -1, H β -1, H β -15), 1,97 (m, 1H, H β -7), 2,06–2,16 (m, 4H, H β -2, H α -6, H-8, H α -16, preklapljen sa dve CH₃-grupe), 2,09 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,12 (s, 3H, ^{C-5''}CH₃), 2,19 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,23 (s, 3H, ^{N-3''}CH₃), 2,43 (m, 1H, H β -6), 2,58 (m, 1H, H α -12), 2,89 (td, *J* = 12,5, 5 Hz, 1H, H α -2), 4,32 (dtd, *J* = 4,0, 13,0 Hz, 1H, H β -16), 5,46 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H, H-11), 5,48 (s, 1H, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD-*d*₄): 173,4 (s, ^{N-3''}C=O), 172,0 (s, ^{C-5''}C=O), 171,9 (s, ^{C-5'}C=O), 171,3 (s, ^{N-3'}C=O), 149,1 (s, C-5''), 147,1 (s, C-9), 146,2 (s, C-5'), 146,0 (s, C-5), 122,0 (d, C-4), 118,9 (d, C-11), 93,5 (s, C-17), 81,4 (s, C-3), 51,4 (s, C-13), 46,1 (d, C-14), 40,6 (d, C-10), 39,6 (d, C-8), 35,5 (t, C-12), 34,7 (t, C-1), 33,7 (t, C-7), 33,1 (t, C-6), 32,6 (t, C-2), 31,4 (t, C-16), 26,9 (s, C-19), 25,2 (t, C-15), 24,9 (k, ^{N-3''}CH₃), 23,9 (k, ^{N-3'}CH₃), 23,0 (k, ^{C-5''}CH₃), 22,9 (k, ^{C-5'}CH₃), 15,8 (k, C-18).

4.1.3.10. (3*R*,17*R*)-*N,N'*-(11 α -Acetoksi-3,3''-diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-androst-4-en-17',2''-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8e)

Polazeći od 450 mg smeše **3d** eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc : MeOH = 50 : 50 : 0,5 izolovan je proizvod **8e** (411 mg, 62%). *R*_f = 0,44 (CHCl₃ : MeOH = 90 : 10). t.t. 199,2–201,8 °C. [α]_D +215 (c = 1,03 · 10⁻³ u CHCl₃ : MeOH = 3 : 1). IR (ATR/cm⁻¹): 2963 (C-H), 2931, 1703, 1669, 1606 (5'/5''C=N), 1371, 1240, 1012, 723 (C-S). ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₃₁H₄₂N₆O₄S₂ izračunata *m/z* vrednost jona [M+2H]²⁺ bila je 330,1376, a nađena 330,1382; za jon [M+H]⁺ izračunato je 659,2680, a nađeno 659,2675; za jon [M+Na]⁺ izračunato je 681,2500, nađeno 681,2499.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 1,00 (s, 3H, H₃C-18), 1,02 (m, 1H, H α -7 preklapljen sa H₃C-18), 1,16 (s, 3H, H₃C-19), 1,26 (t, *J* = 11,0 Hz, 1H, H-9), 1,34–1,47 (m, 2H, H-14, H α -15), 1,55 (dk, *J* = 3, 11 Hz, 1H, H-8), 1,68–1,87 (m, 5H, H α -1, H β -1, H β -7, H β -12, H β -15), 1,97 (šd, *J* = 13,5 Hz, 1H, H β -2), 2,02 (s, 3H, ^{11 α} CH₃), 2,11 (s, 3H, ^{C-5'}CH₃), 2,14 (s, 3H, ^{C-5''}CH₃), 2,19 (s, 3H, ^{N-3'}CH₃), 2,22 (s, 3H, ^{N-3''}CH₃), 2,80 (td, *J* = 14, 3 Hz, 1H, H α -2), 4,37 (dtd, *J* = 3,5, 13,0 Hz, 1H, H β -16), 5,16 (šk, *J* = 10 Hz, 1H, H β -11), 5,58 (s, 1H, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/CD₃OD-*d*₄): 171,6 (s, ^{N-3''}C=O), 170,5 (s, ^{N-3'}C=O), 169,7 (s, ^{C-5''}C=O), 169,6 (s, ^{C-5'}C=O), 169,2 (s, ^{N-3'}C=O), 146,7 (s, C-5''), 144,3 (s, C-5'), 144,2 (s, C-5), 121,9 (d, C-4), 91,5 (s, C-17), 79,3 (s, C-3), 71,4 (d, C-11), 55,5 (d, C-9), 51,5 (s, C-13), 45,9 (d, C-14), 38,2 (t, C-12), 37,7 (s, C-10), 35,9 (t, C-1), 35,5 (d, C-8), 32,1

(t, C-6), 31,2 (t, C-7), 30,8 (t, C-2), 29,9 (t, C-16), 24,2 (k, $^{N-3''}$ CH₃), 23,1 (t, C-15), 22,9 (k, $^{N-3'}$ CH₃), 22,3 (k, $^{C-5''}$ CH₃), 22,2 (k, $^{C-5'}$ CH₃), 21,5 (k, $^{N-3''}$ CH₃), 17,9 (k, C-19), 15,5 (k, C-18).

4.1.3.11. (3*R*,20*R/S*)-*N,N'*-(3,3''-Diacetildispiro-[1,3,4]tijadiazolin-2,3'-pregn-4-en-20',2''-[1,3,4]tijadiazolin-5,5''-diil)bis[acetamid] (8f) (*R/S*)

Polazeći od 460 mg smeše **3f** eluiranjem sistemom CH₂Cl₂ : MeOH = 80 : 20 nakon koga je usledila kristalizacija iz CH₂Cl₂ izolovan je proizvod **8f** (221 mg, 35%) kao smeša dva diastereoizomera (20*R* : 20*S* = 1,2 : 1). $R_f = 0,32$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1), $R_f = 0,16$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4, dvostruko razvijanje). t.t. 191,9–193,2 °C. $[\alpha]_D +14$ ($c = 0,97 \cdot 10^{-3}$ u DMSO). IR (ATR/cm⁻¹): 3325 (C-H), 2933, 1703, 1664, 1644, 1615 ($^{5'/5''}$ C=N), 1387, 1233. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₃₁H₄₄N₆O₄S₂ izračunata m/z vrednost jona $[M+2H]^{2+}$ je bila 315,1506, a nađena 315,1501; za jon $[M+H]^+$ izračunato je 629,2938, a nađeno 629,2919; za jon $[M+Na]^+$ izračunato je 651,2758, nađeno 651,2748; za jon $[2M+H]^+$ izračunato 1257,5804, a nađeno 1257,5780. Elementalna analiza za C₃₁H₄₄N₆O₄S₂ · CH₂Cl₂: izračunato C 53,85; H 6,50; N 11,77; S 8,97, a nađeno C 53,76; H 6,50; N 11,93; S 8,97.

(**8f**-20*R*). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,66 (m, 1H, H-9), 0,80 (m, 1H, H α -7), 0,85 (s, 3H, H₃C-18), 0,94 (m, 1H, H-14), 0,99 (s, 3H, H₃C-19), 1,09–1,51 (m, 6H, H β -1, H-8, H β -11, H β -12, H α -15, H β -15), 1,53–1,70 (m, 4H, H β -7, H α -11, H α -12, H α -16), 1,71–1,83 (m, 2H, H α -1, H β -16), 1,87 (m, 1H, H β -2), 1,91 (s, 3H, H₃C-21), 1,99 (m, 1H, H α -6, delimično preklapljen sa signalom za $^{C-5'}$ CH₃), 2,01 (s, 3H, $^{C-5'}$ CH₃), 2,013 (s, 3H, $^{C-5''}$ CH₃), 2,07 (s, 3H, $^{N-3''}$ CH₃), 2,09 (s, 3H, $^{N-3'}$ CH₃), 2,14 (t, $J = 13,5$ Hz, 1H, H α -6), 2,69 (m, 1H, H α -2), 3,13 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, H α -17), 5,40 (s, 1H, H-4) 11,42 (s, 1H, $^{C-5}$ NH), 11,44 (s, 1H, $^{C-5''}$ NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 169,1 (s, $^{C-5''}$ C=O), 169,2 (s, $^{C-5'}$ C=O), 168,2 (s, $^{N-3''}$ C=O), 167,3 (s, $^{N-3'}$ C=O), 144,6 (s, C-5), 143,4 (s, C-5''), 143,1 (s, C-5'), 120,7 (d, C-4), 83,8 (s, C-20), 78,8 (s, C-3), 54,9 (d, C-14), 54,1 (d, C-17), 53,6 (d, C-9), 42,0 (s, C-13), 36,6 (t, C-12), 36,3 (s, C-10), 34,8 (t, C-1), 34,4 (d, C-8), 30,5 (t, C-2), 31,9 (t, C-7), 31,3 (t, C-6), 30,9 (k, C-21), 24,6 (t, C-16), 24,6 (k, $^{N-3''}$ CH₃), 23,6 (k, $^{N-3'}$ CH₃), 23,1 (t, C-11), 22,5 (k, $^{C-5''}$ CH₃), 22,5 (k, $^{C-5'}$ CH₃), 20,2 (t, C-15), 17,3 (k, C-19), 13,0 (k,

C-18).

(8f-20S). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 0,68 (m, 1H, H-9), 0,73 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,80 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,01 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,05 (m, 1H, H-14 preklapljen sa signalom za $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,09–1,51 (m, 7H, $\text{H}\beta\text{-1}$, H-8, $\text{H}\beta\text{-11}$, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\alpha\text{-15}$, $\text{H}\beta\text{-15}$, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 1,53–1,70 (m, 2H, $\text{H}\beta\text{-7}$, $\text{H}\alpha\text{-11}$), 1,71–1,83 (m, 2H, $\text{H}\alpha\text{-1}$, $\text{H}\beta\text{-16}$), 1,87 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-2}$), 1,94 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-21}$), 1,97 (m, 1H, H- $\text{H}\alpha\text{-12}$), 2,01 (2s, 6H, $^{\text{C-5}'}\text{CH}_3$, $^{\text{C-5}''}\text{CH}_3$), 2,05 (s, 3H, $^{\text{N-3}''}\text{CH}_3$), 2,09 (s, 3H, $^{\text{N-3}'}\text{CH}_3$), 2,69 (m, 2H, $\text{H}\alpha\text{-2}$, $\text{H}\alpha\text{-17}$), 5,41 (s, 1H, H-4) 11,35 (s, 1H, $^{\text{C-5}}\text{NH}$), 11,45 (s, 1H, $^{\text{C-5}''}\text{NH}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 169,2 (s, $^{\text{C-5}''}\text{C=O}$), 169,2 (s, $^{\text{C-5}'}\text{C=O}$), 168,1 (s, $^{\text{N-3}''}\text{C=O}$), 167,3 (s, $^{\text{N-3}'}\text{C=O}$), 144,6 (s, C-5), 143,5 (s, C-5''), 143,1 (s, C-5'), 120,7 (d, C-4), 82,0 (s, C-20), 78,8 (s, C-3), 55,3 (d, C-14), 54,6 (d, C-17), 53,6 (d, C-9), 42,9 (s, C-13), 38,7 (t, C-12), 36,3 (s, C-10), 34,8 (t, C-1), 34,7 (d, C-8), 30,5 (t, C-2), 31,9 (t, C-7), 31,3 (t, C-6), 30,9 (k, C-21), 25,4 (t, C-16), 24,5 (k, $^{\text{N-3}''}\text{CH}_3$), 23,6 (k, $^{\text{N-3}'}\text{CH}_3$), 23,3 (t, C-11), 22,6 (k, $^{\text{C-5}''}\text{CH}_3$), 22,5 (k, $^{\text{C-5}'}\text{CH}_3$), 20,4 (t, C-15), 17,3 (k, C-19), 13,3 (k, C-18).

4.1.4. Generalna procedura za dobijanje tiazolidin-4-onskih derivata

Procedura za pripremanje novih steroidnih tiazolidin-4-onskih derivata analogna je prethodno opisanoj⁶⁹ uz minimalne izmene. U rastvor steroidnog tiosemikarbazona (**2a–f** ili **3a–f**, 1 mmol) i anhidrovanog natrijum-acetata (123 ili 246 mg, 1,5 ili 3 mmol) u apsolutnom etanolu (30 ili 50 mL), polako je dodat etil-hloracetat (122 ili 244 mg, 1 ili 2 mmol). Reakciona smeša je refluktovana do završetka reakcije (24–45 h, praćeno TLC-om), a zatim je ostavljena na sobnoj temperaturi da se ohladi posle čega je sipana u vodu. Precipitat je odvojen filtracijom, ispran hladnom vodom, hladnim etanolom, a zatim osušen. Sakupljeni kristali prekrystalisani su iz metanola, a filtrat je prečišćavan FCC tehnikom.⁶³ U tekstu koji sledi navedene su fizičke karakteristike i spektralni podaci nastalih proizvoda (**9a–f** i **10a–f**).

4.1.4.1. 2,4-Tiazolidindion-2-[(17-oksoestr-4-en-3-iliden)hidrazon] (**9a**)

Posle filtracije proizvod je prekrystalisan iz metanola pri čemu je nastalo 86 mg (22,3%) čistog **9a-E**. $R_f = 0,58$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). Prečišćavanjem ostatka FCC tehnikom (PhMe : EtOAc = 80 : 20) nastala je smeša **9a** ($E : Z = 2 : 1$, 129 mg,

33,5%) koja nije dalje razdvajana. t.t. 215 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3130 (NH), 3082, 2941, 2857 (CH), 1731 (C(17)=O), 1718 (⁴C=O), 1616 (C(3)=N), 1327, 1249 (C–S), 886. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₁H₂₇N₃O₂S izračunata vrednost za jon [M+H]⁺ je bila 386,1897, a nađena 386, 1896.

(**9a-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,75 (m, 1H, H-9), 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,99 (kd, *J* = 12,5, 3 Hz, 1H, H α -7), 1,13–1,33 (m, 4H, H α -1, H α -11, H α -12, H-14), 1,40–1,56 (m, 2H, H-8, H β -15), 1,64 (šd, *J* = 10,5 Hz, 1H, H β -12), 1,78–1,90 (m, 3H, H β -7, H β -11, H α -15), 1,97–2,11 (m, 4H, H β -1, H β -2, H-10, H α -16), 2,22 (td, *J* = 13,5, 3,0 Hz, 1H, H α -6), 2,40 (dd, *J* = 19, 8,5 Hz, 1H, H β -16), 2,47 (dt, *J* = 14, 3,0 Hz, 1H, H β -6), 3,04 (dt, *J* = 16,5, 4 Hz, 1H, H α -2), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 5,95 (s, 1H, H-4), 11,72 (s, 1H, ^{3'}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 219,6 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 162,3 (s, C-3), 161,2 (s, C-2'), 153,6 (s, C-5), 121,9 (d, C-4), 49,4 (d, C-14), 49,1 (d, C-9), 47,1 (s, C-13), 41,5 (d, C-10), 39,2 (d, C-8), 35,3 (t, C-16), 34,4 (t, C-6), 32,7 (t, C-5'), 31,2 (t, C-12), 29,7 (t, C-7), 26,1 (t, C-1), 25,2 (t, C-11), 24,3 (t, C-2), 21,4 (t, C-15), 13,4 (k, C-18).

(**9a-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,75 (m, 1H, H-9), 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,99 (kd, *J* = 12,5, 3 Hz, 1H, H α -7), 1,13–1,33 (m, 4H, H α -1, H α -11, H α -12, H-14), 1,40–1,56 (m, 2H, H-8, H β -15), 1,64 (šd, 1H, *J* = 10,5 Hz, 1H, H β -12), 1,78–1,90 (m, 3H, H β -7, H β -11, H α -15), 1,97–2,11 (m, 3H, H β -1, H-10, H α -16), 2,17–2,27 (m, 2H, H β -2, H α -6), 2,33–2,43 (m, 2H, H α -2, H β -16), 2,48 (m, 1H, H β -6), 3,78 (s, 2H, H₂-5'), 6,60 (s, 1H, H-4), 11,72 (s, 1H, ^{3'}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 219,6 (s, C-17), 174,0 (s, C-4'), 161,3 (s, C-3), 159,5 (s, C-2'), 155,4 (s, C-5), 111,8 (d, C-4), 49,4 (d, C-14), 49,1 (d, C-9), 47,1 (s, C-13), 42,2 (d, C-10), 39,2 (d, C-8), 35,3 (t, C-16), 35,1 (t, C-6), 32,6 (t, C-5'), 31,2 (t, C-12), 30,0 (t, C-2), 29,8 (t, C-7), 26,9 (t, C-1), 25,1 (t, C-11), 21,4 (t, C-15), 13,4 (k, C-18).

4.1.4.2. 2,4-Tiazolidindion-2-[(17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazon] (**9b**)

Posle filtracije i prečišćavanja sirovog proizvoda FCC tehnikom (PhMe : EtOAc = 80 : 20) dobijena je smeša **9b** (*E* : *Z* = 2 : 1, 267 mg, 67%). Kristalizacijom iz metanola dobijen je čist (*E*)-izomer (107 mg, 27%). *R*_f = 0,61 (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. 230,0–236,4 °C. Ostatak je bio smeša (*E* : *Z* = 2 : 3) koja nije razdvojena. IR

(ATR/cm⁻¹): 3082 (NH), 2924 (CH), 1721 (C=O), 1612 (C(3)=N), 1332, 1245 (C-S).
ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₂H₂₉N₃O₂S izračunata vrednost za jon [M+H]⁺ je bila 400,2053, a nađena 400,2055.

(**9b-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,83 (s, 3H, H₃C-18), 0,86 (m, 1H, H-9), 0,97 (kd, *J* = 12,5, 4,5 Hz, 1H, H α -7), 1,06 (s, 3H, H₃C-19), 1,16 (td, *J* = 13, 4 Hz, 1H, H α -12), 1,21–1,40 (m, 3H, H α -1, H α -11, H-14), 1,51 (dtd, *J* = 3, 3,5, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,56 (m, 1H, H β -11), 1,62–1,70 (m, 2H, H-8, H β -12), 1,81–1,92 (m, 3H, H β -1, H β -7, H α -15), 1,99 (dd, *J* = 9,5, 18 Hz, 1H, H α -16), 2,11 (td, *J* = 16, 4,5 Hz, 1H, H β -2), 2,30 (dtd, *J* = 5.0 Hz, 1H, H α -6), 2,35–2,45 (m, 2H, H β -6, H β -16), 3,03 (dt, *J* = 16,5, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 3,795 (s, 2H, H₂-5'), 5,88 (s, 1H, H-4), 11,75 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 219,6 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 161,8 (s, C-3), 161,3 (s, C-2'), 157,8 (s, C-5), 121,2 (d, C-4), 53,3 (d, C-9), 50,2 (d, C-14), 46,9 (s, C-13), 37,9 (s, C-10), 35,3 (t, C-16), 34,8 (t, C-1), 34,6 (d, C-8), 32,7 (t, C-5'), 31,7 (t, C-6), 31,1 (t, C-12), 30,7 (t, C-7), 22,0 (t, C-2), 21,4 (t, C-15), 20,2 (t, C-11), 17,4 (k, C-19), 13,4 (k, C-18).

(**9b-Z**) iz smeše *E* : *Z* = 2 : 3. ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 0,83 (s, 3H, H₃C-18), 0,92 (m, 1H, H-9), 1,00 (m, 1H, H α -7), 1,11 (s, 3H, H₃C-19), 3,78 (s, 2H, H₂-5'), 6,52 (s, 1H, H-4), 11,73 (s, 1H, ³NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 219,5 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 160,7 (s, C-2'), 159,7 (s, C-3), 159,5 (s, C-5), 113,8 (d, C-4), 53,3 (d, C-9), 50,1 (d, C-14), 46,9 (s, C-13), 38,5 (s, C-10), 35,8 (t, C-1), 35,3 (t, C-16), 34,5 (d, C-8), 32,6 (t, C-5'), 32,3 (t, C-6), 31,0 (t, C-12), 30,9 (t, C-7), 27,0 (t, C-2), 21,4 (t, C-15), 20,0 (t, C-11), 17,5 (k, C-19), 13,4 (k, C-18).

4.1.4.3. 2,4-Tiazolidindion-2-[(17-oksoandrosta-4,9(11)-dien-3-iliden)hidrazon] (**9c**)

Posle filtracije sirovi proizvod prečišćavan je FCC tehnikom (PhMe : EtOAc = 75 : 25) pri čemu je dobijeno 226 mg (57%) **9c**. Kristalizacijom iz metanola dobijen je čist (*E*)-izomer (88 mg, 22%). *R_f* = 0,63 (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. > 200 °C (raspada se). Ostatak je bio smeša (*E* : *Z* = 1 : 1) koja nije dalje razdvojena. IR (ATR/cm⁻¹): 2965 (NH), 2953 (CH), 1741 (C(17)=O), 1724 (⁴C=O), 1625

(C=N), 1334, 1252 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu $C_{22}H_{27}N_3O_2S$ izračunata vrednost za jon $[M+H]^+$ je bila 398,1897, a nađena 398,1900.

(9c-E). 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,79 (s, 3H, H₃C-18), 1,00 (kd, $J = 13, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,23 (s, 3H, H₃C-19), 1,46 (m, H-14), 1,58 (dtd, $J = 3, 2,5, 3$ Hz, 1H, H β -15), 1,71 (td, $J = 13,5, 4$ Hz, 1H, H β -1), 1,92–2,14 (m, 6H, H α -1, H β -7, H α -12, H β -12, H α -15, H α -16), 2,26 (dtd, $J = 5, 4, 5$ Hz, 1H, H β -2), 2,32–2,47 (m, 3H, H α -6, H-8, H β -16), 2,54 (m, 1H, H β -6), 3,08 (dt, $J = 17, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 3,80 (s, 2H, H₂-5'), 5,48 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, H β -11), 5,91 (s, 1H, H-4), 11,78 (s, 1H, 3NH).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 220,3 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 161,8 (s, C-3), 161,6 (s, C-2'), 156,3 (s, C-5), 146,3 (s, C-9), 121,4 (d, C-4), 116,4 (d, C-11), 47,5 (d, C-14), 45,2 (s, C-13), 40,5 (s, C-10), 36,4 (d, C-8), 35,8 (t, C-16), 33,1 (t, C-12), 33,0 (t, C-1), 32,7 (t, C-5'), 31,6 (t, C-6), 31,2 (t, C-7), 26,2 (k, C-19), 22,3 (t, C-2), 21,2 (t, C-15), 13,6 (k, C-18).

(9c-Z) iz smeše $E : Z = 1 : 1$. 1H -NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,87 (s, 3H, H₃C-18), 1,11 (m, 1H, H α -7), 1,28 (s, 3H, H₃C-19), 1,48 (m, H-14), 1,61 (dtd, $J = 3, 2,5, 3$ Hz, 1H, H β -15), 1,91–2,02 (m, 2H, H α -1, H β -1), 2,03–2,21 (m, 5H, H β -7, H α -12, H β -12, H α -15, H α -16), 2,29–2,45 (m, 2H, H α -6, H-8), 2,46–2,50 (m, H β -6, H β -16), 2,57–2,63 (m, 2H, H α -2, H β -2), 3,77 (s, 2H, H₂-5'), 5,51 (d, $J = 5,5$ Hz, 1H, H β -11), 6,52 (s, 1H, H-4), 11,78 (šs, 1H, 3NH).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl₃): 221,5 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 161,7 (s, C-3), 159,8 (s, C-2'), 159,4 (s, C-5), 145,9 (s, C-9), 117,1 (d, C-11), 111,4 (d, C-4), 48,1 (d, C-14), 45,9 (s, C-13), 41,6 (s, C-10), 36,9 (d, C-8), 36,2 (t, C-16), 34,2 (t, C-1), 33,4 (t, C-12), 33,2 (t, C-5'), 32,8 (t, C-6), 31,4 (t, C-7), 27,8 (t, C-2), 26,8 (s, C-19), 22,7 (t, C-15), 13,9 (k, C-18).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 220,2 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 159,5 (s, C-3), 161,5 (s, C-2'), 158,0 (s, C-5), 146,1 (s, C-9), 116,6 (d, C-11), 114,1 (d, C-4), 47,5 (d, C-14), 45,2 (s, C-13), 41,3 (s, C-10), 36,3 (d, C-8), 35,8 (t, C-16), 34,0 (t, C-1), 33,1 (t, C-12), 33,3 (t, C-6), 32,7 (t, C-5'), 31,2 (t, C-7), 27,4 (t, C-2), 26,4 (k, C-19), 22,2 (t, C-15), 13,6 (k, C-18).

