

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Bojan Đ. Božić

SINTEZA, STRUKTURA I SVOJSTVA
POTENCIJALNO BIOLOŠKI AKTIVNIH
DERIVATA PROPANSKE KISELINE

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Bojan Đ. Božić

SYNTHESIS, STRUCTURE AND
PROPERTIES OF POTENTIALLY
BIOLOGICALLY ACTIVE
PROPANOIC ACID DERIVATIVES

Doctoral Disertation

Belgrade, 2013.

MENTOR:

Dr Gordana S. Ušćumlić, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Slobodan D. Petrović, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Milka Avramov Ivić, naučni savetnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju
Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE: _____

Zahvalnica

Kao što glasi jedna stara kineska poslovice "Ne obara se svako drvo prvim udarcem", tako i samo idejno stvaranje ove doktorske disertacije kao i njena realizacija i odbrana ne bi bila moguća bez stručnih saveta, nesebične podrške, predanosti, razumevanja i ljubavi sledećih osoba kojima sam neizmerno zahvalan.

Profesorki dr Gordani Ušćumlić, svom mentoru, iskreno se zahvaljujem za sve stručne savete, trud, razumevanje i podršku koju mi je pružila od samog početka moje akademske karijere. Svi lepi i teški trenutci, koji su neminovni tokom izrade svake disertacije, bili su mnogo lepši i lakši posle njenih reči. Zahvalan sam joj za sva profesionalna i ljudska dela koja je učinila za mene.

Profesoru dr Slobodanu Petroviću, zahvaljujem se na korisnim i pravovremenim savetima, iskrenoj podršci pri idejnom stvaranju, izradi i pisanju disertacije. Srećan sam što sam imao priliku da sarađujem sa njim i iskreno se nadam da će se ta saradnja nastaviti.

Profesorki dr Milki Avramov Ivić, zahvaljujem se što mi je omogućila i svim svojim savetima olakšala ulazak u, za mene potpuno novu, oblast nauke i na taj način proširila moja shvatanja i sagledavanje nauke kojom se bavim. Neizmerno sam joj zahvalan što je pored svojih brojnih obaveza uspla da posveti vreme izradi moje teze.

Profesoru dr Dejanu Poletiju i profesorki dr Jeleni Rogan, zahvaljujem se na iscrpnom trudu i korisnim savetima koje su mi uputili u toku izrade i pisanja disertacije.

Profesorki Biljani Božić, sa Biološkog fakulteta, zahvaljujem se jer je omogućila da se urade najznačajnija biološka ispitivanja u okviru ove teze. Takođe, neizmerno sam joj zahvalan za stručne savete i pruženu podršku tokom izrade i pisanja disertacije.

Profesorki dr Jeleni Antić, sa Farmaceutskog fakulteta, zahvaljujem se jer je omogućila da se uradi određeni broj bioloških ispitivanja.

Zahvaljujem se svim članovima katedre za Organsku hemiju (nastavnom i nenastavnom osoblju) koji su posredno ili neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se svojoj porodici (ocu Đuri, majci Gordani, sestrama Biljani i Dragani, supruzi Katarini), kumovima i svim prijateljima koji su mi pružili neizmernu ljubav i strpljenje, bez čije podrške i inspiracije ne bih imao dovoljno snage i upornosti da ostvarim jedan od svojih najvećih snova.

I na kraju bih završio ovu zahvalnicu sledećim rečima:

Aristotela

"Nemoguće je da se sve dokazuje"

Heraklita

"Znati mnogo stvari ne znači biti mudar"

i delom Molitve pre učenja

"da bi pazeći na učenje koje nam se predaje porasli Tebi, našem Tvorcu na slavu, roditeljima na radost, a Crkvi i otadžbini našoj na korist"

*Ovaj rad posvećujem
svom sinu prvencu
Davidu*

Sinteza, struktura i svojstva potencijalno biološki aktivnih derivata propanske kiseline

IZVOD

U cilju proučavanja potencijalne biološke aktivnosti derivata propanske kiseline u ovom radu su sintetisane dve serije jedinjenja. U prvoj seriji, sintetizovani su novi kompleksi prelaznih metala [Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)] sa oksaprozinom (Hoxa), nesteroidnim antiinflamatornim lekom. Lek i kompleksi okarakterisani su elementarnom i TG analizom, FT-IC, ^1H NMR, ^{13}C NMR, UV-Vis spektroskopijom i merenjem magnetne susceptibilnosti.

Na osnovu elektronskih spektara i magnetnih momenata za sve komplekse utvrđena je (pseudo)oktaedarska geometrija. Sa izuzetkom Cu(II)-kompleksa, gde je ustanovljen mostovno bidentatni način vezivanja COO^- -grupa, kod svih ostalih kompleksa na osnovu FT-IC spektara potvrđena je helatna koordinacija COO^- -grupa. Opšta formula kompleksa je $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{oxa})_2] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, gde je $x = 2$ za $\text{M} = \text{Mn}, \text{Co}$ i Ni i $x = 1,5$ za Zn . Binuklearni Cu(II)-kompleks, $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})(\text{oxa})_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ispoljava snažne Cu–Cu interakcije antiferomagnetnog tipa. Prvi put je ispitana *in vitro* antiproliferativna aktivnost sintetizovanih kompleksa prema ćelijskim linijama humanog karcinoma kolona (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231), humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i melanoma (Fem-x). Kod svih kompleksa uočen je statistički značajan antiproliferativni efekat. Zbog izuzetne aktivnosti, čak i pri nanomolarnim koncentracijama, Ni(II)-kompleks se pokazao kao potencijalni antiproliferativni agens.

Drugu seriju jedinjenja čini grupa novih 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanskih kiselina i odgovarajućih metil estara. Sva jedinjenja okarakterisana su temperaturom topljenja, elementarnom analizom, FT-IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom. Kristalna struktura metil-2-(5-(4-metoksifenil)metilen-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propionata određena je rendgenskom strukturnom analizom. Ispitivana je antiproliferativna aktivnost sintetisanih jedinjenja na ćelijskim linijama humanog karcinoma kolona (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231) i mijeloidne leukemije (K-562). Rezultati ukazuju na bolju antiproliferativnost aktivnost

sintetisanih metil estara u odnosu na odgovarajuće kiseline. Dodatno je ispitivana antimikrobna aktivnost, ali nije zabeležen njihov efekat naspram širokog spektra testiranih mikroorganizama.

U nastavku istraživanja, urađena je elektrohemijska karakterizacija oksaprozina, cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata u 0,05 M rastvoru NaHCO₃. Sintetizovan lek, njegov analitički standard i sadržaj aktivne supstance u tableti Duraprox® okarakterisan je jednom oksidacionom i tri redukcionim reakcijama. Uočena je linearna zavisnost anodnih struja od koncentracija leka na 0,83 V za analitički standard i na 0,85 V za tabletu Duraprox®. Elektroda od zlata je modifikovana adsorpcijom goveđeg serum albumina (bovine serum albumin, BSA) u 0,1 M fosfatnom puferu (pH = 7,4) i ispitana je koncentraciona zavisnost anodnih struja za analitički standard oksaprozina na BSA/Au elektrodi. Korišćenjem Lengmirove adsorpcione termodinamičke jednačine izračunata je konstanta vezivanja oksaprozina za BSA/Au elektrodu.

Ključne reči: Derivati propanske kiseline · Oksaprozina · Kompleksi prelaznih metala · 2,4-Tiazolidindion · Rendgenska strukturna analiza · Antiproliferativna aktivnost · Ciklična voltometrija.

Naučna oblast: Hemijsko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Farmaceutsko inženjerstvo

UDK broj: 547.293

Synthesis, Structure and Properties of Potentially Biologically Active Propanoic Acid Derivatives

ABSTRACT

In order to examine potentially biologically active propanoic acid derivatives two series of compounds have been synthesized. In the first series, novel transition metal [Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)] complexes with oxaprozin (Hoxa), a non-steroidal anti-inflammatory drug, have been synthesized. The drug and complexes have been characterized by elemental and TG analysis, FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, UV-Vis spectroscopy and magnetic susceptibility measurements.

The (pseudo)octahedral geometry has been proposed for all complexes based on electronic spectra and magnetic moments. With exception of the Cu(II) complex, where bridging bidentate mode of COO^- groups has been found, FT-IR spectra confirmed chelately coordinated COO^- groups in the other complexes. The general formula of the complexes is $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{oxa})_2] \cdot x\text{H}_2\text{O}$, with $x = 2$ for $\text{M} = \text{Mn}$, Co and Ni and $x = 1.5$ for Zn . The binuclear Cu(II) complex, $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{OH})(\text{oxa})_3] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, has strong Cu–Cu interactions of antiferromagnetic type. The complexes and Hoxa did not exhibit the cytotoxic effect to peritoneal macrophages. For the first time these complexes have been tested for their *in vitro* antiproliferative activity against human colon, breast, and cancer cell lines, HCT-116, MDA-231, HeLa and Fem-x, respectively. For all investigated compounds significant antiproliferative effects have been observed. Ni(II) complex has been shown to be a promising antiproliferative agent exerting excellent activity even in nanomolar concentrations.

In the second series, novel 2-(5-arylidene-2,4-dioxotetrahydrothiazole-3-yl)propanoic acids and six corresponding methyl esters have been synthesized. All compounds were characterized by melting points, elemental analysis, FT-IR, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. Crystal structure of methyl-2-(5-(4-methoxybenzylidene)-2,4-dioxotetrahydrothiazole-3-yl)propionate was confirmed by X-ray analysis. The antiproliferative activity of all synthesized compounds against human colon cancer, breast cancer and myelogenous leukemia cell lines, *i.e.* HCT-116, MDA-231 and K562, respectively, was evaluated. The results indicate that antiproliferative activity of the

synthesized esters is better than the activity of the corresponding acids. Moreover, *in vitro* antimicrobial activity against a wide range of tested microorganisms was examined and not noticed.

Further, electrochemical investigation of oxaprozin, using cyclic voltammetry on gold electrode in 0.05 M NaHCO₃ was performed. The synthesized drug, its analytical standard and its content in Duraprox® tablets were characterized with one oxidation reaction and the three reduction reactions. All they exhibited the linear concentration dependency of anodic currents at 0.83 V for the analytical standard and 0.85 V for Duraprox® tablets. The strong adsorption of bovine serum albumin (BSA) on gold electrode in 0.1 M phosphate buffer solution (pH = 7.4) is shown and concentration dependency of anodic currents of oxaprozin standard on BSA/Au is studied. Following the Langmuir adsorption thermodynamic equation, the binding constants of oxaprozin on BSA/Au electrode was calculated.