4.1.4.4. 2,4-Tiazolidindion-2-(((11 α)-11-hidroksi-17-oksoandrost-4-en-3-iliden)-hidrazon] (9d)

Posle filtracije sirov proizvod prečišćavan je FCC tehnikom (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 3) pri čemu je dobijena smeša jedinjenja **9d** (*E* : *Z* = 3 : 1, 357 mg, 86%) koja nije dalje razdvojena. *R_f* = 0,34 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200°C (raspada se). IR(ATR/cm⁻¹): 3480, 2928 (NH), 1725 (C=O), 1620, 1558 (C=N), 1330, 1242 (C-S). HESI-Orbitrap-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₂H₂₉N₃O₃S izračunata vrednost za jon[M+H]⁺ je bila 416,2008, a nađena 416,1988.

(**9d-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,83 (s, 3H, H₃C-18), 0,94–1,01 (m, 2H, H α -7, H-9), 1,16 (s, 3H, H₃C-19), 1,18 (m, 1H, H α -12), 1,31 (m, 1H, H-14), 1,48 (dtd, *J* = 3, 2,5, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,56 (td, *J* = 14, 3,5 Hz, 1H, H α -1), 1,63 (kd, *J* = 11,5, 2,5 Hz, 1H, H-8), 1,79–1,90 (m, 3H, H β -7, H β -12, H α -15), 2,02 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H α -16), 2,16 (m, 1H, H β -2), 2,27–2,33 (m, 2H, H α -6, H β -6), 2,40 (dd, *J* = 19, 10,5 Hz, 1H, H β -16), 2,58 (dt, *J* = 14, 4 Hz, 1H, H β -1), 2,88 (dt, *J* = 17, 4 Hz, 1H, H α -2), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 3,81 (m, 1H, H β -11), 4,36 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H, OH-11), 5,87 (s, 1H, H-4), 11,73 (s, 1H, ³NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 218,6 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 162,3 (s, C-3), 161,7 (s, C-2'), 158,7 (s, C-5), 121,7 (d, C-4), 67,3 (d, C-11), 58,7 (d, C-9), 49,6 (d, C-14), 47,4 (s, C-13), 42,4 (t, C-12), 39,5 (s, C-10), 36,4 (t, C-1), 35,4 (t, C-16), 34,1 (d, C-8), 32,7 (t, C-6), 32,5 (t, C-5'), 30,3 (t, C-7), 22,4 (t, C-2), 21,3 (t, C-15), 18,2 (k, C-19), 14,3 (k, C-18).

(**9d-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,83 (s, 3H, H₃C-18), 0,94–1,01 (m, 2H, H α -7, H-9), 1,20 (s, 3H, H₃C-19), 1,18 (m, 1H, H α -12), 1,31 (m, 1H, H-8), 1,476 (dtd, *J* = 3, 2,5, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,482 (m, 1H, H-14), 1,72 (m, 1H, H α -1), 1,79–1,90 (m, 3H, H β -7, H β -12, H α -15), 2,02 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H α -16), 2,16 (m, 1H, H β -6), 2,26 (m, 1H, H β -2), 2,37 (m, 1H, H α -6), 2,39 (m, 1H, H α -2, preklopljen sa H β -16), 2,40 (dd, *J* = 19, 10,5 Hz, 1H, H β -16), 2,53 (t, *J* = 4,5 Hz, 1H, H β -1), 3,784 (s, 2H, H₂-5'), 3,81 (m, 1H, H β -11), 4,36 (d, *J* = 6,6 Hz, 1H, OH-11), 6,50 (s, 1H, H-4), 11,73 (s, 1H, ³NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 218,6 (s, C-17), 173,8 (s, C-4'), 161,7 (s, C-2'), 160,3

(s, C-5), 160,1 (s, C-3), 114,5 (d, C-4), 67,2 (d, C-11), 58,8 (d, C-9), 49,5 (d, C-14), 47,4 (s, C-13), 42,4 (t, C-12), 40,2 (s, C-10), 37,5 (t, C-1), 35,4 (t, C-16), 33,9 (d, C-8), 33,3 (t, C-6), 32,5 (t, C-5'), 30,7 (t, C-7), 27,2 (t, C-2), 21,3 (t, C-15), 18,4 (k, C-19), 14,3 (k, C-18).

4.1.4.5. 2,4-Tiazolidindion-2-(((11 α)-11-acetoksi-17-oksoandrost-4-en-3-iliden)-hidrazon] (9e)

Posle filtracije sirov ekstrakt je prečišćavan FCC tehnikom (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1,5) pri čemu je dobijena smeša jedinjenja **9e** (*E* : *Z* = 3 : 1, 352 mg, 77%). *R_f* = 0,59 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 2967, 2934 (NH), 1733 (C=O), 1628, 1576 (C=N), 1330, 1248. HESI-Orbitrap MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₄H₃₁N₃O₄S izračunata vrednost za jon [M+H]⁺ je bila 458,21145, a nađena 458,2098.

(**9e-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,97 (s, 3H, H₃C-18), 1,14 (kd, *J* = 12,5, 5 Hz, 1H, H α -7), 1,18 (s, 3H, H₃C-19), 1,26 (m, 1H, H α -12), 1,36–1,45 (m, 2H, H-9, H-14), 1,57 (dtd, *J* = 3, 2,5, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,69 (td, *J* = 13,5, 4,5 Hz, 1H, H α -1), 1,73–1,86 (m, 2H, H β -1, H-8), 1,97 (m, 1H, H β -7), 2,01 (s, 3H, ^{11 α} H₃C), 2,01 (m, 1H, H α -15), 2,13 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H α -16), 2,20 (m, 1H, H β -12), 2,30 (m, 1H, H β -2), 2,34–2,40 (m, 2H, H α -6, H β -6), 2,49 (dd, *J* = 19, 10,5 Hz, 1H, H β -16), 2,96 (dt, *J* = 17, 4 Hz, 1H, H α -2), 3,767 (s, 2H, H₂-5'), 5,24 (m, 1H, H β -11), 6,05 (s, 1H, H-4).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 218,2 (s, C-17), 173,6 (s, C-4'), 169,9 (s, ^{11 α} C=O), 163,5 (s, C-3), 161,4 (s, C-2'), 157,3 (s, C-5), 122,6 (d, C-4), 70,4 (d, C-11), 55,7 (d, C-9), 49,6 (d, C-14), 47,4 (s, C-13), 39,5 (s, C-10), 38,2 (t, C-12), 35,9 (t, C-1), 35,6 (t, C-16), 34,7 (d, C-8), 33,2 (t, C-5'), 32,9 (t, C-6), 30,6 (t, C-7), 22,4 (t, C-2), 21,7 (k, ^{11 α} CH₃), 21,6 (t, C-15), 18,4 (k, C-19), 14,2 (k, C-18).

(**9e-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,97 (s, 3H, H₃C-18), 1,14 (kd, *J* = 12,5, 5 Hz, 1H, H α -7), 1,22 (s, 3H, H₃C-19), 1,26 (m, 1H, H α -12), 1,39 (m, 1H, H-8), 1,49 (m, 1H, H-9), 1,52–1,63 (m, 2H, H-14, H β -15), 1,73–1,86 (m, 2H, H α -1, H β -2), 2,01 (m, 1H, H α -15), 2,02 (s, 3H, ^{11 α} H₃C), 2,13 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H α -16), 2,18 (m, 1H, H β -7), 2,20 (m, 1H, H β -12), 2,29–2,32 (m, 2H, H α -6, H β -6), 2,43–2,47 (m, 2H, H β -1, H α -2), 2,49 (dd, *J* = 19, 10,5 Hz, 1H, H β -16), 3,774 (s, 2H, H₂-5'), 5,24 (m, 1H, H β -11), 6,55

(s, 1H, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 218,2 (s, C-17), 173,6 (s, C-4'), 169,9 (s, $^{11\alpha}\text{C}=\text{O}$), 161,5 (s, C-3), 161,4 (s, C-2'), 159,2 (s, C-5), 115,2 (d, C-4), 70,2 (d, C-11), 55,8 (d, C-9), 49,5 (d, C-14), 47,4 (s, C-13), 30,2 (s, C-10), 38,2 (t, C-12), 36,9 (t, C-1), 35,6 (t, C-16), 34,6 (d, C-8), 33,3 (t, C-6), 33,1 (t, C-5'), 30,8 (t, C-7), 27,6 (t, C-2), 21,7 (k, $^{11\alpha}\text{CH}_3$), 21,6 (t, C-15), 18,6 (k, C-19), 14,2 (k, C-18).

4.1.4.6. 2,4-Tiazolidindion-2-[(20-okspregn-4-en-3-iliden)hidrazon] (9f)

Posle filtracije i kristalizacije iz metanola dobijena je smeša jedinjenja **9f** ($E : Z = 9 : 1$, 264 mg, 62%). $R_f = 0,65$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. > 170 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 2932 (NH), 2876 (CH), 1718 (C(20)=O), 1700 ($^4\text{C}=\text{O}$), 1618, 1576 (C=N), 1330, 1242 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ izračunata vrednost za jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ je bila 428,2366, a nađena 428,2365.

(**9f-E**). ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 0,56 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,85 (td, $J = 12$, 3 Hz, 1H, H-9), 0,93 (kd, $J = 12$, 3,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,04 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,10–1,21 (m, 2H, H-14, $\text{H}\beta\text{-15}$), 1,28–1,42 (m, 3H, $\text{H}\alpha\text{-1}$, $\text{H}\alpha\text{-11}$, $\text{H}\alpha\text{-12}$), 1,46 (kd, $J = 11$, 2,5 Hz, 1H, H-8), 1,51–1,59 (m, 2H, $\text{H}\beta\text{-11}$, $\text{H}\beta\text{-16}$), 1,62 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-15}$), 1,74 (d, $J = 12,5$ Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-7}$), 1,88 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-1}$), 1,96–2,04 (m, 2H, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 2,05 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-21}$), 2,10 (dtd, $J = 4,5$, 5, 4,5 Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-2}$), 2,21–2,34 (m, 2H, $\text{H}\alpha\text{-6}$, $\text{H}\beta\text{-6}$), 2,56 (t, $J = 9$ Hz, 1H, H-17), 3,04 (dt, $J = 17$, 3,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-2}$), 3,80 (s, 2H, $\text{H}_2\text{-5'}$), 5,86 (s, 1H, H-4), 11,75 (s, 1H, ^3NH).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 208,5 (s, C-20), 173,8 (s, C-4'), 161,9 (s, C-3), 161,4 (s, C-2'), 158,0 (s, C-5), 121,1 (d, C-4), 62,5 (d, C-17), 55,4 (d, C-14), 53,1 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 37,9 (t, C-12), 37,8 (s, C-10), 35,1 (d, C-8), 34,8 (t, C-1), 32,6 (t, C-5'), 31,9 (t, C-7), 31,8 (t, C-6), 31,1 (k, C-21), 23,9 (t, C-15), 22,2 (t, C-16), 22,0 (t, C-2), 20,9 (t, C-11), 17,3 (k, C-19), 13,0 (k, C-18).

(**9f-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 0,56 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,85 (m, 1H, H-9), 0,91 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,07 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,10–1,21 (m, 2H, H-14, $\text{H}\beta\text{-15}$), 1,28–1,42 (m, 3H, $\text{H}\alpha\text{-1}$, $\text{H}\alpha\text{-11}$, $\text{H}\alpha\text{-12}$), 1,51–1,59 (m, 3H, H-8, $\text{H}\beta\text{-11}$, $\text{H}\beta\text{-16}$), 1,62 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-15}$), 1,77 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-7}$), 1,89 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-1}$), 1,96–2,04 (m, 2H, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 2,07 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-21}$), 2,12 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-6}$), 2,30 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-2}$), 2,36 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-6}$), 2,43 (td, $J =$

14,4, 4 Hz, 1H, H α -2), 2,56 (t, J = 9 Hz, 1H, H-17), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 6,50 (s, 1H, H-4), 11,75 (s, 1H, ³NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 208,5 (s, C-20), 173,8 (s, C-4'), 161,4 (s, C-2'), 159,7 (s, C-5), 159,5 (s, C-3), 113,8 (d, C-4), 62,5 (d, C-17), 55,4 (d, C-14), 53,4 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 37,9 (t, C-12), 38,6 (s, C-10), 35,9 (t, C-1), 35,0 (d, C-8), 32,5 (t, C-5'), 32,6 (t, C-6), 32,2 (t, C-7), 31,1 (k, C-21), 27,1 (t, C-2), 23,9 (t, C-15), 22,2 (t, C-16), 20,8 (t, C-11), 17,5 (k, C-19), 13,0 (k, C-18).

4.1.4.7. Estr-4-en-3,17-dion-3,17-bis[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10a)

Nakon filtracije sirov proizvod je prečišćavan FCC tehnikom (PhMe : EtOAc = 1 : 1) pri čemu je dobijena smeša jedinjenja **10a** ($E : Z = 2 : 1$, 264 mg, 53%). $R_f = 0,28$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. > 245 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 2921 (NH), 2859 (CH), 1716 (C=O), 1620 (C=N), 1325, 1239 (C-S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₄H₃₀N₆O₂S₂ izračunata vrednost za jon [M+2H]²⁺ je bila 250,1009, a nađena 250,1012, dok je za jon [M+H]⁺ izračunata vrednost iznosila 499,1944, a nađena 499,1194.

(**10a-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,77 (m, 1H, H-9), 0,89 (s, 3H, H₃C-18), 0,99 (kd, J = 12,5, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,12–1,19 (m, 2H, H α -1, H-14), 1,27–1,43 (m, 4H, H-8, H α -11, H α -12, H β -15), 1,72–1,81 (m, 2H, H β -7, H α -15), 1,82–1,89 (m, 2H, H β -11, H β -12), 1,96–2,13 (m, 3H, H β -1, H β -2, H-10), 2,23 (m, 1H, H α -6), 2,35 (m, 1H, H α -16), 2,43 (m, 1H, H β -6), 2,47 (m, 1H, H β -16), 3,04 (dt, J = 16,5, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 3,74 (s, 2H, H₂-5''), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 5,95 (s, 1H, H-4), 11,72 (s, 2H, ^{3'/3''}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,6 (s, C-17), 174,0 (s, C-4''), 173,8 (s, C-4'), 162,4 (s, C-3), 161,8 (s, C-2''), 161,3 (s, C-2'), 153,6 (s, C-5), 121,9 (d, C-4), 51,7 (d, C-14), 49,3 (d, C-9), 44,2 (s, C-13), 41,6 (d, C-10), 39,28 (d, C-8), 34,5 (t, C-6), 33,8 (t, C-12), 32,7 (t, C(5')), 32,6 (t, C-5''), 30,4 (t, C-7), 27,9 (t, C-16), 26,1 (t, C-1), 25,6 (t, C-11), 24,4 (t, C-2), 22,8 (t, C-15), 16,9 (k, C-18).

(**10a-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,77 (m, 1H, H-9), 0,89 (s, 3H, H₃C-18), 0,99 (kd, J = 12,5, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,25 (m, 1H, H α -1), 1,27–1,43 (m, 5H, H-8, H α -11, H α -12, H-14, H β -15), 1,72–1,81 (m, 2H, H β -7, H α -15), 1,82–1,89 (m, 2H, H β -11, H β -

12), 2,06–2,13 (m, 2H, H β -1, H-10), 2,23 (m, 1H, H α -6), 2,27 (m, 1H, H β -2), 2,30–2,41 (m, 3H, H α -2, H β -6, H α -16), 2,47 (m, 1H, H β -16), 3,74 (s, 2H, H $_2$ -5''), 3,78 (s, 2H, H $_2$ -5'), 6,57 (s, 1H, H-4), 11,75 (s, 2H, $^{3'}/_{3''}$ NH).

13 C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 178,6 (s, C-17), 174,0 (s, C-4''), 173,9 (s, C-4'), 160,2 (s, C-3), 161,8 (s, C-2''), 160,6 (s, C-2'), 155,5 (s, C-5), 121,7 (d, C-4), 51,6 (d, C-14), 49,5 (d, C-9), 44,2 (s, C-13), 42,4 (d, C-10), 39,33 (d, C-8), 35,2 (t, C-6), 33,8 (t, C-12), 32,7 (t, C(5')), 32,6 (t, C-5''), 30,6 (t, C-7), 27,9 (t, C-16), 26,9 (t, C-1), 25,5 (t, C-11), 29,9 (t, C-2), 22,8 (t, C-15), 16,9 (k, C-18).

4.1.4.8. Androst-4-en-3,17-dion-3,17-bis[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10b)

Filtracijom reakcione smeše posle koje je usledila kristalizacija taloga iz sistema CHCl $_3$ /MeOH dobijen je čist (*E*)-izomer jedinjenja **10b** (282 mg, 55%). Ostatak je bio složena smeša koja nije dalje razdvajana. $R_f = 0,25$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm $^{-1}$): 3124, 2930 (NH), 2859 (CH), 1715 (C=O), 1655, 1618 (C=N), 1338, 1243 (C–S). ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C $_{25}$ H $_{32}$ N $_6$ O $_2$ S $_2$ izračunata vrednost za jon [M+2H] $^{2+}$ je bila 257,1087, a nađena 257,1094; za jon [M+H] $^+$ izračunata 513,2101, a nađena 513,2106.

(**10b-E**). 1 H-NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,88 (s, 3H, H $_3$ C-18), 0,89 (m, 1H, H-9, preklopljen sa H $_3$ C-18), 0,97 (kd, $J = 12,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,07 (s, 3H, H $_3$ C-19), 1,13 (m, 1H, H-14), 1,26–1,47 (m, 4H, H α -1, H α -11, H α -12, H β -15), 1,55–1,67 (m, 2H, H-8, H β -11), 1,72–1,92 (m, 4H, H β -1, H β -7, H β -12, H α -15), 2,11 (dtd, $J = 5, 2, 5$ Hz, 1H, H β -2), 2,27 (m, 1H, H α -6), 2,35 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,47 (m, 1H, H α -16), 3,04 (dt, $J = 17, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 3,74 (s, 2H, H $_2$ -5''), 3,79 (s, 2H, H $_2$ -5'), 5,87 (s, 1H, H-4), 11,72 (s, 2H, $^{3'}/_{3''}$ NH).

13 C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 178,5 (s, C-17), 173,8 (s, C-4' i C-4''), 162,0 (s, C-3), 161,4 (s, C-2' i C-2''), 157,9 (s, C-5), 121,1 (d, C-4), 53,5 (d, C-9), 52,4 (d, C-14), 43,9 (s, C-13), 37,9 (d, C-10), 34,8 (t, C-1), 34,7 (d, C-8), 33,8 (t, C-12), 32,6 (t, C-5' i C-5''), 31,7 (t, C-6), 31,3 (t, C-7), 27,8 (t, C-16), 22,9 (t, C-15), 22,0 (t, C-2), 20,4 (t, C-11), 17,4 (k, C-19), 16,8 (k, C-18).

4.1.4.9. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-3,17-bis[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)-hidrazon] (10c)

Sirov proizvod je posle filtracije prečišćen FCC tehnikom (PhMe : EtOAc = 6 : 4) pri čemu je dobijena smeša jedinjenja **10c** (*E* : *Z* = 2 : 1, 260 mg, 51%) koja nije razdvojena. $R_f = 0,25$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 2959 (NH), 2925 (CH), 1726 (C=O), 1660, 1626 (C=N), 1324, 1240 (C-S). ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₅H₃₀N₆O₂S₂ izračunata vrednost za jon [M+2H]²⁺ je bila 256,1009, a nađena 256,1017; za jon [M+H]⁺ izračunata 511,1944, a nađena 511,1944.

(**10c-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,85 (s, 3H, H₃C-18), 1,00 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,22 (s, 3H, H₃C-19), 1,33 (m, 1H, H-14), 1,43 (dšsd, *J* = 3 Hz, 1H, H β -15), 1,72 (td, *J* = 14, 5 Hz, 1H, H β -1), 1,92 (m, 1H, H α -15), 1,95–2,05 (m, 2H, H α -1, H β -7), 2,05–2,18 (m, 2H, H α -12, H β -12), 2,26 (m, 1H, H β -2), 2,29 (m, 1H, H-8), 2,35 (m, 1H, H α -6), 2,39 (m, 1H, H α -16), 2,52–2,60 (m, 2H, H β -6, H β -16), 3,08 (dt, *J* = 17, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 3,76 (s, 2H, H₂-5''), 3,80 (s, 2H, H₂-5'), 5,52 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H, H β -11), 5,90 (s, 1H, H-4), 11,73 (s, 2H, ^{3/3''}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,5 (s, C-17), 173,9 (s, C-4''), 173,8 (s, C-4'), 161,8 (s, C-3), 161,6 (s, C-2'), 161,5 (C-2''), 156,4 (s, C-5), 146,1 (s, C-9), 121,3 (d, C-4), 117,1 (d, C-11), 49,6 (d, C-14), 42,4 (s, C-13), 40,5 (d, C-10), 36,3 (d, C-8), 36,1 (t, C-12), 32,9 (t, C-1), 32,7 (s, C-5'), 32,6 (t, C-5''), 31,7 (t, C-6), 31,7 (t, C-7), 28,4 (t, C-16), 26,2 (k, C-19), 23,8 (t, C-15), 22,4 (t, C-2), 17,1 (k, C-18).

(**10c-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,85 (s, 3H, H₃C-18), 1,00 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,26 (s, 3H, H₃C-19), 1,43 (m, 1H, H-14, preklopljen sa H β -15), 1,43 (dšsd, *J* = 3 Hz, 1H, H β -15), 1,83 (td, *J* = 13,5, 4 Hz, 1H, H β -1), 1,92 (m, 1H, H α -15), 1,95–2,05 (m, 2H, H α -1, H β -7), 2,05–2,18 (m, 2H, H α -12, H β -12), 2,23 (m, 1H, H α -6), 2,29 (m, 1H, H-8), 2,39 (m, 1H, H α -16), 2,42 (m, 1H, H β -2), 2,52–2,60 (m, 3H, H α -2, H β -6, H β -16), 3,76 (s, 2H, H₂-5''), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 5,52 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H, H β -11), 6,52 (s, 1H, H-4), 11,73 (s, 2H, ^{3/3''}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 178,5 (s, C-17), 173,9 (2s, C-4' i C-4''), 161,5 (2s, C-2' i C-2''), 159,5 (s, C-3), 158,2 (s, C-5), 146,0 (s, C-9), 117,2 (d, C-11), 114,1 (d,

C-4), 49,6 (d, C-14), 42,4 (s, C-13), 41,2(d, C-10), 36,3 (d, C-8), 36,1 (t, C-12), 34,0 (t, C-1), 32,7 (s, C-5'), 32,6 (t, C-5''), 32,4 (t, C-6), 31,7 (t, C-7), 28,4 (t, C-16), 27,4 (t, C-2), 26,4 (k, C-19), 23,8 (t, C-15), 17,1 (k, C-18).

4.1.4.10. (11 α)-11-Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-3,17-bis-[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10d)

Posle filtracije sirov proizvod prečišćen je FCC tehnikom (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 5) pri čemu je dobijena smeša jedinjenja **10d** (*E* : *Z* = 4 : 1, 320 mg, 61%) čiji izomeri nisu razdvojeni. *R*_f = 0,30 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3480, 2927 (NH), 1711, 1615 (C=O), 1560 (C=N), 1331, 1240 (C-S). HESI-Orbitrap MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₅H₃₂N₆O₃S₂ izračunata vrednost za [M+H]⁺ jon je bila 529,2056, a nađena 529,2038.

(**10d-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,88 (s, 3H, H₃C-18), 0,94–1,04 (m, 2H, H α -7, H-9), 1,17 (s, 3H, H₃C-19), 1,20 (m, 1H, H-14, preklopljen sa H₃C-19), 1,27–1,39 (m, 2H, H α -12, H β -15), 1,52–1,63 (m, 2H, H α -1, H-8), 1,68–1,85 (m, 2H, H β -7, H α -15), 2,08 (dd, *J* = 5, 12 Hz, 1H, H β -12), 2,16 (dtd, *J* = 4,5, 4, 4,5 Hz 1H, H β -2), 2,22–2,30 (m, 2H, H α -6, H β -6), 2,39 (dd, *J* = 19, 9 Hz, 1H, H α -16), 2,50 (dd, *J* = 18,5, 9 Hz, 1H, H β -16), 2,58 (dt, *J* = 14, 4 Hz, 1H, H β -1), 2,88 (dt, *J* = 17, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 3,76 (s, 2H, H₂-5''), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 3,85 (m, 1H, H β -11), 4,32 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, OH-11), 5,86 (s, 1H, H-4), 11,72 (šs, 2H, ^{3'/3''}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 177,9 (s, C-17), 173,9 (s, C-4'), 174,0 (s, C-4''), 162,4 (s, C-3), 161,8 (s, C-2''), 161,4 (s, C-2'), 158,9 (s, C-5), 121,7 (d, C-4), 67,4 (d, C-11), 58,4 (d, C-9), 51,9 (d, C-14), 45,1 (t, C-12), 44,4 (s, C-13), 39,5 (s, C-10), 36,4 (t, C-1), 34,2 (d, C-8), 32,8 (t, C-6), 32,7 (t, C-5''), 32,6 (t, C-5'), 31,0 (t, C-7), 28,0 (t, C-16), 22,9 (t, C-15), 22,4 (t, C-2), 18,3 (k, C-19), 17,8 (k, C-18).

(**10d-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,88 (s, 3H, H₃C-18), 0,94–1,04 (m, 2H, H α -7, H-9), 1,21 (s, 3H, H₃C-19), 1,27–1,39 (m, 3H, H α -12, H-14, H β -15), 1,55 (m, 1H, H-8), 1,68–1,85 (m, 3H, H α -1, H β -7, H α -15), 2,08 (dd, *J* = 5, 12 Hz, 1H, H β -12), 2,10 (m, H β -6), 2,21 (m, 1H, H β -2), 2,39 (dd, *J* = 19, 9 Hz, 1H, H α -16), 2,50 (dd, *J* = 18,5, 9 Hz, 1H, H β -16), 2,49 (m, 1H, H β -1), 3,76 (s, 2H, H₂-5''), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 3,85 (m, 1H, H β -11), 4,32 (d, *J* = 6,5 Hz, 1H, OH-11), 6,49 (s, 1H, H-4), 11,72 (šs, 2H, ^{3'/3''}NH).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 177,9 (s, C-17), 173,9 (s, C-4'), 174,0 (s, C-4''), 161,8 (s, C-2''), 161,4 (s, C-2'), 160,4 (s, C-3), 160,2 (s, C-5), 114,4 (d, C-4), 67,4 (d, C-11), 59,0 (d, C-9), 51,9 (d, C-14), 45,1 (t, C-12), 44,4 (s, C-13), 39,8 (s, C-10), 37,6 (t, C-1), 34,1 (d, C-8), 33,4 (t, C-6), 32,7 (t, C-5''), 32,6 (t, C-5'), 31,4 (t, C-7), 28,0 (t, C-16), 27,3 (t, C-2), 22,9 (t, C-15), 18,5 (k, C-19), 17,8 (k, C-18).

4.1.4.11. (11 α)-11-(Acetoksi)androst-4-en-3,17-dion-3,17-bis-[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10e)

Sirov proizvod je posle filtracije prečišćen FCC tehnikom (CH_2Cl_2 : MeOH = 100 : 2) pri čemu je dobijena dijastereoizomerna smeša jedinjenja **10e** (*E* : *Z* = 3 : 1, 410 mg, 72%) koja nije razdvojena. R_f = 0,48 (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 2967, 2934 (NH), 1719 (C=O), 1656, 1616, 1562 (C=N), 1332, 1244 (C-S). HESI-Orbitrap MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ izračunata vrednost za jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ je bila 571,2161, a nađena 571,2141.

(**10e-E**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,91 (s, 3H, H_3C -18), 1,06 (kd, J = 13,5, 4,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -7), 1,12 (s, 3H, H_3C -19), 1,26–1,43 (m, 4H, H-9, $\text{H}\alpha$ -12, H-14, $\text{H}\beta$ -15), 1,56 (td, J = 13,5, 4 Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -1), 1,62–1,88 (m, 4H, $\text{H}\beta$ -1, $\text{H}\beta$ -7, H-8, $\text{H}\alpha$ -15), 2,01 (s, 3H, $^{11\alpha}\text{CH}_3$), 2,07–2,21 (m, 2H, $\text{H}\beta$ -2, $\text{H}\beta$ -12), 2,26–2,34 (m, 1H, $\text{H}\alpha$ -6), 2,36–2,45 (m, 2H, $\text{H}\beta$ -6, $\text{H}\alpha$ -16), 2,50 (m, 1H, $\text{H}\beta$ -16, preklopljen sa DMSO), 2,93 (dt, J = 17, 3,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -2), 3,75 (s, 2H, H_2 -5''), 3,80 (s, 2H, H_2 -5'), 5,15 (m, 1H, $\text{H}\beta$ -11), 5,91 (s, 1H, H-4), 11,70 (šs, 2H, $^{3'/3''}\text{NH}$).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 174,05 (s, C-4''), 173,95 (s, C-4'), 173,3 (s, C-17), 169,9 (s, $^{11\alpha}\text{C}=\text{O}$), 162,2 (s, C-3), 162,2 (s, C-2''), 161,6 (s, C-2'), 157,1 (s, C-5), 122,2 (d, C-4), 70,5 (d, C-11), 55,4 (d, C-9), 51,1 (d, C-14), 44,1 (s, C-13), 39,5 (s, C-10), 40,6 (t, C-12), 35,8 (t, C-1), 34,3 (d, C-8), 32,8 (t, C-5'), 32,6 (t, C-5''), 32,4 (t, C-6), 31,0 (t, C-7), 28,0 (t, C-16), 22,9 (t, C-15), 22,3 (t, C-2), 21,6 (k, $^{11\alpha}\text{CH}_3$), 18,3 (k, C-19), 17,5 (k, C-18).

(**10e-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,91 (s, 3H, H_3C -18), 1,06 (kd, J = 13,5, 4,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -7), 1,17 (s, 3H, H_3C -19), 1,26–1,43 (m, 4H, H-8, $\text{H}\alpha$ -12, H-14, $\text{H}\beta$ -15), 1,62–1,88 (m, 4H, $\text{H}\alpha$ -1, $\text{H}\beta$ -7, H-9, $\text{H}\alpha$ -15), 2,02 (s, 3H, $^{11\alpha}\text{CH}_3$), 2,07–2,21 (m, 3H, $\text{H}\alpha$ -6, $\text{H}\beta$ -6, $\text{H}\beta$ -12), 2,26–2,34 (m, 1H, $\text{H}\beta$ -2), 2,36–2,45 (m, 2H, $\text{H}\beta$ -1, $\text{H}\alpha$ -16), 2,50

(m, 1H, H β -16, preklopljen sa DMSO), 2,93 (dt, $J = 17, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 3,75 (s, 2H, H $_2$ -5''), 3,79 (s, 2H, H $_2$ -5'), 5,15 (m, 1H, H β -11), 6,53 (s, 1H, H-4), 11,70 (šs, 2H, $^{3'/3''}$ NH).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 174,05 (s, C-4''), 173,95 (s, C-4'), 173,3 (s, C-17), 169,9 (s, $^{11\alpha}\text{C}=\text{O}$), 162,2 (s, C-2''), 161,6 (s, C-2'), 159,6 (s, C-3), 158,6 (s, C-5), 115,0 (d, C-4), 70,3 (d, C-11), 55,6 (d, C-9), 51,0 (d, C-14), 44,1 (s, C-13), 39,7 (s, C-10), 41,5 (t, C-12), 36,9 (t, C-1), 34,2 (d, C-8), 33,1 (t, C-6), 32,8 (t, C-5'), 32,6 (t, C-5''), 31,3 (t, C-7), 28,0 (t, C-16), 27,2 (t, C-2), 22,9 (t, C-15), 21,1 (k, $^{11\alpha}\text{CH}_3$), 18,3 (k, C-19), 17,5 (k, C-18).

4.1.4.12. Pregn-4-en-3,20-dion-3,20-bis-[2-(4,5-dihidro-4-okso-2-tiazolil)hidrazon] (10f)

Posle filtracije sirov proizvod je prečišćen FCC tehnikom (PhMe : EtOAc = 6 : 4) i dobijena je smeša **10f** ($E : Z = 3 : 1$, 366 mg, 68%) koja nije razdvojena. $R_f = 0,23$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. = 275,0–278,3 °C. IR (ATR/cm $^{-1}$): 2966 (NH), 2932 (CH), 1714 (C=O), 1632, 1616 (C=N), 1331, 1240 (C–S), 1197. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C $_{27}$ H $_{36}$ N $_6$ O $_2$ S $_2$ izračunata vrednost za $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ jon je bila 271,1243, a nađena 271,1246; za jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ izračunata 541,2414, a nađena 541,2414.

(**10f-E**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,61 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 0,85 (td, $J = 11, 3$ Hz, 1H, H-9), 0,93 (kd, $J = 13, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,04 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -19), 1,10–1,24 (m, 2H, H-14, H α -15), 1,25–1,35 (m, 3H, H α -1, H α -11, H α -12), 1,45–1,56 (m, 2H, H-8, H β -11), 1,57–1,63 (m, 2H, H β -15, H β -16), 1,76 (m, 1H, H β -7), 1,83–1,95 (m, 2H, H β -1, H β -12), 1,91 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -21), 2,09 (m, 1H, H β -2), 2,21–2,28 (m, 2H, H α -6, H α -16), 2,29–2,35 (m, 2H, H β -6, H-17), 3,01 (dt, $J = 17, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 3,76 (s, 2H, H $_2$ -5''), 3,793 (s, 2H, H $_2$ -5'), 5,86 (s, 1H, H-4), 11,71 (s, 2H, $^{3'/3''}$ NH).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 173,8 (2s, C-4' i C-4''), 165,3 (s, C-20), 162,0 (s, C-3), 161,4 (s, C-2''), 161,3 (s, C-2'), 158,1 (s, C-5), 121,1 (d, C-4), 58,1 (d, C-17), 55,4 (d, C-14), 53,4 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 38,2 (t, C-12), 37,8 (s, C-10), 35,4 (d, C-8), 34,9 (t, C-1), 32,7 (t, C-5'), 32,6 (t, C-5''), 31,9 (t, C-7), 31,8 (t, C-6), 23,8 (t, C-15), 23,1 (t, C-16), 22,0 (t, C-2), 20,9 (t, C-11), 19,0 (k, C-21), 17,4 (k, C-19), 13,0 (k, C-18).

(**10f-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,61 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 0,85 (td, $J = 11, 3$ Hz,

1H, H-9), 0,93 (kd, $J = 13, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,08 (s, 3H, H₃C-19), 1,10–1,24 (m, 2H, H-14, H α -15), 1,25–1,35 (m, 2H, H α -11, H α -12), 1,40 (m, 1H, H α -1), 1,45–1,56 (m, 2H, H-8, H β -11), 1,57–1,63 (m, 2H, H β -15, H β -16), 1,76 (m, 1H, H β -7), 1,83–1,95 (m, 2H, H β -1, H β -12), 1,91 (s, 3H, H₃C-21), 2,16 (m, 1H, H α -6), 2,24 (m, 1H, H α -16), 2,28–2,35 (m, 2H, H β -2, H-17), 2,37 (m, 1H, H β -6), 2,41 (kd, $J = 14,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 3,76 (s, 2H, H₂-5''), 3,79 (s, 2H, H₂-5'), 6,50 (s, 1H, H-4), 11,70 (s, 2H, ^{3/3}NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 173,9 (s, C-4'), 173,8 (s, C-4''), 165,3 (s, C-20), 161,4 (s, C-2''), 161,3 (s, C-2'), 159,9 (s, C-5), 159,8 (s, C-3), 113,8 (d, C-4), 58,0 (d, C-17), 55,3 (d, C-14), 53,6 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 38,5 (s, C-10), 38,2 (t, C-12), 35,9 (t, C-1), 35,3 (d, C-8), 32,7 (t, C-5'), 32,6 (t, C-5''), 32,6 (t, C-6), 32,2 (t, C-7), 27,2 (t, C-2), 23,8 (t, C-15), 23,1 (t, C-16), 20,8 (t, C-11), 19,0 (k, C-21), 17,6 (k, C-19), 13,0 (k, C-18).

4.1.5. Generalna procedura za dobijanje mono- i bis(semikarbazona)

Steroidni semikarbazoni su dobijeni postupkom opisanim u literaturi.⁸⁵ rastvor steroida (**1a–e**) (3 mmol) u suvom etanolu (150 mL) je dodat semikarbazid (4 mmol). Reakciona smeša je refluktovana 1–2 h uz mešanje, a tok reakcije je praćen TLC-om u sistemu (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). Po završetku reakcije rastvarač je uklonjen pod sniženim pritiskom. Ostatak je kristalisan ili prečišćavan FCC tehnikom uz upotrebu eluenata koji su navedeni u svakom od pojedinačnih eksperimenata. U većini slučajeva proizvod je dobijen kao smeša dva diastereoizomera, *E* i *Z* (**4a–d** i **5a–d**), koji nisu razdvojeni.⁶²

4.1.5.1. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-3-semikarbazon (**4a**)

Polazeći od 815 mg 19-norandrost-4-en-3,17-diona (**1a**), eluiranjem sistemom CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 2,5 izolovan je proizvod **4a** (*E* : *Z* = 55 : 45, 466 mg, 47,1%). $R_f = 0,28$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3422, 3146 (NH), 1732 (C(17)=O), 1678 (C=O^A), 1566, 1427 (C(3)=N), 1087. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₁₉H₂₇N₃O₂ izračunata vrednost [M+H]⁺ jona je bila 330,2176, a nađena 330,2171; za jon [M+Na]⁺ izračunata 352,1996, a nađena 352,2003; za jon [M+K]⁺ izračunata 368,1735, a nađena 368,1750.

(**4a-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,71 (t, $J = 10,5$ Hz, 1H, H-9), 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,97 (št, $J = 9,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,14–1,30 (m, 4H, H α -1, H β -11, H α -12,

H-14), 1,40–1,54 (m, 2H, H-8, H β -15), 1,63 (šd, $J = 11$ Hz, 1H, H β -12), 1,75–1,88 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -15), 1,90 (m, 1H, H β -2), 1,94–2,29 (m, 4H, H β -1, H α -6, H-10, H α -16), 2,34–2,43 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,68 (dt, $J = 16,5, 4$ Hz, 1H, H α -2), 5,83 (s, 1H, H-4), 6,16 (šs, 2H, NH $_2^A$), 9,11 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 219,7 (s, C-17), 157,3 (s, C=O A), 148,5 (s, C-5), 147,2 (s, C-3), 121,9 (d, C-4), 49,5 (d, C-14), 49,0 (d, C-9), 47,1 (s, C-13), 40,7 (d, C-10), 39,2 (d, C-8), 35,3 (t, C-16), 34,1 (t, C-6), 31,2 (t, C-12), 29,8 (t, C-7), 25,8 (t, C-1), 25,3 (t, C-11), 22,6 (t, C-2), 21,2 (t, C-15), 13,4 (k, C-18).

(**4a-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,71 (t, $J = 10,5$ Hz, 1H, H-9), 0,84 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 0,97 (št, $J = 9,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,14–1,30 (m, 4H, H α -1, H β -11, H α -12, H-14), 1,40–1,54 (m, 2H, H-8, H β -15), 1,63 (šd, $J = 11$ Hz, 1H, H β -12), 1,75–1,88 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -15), 1,94–2,29 (m, 6H, H β -1, H α -2, H β -2, H α -6, H-10, H α -16), 2,34–2,43 (m, 2H, H β -6, H β -16), 6,52 (s, 1H, H-4), 6,21 (šs, 2H, NH $_2^A$), 9,33 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 219,6 (s, C-17), 157,3 (s, C=O A), 153,7 (s, C-5), 144,5 (s, C-3), 112,9 (d, C-4), 49,4 (d, C-14), 49,3 (d, C-9), 47,1 (s, C-13), 42,1 (d, C-10), 39,3 (d, C-8), 35,3 (t, C-16), 34,9 (t, C-6), 31,1 (t, C-12), 30,0 (t, C-2), 30,0 (t, C-7), 27,3 (t, C-1), 25,1 (t, C-11), 21,2 (t, C-15), 13,4 (k, C-18).

Daljim eluiranjem sistemom CH $_2$ Cl $_2$: MeOH = 100 : 12 izolovan je proizvod **5a**.

4.1.5.2. 19-Norandrost-4-en-3,17-dion-bis(semikarbazon) (**5a**)

5a ($E : Z = 1 : 1$, 280 mg, 24,2%). $R_f = 0,15$ (CH $_2$ Cl $_2$ /MeOH = 20:1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm $^{-1}$): 3461 i 3199 (NH), 2925, 1688 (C=O A), 1572, 1467, 1420 (C(3/17)=N), 1088. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C $_{20}$ H $_{30}$ N $_6$ O $_2$ izračunata vrednost za [M+H] $^+$ jon je bila 387,2503, a nađena 387,2498; za jon [M+2H] $^{2+}$ izračunata 194,1288, a nađena 194,1289.

(**5a-E**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,75 (m, 1H, H-9), 0,85 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 0,97 (td, $J = 12,5, 3$ Hz, 1H, H α -7), 1,09 (m, 1H, H-14), 1,20–1,29 (m, 3H, H α -1, H β -11, H α -12), 1,31–1,43 (m, 2H, H-8, H β -15), 1,73–1,88 (m, 5H, H β -1, H β -7, H α -11, H β -12, H α -15), 1,92 (m, 1H, H β -2), 1,96 (m, 1H, H-10), 2,11–2,19 (m, 2H, H α -6, H α -16), 2,33–2,42 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,69 (dt, $J = 16,5, 4$ Hz, 1H, H α -2), 5,83 (s, 1H, H-4),

6,09 (šs, 2H, NH₂^D), 6,14 (šs, 2H, NH₂^A), 8,71 (s, 1H, NH^D), 9,06 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 163,0 (s, C-17), 157,4 (s, C=O^D), 157,3 (s, C=O^A), 148,7 (s, C-5), 147,3 (s, C-3), 121,8 (d, C-4), 51,9 (d, C-14), 49,3 (d, C-9), 43,9 (s, C-13), 40,9 (d, C-10), 39,3 (d, C-8), 34,2 (t, C-6), 33,9 (t, C-12), 30,6 (t, C-7), 26,2 (t, C-16), 25,9 (t, C-1), 25,7 (t, C-11), 22,9 (t, C-15), 22,6 (t, C-2), 17,0 (k, C-18).

(**5a-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,75 (m, 1H, H-9), 0,85 (s, 3H, H₃C-18), 0,97 (td, *J* = 12,5, 3 Hz, 1H, H α -7), 1,09 (m, 1H, H-14), 1,20–1,29 (m, 3H, H α -1, H β -11, H α -12), 1,31–1,43 (m, 2H, H-8, H β -15), 1,73–1,88 (m, 5H, H β -1, H β -7, H α -11, H β -12, H α -15), 2,02 (m, 1H, H-10), 2,11–2,19 (m, 2H, H α -6, H α -16), 2,21 (m, 1H, H β -2), 2,33–2,42 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,29 (dt, *J* = 14,5, 4 Hz, 1H, H α -2), 6,09 (šs, 2H, NH₂^D), 6,20 (šs, 2H, NH₂^A), 6,51 (s, 1H, H-4), 8,71 (s, 1H, NH^D), 9,29 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 162,9 (s, C-17), 157,4 (s, C=O^D), 157,2 (s, C=O^A), 153,9 (s, C-5), 144,6 (s, C-3), 112,8 (d, C-4), 51,8 (d, C-14), 49,5 (d, C-9), 43,9 (s, C-13), 42,3 (d, C-10), 40,4 (d, C-8), 35,0 (t, C-6), 33,8 (t, C-12), 30,4 (t, C-7), 30,1 (t, C-2), 27,3 (t, C-1), 26,2 (t, C-16), 25,5 (t, C-11), 22,9 (t, C-15), 17,0 (k, C-18).

4.1.5.3. Androst-4-en-3,17-dion-3-semikarbazon (**4b**)

Polazeći od 860 mg androst-4-en-3,17-diona (**1b**) eluranjem sistemom CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 2,5) izolovano je jedinjenje **4b** (*E* : *Z* = 8 : 2, 520 mg, 50,5%). *R*_f = 0,30 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 205 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3448, 3199 (NH), 2937, 1739 (C(17)=O), 1682 (C=O^A), 1577, 1428 (C(3)=N), 1088. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₀H₂₉N₃O₂ izračunata vrednost za jon [M+H]⁺ je bila 344,2332, a nađena 344,2328.

(**4b-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,81 (s, 3H, H₃C-18), 0,82 (m, 1H, H-9, preklapljen sa H₃C-18), 0,93 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,01 (s, 3H, H₃C-19), 1,15 (td, *J* = 12,5, 3,5 Hz, 1H, H α -12), 1,21–1,30 (m, 2H, H α -1, H-14), 1,35 (m, 1H, H β -2), 1,49 (dtd, *J* = 3, 3,5, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,57 (m, 1H, H β -11), 1,61–1,68 (m, 2H, H β -1, H β -12), 1,79–1,89 (m, 3H, H β -7, H-8, H α -15), 1,92–2,03 (m, 2H, H α -11, H α -16), 2,18 (dt, *J* = 12, 3,5 Hz, 1H, H α -6), 2,31 (td, *J* = 14, 4,5 Hz, 1H, H β -6), 2,38 (dd, *J* = 19, 8,5 Hz, 1H, H β -16), 2,65 (dt, *J* = 17, 3 Hz, 1H, H α -2), 5,73 (s, 1H, H-4), 6,19 (šs, 2H, NH₂^A), 9,06 (s, 1H, NH^A).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 219,6 (s, C-17), 157,2 (s, C=O^A), 152,8 (s, C-5), 146,8 (s, C-3), 121,2 (d, C-4), 53,2 (d, C-9), 50,2 (d, C-14), 46,9 (s, C-13), 37,2 (s, C-10), 35,3 (d, C-16), 34,7 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 31,4 (t, C-6), 31,2 (t, C-12), 30,7 (t, C-7), 21,4 (t, C-15), 20,4 (t, C-11), 20,3 (t, C-2), 17,5 (k, C-19), 13,4 (k, C-18).

(**4b-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,81 (s, 3H, H₃C-18), 0,82 (m, 1H, H-9, preklopljen sa H₃C-18), 0,93 (kd, $J = 13, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,07 (s, 3H, H₃C-19), 1,15 (td, $J = 12,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -12), 1,25 (m, 1H, H-14), 1,31 (m, 1H, H α -1), 1,49 (dtd, $J = 3, 3,5, 3$ Hz, 1H, H β -15), 1,57 (m, 1H, H β -11), 1,61–1,68 (m, 2H, H β -1, H β -12), 1,79–1,89 (m, 3H, H β -7, H-8, H α -15), 1,92–2,03 (m, 2H, H α -11, H α -16), 2,18 (dt, $J = 12, 3,5$ Hz, 1H, H α -6), 2,19 (m, 1H, H β -2), 2,33 (m, 1H, H β -6), 2,38 (dd, $J = 19, 8,5$ Hz, 1H, H β -16), 2,29 (m, 1H, H α -2), 6,43 (s, 1H, H-4), 6,12 (šs, 2H, NH₂^A), 9,30 (s, 1H, NH^A).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 219,6 (s, C-17), 157,8 (s, C-5), 157,2 (s, C=O^A), 143,9 (s, C-3), 112,0 (d, C-4), 53,5 (d, C-9), 50,1 (d, C-14), 46,9 (s, C-13), 38,3 (s, C-10), 36,1 (t, C-1), 35,3 (d, C-16), 34,6 (d, C-8), 32,1 (t, C-6), 31,2 (t, C-12), 31,1 (t, C-7), 27,3 (t, C-2), 21,4 (t, C-15), 20,1 (t, C-11), 17,8 (k, C-19), 13,4 (k, C-18).

Daljim eluiranjem sistemom CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 12 izolovano je jedinjenje **5b**.

4.1.5.4. Androst-4-en-3,17-dion-bis(semikarbazon) (**5b**)

5b (*E* : *Z* = 55 : 45, 162 mg, 13,5%). $R_f = 0,15$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3458, 3320 (NH^{A,D}), 2937, 1666 (C=O^{A,D}), 1573, 1475, 1426 (C(3/17)=N), 1122, 1088. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C₂₁H₃₂N₆O₂ izračunata vrednost za jon [M+H]⁺ je bila 401,2660, a nađena 401,2654; za jon [M+2H]²⁺ izračunata 201,1366, a nađena 201,1368.