Keywords: Propanoic acid derivatives · Oxaprozin · Transition metal complexes · 2,4-Thiazolidinedione · X-ray analysis · Antiproliferative activity · Cyclic voltammetry.

Academic Expertise: Chemical Engineering

Major in: Pharmaceutical Engineering

UDC number: 547.293

SKRAĆENICE

$\Delta_{\text{deh}}H_m^0$ – entalpija dehidratacije

^{13}C NMR – Nuklearna magnetna rezonanca ugljenika

^1H NMR – Protonska nuklearna magnetna rezonanca

BSA – Goveđi serum albumina (bovin serum albumin)

*cis*platina – *cis*-Diamindihloridoplatine(II)TG – Termogravimetrijska analiza

COX – Ciklooksigenaza

CT – Intramolekulski prelaz naelektrisanja (engl. charge transfer)

CV – Ciklična voltametrijia

DMSO – Dimetilsulfoksid

DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina

DSC – Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Fem-X – Čelijska linija melanoma

FT-IC – Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

HCT-116 – Čelijska linija humanog karcinoma kolona

HeLa – Čelijska linija karcinoma grlića materice

K – konstanta vezivanja

K-562 – Čelijska linija mijeloidne leukemije

KB – koordinacioni broj

$\log P$ – Koeficijent raspodele u sistemu oktanol/voda

MDA-231 – Čelijska linija humanog karcinoma dojke

MIC – Minimalna inhibirajuća koncentracija

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid)

NSAIL – Nesteroidni antiinflamatorni lek

PPAR- γ – Gama podtip receptora aktiviranih peroksizom proliferatorom

SAR – Odnosa strukture i aktivnosti (engl. structure-activity relationship)

SCE – Zasićena kalomelova elektroda

TG – Termogravimetrijska analiza

TZD – Tiazolidindion

UV-Vis – Ultravioletna-vidljiva spektroskopija

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	3
2.1. Tumor, njegovo lečenje i prevencija	3
2.1.1. Hemoterapija kancera	4
2.1.2. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi u prevenciji tumora	6
2.1.3. Kompleksi prelaznih metala kao antiproliferativni agensi	7
2.1.4. Tiazolidindioni u prevenciji kancera	10
2.2. Derivati propanske kiseline	14
2.2.1. Derivati oksaprozina	14
2.2.2. Sinteza oksaprozina i njegovih derivata	16
2.2.3. Fizičko-hemijska svojstva oksaprozina	21
2.3. Koordinaciona jedinjenja	25
2.3.1. Svojstva koordinacionih jedinjenja	28
2.3.2. Karakteristike elemenata prvog niza prelaznih metala	29
2.4. Derivati tiazolidindiona	33
2.4.1. Sinteza derivata tiazolidindiona	34
2.4.1.1. Sinteza 2,4-tiazolidindiona	34
2.4.1.2. Reakcije 2,4-tiazolidindiona	36
2.5. Elektrohemijske metode u ispitivanju farmaceutskih preparata	38
2.5.1. Voltometrija	39
2.5.1.1. Ciklična voltometrija	41
3. EKSPERIMENTALNI DEO	47
3.1. Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost kompleksa prelaznih metala sa oksaprozinom	47
3.1.1. Sinteza oksaprozina	48
3.1.2. Sinteza kompleksa prelaznih metala	48
3.1.3. Karakterizacija	49
3.1.4. Rendgenska strukturna analiza	51
3.1.5. Određivanje antiproliferativne aktivnosti oksaprozina i njegovih kompleksa metala	51
3.2. Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline	53
3.2.1. Sinteza derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline	53
3.2.1.1. Sinteza 2,4-tiazolidindiona	54
3.2.1.2. Sinteza 5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazola	54
3.2.1.3. Sinteza metil-2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propionata	55
3.2.1.4. Sinteza 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline	55
3.2.2. Karakterizacija	55
3.2.3. Rendgenska strukturna analiza	58
3.2.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti derivata tiazolidindiona	58

3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti derivata tiazolidindiona	58
3.3. Elektrohemijsko ispitivanje oksaprozina	60
4. REZULTATI I DISKUSIJA	61
4.1. Sinteza, karakterizacija i antiproliferativna aktivnost kompleksa prelaznih metala sa 3-(4,5-difenil-1,3-oksazol-2-il)propanskom kiselinom (oksaprozinom).....	61
4.1.1. Termička svojstva ispitivanih kompleksa	62
4.1.2. IC-spektroskopija	67
4.1.3. Geometrija graditelja kompleksa	71
4.1.4. Biološka studija.....	76
4.2. Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidro- -tiazol-3-il)propanskih kiselina i odgovarajućih metil estara	82
4.2.1. Kristalna struktura metil-2-(5-(4-metoksifenil)metilen-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propionata.....	83
4.2.2. Biološka studija.....	87
4.3. Elektrohemijska karakterizacija oksaprozina na elektrodi od zlata i elektrodi modifikovanoj bovin serum albuminom	92
5. ZAKLJUČAK	103
6. LITERATURA	108
7. BIOGRAFIJA KANDIDATA	121
8. IZJAVA O AUTORSTVU	122
9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE	123
10. IZJAVA O KORIŠĆENJU	124

1. UVOD

Jedna od najizazovnijih oblasti naučnih istraživanja u medicinskoj hemiji predstavlja dizajniranje postojećih i sinteza novih lekova, kao i proučavanje uticaja njihovih strukturnih modifikacija na biološku aktivnost. Iako je u dijagnostici različitih oboljenja, hirurškim tehnikama, nezi pacijenata i adjuvantnim terapijama učinjen značajan napredak, tumor je i dalje jedna od najrazornijih bolesti današnjice, koji kod velikog broja obolelih dovodi do smrtnog ishoda. Veliki naponi usmereni su ka pronalaženju i sintezi lekova u borbi protiv ove bolesti. Mnogi farmaceutski centri počeli su revidiranje biološke aktivnosti već postojećih konvencionalnih lekova za određene bolesti, sa tendencijom da se pronađe njihova nova potencijalna primena u lečenju drugih oboljenja.

Poznato je da lekovi sa dva ili više mehanizama delovanja i sa potencijalom da se primenjuju u lečenju različitih bolesti mogu u nekim slučajevima da imaju veću terapijsku korist od lekova koji se upotrebljavaju za lečenje samo određenog tipa oboljenja. Upravo ovakvi lekovi mogu ispoljiti manji broj neželjenih sporednih efekata za razliku od kombinacija nekoliko lekova koji pojedinačno deluju na istu bolest. Takođe, uočeno je da korišćenje jedne klase komercijalno dostupnih lekova pri lečenju određene bolesti može pored svog primarnog efekta, imati uticaj i na prevenciju nekih drugih oboljenja i na taj način smanjiti rizik od pojave novih bolesti.

Upravo iz tog razloga, značajni naučno-istraživački naponi usmereni su ka pronalaženju supstanci koje istovremeno mogu imati višestruku farmakološku aktivnost, uz minimalne neželjene efekte. Ostvarenje ovog cilja podrazumeva detaljno poznavanje mehanizama delovanja ovih supstanci kao i utvrđivanje veze između njihove strukture i postizanja željene fiziološke aktivnosti.

U cilju proučavanja uticaja strukturnih modifikacija na biološku (antiproliferativnu i antibakterijsku) aktivnost derivata propanske kiseline u ovom rada su sintetizovane dve grupe jedinjenja. Prvu grupu jedinjenja čine novi kompleksi oksaprozina, nesteroidnog antiinflamatornog leka, sa atomima prelaznih metala (Mn, Co, Ni, Cu, Zn). Struktura ispitivanih kompleksa utvrđena je na osnovu elementarne i TG/DSC analize, magnetnih merenja, FT-IC i UV-Vis spektroskopije. Drugu grupu jedinjenja čine tiazolidindioni, strukturno modifikovani u derivate propanske kiseline.

Struktura novosintetisanih jedinjenja potvrđena je FT-IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom, kao i rendgenskom strukturnom analizom.

U nastavku istraživanja ispitivana je biološka aktivnost svih sintetizovanih jedinjenja kao potencijalno novih antiproliferativnih i/ili antibakterijskih agenasa. Na osnovu dobijenih rezultata, utvrđeno je kako izvršene strukturne modifikacije utiču na biološku aktivnost proučavanih molekula.

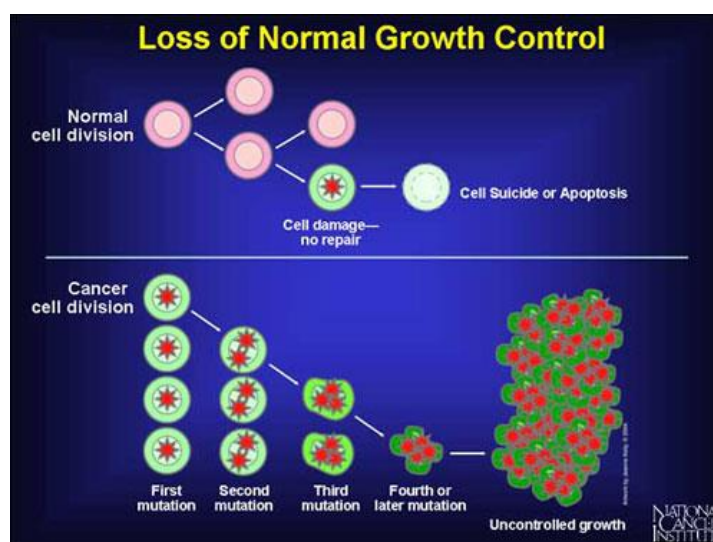
U svetu se u poslednjoj deceniji dosta radi na razvoju elektrohemijskih metoda za kvalitativno i kvantitativno određivanje lekova na elektrodama od različitih materijala (zlato, platina, staklasti ugljenik) i u različitim elektrolitima. Elektrohemijske metode su brže, efikasnije i jeftinije od nekih rutinski primenjivanih metoda i izvanredna su dopuna klasičnim hromatografskim metodama. Kako literaturni podaci o elektrohemijskoj aktivnosti oksaprozina nisu poznati do sada, u ovom radu sistematski je ispitano elektrohemijsko ponašanje oksaprozina cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata u odabranom elektrolitu. Takođe, upotrebom ciklične voltometrije određen je stepen interakcija oksaprozina sa biomakromolekulima.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. Tumor, njegovo lečenje i prevencija

Ljudsko telo čini konglomerat od oko 50 triliona ćelija, od kojih nekoliko milijardi aktivno raste, deli se, a zatim umire na očekivani način. Medicinski izraz za tumor jeste neoplazma, „relativno autonoman rast ćelija“ [1]. Tumor je zajednički naziv za grupu bolesti za koju je karakterističan nekontrolisani rast, deoba i širenje ćelija. Ovo može dovesti do formiranja začaurenih benignih tumora koji se šire i uništavaju susedna tkiva. Sa druge strane, nezačaureni maligni tumori rastu brzo i mogu se raširiti na različite udaljene delove tela, tj. metastazirati. Metastaza predstavlja sekundarni nekontrolisani rast grupe ćelija, poreklom od primarnog tumora, koja je uzrok 90 % smrtnih slučajeva svih obolelih od tumora [2].