(**5b-E**). ^1H -NMR (500 MHz, CDCl₃/CD₃OD- d_4): 0,94 (s, 3H, H₃C-18), 0,95 (m, 1H, H-9, preklopljen sa H₃C-18), 0,95 (td, $J = 12,5, 4$ Hz, 1H, H α -7), 1,13 (s, 3H, H₃C-19), 1,18, (m, 1H, H-14, preklopljen sa H₃C-19 iz *Z*-izomera), 1,37 (m, 1H, H α -12), 1,43–1,58 (m, 3H, H α -1, H β -11, H β -15), 1,61–1,75 (m, 2H, H-8, H α -11), 1,85–2,05 (m, 4H, H β -1, H β -7, H β -12, H α -15), 2,15 (m, 1H, H β -2), 2,22 (dd, $J = 18,5, 9$ Hz, 1H, H α -16), 2,29 (št, $J = 2$ Hz, 1H, H α -6) 2,36 (št, $J = 3$ Hz, 1H, H β -6), 2,42 (dd, $J = 18,5, 8,5$ Hz, 1H, H β -16), 2,60 (dt, $J = 16,5, 4$ Hz, 1H, H α -2), 5,83 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): 165,0 (s, C-17), 158,5 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 158,3 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{D}}$), 154,9 (s, C-5), 149,1 (s, C-3), 120,3 (d, C-4), 53,5 (d, C-9), 52,7 (d, C-14), 43,8 (s, C-13), 37,3 (s, C-10), 34,8 (d, C-8), 34,3 (t, C-1), 33,5 (t, C-12), 31,6 (t, C-6), 31,1 (t, C-7), 25,2 (t, C-16), 22,9 (t, C-15), 20,4 (t, C-11), 19,8 (t, C-2), 17,0 (k, C-19), 16,2 (k, C-18).

(**5b-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): 0,94 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,95 (m, 1H, H-9, preklopljen sa $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,95 (td, $J = 12,5, 4$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,18 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,18 (m, 1H, H-14, preklopljen sa $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,37 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-12}$), 1,43–1,58 (m, 3H, $\text{H}\alpha\text{-1}$, $\text{H}\beta\text{-11}$, $\text{H}\beta\text{-15}$), 1,61–1,75 (m, 2H, H-8, $\text{H}\alpha\text{-11}$), 1,85–2,05 (m, 4H, $\text{H}\beta\text{-1}$, $\text{H}\beta\text{-7}$, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\alpha\text{-15}$), 2,22 (dd, $J = 18,5, 9$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 2,32 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-6}$), 2,36 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-2}$, preklopljen sa $\text{H}\beta\text{-6}$ iz *E*-izomera), 2,42 (dd, $J = 18,5, 8,5$ Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-16}$), 2,43 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-2}$), 2,48 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-6}$), 6,15 (s, 1H, H-4).

^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): 164,8 (s, C-17), 162,2 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 160,6 (s, C-5), 158,3 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{D}}$), 147,5 (s, C-3), 110,2 (d, C-4), 53,9 (d, C-9), 52,6 (d, C-14), 43,9 (s, C-13), 38,6 (s, C-10), 36,0 (t, C-1), 34,7 (d, C-8), 33,4 (t, C-12), 32,5 (t, C-6), 31,6 (t, C-7), 27,2 (t, C-2), 25,2 (t, C-16), 22,9 (t, C-15), 20,2 (t, C-11), 17,5 (k, C-19), 16,3 (k, C-18).

4.1.5.5. (*E*)-Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-3-semikarbazon (**4c**)

Polazeći od 850 mg androsta-4,9(11)-dien-3,17-diona (**1c**) eluiranjem sistemom CH_2Cl_2 : MeOH = 100 : 5 izolovano je jedinjenje **4c** kao čist *E*-izomer (780 mg, 76%). $R_f = 0,30$ (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1). t.t. > 205 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 3427, 3211 (NH^{A}), 2927, 1734 (C(17)=O), 1686 ($\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 1592, 1473 (C(3)=N), 1089. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_2$ izračunata za jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ je bila 342,2176, a nađena 342,2173; za jon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunata 364,1996, a nađena 364,2000.

(**4c-E**). ^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,78 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,96 (kd, $J = 13, 3,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-7}$), 1,18 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,50 (m, H-14), 1,56 (dtd, $J = 3, 3,5, 3$ Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-15}$), 1,68 (td, $J = 13,5, 4,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-12}$), 1,90 (m, 1H, $\text{H}\alpha\text{-1}$), 1,98–2,05 (m, 4H, $\text{H}\beta\text{-1}$, $\text{H}\beta\text{-7}$, $\text{H}\beta\text{-12}$, $\text{H}\alpha\text{-15}$), 2,06–2,17 (m, 2H, $\text{H}\beta\text{-2}$, $\text{H}\alpha\text{-16}$), 2,26 (dt, $J = 11,5, 3$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-6}$), 2,34 (št, $J = 11$ Hz, 1H, H-8), 2,40 (dd, $J = 18,5, 8,5$ Hz, 1H, $\text{H}\beta\text{-16}$), 2,50 (m, 1H, $\text{H}\beta\text{-6}$), 2,73 (dt, $J = 17, 3,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha\text{-2}$), 5,48 (d, $J = 6$ Hz, 1H, H-11), 5,74

(s, 1H, H-4), 6,24 (šs, 2H, NH₂^A), 9,18 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 220,3 (s, C-17), 157,2 (s, C=O^A), 151,1 (s, C-5), 146,6 (s, C-3), 146,3 (s, C-9), 121,3 (d, C-4), 116,3 (d, C-11), 47,3 (d, C-14), 45,2 (s, C-13), 39,8 (s, C-10), 36,6 (d, C-8), 35,8 (d, C-16), 33,1 (t, C-1), 32,7 (t, C-12), 31,4 (t, C-6), 31,1(t, C-7), 26,3 (k, C-19), 22,3 (t, C-15), 20,8 (t, C-2), 13,6 (k, C-18).

Daljim eluiranjem sistemom CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 20 izolovano je jedinjenje **5c**.

4.1.5.6. Androsta-4,9(11)-dien-3,17-dion-bis(semikarbazon) (**5c**)

5c (*E* : *Z* = 85 : 15, 120 mg, 10%). *R*_f = 0,15 (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3463, 3202 (NH^{A,D}), 1685 (C=O^{A,D}), 1581, 1473, 1428 (C(3/17)=N), 1089. ESI-TOF-MS (*m/z*): za molekulsku formulu C₂₁H₃₀N₆O₂ izračunata vrednost za [M+H]⁺ jon je bila 399,2503, a nađena 399,2496; za jon [M+2H]²⁺ izračunata 200,1288, a nađena 200,1290; za jon [M+Na]⁺ izračunata 421,2322, a nađena 421,2321.

(**5c-E**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,79 (s, 3H, H₃C-18), 0,96 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,17 (s, 3H, H₃C-19), 1,26 (m, H-14), 1,43 (dtd, *J* = 3, 3, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,68 (td, *J* = 13,5, 5 Hz, 1H, H α -1), 1,88–2,02 (m, 3H, H β -1, H β -7, H α -15), 2,06–2,13 (m, 3H, H β -2, H α -12, H β -12), 2,18 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H α -16), 2,21 (m, 1H, H-8), 2,24 (dt, *J* = 18, 3 Hz, 1H, H α -6), 2,44 (dd, *J* = 18,5, 9 Hz, 1H, H β -16), 2,48 (m, 1H, H β -6), 2,74 (dt, *J* = 17, 3,5 Hz, 1H, H α -2), 5,48 (d, *J* = 5 Hz, 1H, H-11), 5,75 (s, 1H, H-4), 6,14 (šs, 2H, NH₂^D), 6,24 (s, 2H, NH₂^A), 8,81 (s, 1H, NH), 9,15 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 162,6 (s, C-17), 157,4 (s, C=O^D), 157,3 (s, C=O^A), 151,4 (s, C-5), 146,6 (s, C-3), 146,1 (s, C-9), 121,3 (d, C-4), 117,0 (d, C-11), 49,7 (d, C-14), 42,2 (s, C-13), 39,7 (s, C-10, preklopljen sa DMSO), 36,4 (t, C-8), 36,2 (d, C-12), 32,6 (t, C-1), 31,7 (t, C-6), 31,5(t, C-7), 26,6 (t, C-16), 26,2 (k, C-19), 24,0 (t, C-15), 20,8 (t, C-2), 17,1 (k, C-18).

(**5c-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,79 (s, 3H, H₃C-18), 0,96 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,23 (s, 3H, H₃C-19), 1,26 (m, H-14), 1,43 (dtd, *J* = 3, 3, 3 Hz, 1H, H β -15), 1,79 (td, *J* = 13,5, 3,5 Hz, 1H, H α -1), 1,88–2,02 (m, 3H, H β -1, H β -7, H α -15), 2,06–2,10 (m, 1H, H α -12, H β -12), 2,18 (dd, *J* = 19, 9,5 Hz, 1H, H α -16), 2,21 (m, 1H, H-8), 2,24 (dt, *J* = 18, 3 Hz, 1H, H α -6), 2,32 (t, *J* = 3,5 Hz, 1H, H β -2), 2,38 (m, 1H, H α -2), 2,44

(dd, $J = 18,5, 9$ Hz, 1H, H β -16), 2,48 (m, 1H, H β -6), 5,48 (d, $J = 5$ Hz, 1H, H-11), 6,14 (šs, 2H, NH $_2^D$), 6,18 (s, 2H, NH $_2^A$), 6,45 (s, 1H, H-4), 8,81 (s, 1H, NH D), 9,35 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 162,6 (s, C-17), 157,4 (s, C=O D), 157,3 (s, C=O A), 156,4 (s, C-5), 146,1 (s, C-9), 144,2 (s, C-3), 117,0 (d, C-11), 112,3 (d, C-4), 49,7 (d, C-14), 42,2 (s, C-13), 41,0 (s, C-10, preklopljen sa DMSO), 36,4 (t, C-8), 36,2 (d, C-12), 34,4 (t, C-1), 32,1 (t, C-6), 31,5 (t, C-7), 27,6 (t, C-2), 26,6 (t, C-16), 26,6 (k, C-19), 24,0 (t, C-15), 17,1 (k, C-18).

4.1.5.7. 11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-3-semikarbazon (4d)

Polazeći od 910 mg 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-diona (**1d**) eluiranjem sistemom CH $_2$ Cl $_2$: MeOH = 100 : 5 izolovan je proizvod **4d** ($E : Z = 8 : 2$, 163 mg, 15,1%). $R_f = 0,53$ (CH $_2$ Cl $_2$: MeOH = 20 : 2). t.t. > 218 °C (raspada se). IR (ATR/cm $^{-1}$): 3456 ($^{11\alpha}$ OH), 3209 (NH A), 2929, 1731 (C(17)=O), 1689 (C=O A), 1572, 1458, (C(3)=N), 1087, 730. HESI-Orbitrap MS (m/z): za molekulsku formulu C $_{20}$ H $_{29}$ N $_3$ O $_3$ izračunata vrednost za jon [M+H] $^+$ je bila 360,2282, a nađena 360,2264.

(**4d-E**). ^1H -NMR (200 MHz, CDCl $_3$): 0,93 (s, 3H, H $_3$ C-18), 1,00–1,15 (m, 2H, H α -7, H-9), 1,21 (s, 3H, H $_3$ C-19), 1,26–1,49 (m, 2H), 1,52–1,75 (m, 3H), 1,81–2,36 (m, 9H), 2,40–2,59 (m, 2H) 2,66 (dt, $J = 14, 3,2$ Hz, 1H, H α -2), 4,01 (td, $J = 10,8, 4,6$ Hz, 1H, H β -11), 5,83 (s, 1H, H-4), 6,20 (m, 2H, NH $_2^A$), 8,31 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl $_3$): 219,0 (s, C-17), 157,9 (s, C=O A), 155,0 (s, C-5), 148,8 (s, C-3), 121,7 (d, C-4), 68,7 (d, C-11), 59,1 (d, C-9), 50,1 (d, C-14), 48,0 (s, C-13), 48,0 (t, C-12), 39,0 (s, C-10), 35,8 (t, C-16), 34,7 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 32,8 (t, C-6), 30,3 (t, C-7), 21,6 (t, C-15), 20,6 (t, C-2), 18,5 (k, C-19), 14,6 (k, C-18).

(**4d-Z**). ^1H -NMR (200 MHz, CDCl $_3$): 0,93 (s, 3H, H $_3$ C-18), 1,00–1,15 (m, 2H, H α -7, H-9), 1,26 (s, 3H, H $_3$ C-19), 1,26–1,49 (m, 2H), 1,52–1,75 (m, 3H), 1,81–2,36 (m, 9H), 2,40–2,59 (m, 3H), 4,01 (td, $J = 10,8, 4,6$ Hz, 1H, H β -11), 6,08 (m, 2H, NH $_2^A$), 6,15 (s, 1H, H-4), 8,09 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (50 MHz, CDCl $_3$): 219,0 (s, C-17), 157,9 (s, C=O A), 155,0 (s, C-5), 148,8 (s, C-3), 111,8 (d, C-4), 68,7 (d, C-11), 59,1 (d, C-9), 50,1 (d, C-14), 48,0 (s, C-13), 48,0 (t, C-12), 39,0 (s, C-10), 35,8 (t, C-16), 34,7 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 32,8 (t, C-6), 30,3 (t, C-7), 27,7 (t, C-2), 21,6 (t, C-15), 18,5 (k, C-19), 14,6 (k, C-18).

Daljim eluiranjem istim eluentom izolovano je jedinjenje **6d**.

4.1.5.8. (*E*)-11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion-17-semikarbazon (**6d**)

Dobijen je čist *E*-izomer jedinjenja **6d** (147 mg, 13,6%). $R_f = 0,44$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 2$). t.t. > 215 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 3456 ($^{11\alpha}\text{OH}$), 3196 (NH^{D}), 2940, 1695 ($\text{C}=\text{O}^{\text{D}}$), 1638 ($\text{C}(3)=\text{O}$), 1576, 1415, ($\text{C}(17)=\text{N}$), 1083. HESI-Orbitrap MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{10}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$ izračunata vrednost za $[\text{M}+\text{H}]^+$ jon bila je 360,2282, a nađena 360,2264.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 0,83 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 1,01 (kd, $J = 13, 3$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -7), 1,06 (t, $J = 11,5$ Hz, 1H, H-9), 1,13 (m, 1H, H-14), 1,25 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,26 (m, 1H, $\text{H}\alpha$ -12, preklopljen sa $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,35 (dtd, $J = 3, 2,5, 3$ Hz, 1H, $\text{H}\beta$ -15), 1,60 (kd, $J = 11, 3$ Hz, 1H, H-8), 1,75 (m, 1H, $\text{H}\alpha$ -15), 1,82 (šd, $J = 12,5$ Hz, 1H, $\text{H}\beta$ -7), 1,93 (td, $J = 14, 4,5$ Hz, 1H, $\text{H}\beta$ -2), 2,09 (dd, $J = 12, 4$ Hz, 1H, $\text{H}\beta$ -12), 2,14 (t, $J = 4$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -1), 2,17–2,26 (m, 2H, $\text{H}\alpha$ -6, $\text{H}\alpha$ -16), 2,28–2,44 (m, 3H, $\text{H}\beta$ -6, $\text{H}\beta$ -16, $\text{H}\beta$ -1), 2,58 (dt, $J = 14,5, 4$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha$ -2), 3,85 (m, 1H, $\text{H}\beta$ -11), 4,35 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, OH-11), 5,61 (s, 1H, H-4), 6,08 (šs, 2H, NH_2^{D}), 8,73 (s, 1H, NH^{D}).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): 198,6 (s, C-3), 171,5 (s, C-5), 162,1 (s, C-17), 157,3 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{D}}$), 123,6 (d, C-4), 67,2 (d, C-11), 58,6 (d, C-9), 51,9 (d, C-14), 45,1 (t, C-12), 44,2 (s, C-13), 39,5 (s, C-10), 36,9 (t, C-2), 33,9 (t, C-1), 33,8 (d, C-8), 32,8 (t, C-6), 30,9 (t, C-7), 26,3 (t, C-16), 22,9 (t, C-15), 18,0 (k, C-19), 17,9 (k, C-18).

Nastavkom eluiranja sistemom $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 100 : 30$ izolovan je proizvod **5d**.

4.1.5.9. (*E*)-11 α -Hidroksiandrost-4-en-3,17-dion bis(semikarbazon) (**5d**)

Dobijen je čist *E*-izomer jedinjenja **5d** (215 mg, 17,2%). $R_f = 0,21$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 20 : 2$). t.t. > 223 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 3457 ($^{11\alpha}\text{OH}$), 3284 ($\text{NH}^{\text{A,D}}$), 2927, 1681 ($\text{C}=\text{O}^{\text{A,D}}$), 1571, 1420 ($\text{C}(3/17)=\text{N}$), 1082. HESI-Orbitrap MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_6$ izračunata vrednost za jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ je bila 417,2609, a nađena 417,2626.

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD-}d_4$): 0,76 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-18}$), 0,85–0,99 (m, 2H, $\text{H}\alpha$ -7, H-9), 1,05 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C-19}$), 1,16–1,29 (m, 2H), 1,35–1,55 (m, 2H), 1,60–1,86 (m, 3H), 1,93–2,29 (m, 6H), 2,32–2,56 (m, 3H), 3,83 (m, 1H, $\text{H}\beta$ -11), 5,65 (s, 1H, H-4), 8,10 (s, 1H, NH^{D}), 8,39 (s, 1H, NH^{A}).

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): 163,9 (s, C-17), 158,6 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{D}}$), 158,5 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 155,7 (s, C-5), 149,6 (s, C-3), 121,1 (d, C-4), 68,1 (d, C-11), 58,6 (d, C-9), 51,8 (d, C-14), 44,6 (t, C-12), 44,3 (s, C-13), 38,7 (s, C-10), 35,6 (d, C-8), 34,4 (t, C-1), 32,7 (t, C-6), 30,9 (t, C-7), 25,6 (t, C-16), 23,0 (t, C-15), 20,3 (t, C-2), 18,1 (k, C-19), 17,4 (k, C-18).

4.1.5.10. (*E*)-Progesteron-3-semikarbazon (**4f**)

Polazeći od 940 mg progesterona (**1f**) eluiranjem sistemom CH_2Cl_2 : MeOH = 100 : 4 izolovan je proizvod **4f** (*E* : *Z* = 9 : 1, 480 mg, 43,1%). R_f = 0,30 (CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1). t.t. > 200 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 3473, 3310 (NH^{A}), 2930, 1696 ($\text{C}(20)=\text{O}$), 1676 ($\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 1577, 1428 ($\text{C}(3)=\text{N}$), 1358, 757. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2$ izračunata vrednost za jon $[\text{M}+\text{H}]^+$ je bila 372,2646, a nađena 372,2644; za jon $[\text{M}+\text{Na}]^+$ izračunata 394,2465, a nađena 394,2473.

(**4f-E**). ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 0,56 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-18$), 0,83 (td, J = 12, 3,5 Hz, 1H, H-9), 0,90 (kd, J = 13,5, 3,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha-7$), 1,01 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-19$), 1,11–1,20 (m, 2H, H-14, $\text{H}\alpha-16$), 1,25–1,51 (m, 4H, $\text{H}\alpha-1$, H-8, $\text{H}\beta-11$, $\text{H}\alpha-12$), 1,53–1,59 (m, 2H, $\text{H}\alpha-11$, $\text{H}\beta-15$), 1,63 (m, 1H, $\text{H}\beta-16$), 1,72 (šd, J = 12,5 Hz, 1H, $\text{H}\beta-7$), 1,88 (m, 1H, $\text{H}\beta-1$), 1,94–2,05 (m, 3H, $\text{H}\beta-2$, $\text{H}\beta-12$, $\text{H}\alpha-15$), 2,06 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-21$), 2,16 (dt, J = 13,5, 3 Hz, 1H, $\text{H}\alpha-6$), 2,29 (td, J = 12,5, 3 Hz, 1H, $\text{H}\beta-6$), 2,57 (t, J = 9 Hz, 1H, H-17), 2,68 (dt, J = 17, 3 Hz, 1H, $\text{H}\alpha-2$), 5,73 (s, 1H, H-4), 6,21 (m, 2H, NH_2^{A}), 9,08 (s, 1H, NH^{A}).

^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 208,6 (s, C-20), 157,2 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 153,0 (s, C-5), 146,8 (s, C-3), 121,1 (d, C-4), 62,6 (d, C-17), 55,5 (d, C-14), 53,0 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 38,0 (t, C-12), 37,1 (s, C-10), 35,2 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 31,9 (t, C-7), 31,6 (t, C-6), 31,2 (k, C-21), 24,0 (t, C-16), 22,2 (t, C-15), 21,0 (t, C-11), 20,4 (t, C-2), 17,5 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

(**4f-Z**). ^1H -NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 0,56 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-18$), 0,83 (td, J = 12, 3,5 Hz, 1H, H-9), 0,90 (kd, J = 13,5, 3,5 Hz, 1H, $\text{H}\alpha-7$), 1,06 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-19$), 1,11–1,20 (m, 2H, H-14, $\text{H}\alpha-16$), 1,25–1,51 (m, 4H, $\text{H}\alpha-1$, H-8, $\text{H}\beta-11$, $\text{H}\alpha-12$), 1,53–1,59 (m, 2H, $\text{H}\alpha-11$, $\text{H}\beta-15$), 1,63 (m, 1H, $\text{H}\beta-16$), 1,72 (šd, J = 12,5 Hz, 1H, $\text{H}\beta-7$), 1,88 (m, 1H, $\text{H}\beta-1$), 1,94–2,05 (m, 2H, $\text{H}\beta-12$, $\text{H}\alpha-15$), 2,06 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-21$), 2,16 (dt, J = 13,5,

3 Hz, 1H, H α -6), 2,23 (m, 1H, H β -2), 2,29 (td, $J = 12,5$, 3 Hz, 1H, H β -6), 2,57 (t, $J = 9$ Hz, 1H, H-17), 2,35 (m, 1H, H α -2), 6,14 (m, 2H, NH $_2^A$), 6,43 (s, 1H, H-4), 9,32 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 208,6 (s, C-20), 158,1 (s, C-5), 157,2 (s, C=O A), 144,2 (s, C-3), 111,9 (d, C-4), 62,6 (d, C-17), 56,1 (d, C-14), 53,2 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 38,2 (s, C-10), 38,0 (t, C-12), 36,2 (t, C-1), 35,1 (d, C-8), 32,3 (t, C-7), 32,2 (t, C-6), 31,2 (k, C-21), 27,4 (t, C-2), 24,0 (t, C-16), 22,2 (t, C-15), 20,8 (t, C-11), 17,8 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

Nastavkom eluiranja sistemom CH $_2$ Cl $_2$: MeOH = 100 : 15 izolovano je jedinjenje **5f**.

4.1.5.11. (*E*)-Pregn-4-en-3,20-dion-bis(semikarbazon) (**5f**)

Dobijen je čist *E*-izomer jedinjenja **5f** (128 mg, 10,2%). $R_f = 0,18$ (CH $_2$ Cl $_2$: MeOH = 100 : 2). t.t. > 220 °C (raspada se). IR (ATR/cm $^{-1}$): 3453, 3189 (NH A,D), 2937, 1687 (C=O A,D), 1570, 1437 (C(3/20)=N), 1116, 766. ESI-TOF-MS (m/z): za molekulsku formulu C $_{23}$ H $_{36}$ N $_6$ O $_2$ izračunata vrednost za jon [M+H] $^+$ je bila 429,2972, a nađena 429,2968; za jon [M+Na] $^+$ izračunata 451,2792, a nađena 451,2795.

^1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6): 0,55 (s, 3H, H $_3$ C-18), 0,81 (m, 1H, H-9), 0,89 (kd, $J = 13$, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,00 (s, 3H, H $_3$ C-19), 1,08–1,21 (m, 2H, H-14, H α -15), 1,23–1,36 (m, 3H, H α -1, H β -11, H β -12), 1,44 (kd, $J = 10,5$, 2 Hz, 1H, H-8), 1,50–1,58 (m, 2H, H α -11, H α -16), 1,61 (m, 1H, H β -15), 1,73 (m, 1H, H β -7), 1,76 (s, 3H, H $_3$ C-21), 1,80 (m, 1H, H α -12), 1,87 (šd, $J = 13$ Hz, 1H, H β -1), 1,97 (dtd, $J = 5$, 5, 4,5 Hz, 1H, H β -2), 2,15 (dt, $J = 13,5$, 2,5 Hz, 1H, H α -6), 2,19–2,25 (m, 2H, H β -16, H α -17), 2,29 (td, $J = 13,5$, 4 Hz, 1H, H β -6), 2,67 (dt, $J = 17$, 3 Hz, 1H, H α -2), 5,72 (s, 1H, H-4), 6,14 (šs, 2H, NH $_2^A$), 6,20 (s, 2H, NH $_2^D$), 8,78 (s, 1H, NH D), 9,06 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): 157,4 (s, C=O D), 157,1 (s, C=O A), 153,0 (s, C-5), 148,8 (s, C-20), 146,8 (s, C-3), 120,9 (d, C-4), 58,2 (d, C-17), 55,2 (d, C-14), 53,3 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 38,2 (t, C-12), 37,0 (s, C-10), 35,4 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 31,9 (t, C-6), 31,6 (t, C-7), 23,8 (t, C-15), 22,7 (t, C-16), 21,0 (t, C-11), 20,4 (t, C-2), 17,6 (k, C-21), 17,5 (k, C-19), 13,1 (k, C-18).

4.1.6. Generalna procedura za sintezu etil-hidrazinkarboksilata

U rastvor steroidnih semikarbazona (**4a–f**, 1 mmol) i anhidrovanog natrijum-acetata (123 mg, 1,5 mmol) u apsolutnom etanolu (30 mL), polako je dodavan etil-hloracetat (244 mg, 2 mmol). Reakcione smeše su refluktovane uz stalno mešanje do završetka reakcije (48–96 h, praćeno TLC-om), a nakon hlađenja na sobnu temperaturu su sipane u hladnu destilovanu vodu. Tako dobijeni rastvori su ekstrahovani hloroformom (tri puta), a zatim su ekstrakti sušeni pomoću natrijum-sulfata. Uparavanjem rastvarača su dobijene čvrste supstance koje su prečišćavane FCC tehnikom uz upotrebu sistema PhMe/EtOAc kao eluenta (prinos i odnos eluena je naveden u svakom od pojedinačnih eksperimenata).⁶² Fizičke osobine i spektralne karakteristike dobijenih proizvoda (**11a–f**) su navedene u tekstu koji sledi.

4.1.6.1. Etil-2-(17-okso-19-norandrost-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilat (**11a**)

Polazeći od 330 mg (*E*)-19-norandrost-4-en-3,17-diona-3-semikarbazona (**4a**), eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 70 : 30 dobijeno je jedinjenje **11a** (*E* : *Z* = 6 : 4, 114 mg, 31,7%). $R_f = 0,67$ (CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). t.t. > 160 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3232 i 2928 (NH^A), 1737 (C(17)=O), 1686 (C=O^A), 1424 (C(3)=N), 1300, 1057. Elementalna analiza za molekulsku formulu C₂₁H₃₀N₂O₃: izračunato: C 70,36; H 8,44; N 7,81; nađeno: C 69,87; H 8,10; N 7,44.

(**11a-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,80 (m, 1H, H-9), 0,92 (s, 3H, H₃C-18), 1,07 (td, $J = 12,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,22–1,36 (m, 7H, H α -1, H α -11, H β -12, H-14, CH₃^A), 1,45 (m, 1H, H-8), 1,56 (td, $J = 9, 3,5$ Hz, 1H, H β -15), 1,83 (m, 1H, H α -12), 1,86–2,00 (m, 5H, H β -2, H β -7, H-10, H α -11, H α -15), 2,10 (dd, $J = 19, 9$ Hz, 1H, H α -16), 2,14–2,22 (m, 2H, H β -1, H α -6), 2,38–2,50 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,56 (dt, $J = 15,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 4,28 (šd, $J = 5$ Hz, 2H, CH₂^A), 6,09 (s, 1H, H-4), 7,86 (s, 1H, NH^A).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,71 (td, $J = 13, 2,5$ Hz, 1H, H-9), 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,96 (td, $J = 11,5, 2,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,14 (šs, 1H, H α -1), 1,17 (m, 1H, H β -12), 1,18–1,23 (m, 4H, H β -11, CH₃^A), 1,28 (m, 1H, H-14), 1,44 (šd, $J = 11,5$ Hz, 1H, H-8), 1,50 (dtd, $J = 2,5$ Hz, 1H, H β -15), 1,63 (d, $J = 11$ Hz, 1H, H α -12), 1,75–1,88 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -15), 1,92 (dt, $J = 17,5, 3,5$ Hz, 1H, H β -2), 1,95–2,09 (m, 3H, H β -1, H-10, H α -16), 2,18 (m, 1H, H α -6), 2,34–2,44 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,71 (dt,

$J = 17, 4 \text{ Hz}$, 1H, H α -2), 4,09 (k, $J = 7\text{Hz}$, 2H, CH₂^A), 5,86 (s, 1H, H-4), 9,78 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 220,9 (s, C-17), 154,2 (s, C=O^A), 151,5 (s, C-3), 150,3 (s, C-5), 122,2 (d, C-4), 61,9 (t, CH₂^A), 50,3 (d, C-14), 49,5 (d, C-9), 47,8 (s, C-13), 41,5 (d, C-10), 40,0 (d, C-8), 35,8 (t, C-16), 34,7 (t, C-6), 31,4 (t, C-12), 30,1 (t, C-7), 26,0 (t, C-1), 25,9 (t, C-11), 22,2 (t, C-2), 21,7 (t, C-15), 14,6 (k, CH₃^A), 13,8 (k, C-18).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 220,4 (s, C-17), 154,1 (s, C=O^A), 151,8 (s, C-3), 149,9 (s, C-5), 121,7 (d, C-4), 60,2 (t, CH₂^A), 49,5 (d, C-14), 49,0 (d, C-9), 47,1 (s, C-13), 40,8 (d, C-10), 39,2 (d, C-8), 35,3 (t, C-16), 34,1 (t, C-6), 31,2 (t, C-12), 29,7 (t, C-7), 27,1 (t, C-1), 25,9 (t, C-11), 23,0 (t, C-2), 21,3 (t, C-15), 14,6 (k, CH₃^A), 13,4 (k, C-18).

(**11a-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,80 (m, 1H, H-9), 0,92 (s, 3H, H₃C-18), 1,07 (td, $J = 12,5, 3,5 \text{ Hz}$, 1H, H α -7), 1,22–1,36 (m, 8H, H α -1, H-8, H α -11, H β -12, H-14, CH₃^A), 1,57 (dtd, $J = 3,5 \text{ Hz}$, 1H, H β -15), 1,83 (m, 1H, H α -12), 1,86–2,00 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -15), 2,03 (m, 1H, H-10), 2,10 (dd, $J = 19, 9 \text{ Hz}$, 1H, H α -16), 2,16 (m, 1H, H β -1), 2,27 (td, $J = 14, 4 \text{ Hz}$, 2H, H β -2, H α -6), 2,38–2,50 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,56 (dt, $J = 15,5, 3,5 \text{ Hz}$, 1H, H α -2), 4,28 (šd, $J = 5 \text{ Hz}$, 2H, CH₂^A), 6,12 (s, 1H, H-4), 8,05 (šs, 1H, NH^A).

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,71 (td, $J = 13, 2,5 \text{ Hz}$, 1H, H-9), 0,84 (s, 3H, H₃C-18), 0,96 (td, $J = 11,5, 2,5 \text{ Hz}$, 1H, H α -7), 1,17 (m, 1H, H β -12), 1,18–1,23 (m, 6H, H α -1, H-8, H β -11, CH₃^A), 1,49 (m, 1H, H-14), 1,50 (dtd, $J = 2,5 \text{ Hz}$, 1H, H β -15), 1,63 (d, $J = 11 \text{ Hz}$, 1H, H α -12), 1,75–1,88 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -15), 1,95–2,09 (m, 3H, H β -1, H-10, H α -16), 2,18 (m, 2H, H β -2, H α -6), 2,29 (dt, $J = 14,5, 4 \text{ Hz}$, 1H, H α -2), 2,34–2,44 (m, 2H, H β -6, H β -16), 4,09 (k, $J = 7 \text{ Hz}$, 2H, CH₂), 6,51 (s, 1H, H-4), 9,98 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 220,6 (s, C-17), 156,7 (s, C-3), 154,2 (s, C=O^A), 150,5 (s, C-5), 111,1 (d, C-4), 61,9 (t, CH₂^A), 50,2 (d, C-14), 50,0 (d, C-9), 47,8 (s, C-13), 43,3 (d, C-10), 40,2 (d, C-8), 35,9 (t, C-6), 35,8 (t, C-16), 31,3 (t, C-12), 30,5 (t, C-2), 30,5 (t, C-7), 27,4 (t, C-1), 25,6 (t, C-11), 21,7 (t, C-15), 14,6 (k, CH₃^A), 13,8 (k, C-18).

¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): 220,3 (s, C-17), 154,1 (s, C=O^A), 154,4 (s, C-3), 148,9 (s, C-5), 112,9 (d, C-4), 60,1 (t, CH₂^A), 49,4 (d, C-14), 49,3 (d, C-9), 47,1 (s, C-13), 42,1 (d, C-10), 39,2 (d, C-8), 35,3 (t, C-16), 34,9 (t, C-6), 31,1 (t, C-12), 30,0 (t,

C-2), 29,9 (t, C-7), 27,1 (t, C-1), 25,1 (t, C-11), 21,3 (t, C-15), 14,6 (k, CH₃^A), 13,4 (k, C-18).

4.1.6.2. Etil-2-(17-oksoandrost-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilat (11b)

Polazeći od 340 mg androst-4-en-3,17-dion-3-semikarbazona (**4a**, *E* : *Z* = 8 : 2) eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 60 : 40 dobijeno je jedinjenje **11b**, *E* : *Z* = 8 : 2 (185,5 mg, 49,8%). *R*_f = 0,39 (PhMe : EtOAc = 6 : 4, dvostruko razvijanje). t.t. > 205 °C (raspada se). IR (ATR/cm⁻¹): 3232 (NH^A), 2928, 2864, 1737 (C(17)=O), 1687 (C=O^A), 1424, 1300 (C(3)=N), 1057. Elementalna analiza računata za C₂₂H₃₂N₂O₃ × 0,5 CH₂Cl₂ × 0,2 C₇H₈: C 66,45; H 8,06; N 6,40; nađena: C 66,11; H 8,04; N 6,23.

(**11b-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,90 (s, 3H, H₃C-18), 0,91 (m, 1H, H-9, preklopljen sa H₃C-18), 1,03 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H_α-7), 1,08 (s, 3H, H₃C-19), 1,24–1,29 (m, 2H, H_α-12, H-14), 1,31 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H, CH₃^A), 1,40–1,48 (m, 2H, H_α-1, H_α-11), 1,54 (dtd, *J* = 2, 2, 2 Hz, 1H, H_β-15), 1,65–1,70 (m, 2H, H-8, H_β-11), 1,84 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, H_β-12), 1,89 (m, 1H, H_β-7), 1,94–2,02 (m, 2H, H_β-1, H_α-15), 2,04–2,12 (m, 2H, H_β-2, H_α-16), 2,20–2,33 (m, 2H, H_α-6, H_β-6), 2,46 (dd, *J* = 19,5, 9 Hz, 1H, H_β-16), 2,54 (šd, *J* = 16 Hz, 1H, H_α-2), 4,28 (šd, *J* = 5 Hz, 2H, CH₂^A), 6,00 (s, 1H, H-4), 7,83 (šs, 1H, NH^A).

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): 220,8 (s, C-17), 154,9 (s, C-5), 154,3 (s, C=O^A), 150,9 (s, C-3), 121,3 (d, C-4), 61,9 (t, CH₂^A), 53,6 (d, C-9), 51,0 (d, C-14), 47,5 (s, C-13), 37,7 (s, C-10), 35,8 (d, C-16), 35,4 (t, C-8), 34,7 (t, C-1), 32,0 (t, C-6), 31,4 (t, C-12), 30,9 (t, C-7), 21,8 (t, C-15), 20,7 (t, C-11), 20,1 (t, C-2), 17,8 (k, C-19), 14,6 (k, CH₃^A), 13,7 (k, C-18).

(**11b-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,90 (s, 3H, H₃C-18), 0,91 (m, 1H, H-9, preklopljen sa H₃C-18), 1,03 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H_α-7), 1,14 (s, 3H, H₃C-19), 1,24–1,29 (m, 2H, H_α-12, H-14), 1,31 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H, CH₃^A), 1,40–1,48 (m, 2H, H_α-1, H_α-11), 1,54 (dtd, *J* = 2, 2, 2 Hz, 1H, H_β-15), 1,65–1,70 (m, 2H, H-8, H_β-11), 1,84 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, H_β-12), 1,88–1,93 (m, 2H, H_β-1, H_β-7), 1,98 (m, 1H, H_α-15), 2,09 (m, 1H, H_α-16), 2,20–2,33 (m, 2H, H_α-6, H_β-6), 2,40 (m, 1H, H_β-2), 2,46 (dd, *J* = 19,5, 9 Hz, 1H, H_β-16), 2,49 (m, 1H, H_α-2), 4,28 (šd, *J* = 5 Hz, 2H, CH₂^A), 6,05 (s, 1H, H-4), 7,83 (šs, 1H, NH^A).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 220,7 (s, C-17), 161,1 (s, C-5), 154,4 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 154,3 (s, C-3), 110,2 (d, C-4), 61,9 (t, CH_2^{A}), 54,1 (d, C-9), 50,9 (d, C-14), 47,6 (s, C-13), 39,2 (s, C-10), 36,5 (t, C-1), 35,8 (d, C-16), 35,3 (t, C-8), 33,1 (t, C-6), 31,4 (t, C-12), 31,2 (t, C-7), 27,8 (t, C-2), 21,8 (t, C-15), 20,4 (t, C-11), 18,2 (k, C-19), 14,6 (k, CH_3^{A}), 13,7 (k, C-18).

4.1.6.3. (*E*)-Etil-2-(17-oksoandrosta-4,9(11)-dien-3-iliden)hidrazinkarboksilat (**11c**)

Polazeći od 340 mg (*E*)-androsta-4,9(11)-dien-3,17-diona-3-semikarbazona (**4c-E**) eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 65 : 35 dobijeno je jedinjenje **11c-E** (198 mg, 53,5%). $R_f = 0,40$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4, dvostruko razvijanje). Kristalizacijom iz sistema $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ nisu dobijeni kristali pogodni za rendgensku analizu. t.t. > 77 °C (raspada se). IR (ATR/ cm^{-1}): 3258 (NH^{A}), 2964 i 2928 (CH), 1735 ($\text{C}(17)=\text{O}$), 1517, 1449 ($\text{C}(3)=\text{N}$), 1231, 1057. Elementalna analiza računata za $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3 \times 0,3 \text{CHCl}_3 \times 0,3 \text{C}_7\text{H}_8$: C 67,18; H 7,54; N 6,35; nađeno: C 67,35; H 7,66; N 6,50.

^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): 0,87 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-18$), 1,11 (kd, $J = 12,5, 3,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha-7$), 1,24 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C}-19$), 1,32 (t, $J = 6,5$ Hz, 3H, CH_3^{A}), 1,50 (m, H-14), 1,61 (m, 1H, $\text{H}\beta-15$), 1,89 (td, $J = 13, 5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha-12$), 2,03–2,09 (m, 3H, $\text{H}\alpha-1$, $\text{H}\beta-7$, $\text{H}\beta-12$), 2,11 (m, 1H, $\text{H}\beta-1$), 2,13 (m, 1H, $\text{H}\alpha-15$), 2,15 (m, 1H, $\text{H}\alpha-16$), 2,24 (m, 1H, $\text{H}\beta-2$), 2,34 (m, 1H, H-8), 2,27 (t, $J = 3$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha-6$), 2,48 (m, 1H, $\text{H}\beta-16$), 2,51 (m, 1H, $\text{H}\beta-6$), 2,58 (dt, $J = 16,5, 3,5$ Hz, 1H, $\text{H}\alpha-2$), 4,29 (šd, $J = 6$ Hz, 2H, CH_2^{A}), 5,52 (d, $J = 5$ Hz, 1H, H-11), 6,02 (s, 1H, H-4), 7,72 (s, 1H, NH^{A}).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): 221,4 (s, C-17), 153,5 (s, C-5), 150,8 (s, $\text{C}=\text{O}^{\text{A}}$), 150,7 (s, C-3), 146,0 (s, C-9), 121,5 (d, C-4), 117,2 (d, C-11), 61,9 (t, CH_2), 48,2 (d, C-14), 46,0 (s, C-13), 40,3 (s, C-10), 37,3 (t, C-8), 36,4 (d, C-16), 33,6 (t, C-1), 32,8 (t, C-12), 32,1 (t, C-6), 31,4 (t, C-7), 26,8 (k, C-19), 22,8 (t, C-15), 20,5 (t, C-2), 14,7 (k, CH_3^{A}), 14,0 (k, C-18).

4.1.6.4. (*E*)-Etil-2-(11 α -hidroksi-17-oksoandrost-4-en-3-iliden)-hidrazinkarboksilat (**11d**)

Polazeći od 360 mg 11 α -hidroksiandrost-4-en-3,17-diona-3-semikarbazona (**4d**) (*E* : *Z* = 8 : 2) eluiranjem sistemom PhMe : EtOAc = 50 : 50 dobijen je proizvod **11d** (*E* : *Z* = 8 : 2, 161,8 mg, 41,7%). $R_f = 0,49$ (PhMe : EtOAc = 6 : 4). t.t. > 120 °C (raspada se).

IR (ATR/cm⁻¹): 3450 (¹¹αOH), 3219 (NH^A), 2935 (CH), 1733 (C(17)=O), 1527 i 1458, (C(3)=N), 1236, 1026, 736. Elementalna analiza računata za C₂₂H₃₂N₂O₄ × 0,9 CHCl₃: C 55,46; H 6,69; N 5,65; nađeno: C 55,36; H 6,21; N 5,21.

(**11d-E**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,93 (s, 3H, H₃C-18), 1,03–1,13 (m, 2H, H_α-7, H-9), 1,21 (s, 3H, H₃C-19), 1,28–1,35 (m, 4H, CH₃^A, H_β-12), 1,39 (m, 1H, H-14), 1,54 (t, *J* = 12 Hz, H_β-15), 1,64 (šd, *J* = 11Hz, H-8), 1,72 (td, *J* = 13,5, 4,5 Hz, H_β-1), 1,88 (šd, *J* = 14 Hz, H_β-7), 1,96 (m, 1H, H_α-15), 2,13 (m, 3H, H_β-2, H_α-12, H_α-16), 2,26–2,35 (m, 2H, H_α-6, H_β-6), 2,39–2,51 (m, 2H, H_α-2, H_β-16), 2,67 (šd, *J* = 13,5 Hz, H_α-1), 4,02 (šs, 1H, H_β-11), 4,27 (šs, 2H, CH₂^A), 6,00 (s, 1H, H-4), 7,83 (s, 1H, NH^A). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 219,1 (s, C-17), 155,2 (s, C-5), 154,3 (s, C=O^A), 151,2 (s, C-3), 122,1 (d, C-4), 68,9 (d, C-11), 61,9 (t, CH₂^A), 59,1 (d, C-9), 50,2 (d, C-14), 48,1 (s, C-13), 42,9 (t, C-12), 39,1 (s, C-10), 36,0 (t, C-1), 35,8 (t, C-16), 34,8 (d, C-8), 32,9 (t, C-6), 30,5 (t, C-7), 21,8 (t, C-15), 20,5 (t, C-2), 18,6 (k, C-19), 14,7 (k, CH₃^A), 14,7 (k, C-18).

(**11d-Z**). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,93 (s, 3H, H₃C-18), 1,03–1,13 (m, 2H, H_α-7, H-9), 1,27 (s, 3H, H₃C-19), 1,28–1,35 (m, 4H, CH₃^A, H_β-12), 1,51 (m, 1H, H-14), 1,54 (t, *J* = 12 Hz, H_β-15), 1,64 (šd, *J* = 11Hz, H-8), 1,82 (m, 1H, H_β-1), 1,93 (m, 1H, H_β-7), 1,96 (m, 1H, H_α-15), 2,13 (m, 3H, H_β-2, H_α-12, H_α-16), 2,35–2,39 (m, 2H, H_α-6, H_β-6), 2,39–2,47 (m, 2H, H_α-2, H_β-16), 2,49 (m, H_α-1), 4,02 (šs, 1H, H_β-11), 4,27 (šs, 2H, CH₂^A), 6,05 (s, 1H, H-4), 8,03 (s, 1H, NH^A). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): 218,9 (s, C-17), 161,0 (s, C-5), 154,3 (s, C=O^A), 150,3 (s, C-3), 111,1 (d, C-4), 68,7 (d, C-11), 61,9 (t, CH₂^A), 59,5 (d, C-9), 50,1 (d, C-14), 48,1 (s, C-13), 42,8 (t, C-12), 40,7 (s, C-10), 38,1 (t, C-1), 35,8 (t, C-16), 34,6 (d, C-8), 33,9 (t, C-6), 31,0 (t, C-7), 27,8 (t, C-2), 21,8 (t, C-15), 19,0 (k, C-19), 14,7 (k, CH₃^A), 14,7 (k, C-18).

4.1.6.5. (*E*)-Etil-2-(20-okspregn-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilat (**11f**)

Polazeći od 370 mg (*E*)-progesteron-3-semikarbazona (**4f**) eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 70 : 30 izolovan je proizvod **11f-E** (194,8mg, 48,7%). *R*_f = 0,48 (PhMe : EtOAc = 6 : 4, dvostruko razvijanje). Kristalizacijom iz diizopropil-etra nismo uspjeli da dobijemo kristale pogodne za rendgensku analizu. t.t. 83,7 °C. IR (ATR/cm⁻¹): 3275

(NH^A), 2937 (CH), 1701 (C(20)=O), 1518, 1449 (C(3)=N), 1267, 1047. Elementalna analiza za molekulska formulu C₂₄H₃₈N₂O₃: izračunato C 71,96; H 9,06; N 6,99; nađeno: C 72,33; H 9,26, N 6,44.

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): 0,56 (s, 3H, H₃C-18), 0,82 (td, *J* = 11,5, 2,5 Hz, 1H, H-9), 0,90 (šk, *J* = 12 Hz, 1H, H α -7), 1,00 (s, 3H, H₃C-19), 1,09–1,17 (m, 2H, H-14, H α -16), 1,21 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH₃^A), 1,25–1,48 (m, 4H, H α -1, H-8, H β -11, H α -12), 1,50–1,60 (m, 2H, H α -11, H β -15), 1,62 (m, 1H, H β -16), 1,72 (šd, *J* = 11,5 Hz, 1H, H β -7), 1,86 (šd, *J* = 13 Hz, 1H, H β -1), 1,94–2,03 (m, 3H, H β -2, H β -12, H α -15), 2,06 (s, 3H, H₃C-21), 2,20 (t, *J* = 4 Hz, 1H, H α -6), 2,29 (m, 1H, H β -6), 2,56 (t, *J* = 9 Hz, 1H, H-17), 2,70 (d, *J* = 17 Hz, 1H, H α -2), 4,10 (k, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂^A), 5,75 (s, 1H, H-4), 9,78 (s, 1H, NH^A).

¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 208,6 (s, C-20), 154,2 (s, C-5 i C=O^A), 151,3 (s, C-3), 120,9 (d, C-4), 62,6 (d, C-17), 60,2 (t, CH₂^A), 55,4 (d, C-14), 53,0 (d, C-9), 43,3 (s, C-13), 38,0 (t, C-12), 37,0 (s, C-10), 35,2 (d, C-8), 34,5 (t, C-1), 31,8 (t, C-7), 31,6 (t, C-6), 31,1 (k, C-21), 24,0 (t, C-16), 22,2 (t, C-15), 20,9 (t, C-11), 20,7 (t, C-2), 17,4 (k, C-19), 14,6 (k, CH₃^A), 13,0 (k, C-18).