Nekontrolisana deoba ćelija uzrokovana je oštećenjem dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) ćelije usled mutacija. Jedna ili više takvih mutacija, bilo nasleđenih (hormonski i/ili imunološki poremećaji), bilo stečenih (duvan, hemikalije, radijacija), dovodi do gubitka regulacije ćelijskog ciklusa i programirane ćelijske smrti – *apoptoze* (slika 1). Takva ćelija postaje inicijator i obrazac prema kojem će se stvarati nove maligne ćelije koje u svom genetskom kodu nemaju informaciju za normalan proces apoptoze pa se umnožavaju bez delovanja kontrolnih mehanizama koji postoje u ostalim, zdravim tkivima.



Slika 1. Prikaz apoptoze i nekontrolisanog rasta ćelije (preuzeto od National Cancer Institute).

Postoji više od 100 različitih tipova i podtipova tumora. Karcinomi nastaju iz epitelnih ćelija koje pokrivaju telo i unutrašnje organe, za razliku od sarkoma koji nastaju iz mezenhimalnih ćelija (mišići, sinovija, kosti, itd.). Pošto su epitelne ćelije rasprostranjene u čitavom telu, karcinom se može javiti u mnogim organima (npr. koža, pluća, dojke, prostata, bubreg, itd.).

Maligni tumori su bolesti koje su među vodećim po rastu incidence širom celog sveta. Procenjuje se da je u 2008. godini broj obolelih od ove bolesti porastao sa 11 miliona (2007.) na 12,7 miliona, i da će do 2020. godine broj obolelih porasti na 16 miliona [3,4]. Maligni tumori su glavni uzroci smrti u svetu, sa 7,6 miliona smrtnih slučajeva (oko 13 % svih smrtnih slučajeva) u 2008. godini i procenjuje se da će do 2030. godine broj smrtnih ishoda porasti na 12 miliona. Lečenje malignih tumora najviše se bazira na hirurgiji, radioterapiji i hemoterapiji.

2.1.1. Hemoterapija kancera

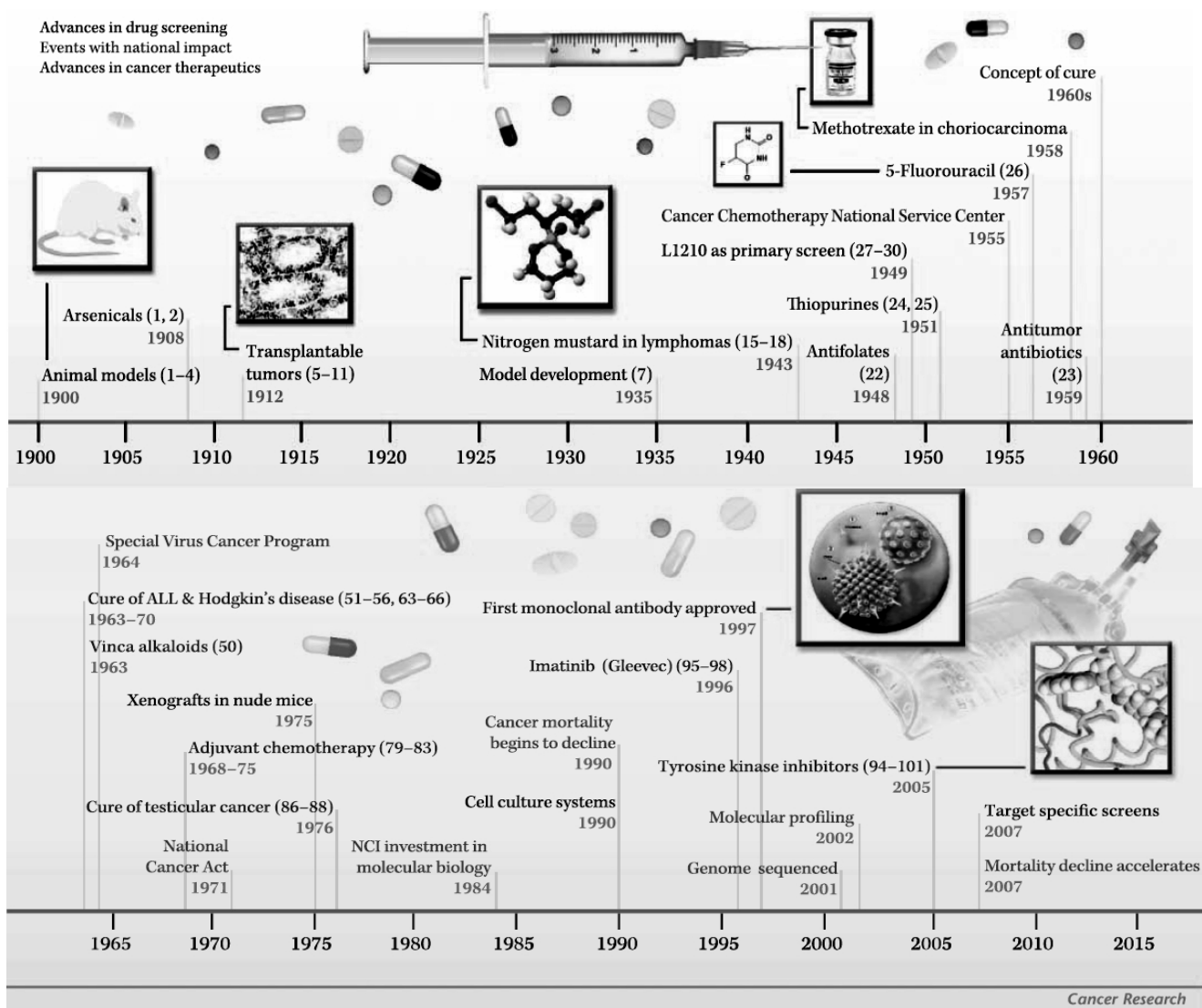
Reč „hemoterapija“ prvi put je uvedena od strane nemačkog hemičara i imunologa Pola Erliha (Paul Ehrlich), i označava lečenje bolesti hemikalijama. Erlih je dokumentovao efikasnost ispitivanih lekova na životinjama i pokazao njihovu potencijalnu biološku aktivnost [5].

Cilj hemoterapeutskih lekova je više ili manje selektivno ubijanje malignih ćelija tumora. Tokom dvadesetog veka bilo je mnogo ključnih napredaka u razvoju i dizajniranju lekova koji se koriste u lečenju tumora (slika 2) [5]. U prvoj polovini XX veka, bila je otkrivena serija antimetabolita kao što su antifolati, tiopurini, 5-fluorouracili i metotreksat. Na primer, merkaptopurin je glavni predstavnik purinskih antagonista koji se koriste u lečenju akutne leukemije. 5-Fluorouracil, pirimidinski analog, koristi se kao hemoterapeutik u lečenju tumora debelog creva i tumora pankreasa.

Ozbiljan problem u tretmanu hemoterapeutskim lekovima predstavlja njihova uska margina bezbednosti (npr. terapijski indeks), pri čemu je uzrok njihove toksičnosti neselektivna biodistribucija u organizmu.

Efikasniji način dopremanja leka u organizam jeste ciljana terapija. Ovaj način upotrebe leka ima za cilj selektivnu akumulaciju leka u ciljnim ćelijama nezavisno od načina i puta unošenja leka. Primena prekursora aktivnih lekova jedan je od načina da se

poboljša selektivnost antitumorskih lekova. Ovaj pristup koristi neke od karakteristika tumora kao što je hipoksija, selektivna ekspresija enzima i niska ekstracelularna pH-vrednost.



Slika 2. Razvoj hemoterapije u periodu od 1900–2007. godine (preuzeto iz reference [5]).

Takođe, rezistentnost prema lekovima i dalje ostaje jedan od glavnih problema hemoterapije. Čelije imaju sposobnost da razviju unakrsnu rezistenciju prema strukturno sličnim lekovima, koja je poznata kao rezistencija na više lekova (engl. multidrug resistance, MDR) [6]. Mehanizmi koji dovode do MDR su na primer modifikacija leka

ili njegova inaktivacija (kao u slučaju inaktivacije *cis*-diamindihloridoplatine(II) (*cis*platine) od strane glutationa), smanjenje permeabilnosti ili povećano izlučivanje leka.

2.1.2. Nesteroidni antiinflamatorni lekovi u prevenciji tumora

Otkrića novih hemoterapeutskih agenasa i unapređivanje radio-hemoterapeutskog tretmana može omogućiti veći broj preživelih pacijenata obolelih od tumora. Salicilna kiselina se već opsežno koristi kod pacijenata za oslobađanje od bola i groznice [7], a za njenu primenu u prevenciji kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti zna se već nekoliko decenija [8-10]. Poslednjih godina pokazano je da upotreba aspirina i drugih nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL-ova) smanjuje mogućnost oboljevanja od tumora [11]. Veliki broj studija pokazao je da ljudi koji su redovno uzimali aspirin ili neki drugi NSAIL imaju manje problema sa adenomatoznim polipima i da je broj preživelih pacijenata obolelih od karcinoma debelog creva veći u poređenju sa ljudima koji nisu koristili ove lekove [12,13]. Takođe, dokazano je da NSAIL-ovi mogu smanjiti rizik od oboljevanja karcinoma jednjaka [11], želuca [13], dojke [13-16], pluća [14], prostate [17], mokraćne bešike [13] i jajnika [13,18]. U nekim studijama na glodarima, aspirinom i drugim konvencionalnim NSAIL-ovima kao što su piroksikam, indometacin, ibuprofen i ketoprofen, uspešno je hemijski inhibirana indukovana tumorogeneza [19,20].

Mnoge studije pokazale su da antiproliferativni efekat NSAIL-ova potiče od njihove sposobnosti da inhibiraju enzim ciklooksigenazu (COX), odnosno njegove izomere COX-1 i/ili COX-2 [21-23]. Uočeno je da je kod karcinoma debelog creva, želuca, dojke, jednjaka, pluća, jetre i pankreasa povećan nivo COX-2 enzima [24-31], a da je nasuprot tome nivo COX-1 enzima ostao sličan kao u zdravim ćelijama [24]. Ovo otkriće ukazuje na mogućnost povezanosti ekspresije COX-2 enzima sa kancerogenezom i/ili progresijom određenih tipova maligniteta kod ljudi.