4.1.7. Sinteza etil-2-(17-okso-19-norandrost-4-en-3-iliden)hidrazinkarboksilata (11a) bez dodatka etil-hloracetata kao reagensa

Rastvor 19-norandrost-4-en-3,17-diona 3-semikarbazona (**4a**) (330 mg, 1 mmol) u apsolutnom etanolu (30 mL, 0,5 mol) koji je ujedno igrao i ulogu nukleofila refluktovan je 48 h na 80 °C. Tok reakcije je praćen TLC-om. Uparavanjem rastvarača je dobijena svetložuta čvrsta supstanca iz koje je prečišćavanjem FCC tehnikom dobijen proizvod **11a** (*E* : *Z* = 3 : 1, 170 mg, 47,3%). Posle nekoliko uzastopnih hromatografija eluiranjem pomoću sistema PhMe : EtOAc = 65 : 35 uspešno je izolovan dijastereoizomerno čist glavni izomer **5a-E** (98,6 mg, 27,4%). Ostatak je bio *E* : *Z* = 2 : 8 smeša proizvoda **11a** (49,7 mg, 13,8 %).

(**11a-E**): ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): 0,78 (šd, *J* = 11 Hz, 1H, H-9), 0,90 (s, 3H, H₃C-18), 1,04 (kd, *J* = 13, 3,5 Hz, 1H, H α -7), 1,23–1,35 (m, 7H, H α -1, H β -11, H β -12, H-14, CH₃^A), 1,42 (k, *J* = 10,5 Hz, 1H, H-8), 1,54 (dšsd, *J* = 3 Hz, 1H, H β -15), 1,78–1,90 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -12), 1,92–2,00 (m, 2H, H-10, H α -15), 2,02 (t, *J* = 5 Hz, 1H, H β -2), 2,08 (dd, *J* = 18,5, 9 Hz, 1H, H α -16), 2,11–2,22 (m, 2H, H β -1, H α -6), 2,38–2,47 (m,

2H, H β -6, H β -16), 2,53 (dt, $J = 16,5, 4$ Hz, 1H, H α -2), 4,26 (šd, $J = 5,5$ Hz, 2H, CH $_2^A$), 6,08 (s, 1H, H-4), 7,69 (s, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl $_3$): 220,9 (s, C-17), 154,0 (s, C=O A), 151,4 (s, C-3), 150,5 (s, C-5), 122,2 (d, C-4), 61,9 (t, CH $_2^A$), 50,4 (d, C-14), 49,6 (d, C-9), 47,8 (s, C-13), 41,6 (d, C-10), 40,1 (d, C-8), 35,8 (t, C-16), 34,8 (t, C-6), 31,5 (t, C-12), 30,1 (t, C-7), 26,1 (t, C-1), 26,0 (t, C-11), 22,2 (t, C-2), 21,8 (t, C-15), 14,7 (k, CH $_3^A$), 13,9 (k, C-18).

(**11a-Z**) iz smeše $E : Z = 2 : 8$. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl $_3$): 0,81 (šd, $J = 10,5$ Hz, 1H, H-9), 0,92 (s, 3H, H $_3\text{C}$ -18), 1,08 (kd, $J = 12,5, 3,5$ Hz, 1H, H α -7), 1,24 (m, 2H, H β -11, H β -12), 1,28 (m, 1H, H-14), 1,29–1,36 (m, 4H, H α -1, CH $_3^A$), 1,48 (kd, $J = 11, 2,5$ Hz, 1H, H-8), 1,57 (dtd, $J = 3,5$ Hz, 1H, H β -15), 1,83 (dd, $J = 8,5, 3$ Hz, 1H, H α -12), 1,87–2,00 (m, 3H, H β -7, H α -11, H α -15), 2,04 (m, 1H, H-10), 2,10 (dd, $J = 19,5, 9$ Hz, 1H, H α -16), 2,18 (m, 1H, H β -1), 2,27 (td, $J = 12, 3,5$ Hz, 2H, H β -2, H α -6), 2,42–2,51 (m, 2H, H β -6, H β -16), 2,54 (dt, $J = 14, 3,5$ Hz, 1H, H α -2), 4,28 (šd, $J = 5$ Hz, 2H, CH $_2^A$), 6,14 (s, 1H, H-4), 8,05 (šs, 1H, NH A).

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl $_3$): 220,6 (s, C-17), 156,7 (s, C-3), 154,6 (s, C=O A), 150,5 (s, C-5), 111,1 (d, C-4), 61,9 (t, CH $_2^A$), 50,2 (d, C-14), 50,0 (d, C-9), 47,8 (s, C-13), 43,3 (d, C-10), 40,1 (d, C-8), 35,9 (t, C-6), 35,8 (t, C-16), 31,3 (t, C-12), 30,5 (t, C-2), 30,5 (t, C-7), 27,4 (t, C-1), 25,5 (t, C-11), 21,7 (t, C-15), 14,7 (k, CH $_3^A$), 13,8 (k, C-18).

4.1.8. Rendgenska strukturna analiza

4.1.8.1. Određivanje kristalne strukture 1,3,4-tijadiazolina **7a**

Kristali pogodni za strukturnu analizu dobijeni su sporom prekrizacijom iz DMSO. Difrakcija X-zraka na monokristalu jedinjenja **7a** je rađena na sobnoj temperaturi na Agilent Technologies Gemini S difraktometru sa anodom od molibdena (Mo K α , $\lambda = 0,71069$ Å). Sakupljanje podataka, iznalaženje jedinične ćelije, integraljenje intenziteta i skaliranje refleksija urađeno je pomoću CrysAlisPro softvera.⁸⁶ Primenjena je empirijska korekcija apsorpcije upotrebom sfernih harmonika, u okviru SCALE3 ABSPACK algoritma u sklopu CrysAlisPro. Kristalna struktura je rešena metodom dualnog prostora koristeći SHELXT⁸⁷ program, a utajnjavana je upotrebom SHELXL-2014⁸⁷ sa SHELXLE⁸⁸ kao grafičkim interfejsom.

Svi nevodonični atomi su anizotropno utičjavani. Atomi vodonika vezani za atome ugljenika su postavljeni u geometrijski idealizovane pozicije, sa C–H rastojanjima fiksiranim na 0,93 i 0,96 Å, a parametri njihovog izotropnog izmeštanja podešeni su na 1,2 Ueq i 1,5 Ueq za sp² i sp³ atome ugljenika, redom. Orijehtacija vodonikovih atoma iz metil-grupa utičjavana je tako da se najbolje uklapa u uočenu elektronsku gustinu. Vodonikov atom vezan za atom azota lociran je u Fourier-ovoj mapi diferentne elektronske gustine i utičjavan je izotropno. Apsolutna struktura asigmirana je tako da odgovara poznatoj apsolutnoj konfiguraciji steroidnih molekula.

Detaljnim pregledom 3D Fourier-ove mape diferentne elektronske gustine ustanovljeno je da kristalna struktura sadrži šupljine koje su popunjene neuređenim molekulima rastvarača. Upotrebom programa PLATON⁸⁹ određena je ukupna zapremina šupljina u koje može da se smesti rastvarač. Ispostavilo se da ona iznosi 22,4% od jedinične zapremine ćelije. Kako neuređenost nije mogla racionalno da se modeluje, doprinos neuređenog regiona u dobijenim strukturnim faktorima uklonjen je SQUEEZE procedurom⁹⁰ ugrađenom u PLATON. Broj elektrona u regionu šupljine procenjen je na 120 po jediničnoj ćeliji što je odgovaralo smeštanju približno tri molekula DMSO po jediničnoj ćeliji. Analitički podaci o hemijskom sastavu ukazuju na prisustvo četiri molekula DMSO po jediničnoj ćeliji.

Konačni rezultati određivanja kristalne strukture navedeni su u tekstu koji sledi. Molekulska formula: C₂₃H₃₁N₃O₃S; $M_r = 429,57$; kristalni sistem: tetragonalni; prostorna grupa: *I4*; parametri jedinične ćelije: $a = 21,9810(3)$ Å, $c = 10,9904(3)$ Å, $V = 5310,2(2)$ Å³; $Z = 8$; $\mu = 0,146$ mm⁻¹; merene su 15 692 refleksije, 6 161 nezavisna refleksija ($R_{int} = 0,047$); kompletost podataka 99,7% do $2\theta = 52,64^\circ$, a 90,3% do $2\theta_{max} = 58,24^\circ$; 4 874 refleksije sa $I > 2\sigma(I)$; broj utičjavanih parametara: 278; $R_1 = 0,055$ za podatke sa $I > 2\sigma(I)$; $wR_2 = 0,149$ za sve podatke; faktor slaganja $S = 1,066$; Flack $x = 0,05(12)$ određen konvencionalnim TWIN/BASF utičjavanjem⁹¹; Flack $x = 0,03(3)$ određen upotrebom Parson-ove metode post-utičjavanja⁷⁰ (1 931 koeficijent); Hooft $y = 0,04(3)$ određen pomoću 2 769 Bijvoet-ovih parova (9 outliers)⁹² upotrebom optimizovanog Student-ovog *t*-grafika verovatnoće ($\nu = 99$, korekcionni koeficijent = 0,999).⁹³

Kristalografski podaci o jedinjenju **7a** deponovani su u Kembričkoj banci strukturnih

podataka (*Cambridge Crystallographic Data Centre*) kao dodatni materijal broj CCDC 1038059.

4.1.8.2. Određivanje kristalne strukture mono-tiazolidin-4-ona **9b-E**

Podaci o difrakciji X-zraka na kristalu **9b-E** sakupljeni su pomoću Gemini S difraktometra (Oxford Diffraction) sa anodom od molibdena (Mo $K\alpha$, $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) na sobnoj temperaturi. Prikupljanje sirovih podataka, redukcija i korekcije analitičke apsorpcije urađene su pomoću CRYALISPRO softvera.⁹⁴ Kristalna struktura rešena je upotrebom SHELXT,⁹⁵ a utačnjavan pomoću programa SHELXL-2014⁹⁶ sa SHELXLE⁸⁸ kao grafičkim interfejsom.

Svi atomi osim vodonikovih anizotropno su utačnjavani. Vodonikovi atomi postavljeni su na geometrijski idealizovane pozicije s fiksnim dužinama veza. Njihovi parametri izotropnog izmeštavanja usklađivani su sa U_{eq} su sa U_{eq} atoma na kojima se nalaze. Apsolutna konfiguracija asignirana je u skladu sa poznatom apsolutnom konfiguracijom steroidnih molekula. Okupacioni faktor za kiseonik iz vode utačnjen je na 0,475(2), dok je u poslednjem koraku utačnjavanja bio fiksiran na 0,5. Atomi vodonika iz molekula vode nisu mogli da budu locirani na osnovu mapa diferentne elektronske gustine.

Konačni rezultati određivanja kristalne strukture su sumirani ovde. Molekulska formula: $C_{22}H_{30}N_3O_{2,5}S$; $M_r = 408,55$; kristalni sistem: ortorombičan; prostorna grupa: $P2_12_12_1$; parametri elementarne ćelije: $a = 7,5223(3) \text{ \AA}$, $b = 9,7210(4) \text{ \AA}$, $c = 28,8938(16) \text{ \AA}$, $V = 2112,84(18) \text{ \AA}^3$; $Z = 4$; $\mu = 0,179 \text{ mm}^{-1}$; 19 050 izmerenih refleksija, 4 949 nezavisnih refleksija ($R_{int} = 0,038$); kompletnost podataka 99,9% do $2\theta = 52,64^\circ$, a 91,1% do $2\theta_{max} = 58,04^\circ$; 3 699 refleksija sa $I > 2\sigma(I)$; broj utačnjenih parametara: 264; $R_1 = 0,054$ za podatke sa $I > 2\sigma(I)$, $wR_2 = 0,174$ za sve podatke; faktor slaganja $S = 0,827$; Flack $x = 0,02(5)$ je određen Parson-ovom metodom.⁷⁰

Kristalografski podaci o jedinjenju **9b-E** deponovani su u Kembričkoj banci strukturnih podataka (*Cambridge Crystallographic Data Centre*) kao dodatni materijal broj CCDC 1541508.

4.2. Biologija

4.2.1. Citotoksična aktivnost derivata steroidnih hidrazona

4.2.1.1. Pripremanje potrebnih rastvora

Osnovni rastvori ispitivanih derivata steroidnih hidrazona (10 mM, DMSO) su razblaživani tzv. kompletnim hranljivim medijumom. To je hranljivi medijum RPMI 1640 koji sadrži L-glutamin (2 mM), streptomycin (100 µg/mL), penicilin (100 IU/mL), 10% serum goveđeg fetusa (engl. *fetal bovine serum*, FBS) koji je inaktivisan na 56°C i 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfonsku kiselinu (HEPES) (25 mM) čiji je pH podešen na vrednost 7,2 upotrebom bikarbonatnog rastvora. U eksperimentima je korišćen i Dulbecco modifikovani minimalni esencijalni medijum (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) koji sadrži 10% serum goveđeg fetusa, 3,97 mM stabilni L-glutamin, visok nivo glukoze (4,5 g/L), natrijum-piruvat, penicilin i streptomycin.

3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid (MTT) rastvoren je u fosfatnom puferu (PBS) do koncentracije 5 mg/mL. Korišćeni RPMI 1640 medijum za ćelijske kulture, FBS, HEPES, MTT i antibiotici su bili proizvodi kompanije Sigma Aldrich. DMEM medijum je bio proizvod kompanije Capricorn Scientific.

Koncentracije osnovnih i radnih rastvora ispitivanih steroidnih jedinjenja u dimetilsulfoksidu (DMSO) su pažljivo odabirane kako bi bio eliminisan bilo kakav moguću udeo toksičnih efekata DMSO.

4.2.1.2. Humane ćelijske kulture

Ispitivanja su vršena na sledećim humanim malignim ćelijskim linijama: HeLa (adenokarcinom cerviksa), MDA-MB-361 (adenokarcinom dojke), MDA-MB-453 (karcinom dojke), LS174 (adenokarcinom kolona), A549 (karcinom pluća), K562 (hronična mijeloidna leukemija), Jurkat (akutna T-limfocitna leukemija), kao i na normalnim humanim MRC-5 ćelijama (fibroblasti pluća) i na humanim EAhy.926 ćelijama (transformisane humane endotelne ćelije pupčane vene). Sve adherentne ćelijske linije (HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS174, A549, MRC-5 i EA.hy926) su održavane u kulturi u vidu monosloja u kompletnom hranljivom medijumu

dok su ćelijske linije leukemije, K562 i Jurkat, održavane u kulturi u suspenziji. Ćelijske kulture su gajene u inkubatoru na temperaturi od 37 °C, u atmosferi vazduha obogaćenog 5% CO₂ i zasićenog vodenom parom. Sve testirane ćelijske linije su dobijene od kompanije *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, Sjedinjene Američke Države).

4.2.1.3. Tretman humanih ćelijskih linija

Citotoksična aktivnost sintetisanih derivata steroidnih hidrazona je ispitivana na sedam malignih ćelijskih linija (HeLa, MDA-MB-361, MDA-MB-453, LS174, A549, K562 i Jurkat) kao i na normalnim humanim MRC-5 ćelijama. HeLa (2.000 ćelija/100 µL po bunarčiću), MDA-MB-361 (10.000 ćelija/100 µL po bunarčiću), MDA-MB-453 (3.000 ćelija/100 µL po bunarčiću), LS174 (7.000 ćelija/100 µL po bunarčiću), A549 (5.000 ćelija/100 µL po bunarčiću) i MRC-5 (5.000 ćelija/100 µL po bunarčiću) ćelije su zasejane u bunarčiće mikrotitarskih ploča sa 96 bunarčića, a nakon 20 h pošto su se ćelije zalepile za površinu po 50 µL ispitivanih jedinjenja i to u pet različitih koncentracija (opseg je bio 6,25–100 µM ili 12,50–200 µM) je dodato ćelijama. Kontrolnim ćelijama je dodato po 50 µL hranljivog medijuma. K562 (5.000 ćelija/100 µL po bunarčiću) i Jurkat (15.000 ćelija/100 µL po bunarčiću) ćelije koje su neadherentne, zasejane su 2 h pre dodatka jedinjenja. Po dodatku rastvora ispitivanih jedinjenja ćelije su inkubirane naredna 72 h.

Svi eksperimenti su ponovljeni minimum tri puta, dok je svaki eksperiment bio urađen u triplikatu. Kao pozitivna kontrola je korišćen standardni hemioterapeutik cisplatin.

4.2.1.4. Određivanje preživljavanja ćelija (MTT test)

Preživljavanje ćelija je određeno pomoću MTT tetsa po metodi koju je razvio Mosmann,⁹⁷ a modifikovali su je Ohno i Abe.⁹⁸

Po isteku 72 h inkubiranja ćelija sa ispitivanim derivatima steroidnih hidrazona dodato im je po 10 µL MTT reagensa (5 mg/mL u PBS-u). Usledila je četvoročasovna inkubacija na 37 °C, a potom je uzorcima dodato po 100 µL 10% SDS-a (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) te su ploče inkubirane tokom noći. Narednog dana su merene apsorbcije uzoraka na talasnoj dužini od 570 nm na Multiskan EX Thermo Labsystems spektrofotometru. Preživljavanje ćelija (S[%]) je određivano na osnovu

formule:

$$S [\%] = [A_{(uzorka)}/A_{(kontrola)}] \times 100$$

gde $A_{(uzorka)}$ predstavlja apsorbanciju uzorka ćelija na koje je delovalo ispitivano jedinjenje, a $A_{(kontrola)}$ apsorbanciju uzorka ćelija koje su rasle u čistom hranljivom medijumu. Od svake izmerene vrednosti apsorbancije pre proračuna je oduzeta vrednost apsorbancije dobijena za slepu probu. IC_{50} vrednost (μM) je definisana kao koncentracija ispitivanog jedinjenja koja inhibira ćelijsko preživljavanje za 50% i određena je sa kriva ćelijskog preživljavanja.

4.2.2. Ispitivanje citotoksičnosti prema humanim mononuklearnim ćelijama periferne krvi

4.2.2.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija periferne krvi

Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) su izolovane iz pune heparinizovane periferne krvi zdravih davalaca centrifugiranjem u gradijentu gustine pomoću medijuma za separaciju (Histopaque®-1077, Sigma-Aldrich). Sastavni delovi medijuma za separaciju PBMC su polisaharoza i natrijum-diatrizoat koji formiraju gradijent gustine od $1,077 \pm 0,001$ g/mL. Periferna krv sa heparinom se centrifugira 10 min na 2000 obrtaja u minuti. Zatim se plazma i interfaza koja sadrži leukocite (engl. *buffy coat*) aspiriraju i prebace na medijum za separaciju te se uzorak centrifugira 30 min na 2000 obrtaja u minuti. Po završetku centrifugiranja u epruveti mogu da se uoče tri faze. Gornja faza predstavlja plazmu, na dnu epruvete se nalaze eritrociti i granulociti, dok su PBMC (limfociti i monociti) smeštene u središnjoj fazi. Izolovane PBMC zatim se tri puta ispiraju hranljivim medijumom RPMI 1640, a na samom kraju talog ćelija se resuspenduje u kompletnom hranljivom medijumu.

4.2.2.2. Tretman PBMC

Humane PBMC (150.000 ćelija/100 μL po bunarčiću) zasejane su u bunarčiće mikrotitarskih ploča sa 96 bunarčića u hranljivom medijumu ili u hranljivom medijumu koji sadrži mitogenfitohemaglutinin (PHA) čija je konačna koncentracija 5 $\mu g/mL$.

Posle 2 h inkubiranja u svaki od bunarčića, osim u kontrolne, dodato je po 50 μ L rastvora ispitivanih jedinjenja (pet različitih finalnih koncentracija i to: 12,5, 25, 50, 100 i 200 μ g/mL). U kontrolne uzorke ćelija je dodato po 50 μ L medijuma. Nakon dodavanja rastvora ispitivanih steroidnih jedinjenja PBMC su inkubirane naredna 72 h. Preživljavanje PBMC je određivano MTT testom. Tretman humanih PBMC cisplatinom je služio u analizama kao pozitivni kontrolni eksperiment.⁹⁹

Suspencije PBMC odgovarajuće gustine kao i rastvori testiranih jedinjenja pripremani su u kompletnom hranljivom medijumu RPMI 1640. PHA je nabavljen od proizvođača INEP (Beograd, Srbija). Svaki od pojedinačnih eksperimenata je izveden u triplicatu. Urađena su minimum dva nezavisna eksperimenta.

Eksperimente na PBMC izolovanim iz krvi zdravih donora je odobrio Etički komitet Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Svi zdravi donori krvi su dali pisanu saglasnost za izvođenje eksperimenata.

4.2.3. Analiza raspodele HeLa i K562 ćelija po fazama ćelijskog ciklusa

Uticaj osam odabranih derivata steroidnih hidrazona (**2a, 2b, 2c, 2f, 8a, 8e, 9a, 10a**) na promenu distribucije HeLa i K562 ćelija u određenim fazama ćelijskog ciklusa je ispitivan primenom protočne citometrije.¹⁰⁰

HeLa (200.000) i K562 ćelije (250.000) su zasejane u 3 mL RPMI 1640 kompletnog hranljivog medijuma u bunarčiće ploče sa 6 bunarčića. Za HeLa ćelije, nakon 20 h je uklonjen medijum, te je u kontrolne uzorke dodat čist kompletni hranljivi medijum, a u preostale uzorke ćelija ispitivana jedinjenja rastvorena u svežem kompletnom hranljivom medijumu tako da su njihove krajnje koncentracije odgovarale IC_{50} i dvostrukim IC_{50} vrednostima određenim tokom neprekidnog delovanja u trajanju od 72 h. K562 ćelije su tretirane 2 h nakon zasejavanja. Promene do kojih dolazi kao posledica delovanja derivata steroidnih hidrazona na HeLa i K562 ćelije su analizirane po završetku 24 odnosno 48 h inkubacije.

Po isteku inkubacionog perioda uzorci HeLa ćelija su sakupljeni tripsinizacijom, dok su suspencije K562 ćelije pokupljene iz bunara pipetom. Ćelijski uzorci su zatim isprani PBS-om, nakon čega je u uzorke ćelija u epruvetama za protočni citometar dodato po 200 μ L hladnog rastvora PBS-a. Fiksiranje uzoraka ćelija je izvršeno pažljivim dodavanjem 2 mL hladnog 70% etanola pri vorteksovanju. Usledilo je čuvanje uzoraka

na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom jedne sedmice posle koga su isprani PBS-om radi uklanjanja ostataka etanola. Sledeći korak u pripremi je bio bojenje uzoraka koje podrazumeva polučasovno inkubiranje u $500\text{ }\mu\text{L}$ rastvora PBS-a sa ribonukleazom A (finalna koncentracija $200\text{ }\mu\text{g/mL}$). Nakon inkubacije u uzorke ćelija je dodato po $100\text{ }\mu\text{L}$ propidijum-jodida pri koncentraciji od $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ i uzorci su potom inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi pre analize. Kako fluorescentna boja, propidijum-jodid, može da se interkalira i u DNK i u RNK, pri analizi faza ćelijskog ciklusa je važno da se uzorci tretiraju ribonukleazom A u cilju degradacije RNK. Ribonukleaza A i propidijum-jodid su nabavljeni od kompanije Sigma Aldrich.

Na taj način pripremljeni uzorci ćelija analizirani su na FACSCalibur protočnom citometru (BD Biosciences, Sjedinjene Američke Države) podešenom tako da detektuje 10.000 događaja. Intenzitet fluorescencije propidijum-jodida ekscitovanog argon-jonskim laserom (488 nm) detektovan je na FL2 kanalu. Dobijeni podaci su analizirani pomoću CELLQuest softvera (BD Biosciences). Procenat ciljnih ćelija u svakoj od faza ćelijskog ciklusa je određivan na osnovu dobijenih DNK histograma (broj događaja u odnosu na FL2-A (engl. FL2-area)).

Rezultati ispitivanja raspodele ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost razlike između kontrole i tretiranih uzoraka ćelija je određena pomoću ANOVA sa Dunnett-ovim testom. p vrednosti ispod $0,05$ su smatrane statistički značajnim.