Pokazano je da COX-2 doprinosi tumorogenezi i malignom fenotipu tumorskih ćelija kroz jedan ili više mehanizama uključujući [32,33]:

- povećanje produkcije prostaglandina;
- prevođenje prokarcinogena u karcinogene;
- inhibiciju apoptoze;

- favorizovanje angiogeneze;
- povećanje invazivnosti ćelija tumora;
- modulaciju inflamacije i imunološkog odgovora.

COX je enzim koji je odgovoran za formiranje važnih bioloških medijatora prostanoida, u koje spada prostaglandin. COX-2 učestvuje u sintezi prostaglandina E_2 (PGE_2) koji je jedan od proinflamatornih agenasa i za koji su mnoga istraživanja ukazala da podstiče rast tumora. PGE_2 je najvažniji prostaglandin koji se proizvodi u mnogim ćelijama tumora, uključujući karcinom debelog creva [34], želuca [35] i dojke [36].

Sa druge strane, povoljan efekat NSAIL-ova na suzbijanje proliferacije tumorskih ćelija može se dodatno objasniti nezavisnim mehanizmima delovanja u odnosu na COX inhibicioni mehanizam [37]. COX nezavisni efekat NSAIL-ova posredovan je kroz modulaciju aktivnosti različitih intracelularnih kinaza kao što su: ekstracelularnim signalom regulisane kinaze (ERK), serin/treonin-specifična proteinska kinaza (Akt), p38 mitogenom-aktivirane proteinske kinaze (MAPK), c-Jun N-terminalne kinaze (JNK) [38-41], koje indukujući apoptozu mogu da dovedu do promene u aktivnosti i ekspresiji nekih transkripcionih faktora (nuklearni faktor (NF)- κ B, Erg-1, AP-1, PPAR γ) [42-45].

2.1.3. Kompleksi prelaznih metala kao antiproliferativni agensi

Ideja o korišćenju neorganskih jedinjenja za lečenje tumora, pre velikog uspeha cisplatine, bila je prilično nezastupljena. Za jedinjenja koja sadrže jone teških metala, koji zbog svoje toksičnosti izazivaju različite slučajeve trovanja, nije se moglo ni pretpostaviti da deluju kao potencijalni lekovi u borbi protiv tumora. Najraniji pokušaj da se uvede metal u razvoj lekova bio je Faulerov (Fowler) rastvor koji sadrži 1% kalijum-arsenit ($KAsO_2$), i od tada počinje razvoj terapije arsenom [46]. Neka od sličnih jedinjenja, kao što je As_2O_3 , i danas se koriste [47].

Analizu veze između strukture i efikasnosti kompleksa metala započeli su 1931. godine nemački naučnici, Koller (Collier) i Kraus (Krauss). Oni su došli do zaključka da: „Efekat teških metala na tumore kod eksperimentalnih miševa ne potiče samo od atoma metala već i od strukture jedinjenja i tipa jedinjenja“ [48].

*Cisplatin*a prvi put je sintetizovana 1845. godine i imala je naziv Pejronov (Peyrone) hlorid. Rozenberg (Rosenberg) i saradnici pokušali su da sintetizuju jedinjenje, međutim dobijeni proizvod nije pokazivao biološku aktivnost. Ispostavilo se da ovo jedinjenje platine ima dva izomerna oblika, *cis* i *trans*, pri čemu je *trans* oblik stabilniji ali biološki neaktivan. 1965. godine Rozenberg je uočio biološki potencijal *cisplatin*e, otkrivši da ovaj agens uspešno inhibira deobu ćelije bez ikakvog uticaja na njen rast [49,50].

Veoma brzo posle otkrića *cisplatin*e, sinteza kompleksa prelaznih metala sa odgovarajućim ligandima postala je interesantan i atraktivan pravac u razvoju antiproliferativnih lekova zbog njihove potencijalne biološke aktivnosti. Za razliku od čistih organskih jedinjenja, mogućnost raznovrsnih koordinacionih brojeva i geometrija graditelja kompleksa omogućava sintezu koordinacionih jedinjenja sa jedinstvenom stereohemijom i orijentacijom organskih liganada [51].

Kritični faktori koji utiču na biološku aktivnost kod koordinacionih jedinjenja jesu vrsta liganda i oksidaciono stanje metala, koje često i diktira određeni tip koordinacije i geometrije kompleksa [52]. Prelazni metali, poznatiji kao *d*-blok metali, pokazali su odličan antiproliferativni potencijal [53].

Prvi niz prelaznih metala [mangan (Mn), kobalt (Co), nikl (Ni), bakar (Cu) i cink (Zn)] privukao je veliku pažnju koordinacionih hemičara zbog njihove važne uloge u metabolizmu čoveka. Oni predstavljaju esencijalne mikroelemente koji se pojavljuju u reaktivnim centrima mnogih enzima [54-58], pri čemu su njihovi efekti u velikoj meri zavisni jedni od drugih [59].

Kao kofaktor, Mn se javlja u velikom broju enzima koji su uključeni u procese hidrolize, fosforilacije, dekarboksilacije i transaminacije. Ima značajnu ulogu u imunološkom sistemu, produkciji energije u ćeliji, održavanju balansa glukoze u krvi, antioksidativnom metabolizmu, kao i reprodukciji i metabolizmu kostiju [60]. Co kao integralni deo molekula vitamina B12 neophodan je za rast tkiva, a deficijencija ovog elementa rezultuje defektnom sintezom DNK [61]. Ni je osnovni element za delovanje ureaze (enzim koji omogućava hidrolizu uree). Nova otkrića ukazuju na njegove sposobnosti da se vezuje za protein i učestvuje u prepoznavanju antigena od strane antitela specifičnog za Ni(II) [62]. Cu ima mnogo važnih fizioloških uloga u organizmu uključujući ulogu u uspostavljanju imunološke funkcije, metabolizmu kosti i

homeostazi. Istraživanja s kraja prošlog veka ukazala su i na druge uloge Cu kod čoveka uključujući ulogu kofaktora za specifične enzime i elektron transportne proteine uključene u energetske i antioksidativni metabolizam [63]. Zn je sveprisutan u subćelijskom metabolizmu. On je osnovna komponenta jednog ili više katalitičkih mesta u najmanje jednom enzimu u svakoj klasifikaciji enzima [64]. Širok spektar bioloških funkcija stavlja ga vrlo visoko na lestvici po važnosti za organizam; ima enzimsku aktivnost, igra važnu ulogu u metabolizmu nukleinskih kiselina, održanju strukturnog i funkcionalnog integriteta membrana, a ima čak i ulogu hormona.

Pokazano je da su kompleksi prelaznih metala sa NSAID-ima značajno aktivniji u poređenju sa svojim matičnim lekovima i da poseduju manji broj sporednih (neželjenih) efekata [65]. Ova prednost koordinacionih jedinjenja u odnosu na slobodan ligand može se objasniti doprinosom više različitih faktora kao što su [66,67]:

- sinergetski povoljan efekat liganda i jona metala;
- zaštita liganda koji je vezan za jon metala od enzimske degradacije;
- neutralizacija negativnog naelektrisanja na ligandu nakon formiranja kompleksa;
- podešavanje hidrofobnih / hidrofилnih svojstava na način koji omogućava bolju rastvorljivost u biološkim tečnostima;
- olakšani transport kroz ćelijsku membranu;

Mnoga istraživanja pokazala su da kompleksi NSAID-ova sa prelaznim metalima četvrte periode poseduju izraženu antitumorsku aktivnost. Meklofenaminska kiselina kao i njeni kompleksi sa Mn(II), Cu(II) i Zn(II) pokazali su antiproliferativni efekat na tri ćelijske linije tumora: tumor pluća (MCF-7), tumor bešike (T24) i tumor alveola (A-549) [68]. Takođe, i kod kompleksa prelaznih metala sa acetilsalicilnom kiselinom (aspirinom) uočena je značajna antiproliferativna aktivnost [69]. Dalja istraživanja potvrdila su da su kompleksi naproksena i mefenaminske kiseline sa Co(II) potencijalni antitumorski agensi [70,71]. Kod kvadratno planarnog kompleksa ketoprofena sa Cu(II) pokazan je značajan antiproliferativni efekat na ćelije tumora dojke (T47D) [72]. Kompleksi piroksikama i meloksikama (pripadaju grupi oksikama) sa Cu(II) takođe su pokazali značajan antitumorski efekat [73]. Tolfenaminska kiselina i njeni mono- i trinuklearni kompleksi sa Zn(II) poseduju veliku sposobnost vezivanja za

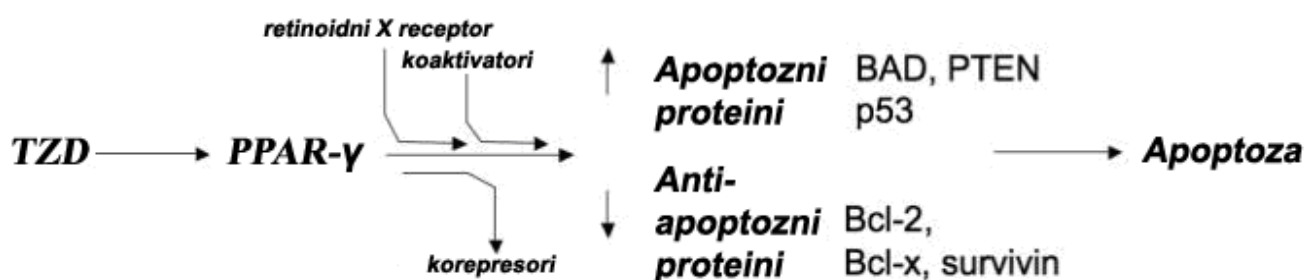
goveđi serum albumin (bovin serum albumin, BSA) što ih kandiduje u grupu potencijalnih antitumorskih agenasa [74].

U poslednjih nekoliko godina mnogo je truda uloženo u povećanje broja koordinacionih jedinjenja koja bi potencijalno mogla da nađu terapeutsku primenu. Istorijski gledano, metali i kompleksi metala odigrali su ključnu ulogu u razvoju savremene farmacije i hemoterapije. Međutim, njih je i dalje manje u odnosu na sve komercijalno dostupne lekove na tržištu [75].