4.2.4. Detekcija tipa ćelijske smrti HeLa ćelija

4.2.4.1. Morfološka analiza fluorescentnom mikroskopijom

U cilju rasvetljivanja tipa ćelijske smrti indukovane tiosemikarbazonima **2a**, **2b**, **2c**, **2f**, tijadiazolinima **8a** i **8e** i tiazolidin-4-onima **9a** i **10a**,⁶¹ urađena je morfološka analiza HeLa ćelija obojenih smešom boja za nukleinske kiseline akridin-oranž i etidijum-bromid fluorescentnom mikroskopijom prema proceduri opisanoj u literaturi.^{23,99} HeLa ćelije (100.000) su zasejane u 3 mL kompletnog hranljivog medijuma na pokrovna mikroskopska stakla u bunarima pločice sa 6 bunara. Po isteku dvadesetočasovnog inkubiranja ćelijama je uklonjen medijum, a zatim su tretirane steroidnim jedinjenjima rastvorenim u kompletnom hranljivom medijumu. Kontrolnom uzorku ćelija je dodat

sveže pripremljen čist kompletni hranljivi medijum. Krajnje koncentracije steroidnih jedinjenja su odgovarale dvostrukim IC_{50} koncentracijama određenim za svako od njih tokom kontinuiranog dejstva u trajanju od 72 h. Usledilo je jednodnevno inkubiranje i bojenje smešom boja akridin-oranž/etidijum-bromid (krajnja koncentracija 3 odnosno 10 μ g boje po mL PBS-a, redom). Morfološka analiza tipa ćelijske smrti je urađena pomoću Carl Zeiss PALM MicroBeam mikroskopa sa Axio Observer.Z1 i AxioCam MRm kamerom (filteri: Alexa 488 i Alexa 568, uvećanje 20 \times).

Akridin-oranž je katjonska fluorescentna boja koja emituje zelenu fluorescenciju pri interakciji sa dvolančanim molekulom DNK, dok crvenu fluorescenciju emituje ukoliko se veže za jednolančani molekul DNK ili RNK. Bilo da su ćelije žive ili u procesu apoptoze ili nekroze one propuštaju ovu boju. Nasuprot njoj, etidijum-bromid može da uđe samo u mrtve ćelije koje su izgubile integritet ćelijske membrane. To je fluorescentna boja koja se interkalira u dvolančani molekul DNK pri čemu fluorescira narandžasto.

Ukoliko akridin-oranž uđe u ćeliju koja se nalazi u ranoj fazi apoptoze njeno jedro se boji zeleno. I akridin-oranž i etidijum-bromid su sposobni da uđu u ćelije u kasnoj fazi apoptoze pri čemu jedro biva narandžasto-crveno obojeno. Ako je slučaj da ćelije nisu ušle u apoptozu one imaju uniformna jedra zelene boje sa nešto intenzivnije obojenim jedarcima. Ćelije koje su započele proces apoptoze odlikuje kondenzacija hromatina i promena oblika jedra, zatim dolazi do fragmentacije jedra i pojave ispuččenja na ćelijskoj membrani, nastavak skupljanja ćelije, formiranje dodatnih ispuččenja i mehurova i naposljetku nastanak apoptotskih tela u kojima se nalaze ćelijske organele i fragmenti jedra. Morfološka obeležja ćelije u kojoj je započeo proces nekroze su vakuolizacija citoplazme, bubrenje mitohondrija i endoplazmatičnog retikuluma, piknoza jedra, pojava oštećenja na ćelijskoj membrani i oslobađanje ćelijskog sadržaja. Karakteristika nekrotskih ćelija obojenih smešom boja akridin-oranž/etidijum-bromid je dobro očuvano jedro narandžaste boje. Do dezintegracije jedra dolazi tek u poznim stadijumima nekroze.

4.2.4.2. Detekcija ćelija u apoptozi primenom protočne citometrije

Određivanje broja živih HeLa ćelija kao i onih u ranim i poznim stadijumima apoptoze ili nekroze je izvedeno metodom protočne citometrije nakon bojenja ćelija pomoću

aneksina V konjugovanog sa fluoroforom FITC (engl. *fluorescein isothiocyanate*, FITC) (BD Pharmingen San Dijego, Kalifornija, SAD) i propidijum-jodida (Sigma Aldrich).⁶¹ HeLa ćelije (200.000) su zasejane u bunare ploče sa 6 bunara i inkubirane tokom noći. Ćelijama je uklonjen medijum, a potom im je dodato po 3 mL medijuma sa ispitivanim jedinjenjima čije su koncentracije odgovarale dvostrukim IC₅₀ vrednostima. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h ćelije su sakupljene tripsinizacijom i isprane u PBS-u. Potom su resuspendovane u 100 µL pufera za vezivanje aneksina (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) kome je dodato 2,5 µL aneksin V-FITC i 2,5 µL propidijum-jodida. Nakon petnaestominutnog inkubiranja u mraku na sobnoj temperaturi u uzorke je dodato po 400 µL pufera za vezivanje aneksina. Nakon toga je određivan intenzitet fluorescencije (zelena FL1-H i crvena FL2-H) na protočnom citometru (FACSCalibur, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, SAD). Za svaki uzorak analizirano je 10.000 ćelija, a procenat živih ćelija (A⁻/P⁻), ćelija u ranoj apoptozi (A⁺/P⁻), kao i mrtvih (A⁻/P⁺) ćelija je analiziran CellQuest Pro softverom. Dobijeni rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± S.D. dva nezavisna eksperimenta.

4.2.5. Određivanje ciljnih kaspaza

HeLa ćelije pretretirane specifičnim inhibitorima kaspaza (Z-DEVD-FMK, inhibitor kaspaze-3, Z-IETD-FMK, inhibitor kaspaze-8 i Z-LEHD-FMK, inhibitor kaspaze-9 (R & D Systems, Minneapolis, Sjedinjene Američke Države)) podvrgnute su dvadesetčetvoročasovnom dejstvu osam odabranih derivata steroidnih hidrazona (**2a**, **2b**, **2c**, **2f**, **8a**, **8e**, **9a**, **10a**) posle čega je protočnom citometrijom određivan procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa.^{23,99}

Za svako od osam ispitivanih steroidnih jedinjenja urađeno je sledeće. HeLa ćelije su zasejane u kompletnom hranljivom medijumu. Po isteku 20 h inkubiranja ćelija uklonjen im je medijum. U kontrolni uzorak HeLa ćelija je dodat hranljivi medijum. U jedan uzorak HeLa ćelija su dodata 2 mL hranljivog medijuma dok su u tri uzorka HeLa ćelija dodata po 2 mL hranljivog medijuma koji sadrži odgovarajući inhibitor kaspaze pri koncentraciji od 40 µM. Ćelije su inkubirane 2 h. Po isteku inkubacionog perioda u uzorke HeLa ćelija je dodat po 1 mL rastvora ispitivanog jedinjenja u hranljivom medijumu tako da krajnja koncentracija svakog od jedinjenja u 3 mL odgovara dvostrukoj IC₅₀ koncentraciji određenoj posle kontinuiranog delovanja steroidnih

jedinjenja u trajanju od 72 h. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h uzorci HeLa ćelija su sakupljeni tripsinizacijom, isprani u PBS-u i fiksirani u 70% hladnom etanolu. Po isteku nedelju dana čuvanja na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ćelijski uzorci su bojeni propidijum-jodidom. Detaljna procedura je opisana u prethodnom poglavlju **4.2.3.** i odgovara analizi faza ćelijskog ciklusa. Procenat HeLa ćelija u subG1 fazi ćelijskog ciklusa je određivan pomoću FACSCalibur protočnog citometra, a dobijeni podaci su analizirani pomoću CELLQuest softvera.

4.2.6. *In vitro* test angiogeneze ili “The endothelial cell tube formation” test

Efekat odabranih osam steroidnih jedinjenja (**2a**, **2b**, **2c**, **2f**, **8a**, **8e**, **9a**, **10a**) na proces angiogeneze *in vitro* je ispitan primenom "endothelial cell tube formation" testa na humanim endotelnim ćelijama pupčane vene EA.hy926.⁷⁹

U eksperimentima je korišćen matriksni matrigel (Corning[®] Matrigel[®], kataloški broj 356234), preparat solubilizovane bazalne membrane izolovan iz EHS (engl. *Engelbreth-Holm-Swarm*) mišjeg sarkoma, tumora sa visokim sadržajem proteina ekstracelularnog matriksa. Matrigel sadrži niz proteina ekstracelularnog matriksa kao što su laminin, kolagen tipa IV, heparan sulfat proteoglikan, entaktin/nidogen, kao i različite faktore rasta (TGF- β , EGF, FGF, IGF i tPA).

Matrigel je čuvan na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, otapan je za upotrebu na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na ledu tokom noći. Istovremeno su hlađeni i nastavci za pipete i ploča sa 24 bunarčića.

Tabela 4.1. IC₂₀ vrednosti ispitivanih steroidnih hidrazona primenjene u eksperimentu.

Jedinjenje	IC₂₀ (μM)
2a	3,5
2b	10
2c	10
2f	10
8a	4,5
8e	60
9a	30
10a	35

U bunarčiće je nanoseno po 200 μL ohlađenog matrigela posle čega je usledilo dvočasovno inkubiranje ploča na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ u atmosferi vlažnog vazduha obogaćenog

ugljen-dioksidom (5%). Na taj način na dnu bunarčića je formiran sloj čvrstog matrigela. Potom je dodata suspenzija EA.hy926 ćelija u DMEM kompletnom hranljivom medijumu (40.000 ćelija/400 μ L). Na posletku, u uzorke je dodato po 200 μ L rastvora ispitivanih jedinjenja, dok je u kontrolni uzorak ćelija dodato 200 μ L kompletnog hranljivog medijuma. EA.hy926 ćelije su tretirane niskim suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama ispitivanih jedinjenja dobijenim MTT testom posle 24 h delovanja (**Tabela 4.1**).

EA.hy926 ćelije su inkubirane 20 h. Po završetku perioda inkubacije ćelije su fotografisane.

4.2.7. Analiza ekspresije gena metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu u HeLa ćelijama

HeLa ćelije su zasejane u 15 mL kompletnog hranljivog medijuma u boce za ćeljske kulture površine 75 cm² (4×10⁶ ćelija). Medijum je uklonjen posle 24 h pa je ćelijama dodato po 15 mL medijuma sa ispitivanim jedinjenjem. Ćelije su tretirane niskim suptoksičnim IC₂₀ koncentracijama tiazolidin-4-ona **9a** i **10a** (5 μ M). Kontrolne ćelije su rasle u čistom hranljivom medijumu. Po završetku inkubacije u trajanju od 24 h ćelije su sakupljene tripsinizacijom i isprane PBS-om. Potom su uzorci ćelija čuvani na –80 °C do sledećih analiza. U svrhu određivanja nivoa ekspresije gena primenom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu (RT-qPCR, *Real Time Quantitative Polymerization of RNA Chain*) iz HeLa ćelija je izolovana ukupna RNK upotrebom Trizol[®] reagensa (TRI Reagent[®] Sigma) prema uputstvu proizvođača. Provera kvaliteta izolovane RNK je vršena određivanjem parametra RIN elektroforezom uzoraka (engl. *RNA Integrity Number*, RIN) primenom RNA 6000 Nano Kit-a (Agilent, Palo Alto, SAD) na aparatu 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, SAD). Koncentracije ukupne ćeljske RNK su određene spektrofotometrijski na aparatu BioSpec Nano, (Shimadzu). Jednolančana komplementarna DNK (cDNK) je sintetisana od polazne totalne ćeljske RNK (2 μ g) reversnom transkripcijom primenom kita za reversnu transkripciju (*High-capacity cDNA Reverse Transcription kit*, Thermo Fisher Scientific).

4.2.7.1. Kvantitativni RT-PCR u realnom vremenu (RT-qPCR)

Određivanje nivoa ekspresije iRNK odabranih gena je vršeno metodom kvantitativnog RT-PCR u realnom vremenu i primenom “*TaqMan*®” testa (Thermo Fisher Scientific). “*TaqMan*®” testovi za određivanje ekspresije gena (*MMP2*-Hs01548727_m1, *MMP9*-Hs00234579_m1 i *VEGFA*-Hs00900055_m1) se sastoje iz 20x smeše neobebeženih PCR prajmera i *TaqMan*® MGB proba koje se vezuju za mali žljeb (*minor groove binding*, MGB proba) obebeženih fluorescentnom indikatorskom bojom FAM™ na 5' kraju i 3' nefluorescentnim hvatačem (engl. *quencher*). Kao endogena kontrola je korišćen nivo ekspresije gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaze (*GAPDH*) za koju su podaci dobijeni upotrebom kontrolnog “*TaqMan*” testa (Applied Biosystems-Hs02758991_g1). Reakcije PCR-a su izvedene upotrebom sistema za detekciju “*ABI Prism 7500 Sequence Detection System*” (Applied Biosystems).¹⁰¹

4.2.8. Antioksidativni test: hvatanje slobodnih radikala (DPPH metoda)

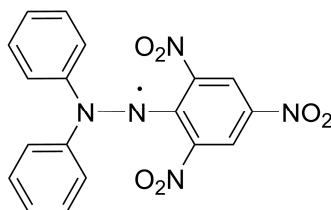
Sposobnost novosintetisanih tiazolidin-4-ona da hvataju 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil-radikale (DPPH) je određena po Blois-ovoj metodi.¹⁰² Analizirana jedinjenja su rastvorena u čistom DMSO, dok je komercijalno dostupan DPPH (Slika 4.1) rastvoren u metanolu tako da njegova koncentracija iznosi $6,58 \times 10^{-5}$ M. U bunarčice mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića je nanoseno po 140 μ L rastvora DPPH i po 10 μ L rastvora svakog od ispitivanih jedinjenja u deset različitih koncentracija. Za kontrolu je korišćeno 10 μ L čistog DMSO. Po isteku polučasovnog inkubiranja mikroploča na sobnoj temperaturi u mraku merena je apsorbanacija uzoraka na 517 nm. Sva merenja su izvršena u triplikatu, a sposobnost hvatanja slobodnih radikala računata je na osnovu sledećeg izraza:

$$\text{Sposobnost hvatanja slobodnih radikala (\%)} = [(A_{(kontrola)} - A_{(uzorka)}) / A_{(kontrola)}] \times 100$$

gde su $A_{(kontrola)}$ i $A_{(uzorka)}$ apsorbanacije DPPH u kontrolnom rastvoru i uzorku, redom.

Za svako od ispitivanih jedinjenja, IC_{50} vrednost je izračunata iz grafika zavisnosti sposobnosti hvatanja slobodnih radikala od koncentracije, a ista je definisana kao ukupna koncentracija antioksidanta potrebna da smanji početnu koncentraciju DPPH-

radikala za 50%. IC₅₀ vrednosti izračunate su na osnovu procenta uhvaćenih DPPH-radikala. Kao referentno jedinjenje (pozitivna kontrola) je korišćena askorbinska kiselina (AK) u koncentracionom opsegu 50–500 mg/mL.



Slika 4.1. Struktura DPPH radikala

4.2.9. „Brine shrimp” test toksičnosti

4.2.9.1. Uzgajanje račića

U 0,5 L veštačke morske vode je dodato 3 mg suvog kvasca suspendovanog u 5 mL destilovane vode i kašičica liofilizovanih jajašaca račića *Artemia salina*. Kroz suspenziju je pomoću pumpe 48 h produvavan vazduh na temperaturi 18–20 °C uz stalno osvetljivanje. Tako dobijene sveže izležene jedinke su korišćene za eksperimente.

4.2.9.2. Tretman račića steroidnim jedinjenjima

Ispitivani steroidni derivati rastvoreni u sistemu rastvarača MeOH/CHCl₃ su nanoseni na diskove od filter-papira prečnika 8 mm u različitim količinama (1,0–0,05 mg) sa kojih je potom fenom uparen rastvarač. Papirni diskovi su postavljeni na dno staklenih vijala u koje je dodat po 1 mL veštačke morske vode i 15–20 jedinki račića. Po isteku 24 h osvetljivanja na sobnoj temperaturi izbrojane su preživele i uginule jedinke. Rezultat je izražen kao procenat uginulih račića. Sva određivanja rađena su u triplicatu. LC₅₀ vrednost je definisana kao koncentracija ispitivanog jedinjenja koja prouzrokuje smrt 50% jedinki, a dobija se iz grafika zavisnosti procenta uginulih račića od koncentracije.

4.2.10. Antimikrobna aktivnost

4.2.10.1. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska aktivnost je procenjena na osnovu dejstva ispitivanih steroidnih jedinjenja na četiri soja Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404) i *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)) i četiri soja Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (ATCC 13076)) metodom difuzije u bunarčiću u agaru.⁸⁴ U svaku Petrijevu šolju (prečnika 90 mm) je sipano 22 mL hranljivog medijuma, agara (HiMedia, Mumbai, India) i 100 µL suspenzije bakterija (10^6 ćelija po šolji). Zatim je bunarčić dijametra 8 mm pažljivo probušen sterilnim bušačem i u svaki označen bunar je dodato po 100 µL ispitivanog jedinjenja (1 mg/100 µL DMSO). Kao pozitivna kontrola je korišćen amikacin (30 µg/100 µL H₂O), dok su voda i DMSO služili kao negativna kontrola. Ista procedura je ponovljena za sve mikroorganizme. Posle inokulacije organizama i dodavanja jedinjenja i kontrola, Petrijeve šolje su inkubirane 24 h na 37 °C. Zone inhibicije su merene u milimetrima.

4.2.10.2. Antifungalna aktivnost

Testirane gljivice su bile: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) i *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Sabouraud-ov dekstrozni agar (Institut za virologiju, vakcine i serume „Torlak”, Beograd, Srbija) pripremljen je prema uputstvu proizvođača. U svaku sterilnu Petrijevu šolju (prečnika 90 mm) je sipano po 22 mL suspenzije agara, a zatim je dodato 100 µL gljiva (10^5 spora po šolji). Bunarčići prečnika 8 mm su probušeni sterilnim staklenim bušačem nakon čega je u svaki dodato 100 µL testirane supstance (1 mg/100 µL DMSO). Kao pozitivna kontrola je korišćen nistatin (30 µg/100 µL DMSO) dok je 100 µL DMSO služilo kao negativna kontrola. Petrijeve šolje su inkubirane 48 h na 24 °C. Antifungalna aktivnost je određena merenjem prečnika zone inhibicije i izražena je u milimetrima.

5. Zaključak

Polazeći od progesterona i 3-okso- α,β -nezasićenih androstenskih steroida u okviru ove disertacije sintetisano je i potpuno okarakterisano pedeset novih derivata steroidnih hidrazona, od kojih jedanaest tiosemikarbazona, jedanaest tijadiazolina, dvanaest tiazolidin-4-ona, jedanaest semikarbazona i pet karbazatnih estara dobijenih iz 3-mono-semikarbazona.

Prvi put je urađena detaljna analiza stereochemije steroidnih hidrazona u položajima C-3 i C-17 androstenskih, odnosno C-3 i C-20 progesteronskih derivata. Struktura i stereochemija potvrđene su rezultatima rendgenske strukturne analize za tijadiazolin **7a** i tiazolidin-4-on **9b-E**. Tijadiazolin **7a** je prvo okarakterisano steroidno jedinjenje koje sadrži šestočlani ugljenični prsten kondenzovan sa spiro-tijadiazolinskim prstenom. Tiazolidin-4-on **9b-E** je prvi steroidni derivat sa poznatom konfiguracijom dvostruke veze u položaju C-3 hidrazono-tiazolidin-4-onskog fragmenta.

Prema testiranim malignim ćelijskim linijama sintetisani derivati steroidnih hidrazona ispoljili su selektivnu citotoksičnu aktivnost zavisnu od koncentracije.

Sedamnaest od 34 sintetisana tio-jedinjenja ispoljila su veoma jak citotoksični efekat prema K562 ćelijama sa $IC_{50} = 6,6\text{--}14,9 \mu\text{M}$, četrnaest prema HeLa ćelijama sa $IC_{50} = 7,6\text{--}18,9 \mu\text{M}$, pet jedinjenja prema MDA-MB-453 ćelijama sa $IC_{50} = 6,8\text{--}18,0 \mu\text{M}$. Prema MDA-MB-361 ćelijama devet jedinjenja je ispoljilo aktivnost bolju ili vrlo sličnu aktivnosti cisplatina ($IC_{50} = 8,7\text{--}20,6 \mu\text{M}$) dok je prema A549 ćelijama karcinoma pluća čak sedam jedinjenja pokazalo aktivnost bolju od cisplatina, ali je njihovo dejstvo prema normalnim ćelijama MRC-5 bilo još jače.

Nasuprot tome, ova jedinjenja pokazala su vrlo slab toksični efekat na nestimulisane i fitohemaglutininom stimulisane PBMC. Pri tome je koeficijent selektivnosti za K562 i HeLa ćelije za osam jedinjenja od kojih su četiri mono-tiosemikarbazoni **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, dva tijadiazolini **8a** i **8e** i dva tiazolidinoni **9a** i **10a** bio daleko veći od 2,5.

Morfološkom analizom HeLa ćelija tretiranih ovim jedinjenjima utvrđeno je njihovo pro-apoptotsko dejstvo što je potvrđeno rezultatima protočne citometrije.

Određivanjem ciljnih kaspaza ustanovljeno je da do apoptoze dolazi posredstvom kaspaze-3, -8 i -9 i to kako spoljašnjim tako i unutrašnjim putem aktivacije apoptoze.

Svi ispitivani derivati pokazali su i sposobnost da inhibiraju angiogenezu od EA.hy926 ćelija *in vitro*.

Tiazolidin-4-oni **9a** i **10a** nisu prouzrokovali značajne promene u nivoima ekspresije gena *MMP2*, *MMP9* i *VEGFA* u tretiranim HeLa ćelijama.

Niske antimikrobne aktivnosti derivata steroidnih hidrazona ukazuju na selektivnu biološku aktivnost čiji je akcenat na antikancerskoj aktivnosti.

Zamena tiokso-grupe derivata steroidnih hidrazona karbonilnom grupom dovodi do značajnog smanjenja citotoksične aktivnosti. Strukturni fragmenti koji pozitivno utiču na antikancersku aktivnost novih derivata su α,β -nezasićen tiosemikarbazonska strukturna jedinica u položaju C-3, spiro heterociklični supstituent u položaju C-17 bis(tijadiazolina) i heterociklični 4-tiazolidinonski prsten uveden u položaj C-3, a naročito u položaj C-17 ili C-20.

Zahvaljujući njihovom jakom antiproliferativnom i proapoptotskom efektu prema malignim ćelijskim linijama, kao i visokoj selektivnosti u citotoksičnom dejstvu prema malignim u odnosu na normalne ćelije, rezultati sprovedenih *in vitro* istraživanja mogu da ukažu na značajan antikancerski potencijal steroidnih tiosemikarbazona **2a**, **2b**, **2c** i **2f**, tijadiazolina **8a** i **8e** i tiazolidin-4-ona **9a** i **10a**, što ova jedinjenja ubraja u potencijalne kandidate za *in vivo* ispitivanja.

6. Literatura

1. Grujić-Injac, B., *Hemija prirodnih proizvoda*. Naučna knjiga: 1966.
2. Patrick, G. L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 5th Edition ed.; OUP Oxford: 2013.
3. Zhao, Z.; Shi, Z.; Liu, M.; Liu, X., Microwave-assisted synthesis and in vitro antibacterial activity of novel steroidal thiosemicarbazone derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, *22*, 7730-7734.
4. Fieser, L. F.; Fieser, M., *Steroids*. Reinhold Pub.: 1967.
5. Risley, J. M., Cholesterol Biosynthesis: Lanosterol to Cholesterol. *Journal of Chemical Education*, **2002**, *79*, 377-384.
6. World Health Organization. <https://www.who.int/cancer/en/>
7. Singh, R.; Panda, G., An overview of synthetic approaches for heterocyclic steroids. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 2853-2884.
8. Wallin, K. G.; Wood, R. I., Anabolic–androgenic steroids impair set-shifting and reversal learning in male rats. *European Neuropsychopharmacology*, **2015**, *25*, 583-590.
9. Mohareb, R. M.; Al-Omran, F., Reaction of pregnenolone with cyanoacetylhydrazine: Novel synthesis of hydrazide–hydrazone, pyrazole, pyridine, thiazole, thiophene derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids*, **2012**, *77*, 1551-1559.
10. Robinson, A. J.; DeLucca, I.; Drummond, S.; Boswell, G. A., Steroidal nitron inhibitors of 5 α -reductase. *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 4801-4804.
11. Frank, É.; Kovács, D.; Schneider, G.; Wölfling, J.; Bartók, T.; Zupkó, I., Synthesis of novel steroidal 16-spiroisoxazolines by 1,3-dipolar cycloaddition, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro. *Molecular Diversity*, **2014**, *18*, 521-534.
12. Tremblay, M. R.; Luu-The, V.; Leblanc, G.; Noël, P.; Breton, E.; Labrie, F.; Poirier, D., Spironolactone-related inhibitors of type II 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: chemical synthesis, receptor binding affinities, and proliferative/antiproliferative activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1999**, *7*, 1013-1023.
13. Huang, Y.; Cui, J.; Zheng, Q.; Zeng, C.; Chen, Q.; Zhou, A., 6-Hydroximino-4-aza-A-homo-cholest-3-one and related analogue as a potent inducer of apoptosis in

cancer cells. *Steroids*, **2012**, *77*, 829-834.