2.1.4. Tiazolidindioni u prevenciji kancera

Tiazolidindioni (TZD), poznati još i kao glitazoni, pripadaju klasi antidijabetes lekova. Pioglitazon, rosiglitazon, ciglitazon i troglitazon su glavni predstavnici derivata TZD, pri čemu je troglitazon povučen iz upotrebe 2000. godine zbog svog hepatotoksičnog efekta. TZD poseduju veliki afinitet vezivanja za gama podtip receptora aktiviranih peroksizom proliferatorom (engl. peroxisome-proliferator activated receptors, PPAR- γ) [76]. PPAR-i su članovi superfamilije nuklearnih receptora koji funkcionišu kao transkripcioni faktori i regulišu ekspresiju gena [77]. Nakon aktivacije, bilo sintetskim ligandima kao što su TZD, ili prirodnim ligandima (masne kiseline), PPAR- γ formira heterodimer sa retinoid X receptorom (RXR) i aktivira ekspresiju određenih ciljnih gena.

Brojne studije pokazale su da je jedan od glavnih mehanizama delovanja TZD kao potencijalnih antiproliferativnih agenasa indukcija apoptoze (slika 3) [78].



Slika 3. Mehanizam indukcije apoptoze od strane TZD.

Pokazano je da se primenom troglitazona indukuje PPAR- γ zavisna apoptoza ćelija karcinoma pluća [79] i karcinoma debelog creva [80]. Takođe, ciglitazon dozna i vremenski zavisno inhibira proliferaciju ćelijske linije karcinoma pluća [81] i indukuje apoptozu ćelija karcinoma dojke, karcinoma prostate i melanoma [82].

Pored indukcije apoptoze ćelija karcinoma, aktivacija PPAR- γ može da smanji razvoj tumora putem prekida proliferacije ćelija kancera delovanjem na kontrolne tačke ćelijskog ciklusa ili inhibicijom faktora rasta u mnogim tipovima tumora [83].

PPAR- γ zavisni mehanizmi antitumorskog efekta TZD nisu jedini načini delovanja, već postoje i PPAR- γ nezavisni mehanizmi delovanja TZD [84,85], kao što su ekspresija protein fosfataze [86], ciklina D1 i E, inflamatornih citokina, transkripcionih faktora i povećana ekspresija molekula koji su u vezi sa regulacijom rasta i sazrevanjem ćelija [87]. Zbog postojanja i PPAR- γ nezavisnog mehanizma delovanja TZD, neophodno je naglasiti koji od PPAR- γ liganada u terapiji tumora mogu da ispolje PPAR- γ zavisan i/ili PPAR- γ nezavisan mehanizam delovanja.

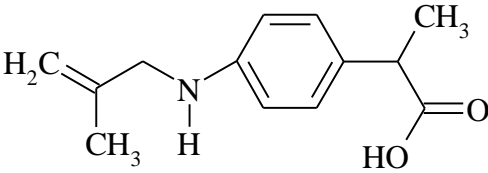
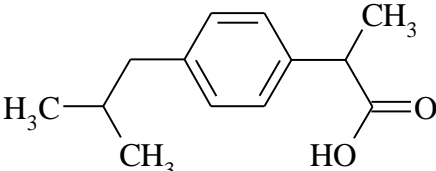
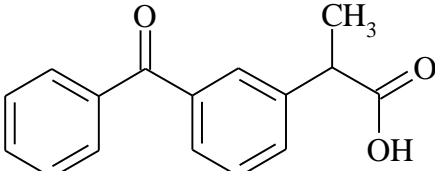
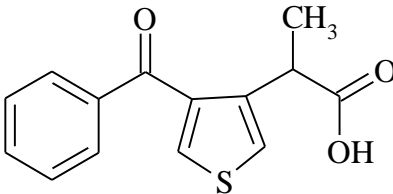
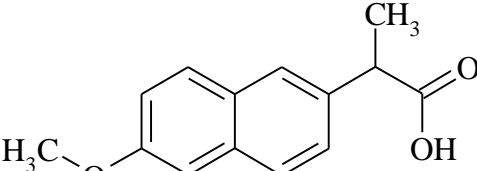
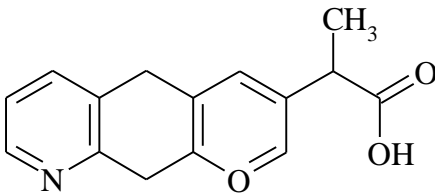
Iako se TZD već uveliko koriste u prekliničkim i kliničkim studijama za terapiju različitih tipova tumora, osnovni mehanizam njihovog delovanja i dalje nije objašnjen. Generalno se smatra da se aktivacijom PPAR- γ postiže antitumorski efekat derivata TZD, ali mnogobrojne studije pokazale su i postojanje mehanizama koji su nezavisni od prethodno predloženog mehanizma.

2.2. Derivati propanske kiseline

Antiinflamatorni lekovi mogu biti steroidni, nesteroidni i imuno selektivni. NSAID-ovi pripadaju grupi lekova sa analgetskim, antipiretičkim i, pri većim dozama, antiinflamatornim efektom. Pojam *nesteroidni* koristi se u cilju razlikovanja ovih lekova od *steroida*, koji takođe deluju antiinflamatorno, ali imaju niz drugih negativnih sporednih efekata i utiču na psihičko stanje pacijenta.

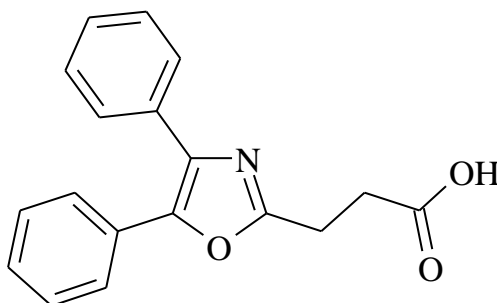
Derivati propanske kiseline sa analgetskim i antipiretičkim svojstvima pripadaju grupi NSAID-a (tabela 1). Širok spektar NSAID-ova koristi se u kliničkoj praksi za lečenje inflamatornih bolesti, uključujući osteoartritis, reumatoidni artritis i ankilozirajući spondilitis, kao i za prevenciju infarkta miokarda i Alchajmerove bolesti [88-92].

Tabela 1. Struktura derivata propanske kiseline.

naziv jedinjenja	molekulska struktura
alminoprofen	
ibuprofen	
ketoprofen	
tiaprofenska kiselina	
naproksen	
pranoprofen	

Pokazano je da su NSAID-ovi inhibitori sinteze prostaglandina, koji inhibiraju COX jedan od glavnih enzima u inflamatornoj kaskadi [93]. Jedinjenja koja inhibiraju COX-1, dovode do gastrointestinalnih iritacija, jer je upravo ovaj enzim uključen u fiziološke funkcije zaštite sluznice želuca [94,95]. Shodno tome, veliki istraživački naponi usmereni su ka razvoju jedinjenja koja će inhibirati sintezu prostaglandina selektivnom inhibicijom COX-2 enzima [96] čime bi se smanjio broj neželjenih efekata.

Oksaprozin (Wy-21,743; 3-(4,5-difeniloksazol-2-il)propanska kiselina [97]; CAS-21256-18-8) (slika 4), je prvi reprezentativni član diaril-supstituisanih heterocikličnih jedinjenja, koji je našao kliničku upotrebu kao selektivni COX-2 inhibitor [98]. Oksaprozin je dugodelujući NSAID koji se koristi za lečenje brojnih inflamatornih mišićnoskeletnih bolesti, uključujući reumatoidni artritis, osteoartritis, upale tetiva, postoperativnih bolova zuba, ankilozirajući spondilitis i burzitis [99-101]. Američka administracija za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) odobrila je zvaničnu upotrebu oksaprozina u oktobru 1992. godine [102]. Karakteristično je da oksaprozin, u poređenju sa ostalim lekovima iz iste klase jedinjenja, poseduje jedinstvene hemijske i farmakokinetičke osobine.



Slika 4. Struktura 3-(4,5-difeniloksazol-2-il)propanske kiseline (oksaprozina).

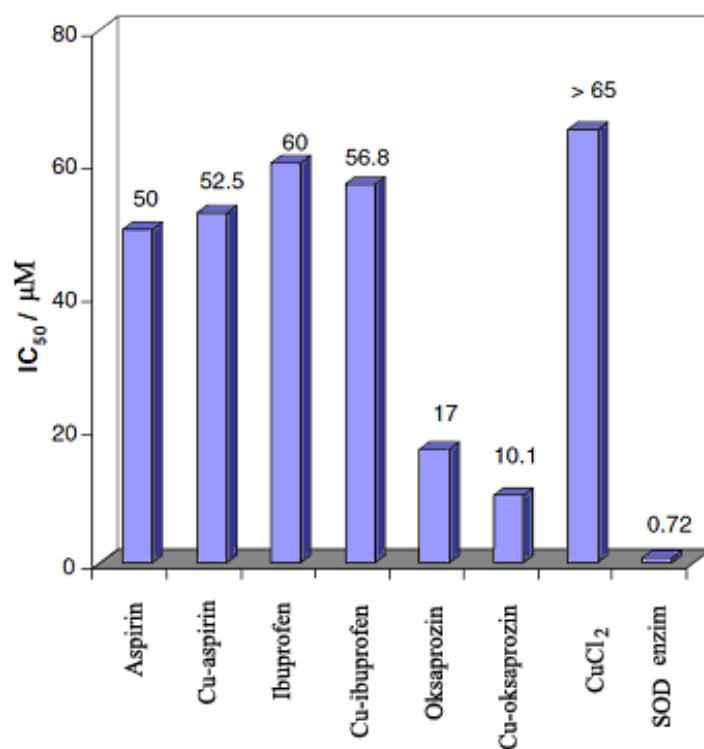
Povoljan antiinflamatorni efekat oksaprozina može da se objasni visokim nivoom akumulacije u inflamiranoj sinoviji u poređenju sa nivoom u plazmi i sinovijalnoj tečnosti. Pokazano je da se u osnovi antiinflamatornog i analgetskog svojstva oksaprozina nalazi njegova sposobnost inhibicije COX2 enzima. Pored toga, u novije vreme pokazano je da povoljni efekti oksaprozina mogu biti objašnjeni i mehanizmima nezavisnim od inhibicije COX enzima [103].

U terapiji inflamatornih oboljenja u odnosu na druge NSAIL-ove, kao što su aspirin, naproksen, indometacin i fenilbutazon, oksaprozin ima nekoliko prednosti, uključujući dugačak biološki poluživot sa produženim delovanjem, oralno konzumiranje po jednodnevnom režimu i smanjeni broj gastrointestinalnih iritacija kao sporednih efekata [104,105]. Ove prednosti su mu omogućile da postane jedan od najviše korišćenih NSAIL-a u SAD [106]. Ipak, iako se generalno dobro podnosi, oksaprozin može da dovede do gastrointestinalnih komplikacija, disfunkcije bubrega, hipersenzitivnosti, reakcije kod astmatičara, kao i oštećenja jetre [105,107].