14. Koutsourea, A. I.; Foustieris, M. A.; Arsenou, E. S.; Papageorgiou, A.; Pairas, G. N.; Nikolaropoulos, S. S., Rational design, synthesis, and in vivo evaluation of the antileukemic activity of six new alkylating steroidal esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, *16*, 5207-5215.

15. Krstić, N. M.; Bjelaković, M. S.; Zizak, Z.; Pavlović, M. D.; Juranić, Z. D.; Pavlović, V. D., Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities. *Steroids*, **2007**, *72*, 406-414.

16. Dhingra, N.; Bhardwaj, T. R.; Mehta, N.; Mukhopadhyay, T.; Kumar, A.; Kumar, M., Synthesis, antiproliferative, acute toxicity and assessment of antiandrogenic activities of some newly synthesized steroidal lactams. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, *45*, 2229-2236.

17. Iványi, Z.; Szabó, N.; Huber, J.; Wölfling, J.; Zupkó, I.; Szécsi, M.; Wittmann, T.; Schneider, G., Synthesis of D-ring-substituted (5'R)- and (5'S)-17 β -pyrazolinylandrostene epimers and comparison of their potential anticancer activities. *Steroids*, **2012**, *77*, 566-574.

18. Baji, Á.; Kiss, T.; Wölfling, J.; Kovács, D.; Igaz, N.; Gopisetty, M. K.; Kiricsi, M.; Frank, É., Multicomponent access to androstano-arylpyrimidines under microwave conditions and evaluation of their anti-cancer activity in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2017**, *172*, 79-88.

19. Baji, Á.; Kovács, F.; Mótyán, G.; Schneider, G.; Wölfling, J.; Sinka, I.; Zupkó, I.; Ocsovszki, I.; Frank, É., Investigation of pH and substituent effects on the distribution ratio of novel steroidal ring D- and A-fused arylpyrazole regioisomers and evaluation of their cell-growth inhibitory effects in vitro. *Steroids*, **2017**, *126*, 35-49.

20. Krstić, N. M.; Bjelaković, M. S.; Dabović, M. M.; Pavlović, V. D., Thionation of Some α,β -Unsaturated Steroidal Ketones. *Molecules*, **2010**, *15*, 3462-3477.

21. Krstić, N.; Bjelaković, M.; D Pavlović, V.; Robeyns, K.; Juranić, Z.; Matić, I.; Novaković, I.; M Sladić, D., New androst-4-en-17-spiro-1,3,2-oxathiaphospholanes. Synthesis, assignment of absolute configuration and in vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *Steroids*, **2012**, *77*, 558-565.

22. Krstić, N. M.; Pavlović, V. D.; Novaković, I. T.; Matić, I. Z.; Sladić, D. M., Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel P-heterocyclic

- androst-4-ene derivatives. *Molecular Diversity*, **2013**, 17, 547-561.
23. Krstić, N. M.; Matić, I. Z.; Juranić, Z. D.; Novaković, I. T.; Sladić, D. M., Steroid dimers - In vitro cytotoxic and antimicrobial activities. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2014**, 143, 365-375.
24. Khan, S. A.; Asiri, A. M., Synthesis and In Vitro Antibacterial Activity of Novel Steroidal (6R)-Spiro-1,3,4-thiadiazoline Derivatives. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2012**, 49, 1452-1457.
25. Mohareb, R. M.; Wardakhan, W. W.; Elmegeed, G. A.; Ashour, R. M. S., Heterocyclizations of pregnenolone: Novel synthesis of thiosemicarbazone, thiophene, thiazole, thieno[2,3-b]pyridine derivatives and their cytotoxicity evaluations. *Steroids*, **2012**, 77, 1560-1569.
26. Asif, M.; Husain, A., Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antiplatelet Profile of Hydrazones Containing Synthetic Molecules. *Journal of Applied Chemistry*, **2013**, 2013, 1-7.
27. Verma, G.; Marella, A.; Shaquiquzzaman, M.; Akhtar, M.; Ali, M.; Alam, M., A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, **2014**, 6, 69-80.
28. Ergenç, N.; Günay, N. S.; Demirdamar, R., Synthesis and antidepressant evaluation of new 3-phenyl-5-sulfonamidoindole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1998**, 33, 143-148.
29. Khan, S. A.; Asiri, A. M., Novel Steroidal (6R)-Spiro-1,3,4-thiadiazoline Derivatives as Anti-bacterial Agents. *Chinese Journal of Chemistry*, **2012**, 30, 1901-1905.
30. Singh, S.; Athar, F.; Maurya, M. R.; Azam, A., Cyclooctadiene Ru(II) complexes of thiophene-2-carboxaldehyde-derived thiosemicarbazones: synthesis, characterization and antiamoebic activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, 41, 592-598.
31. Bermejo, E.; Carballo, R.; Castineiras, A.; Dominguez, R.; E. Liberta, A.; Maichle-Mössmer, C.; West, D., Complexes of Group 12 Metals with 2-Acetylpyridine 4N-Dimethylthiosemicarbazone and with 2-Acetylpyridine-N-oxide 4N-Dimethylthiosemicarbazone: Synthesis, Structure and Antifungal Activity. *Zeitschrift für Naturforschung B*, **1999**, 54, 777-787.

32. Verma, K.; Pandeya, S. N.; Singh, U. K.; Gupta, S.; Sharma, P.; Chaudhary, A.; Bhardwaj, G., Synthesis and Pharmacological Activity of Some Substituted Menthone Semicarbazone and Thiosemicarbazone Derivatives. *International journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, **2009**, 1, 357-362.
33. Sikharulidze, M. I.; Nadaraia, N. S.; Kakhabrishvili, M. L., Synthesis and antituberculosis activity of several steroids from 3 β -acetoxy-5 α -pregn-16-en-20-one. *Chemistry of Natural Compounds*, **2012**, 48, 423-425.
34. Loncle, C.; Brunel, J. M.; Vidal, N.; Dherbomez, M.; Letourneux, Y., Synthesis and antifungal activity of cholesterol-hydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, 39, 1067-1071.
35. Jabeen, M.; Choudhry, M. I.; Miana, G. A.; Rahman, K. M.; Rashid, U.; Khan, H.-u.; Arshia; Sadiq, A., Synthesis, pharmacological evaluation and docking studies of progesterone and testosterone derivatives as anticancer agents. *Steroids*, **2018**, 136, 22-31.
36. Cui, J.; Liu, L.; Zhao, D.; Gan, C.; Huang, X.; Xiao, Q.; Qi, B.; Yang, L.; Huang, Y., Synthesis, characterization and antitumor activities of some steroidal derivatives with side chain of 17-hydrazone aromatic heterocycle. *Steroids*, **2015**, 95, 32-38.
37. Nadaraia, N. S., Synthesis and Biological Activity of Steroidal Tigogenin Hydrazones and Pyrazolines. *Chemistry of Natural Compounds*, **2018**, 54, 926-929.
38. Benmohammed, A.; Khoumeri, O.; Djafri, A.; Terme, T.; Vanelle, P., Synthesis of Novel Highly Functionalized 4-Thiazolidinone Derivatives from 4-Phenyl-3-thiosemicarbazones. *Molecules*, **2014**, 19, 3068-3083.
39. Pérez, J. M.; Matesanz, A. I.; Martín-Ambite, A.; Navarro, P.; Alonso, C.; Souza, P., Synthesis and characterization of complexes of p-isopropyl benzaldehyde and methyl 2-pyridyl ketone thiosemicarbazones with Zn(II) and Cd(II) metallic centers. Cytotoxic activity and induction of apoptosis in Pam-ras cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **1999**, 75, 255-261.
40. Krishna, P. M.; Shankara, B. S.; Reddy, N. S., Synthesis, Characterization, and Biological Studies of Binuclear Copper(II) Complexes of (2E)-2-(2-Hydroxy-3-Methoxybenzylidene)-4N-Substituted Hydrazinecarbothioamides. *International Journal of Inorganic Chemistry*, **2013**, 2013, 1-11.

41. Liberta, A. E.; West, D. X., Antifungal and antitumor activity of heterocyclic thiosemicarbazones and their metal complexes: current status. *Biometals*, **1992**, 5, 121-126.
42. West, D. X.; Liberta, A. E.; Padhye, S. B.; Chikate, R. C.; Sonawane, P. B.; Kumbhar, A. S.; Yerande, R. G., Thiosemicarbazone complexes of copper(II): structural and biological studies. *Coordination Chemistry Reviews*, **1993**, 123, 49-71.
43. Yusuf, M.; Jain, P., Synthesis and biological significances of 1,3,4-thiadiazolines and related heterocyclic compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, **2014**, 7, 525-552.
44. H. Hall, I.; Y Chen, S.; Jo Barnes, B.; West, D., The Hypolipidemic Activity of Heterocyclic Thiosemicarbazones, Thioureas and Their Metal Complexes in Sprague Dawley Male Rats. *Metal-Based Drugs*, **1999**, 6, 143-147.
45. Brousse, B. N.; Moglioni, A. G.; Martins Alho, M.; Álvarez-Larena, Á.; Moltrasio, G. Y.; D'Accorsob, N. B., Behavior of thiosemicarbazones derived from some terpenones under acetylating conditions. *ARKIVOC: Archive for Organic Chemistry*, **2002**, 2002, 14-23.
46. Kelly, P. F.; Slawin, A. M. Z.; Soriano-Rama, A., *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1996**, 53-59.
47. West, D. X.; Pardhye, S. B.; Sonawane, P. B., Structural and physical correlations in the biological properties of transition metal heterocyclic thiosemicarbazone and S-alkyldithiocarbazate complexes. In *Complex Chemistry*; 1991; Vol. 76, pp 1-50.
48. Ostrovskaya, R. U.; Voronina, T. A., Antagonistic effect of bicuculline and thiosemicarbazide on the tranquilizing action of diazepam. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **1977**, 83, 332-334.
49. Voronina, T. A.; Tozhanova, N. M., Effect of stimulants on tranquilizing, hypnotic and myorelaxant effects of phenazepam. *Farmakologiya i Toksikologiya (Moscow)*, **1981**, 44, 155-159.
50. Swathi, K.; Sarangapani, M., Synthesis and sedativehypnotic activity of novel series of isatin hydrazone and isatin thiosemicarbazone derivatives. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **2014**, 3, 2720-2729.
51. Pandeya, S. N.; Mishra, V., Analgesic activity and hypnotic effect of (\pm)-3-

mentone semicarbazone and thiosemicarbazone derivatives. *Acta Pharmaceutica*, **2001**, 51, 183-188.

52. Khan, S. A.; Kumar, P.; Joshi, R.; Iqbal, P. F.; Saleem, K., Synthesis and in vitro antibacterial activity of new steroidal thiosemicarbazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 43, 2029-2034.

53. Lessa, J. A.; Mendes, I. C.; da Silva, P. R. O.; Soares, M. A.; dos Santos, R. G.; Speziali, N. L.; Romeiro, N. C.; Barreiro, E. J.; Beraldo, H., 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2010**, 45, 5671-5677.

54. Adsule, S.; Banerjee, S.; Ahmed, F.; Padhye, S.; Sarkar, F. H., Hybrid anticancer agents: isothiocyanate-progesterone conjugates as chemotherapeutic agents and insights into their cytotoxicities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 1247-1251.

55. Khan, S.; Yusuf, M., Synthesis, spectral studies and in vitro antibacterial activity of steroidal thiosemicarbazone and their palladium (Pd (II)) complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 2270-2274.

56. Huang, Y.; Cui, J.; Chen, S.; Lin, Q.; Song, H.; Gan, C.; Su, B.; Zhou, A., Synthesis and Evaluation of Some New Aza-B-homocholestane Derivatives as Anticancer Agents. *Marine Drugs*, **2014**, 12, 1715-1731.

57. Cui, J.; Lin, Q.; Huang, Y.; Gan, C.; Yao, Q.; Wei, Y.; Xiao, Q.; Kong, E., Design, synthesis and antiproliferative evaluation of some B-homo steroidal lactams. *Medicinal Chemistry Research*, **2015**, 24, 2906–2915.

58. Gan, C.; Cui, J.; Su, S.; Lin, Q.; Jia, L.; Fan, L.; Huang, Y., Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal thiosemicarbazones, semicarbazones and hydrozones. *Steroids*, **2014**, 87, 99-107.

59. Jain, A. K.; Vaidya, A.; Ravichandran, V.; Kashaw, S. K.; Agrawal, R. K., Recent developments and biological activities of thiazolidinone derivatives: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2012**, 20, 3378-3395.

60. Khan, S.; Asiri, A. M.; M Asiria, A.; Yusuf, M., Erratum to “Synthesis and biological evaluation of some thiazolidinone derivatives of steroid as antibacterial agents”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, 44, 2597-600.

61. Živković, M. B.; Matić, I. Z.; Rodić, M. V.; Novaković, I. T.; Sladić, D. M.;

- Krstić, N. M., Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic activities of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines. *RSC Advances*, **2016**, 6, 34312-34333.
62. Živković, M. B.; Novaković, I. T.; Matić, I. Z.; Sladić, D. M.; Krstić, N. M., Synthesis and preliminary screening for the biological activity of some steroidal Δ^4 -unsaturated semicarbazone derivatives. *Steroids*, **2019**, 148, 36-46.
63. Živković, M. B.; Matić, I. Z.; Rodić, M. V.; Novaković, I. T.; Krivokuća, A. M.; Sladić, D. M.; Krstić, N. M., Anticancer potential of new steroidal thiazolidin-4-one derivatives. Mechanisms of cytotoxic action and effects on angiogenesis in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2017**, 174, 72-85.
64. Rouge, P. D.; Brousse, B. N.; Moglioni, A. G.; Cozzi, G. A.; Alvarez-Larena, A.; D'Accorso, N.; Moltrasio, G. Y., Behavior of thiosemicarbazones derived from some terpenones under acetylation conditions. Part II. *ARKIVOC: Archive for Organic Chemistry*, **2005**, 12, 8-21.
65. Shamsuzzaman; Aslam, M.; Salim, A., Stereoselective Synthesis of Steroidal (6R)-Spiro-1',3',4'-Thiadiazolines. *Journal of Chemical Research, Synopses*, **1998**, 824-825.
66. Rani, M.; Ramachandran, R.; Kabilan, S., Efficient synthesis, spectral analysis and antimicrobial studies of nitrogen and sulfur containing spiro heterocycles from 2,4-diaryl-3-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2010**, 20, 6637-6643.
67. Feddoui, A.; Itto, M. Y. A.; Hasnaoui, A.; Villemin, D.; Jaffrès, P.-A.; Santos, J. S.-D. O.; Riahi, A.; Huet, F.; Daran, J.-C., One pot diastereoselective synthesis of new chiral spiro-1,3,4-thiadiazoles and 1,4,2-oxathiazoles from (1R)-thiocamphor. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2004**, 41, 731-735.
68. Etter, M. C., Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic compounds. *Accounts of Chemical Research*, **1990**, 23, 120-126.
69. Abbady, M. A.; Abdel-Hafez, S. H.; Kandeel, M. M.; Abdel-Monem, M. I., Syntheses of New Unsymmetrical and Symmetrical Diarylsulphides and Diarylsulphones Containing Thiazolinyl and Thiazolidinonyl Moieties Using 4,4'-Diacetyldiphenylsulphide. *Molecules*, **2003**, 8, 622-641.
70. Parsons, S.; Flack, H. D.; Wagner, T., Use of intensity quotients and differences in absolute structure refinement. *Acta Crystallographica Section B*, **2013**, 69, 249-259.

71. Boeyens, J. C. A., The conformation of six-membered rings. *Journal of Crystal and Molecular Structure*, **1978**, 8, 317-320.
72. Duax, W. L.; Weeks, C. M.; Rohrer, D. C. Crystal Structures of Steroids. In *Topics in Stereochemistry*, Allinger, N. L.; Eliel, E. L., Eds., pp 271-383.
73. Gautam, D.; Chaudhary, R. P., Synthesis, crystal structure, computational and photophysical studies of new hydrazono-thiazole derivatives decorated with N-methyl tetrahydrocarbazole pendant. *Journal of Molecular Structure*, **2015**, 1080, 137-144.
74. Groom, C. R.; Bruno, I. J.; Lightfoot, M. P.; Ward, S. C., The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallographica Section B*, **2016**, 72, 171-179.
75. Cremer, D.; Pople, J. A., General definition of ring puckering coordinates. *Journal of the American Chemical Society*, **1975**, 97, 1354-1358.
76. Garland, K.; Gan, W.; Depatie-Sicard, C.; Beauchemin, A. M., A Practical Approach to Semicarbazone and Hydrazone Derivatives via Imino-isocyanates. *Organic Letters*, **2013**, 15, 4074-4077.
77. Viličić, J., Dobijanje aminokiselinskih derivata avarona i *tert*-butilhinona i ispitivanje njihove biološke aktivnosti. Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2017.
78. McIlwain, D. R.; Berger, T.; Mak, T. W., Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2013**, 5, a008656.
79. Aranda, E.; Owen, G., A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line. *Biological Research*, **2009**, 42, 377-389.
80. Kessenbrock, K.; Plaks, V.; Werb, Z., Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, **2010**, 141, 52-67.
81. Mueller, M. D.; Vigne, J.-L.; Minchenko, A.; Lebovic, D. I.; Leitman, D. C.; Taylor, R. N., Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2000**, 97, 10972-10977.
82. Afonso de Almeida, P.; Maria Sarmiento da Silva, T.; Echevarria, A., Mesoionic 5-alkyl-1,3-dithiolium-4-thiolates: Synthesis and brine shrimp toxicity. *Heterocyclic Communications*, **2002**, 8, 593-600.
83. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; McLaughlin, J. L., Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant

constituents [*Artemia salina*]. *Planta Medica; Journal of Medicinal Plant Research*, **1982**, 45, 31-34.

84. Perez, C.; Pauli, M.; Bazerque, P., An Antibiotic Assay by Agar Well Diffusion Method. *Acta Biologiae et Medicinae Experimentalis*, **1990**, 15, 113-115.

85. Khan, S. A.; Asiri, A. M., Synthesis of novel steroidal oxazolo quinoxaline as antibacterial agents. *Arabian Journal of Chemistry*, **2011**, 4, 349-354.

86. *CrysAlisPro Software system*, Agilent Technologies UK Ltd., Oxford: 2014.

87. Sheldrick, G., A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A*, **2008**, 64, 112-122.

88. Hubschle, C. B.; Sheldrick, G. M.; Dittrich, B., ShelXle: a Qt graphical user interface for SHELXL. *Journal of Applied Crystallography*, **2011**, 44, 1281-1284.

89. Spek, A., Structure validation in chemical crystallography. *Acta Crystallographica Section D*, **2009**, 65, 148-155.

90. van der Sluis, P.; Spek, A. L., BYPASS: an effective method for the refinement of crystal structures containing disordered solvent regions. *Acta Crystallographica Section A*, **1990**, 46, 194-201.

91. Flack, H., On enantiomorph-polarity estimation. *Acta Crystallographica Section A*, **1983**, 39, 876-881.

92. Hooft, R. W. W.; Straver, L. H.; Spek, A. L., Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. *Journal of Applied Crystallography*, **2008**, 41, 96-103.

93. Hooft, R. W. W.; Straver, L. H.; Spek, A. L., Probability plots based on Student's t-distribution. *Acta Crystallographica Section A*, **2009**, 65, 319-321.

94. *CrysAlisPro Software System*, 1.171.38.41; Rigaku Oxford Diffraction; Rigaku Corporation: Oxford, UK, 2015.

95. Sheldrick, G., SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A*, **2015**, 71, 3-8.

96. Sheldrick, G., Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C*, **2015**, 71, 3-8.

97. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.

98. Ohno, M.; Abe, T., Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*, **1991**, 145, 199-203.
99. Matić, I. Z.; Aljančić, I.; Žižak, Ž.; Vajs, V.; Jadranin, M.; Milosavljević, S.; Juranić, Z. D., In vitro antitumor actions of extracts from endemic plant *Helichrysum zivojinii*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, 13, 1-12.
100. Ormerod, M., *Flow Cytometry A Practical Approach*. Oxford University Press, Inc., New York: 1992; p 279.
101. Zec, M.; Srđić-Rajić, T.; Krivokuća, A.; Janković, R.; Todorović, T.; Anđelković, K.; Radulović, S., Novel Selenosemicarbazone Metal Complexes Exert Anti-tumor Effect via Alternative, Caspase-independent Necroptotic Cell Death. *Medicinal Chemistry*, **2014**, 10, 759-771.
102. Blois, M. S., Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, **1958**, 181, 1199-1200.

Biografija

Marijana (Branislav) Živković rođena je 02.02.1985. godine u Sremskoj Mitrovici. Osnovnu školu završila je u Šidu, a srednju Prehrambeno-šumarsku i hemijsku školu, smer hemijsko-tehnološki tehničar, u Sremskoj Mitrovici. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je 2003. godine, a diplomirala aprila 2011. godine na Katedri za organsku hemiju na temu „Izolovanje i određivanje strukture diterpena jatrofanskog tipa iz biljne vrste *Euphorbia dendroides*“. Diplomirala je sa ocenom 10 (deset) i ukupnom prosečnom ocenom 8,27 (8 i 27/100) čime je stekla zvanje diplomirani hemičar. Iste, 2011. godine, upisala je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu na smeru doktor hemijskih nauka.

Od oktobra 2011. godine bila je zaposlena kao istraživač pripravnik pri Centru za hemiju Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju na nacionalnom projektu broj 172053 pod nazivom „Bioaktivni prirodni proizvodi samoniklih, gajenih i jestivih biljaka: određivanje strukture i aktivnosti“, a od januara 2014. godine angažovana je na projektu broj 172055 pod nazivom „Interakcije prirodnih proizvoda, njihovih derivata i kompleksnih jedinjenja sa proteinima i nukleinskim kiselinama“ čiji je rukovodilac profesor dr Dušan Sladić. Od 12.05.2014. godine je u zvanju istraživač saradnik, a u isto zvanje je reizabrana 04.05.2017. godine.

Marijana B. Živković je član Srpskog hemijskog društva. Koautor je osam radova objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima od čega su četiri rada objavljena u vodećim časopisima, jedan u istaknutim i tri rada u inostranim časopisima sa recenzijom.

Radovi proistekli iz ove disertacije:

1. Živković, M. B.; Matić, I. Z.; Rodić, M. V.; Novaković, I. T.; Sladić, D. M.; Krstić, N. M., Synthesis, characterization and in vitro cytotoxic activities of new steroidal thiosemicarbazones and thiadiazolines. *RSC Advances*, **2016**, 6, 34312-34333.
2. Živković, M. B.; Matić, I. Z.; Rodić, M. V.; Novaković, I. T.; Krivokuća, A. M.; Sladić, D. M.; Krstić, N. M., Anticancer potential of new steroidal thiazolidin-4-one derivatives. Mechanisms of cytotoxic action and effects on angiogenesis in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **2017**, 174, 72-85.
3. Živković, M. B.; Novaković, I. T.; Matić, I. Z.; Sladić, D. M.; Krstić, N. M., Synthesis and preliminary screening for the biological activity of some steroidal Δ^4 -unsaturated semicarbazone derivatives. *Steroids*, **2019**, 148, 36-46.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Маријана Живковић

Број индекса ДХ13/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

«Синтеза, карактеризација и биолошка активност деривата стероидних хидразона»

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____:

М. Живковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Маријана Живковић
Број индекса ДХ13/2011
Студијски програм доктор хемијских наука
Наслов рада „Синтеза, карактеризација и биолошка активност деривата стероидних хидразона“
Ментори др Душан Сладић, редовни професор Хемијског факултета Универзитета у Београду, и др Наталија Крстић, научни саветник Центра за хемију ИХТМ-а Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Синтеза, карактеризација и биолошка активност деривата стероидних хидразона“
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
- 4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)**
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.