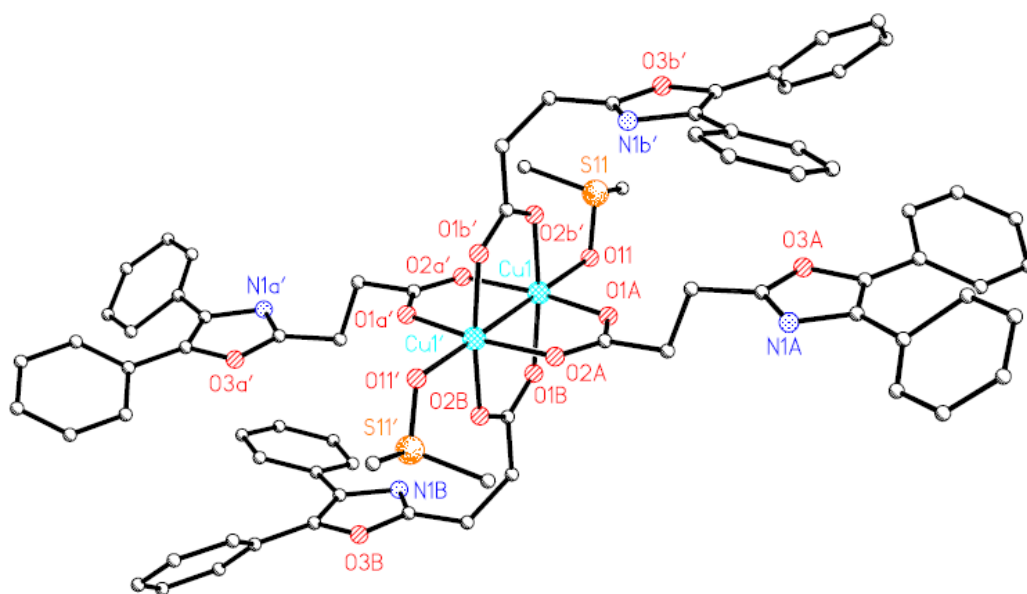
2.2.1. Derivati oksaprozina

Pjuig (Puig) i saradnici [108] izučavali su seriju 3,4-diariloksazol derivata i pokazali da kada se na fenilnom jezgru nalaze metilsulfonil- ili aminosulfonil-supstituenti, derivati istovremeno poseduju antiinflamatornu i analgetsku aktivnost, a da fluoro supstituenti povećavaju potencijal delovanja molekula tri puta u odnosu na nesupstituisane derivate. Isti supstituenti uvedeni su i kod oksaprozina, pri čemu se pokazalo da kod derivata oksaprozina kod kojih je uvedena aminosulfonil-grupa, ne samo da je zadržana analgetska i antiinflamatorna aktivnost, već je i značajno smanjena mogućnost lezije želudca [109].

Kompleksi NSAIL-ova sa metalima mogu minimizirati štetan uticaj ovih lekova na organizam. Delotvorni efekti Cu(II) u inhibiciji inflamacije primećeni su 40-ih godina prošlog veka pri ispitivanju kompleksa Cu za lečenje artritisa [110]. Zanimanje za moguće blagotvorne efekte kompleksa Cu obnovljeno je 1976. godine Sorensonovim istraživanjima [111]. Dalja istraživanja potvrdila su da su kompleksi antiinflamatornih lekova sa Cu(II) (slika 5) aktivniji kao antiinflamatorni agensi od osnovnih neorganskih Cu(II)-soli i osnovnih NSAIL-ova [112]. Na slici 6 prikazana je struktura dimera bakarnog kompleksa oksaprozina, jedina do sada poznata, koja je određena rendgenskom strukturnom analizom [112].



Slika 5. SOD aktivnosti opisane IC₅₀ vrednostima (SOD-superoksid dismutaza, IC₅₀-koncentracija pri kojoj se ispoljava 50 % maksimalnog inhibitorynog dejstva leka) [112].



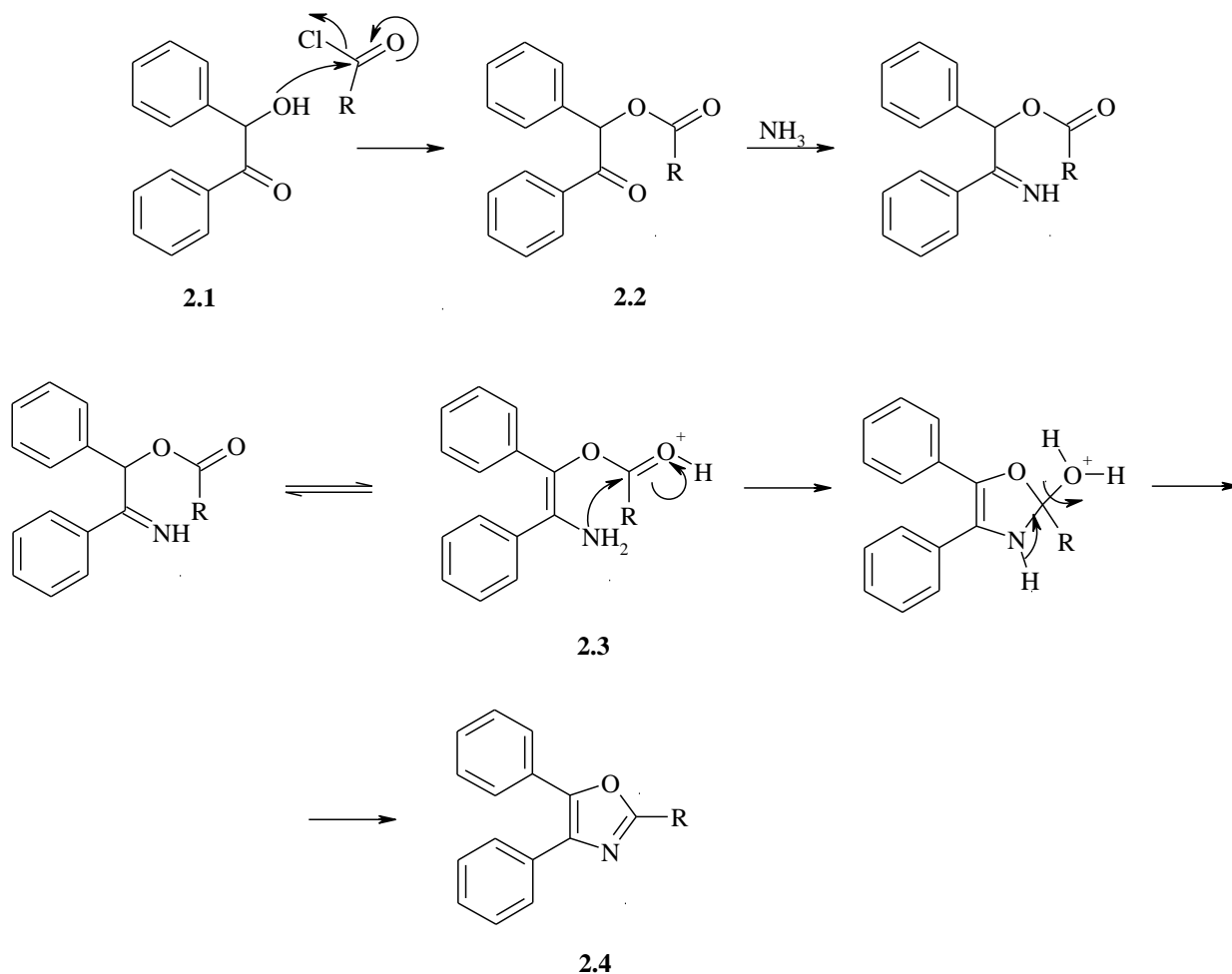
Slika 6. Kristalna struktura [Cu₂(DMSO)₂(oxa)₄] [112].

Istovremenom upotrebom NSAIL-ova sa paracetamolom [113] ili kiselim blokatorom (ranitidinom) [114] postiže se bolji efekat na smanjenje bola i upala, nego njihovom pojedinačnom upotrebom, pri čemu se broj gastrointestinalnih iritacija smanjuje.

2.2.2. Sinteza oksaprozina i njegovih derivata

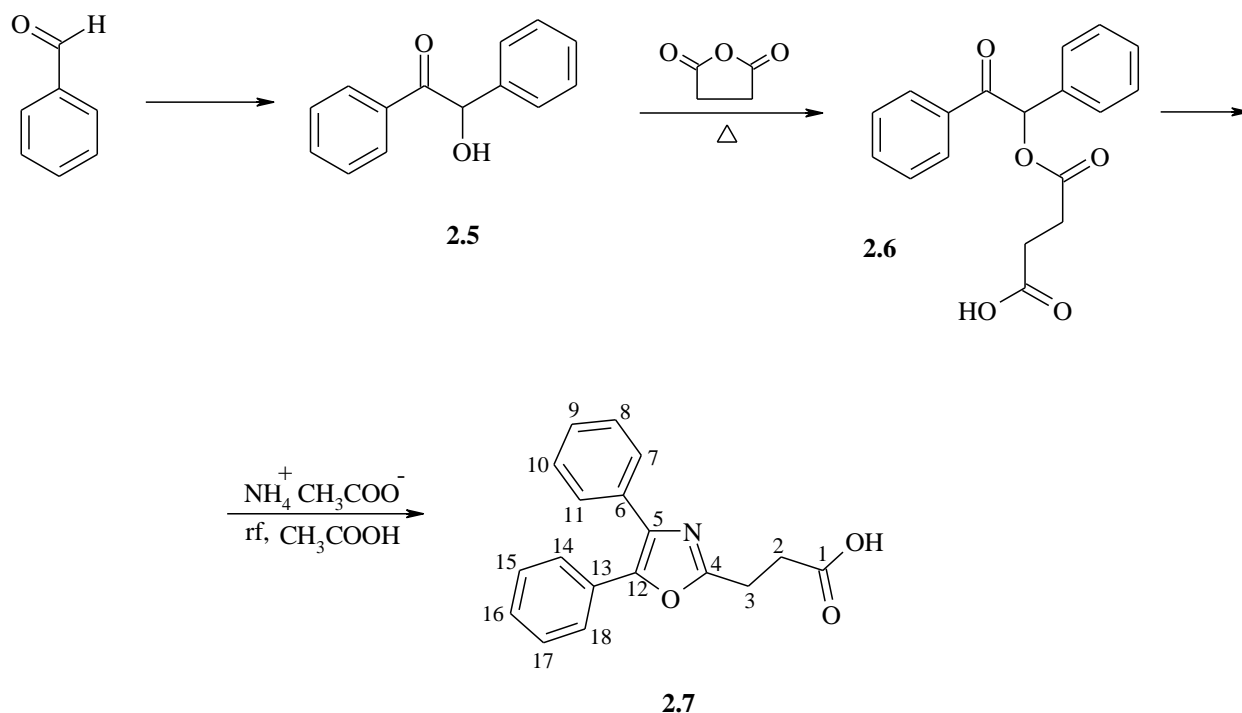
Postupak dobijanja oksaprozina zasnovan je na Dejvidsonovoj (Davidson) sintezi oksazola [115]. Prema ovoj metodi, supstituisani oksazoli dobijaju se reakcijama kondezacije O-acilaciloina sa amonijakom, amonijum-acetatom ili ureom. Ova reakcija najpogodnija je za 2,4,5-trisupstituisane oksazole sa aromatičnim supstituentom u položaju C5, pri čemu se dobijaju mali prinosi za 2,4-disupstituisane ili monosupstituisane oksazole. Kada se amonijak ili amonijum-acetat zamene aminima, reakcija ciklizacije se ne odigrava.

Mehanizam Dejvidsonove sinteze prikazan je na shemi 1. U reakciji benzoina (2.1) sa hloridom ili anhidridom odgovarajuće kiseline dobija se O-acilaciloin (2.2), koji u reakciji sa amonijum-acetatom u glacijalnoj sirćetnoj kiselini kao proizvod daje odgovarajući derivat sa oksazolovim prstenom u svojoj osnovi (2.4). Aciloksienamin (2.3) je najverovatnije intermedijer u ovoj reakciji.



Shema 1. Mehanizan Dejvidsonove sinteze.

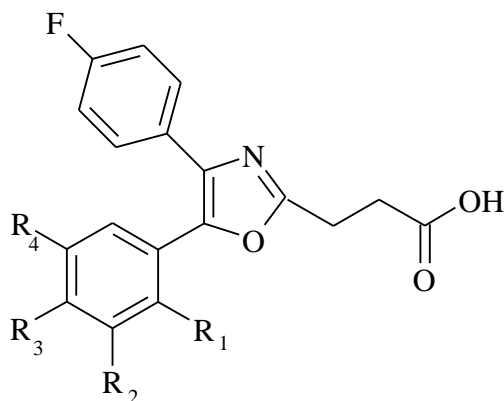
Sinteza oksaprozina prikazana je na shemi 2 i odigrava se po mehanizmu prikazanom na shemi 1. Iz benzaldehida benzoinskom kondenzacijom pri odgovarajućim reakcionim uslovima uz prisustvo katalizatora dobija se benzoin (α -hidroksi keton) (2.5). Esterifikacijom anhidrida ćilibarne kiseline dobijenim benzoinom dobija se O-acilacilion (hemisukcinat) (2.6), koji u reakciji sa amonijum-acetatom u sirćetnoj kiselini kao proizvod daje oksaprozin (2.7). Posle prekriztalizacije iz metanola dobija se oksaprozin visoke čistoće u prinosu od 72 % u odnosu na benzoin [116].



Shema 2. Sinteza oksaprozina.

Kao i kod procesa zatvaranja prstena, pri postupku esterifikacije moguće je izvoditi reakciju u prisustvu ili odsustvu rastvarača. Dodavanjem rastvarača omogućava se odigravanje reakcije pri nižim temperaturama, uz refluks. Ako se esterifikacija odigrava bez rastvarača, topljenjem anhidrida ćilibarne kiseline zajedno sa odgovarajućim α -hidroksi ketonom, prihvatljive su temperature do 180 °C, pri čemu je interval 100 – 140 °C optimalan [116].

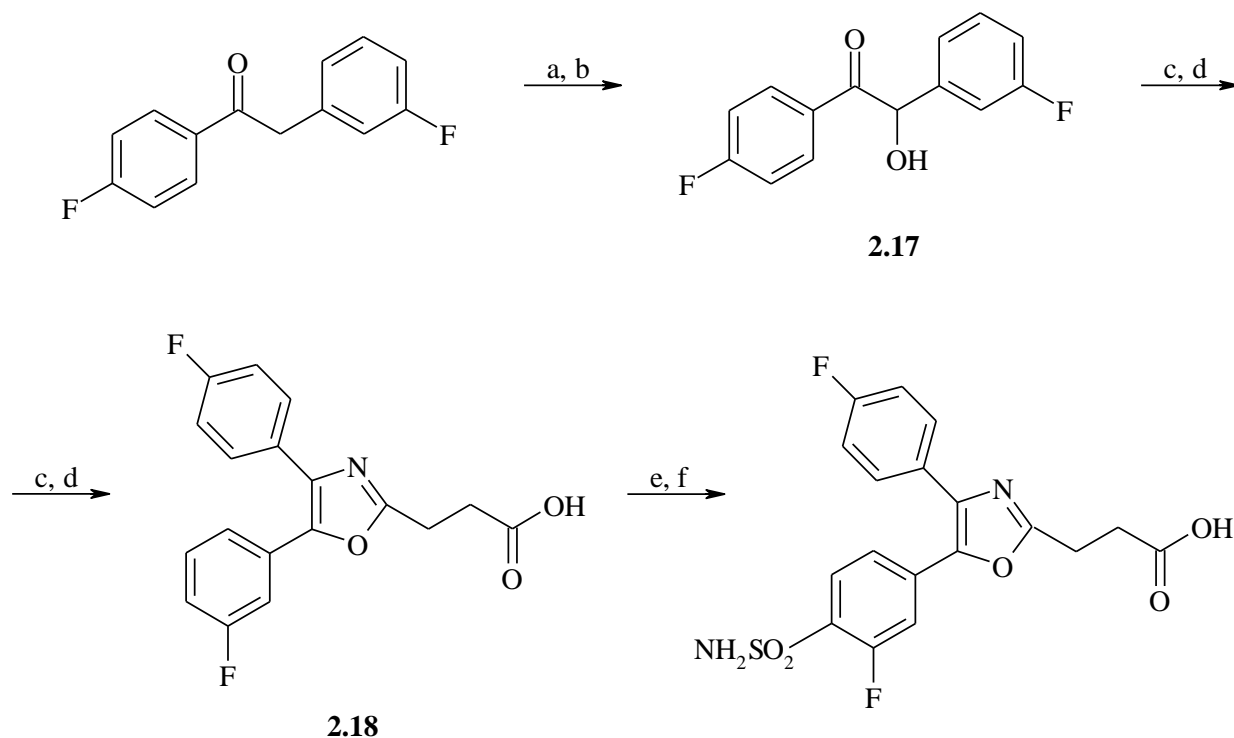
Nove klase 4,5-diariloksazolovih derivata [109] (slika 7) predložene su radi poboljšanja biološke aktivnosti i smanjenja gastrointestinalne toksičnosti oksaprozina. Ove izmene izvršene su analizom odnosa strukture i aktivnosti (engl. structure-activity relationship, SAR), koja uzima u obzir da ova jedinjenja inhibiraju COX-2 enzim [117], kao i mehanizam delovanja NSAIL-a.



Jedinjenje	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
2.8	H	F	H	H
2.9	F	H	H	H
2.10	H	H	F	H
2.11	H	F	SO ₂ NH ₂	H
2.12	H	SO ₂ NH ₂	H	F
2.13	SO ₂ NH ₂	H	H	F
2.14	H	F	SO ₂ CH ₃	H
2.15	H	SO ₂ CH ₃	H	F
2.16	SO ₂ CH ₃	H	H	F

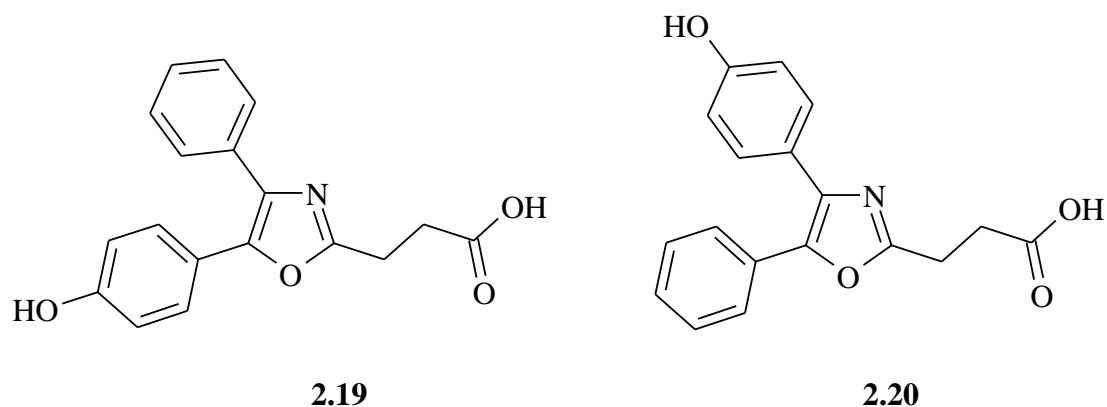
Slika 7. Derivati oksaprozina

Najbolju aktivnost iz ove grupe derivata oksaprozina pokazala je 3-[4-(4-fluorfenil)-5-(4-aminosulfonyl-3-fluorfenil)oksazol-2-il]propanska kiselina. Sinteza jedinjenja **2.11** (shema 3), počinje bromovanjem α -(3-fluorfenil)-4-fluoracetofenona, koji se zatim supstitucijom prevodi u intermedijer **2.17**. Ovako dobijeni derivat benzoina se prethodno opisanim postupcima prevodi u intermedijer **2.18**, koji se dalje modifikacijama (u prisustvu HSO₃Cl i NH₄OH) prevodi u konačan proizvod [109,118].



Shema 3. Sinteza 3-[4-(4-fluorfenil)-5-(4-aminosulfonil-3-fluorfenil)oksazol-2-il]propanske kiseline. Reagensi i uslovi: (a) *N*-bromosukcinimid, 25 °C, 5 h; (b) CH₃COCH₃/H₂O, NaHCO₃, 50 °C, 5 h; (c) anhidrid ćilibarne kiseline, piridin, 90–95 °C, 1,5 h; (d) amonijum-acetat, glacialna sirćetna kiselina, 90–95 °C, 2,5 h; (e) HSO₃Cl, 25 °C, 96 h; (f) NH₄OH, refluks, 2,5 h.

Derivati koji sadrže hidroksidnu grupu na jednom od fenilnih jezgara oksaprozina takođe su pokazali značajnu antiinflamatornu aktivnost. 3-[5-(4-Hidroksifenil)-4-feniloksazol-2-il]-propanska kiselina (slika 8, **2.19**) sintetizovana je polazeći od 4'-metoksibenzoina, dok je 3-[4-(4-hidroksifenil)-5-feniloksazol-2-il]propanska kiselina (slika 8, **2.20**) sintetizovana polazeći od 4-metoksibenzoina. Odgovarajući hemisukcinati dobijeni su esterifikacijom navedenih benzoina i anhidrida ćilibarne kiseline, katalizovani trietilaminom u prisustvu toluena u atmosferi azota. Zatvaranje oksazolovog prstena izvršeno je klasičnim putem, uvođenjem amonijum-acetata uz prisustvo sirćetne kiseline kao rastvarača i zagrevanjem uz refluks [119].



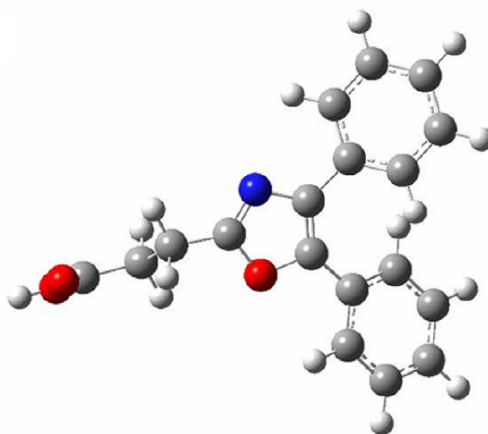
Slika 8. Struktura hidroksi derivata oksaprozina

U industrijskoj proizvodnji oksaprozina, upotrebom toluena u reakciji esterifikacije benzoina, kao i dodavanjem mravlje kiseline u odgovarajućem odnosu prema sirćetnoj kiselini kod procesa ciklizacije, dobijaju se veći prinosi oksaprozina i izbegava se upotreba većih količina piridina (katalizator u reakciji esterifikacije). Toluena se dodaje u odnosu 450–550 L na 100 kg dobijenog čistog oksaprozina. Kao katalizator se koristi derivat piridina (dimetilaminopiridin) u odnosu 0,5–1,5 % na dodatnu masu benzoina. Proces ciklizacije se odigrava u prisustvu sirćetne i mravlje kiseline u masenom odnosu 10:1 do 5:1 [120].

2.2.3. Fizičko-hemijska svojstva oksaprozina

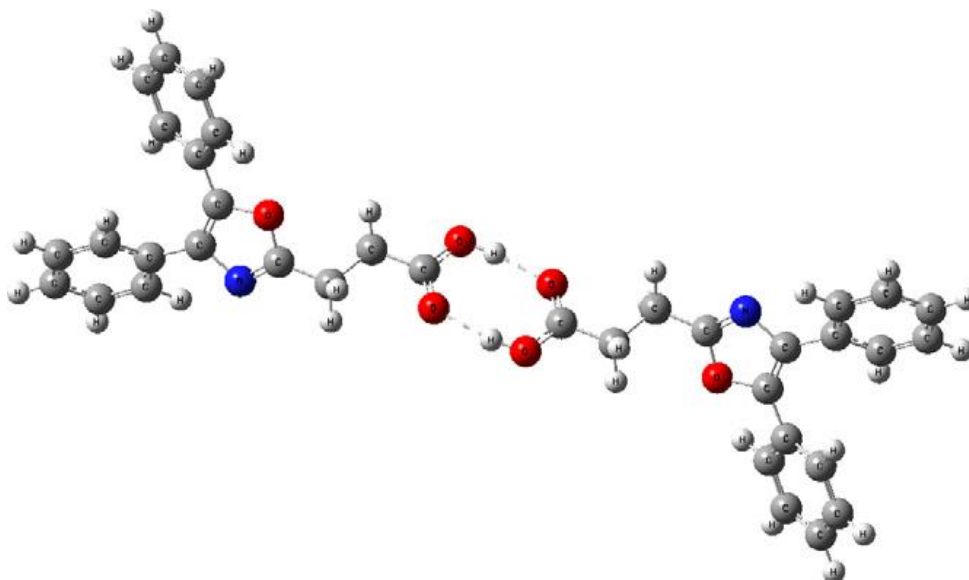
Oksapropazin, empirijske formule $C_{18}H_{15}NO_3$ i molekulske mase 293 g mol^{-1} , jeste beo do sivo beli prah karakterističnog mirisa i temperature topljenja $162\text{--}163 \text{ }^\circ\text{C}$. Umereno se rastvara u alkoholu, a nerastvoran je u vodi. Vrednost $\log P$ (koeficijent raspodele u sistemu oktanol/voda) iznosi 3,7 (eksperimentalni podatak) pri fiziološkoj vrednosti $\text{pH} = 7,4$. Vrednost pKa u vodi iznosi 4,3 (eksperimentalni podatak), a biološko poluvreme jedinjenja je 54,9 h [121].

Geometrijska interpretacija monomerne strukture oksaprozina određena je pomoću B3LYP i HF teoretskih modela koristeći 6-31G(d,p) osnovni set. Optimizovana struktura monomera molekula oksaprozina dobijena B3LYP/6-31G(d,p) modelom prikazana je na slici 9 [122]:



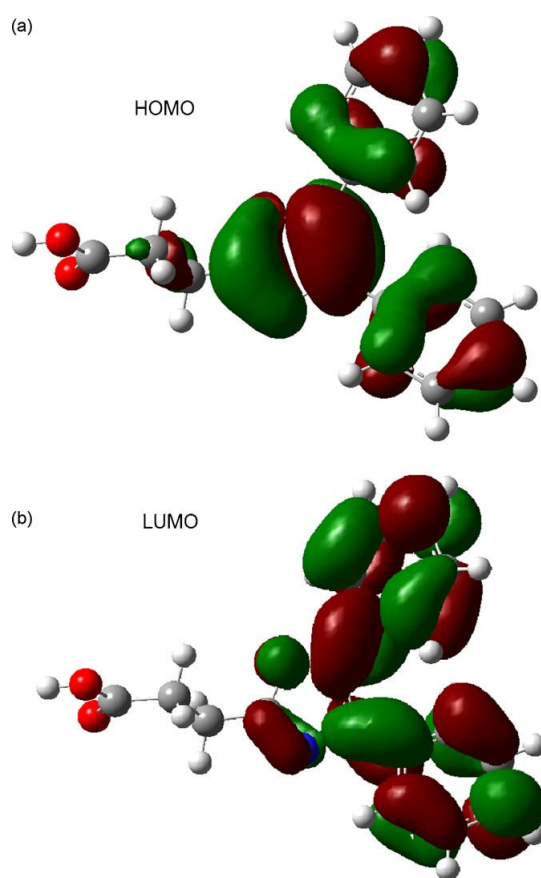
Slika 9. Optimizovana struktura oksaprozina dobijena korišćenjem B3LYP/6-31G(d,p) modela.

Molekularni geometrijski parametri dimera oksaprozina određeni su korišćenjem B3LYP/6-31G(d,p) modela i njegova optimizovana struktura prikazana je na slici 10. Struktura dimera formirana je intermolekulskom vodoničnom vezom između karboksilnih grupa monomera molekula oksaprozina. Izračunata vrednost dužina vodoničnih veza iznosi 0,2721 nm.



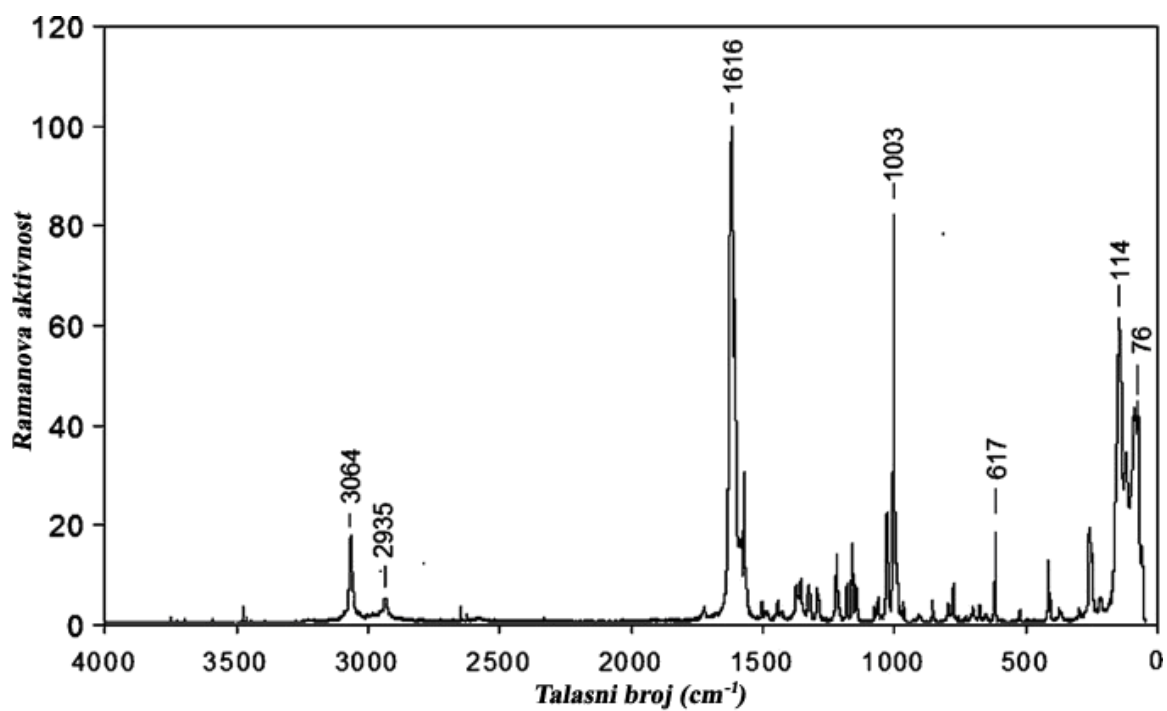
Slika 10. Optimizovana struktura dimera oksaprozina dobijena korišćenjem B3LYP/6-31G(d,p) modela.

Pored geometrijske interpretacije strukture monomera i dimera oksaprozina, predstavljen je 3D prikaz za HOMO i LUMO orbitale ispitivanog molekula koje su dobijene primenom HF/6-31G(d,p) modela (slika 11). Najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) i najniže nepopunjene molekulske orbitale (LUMO) uglavnom su lokalizovane na oksazolovom prstenu i π -vezama fenilnih jezgara molekula oksaprozina.

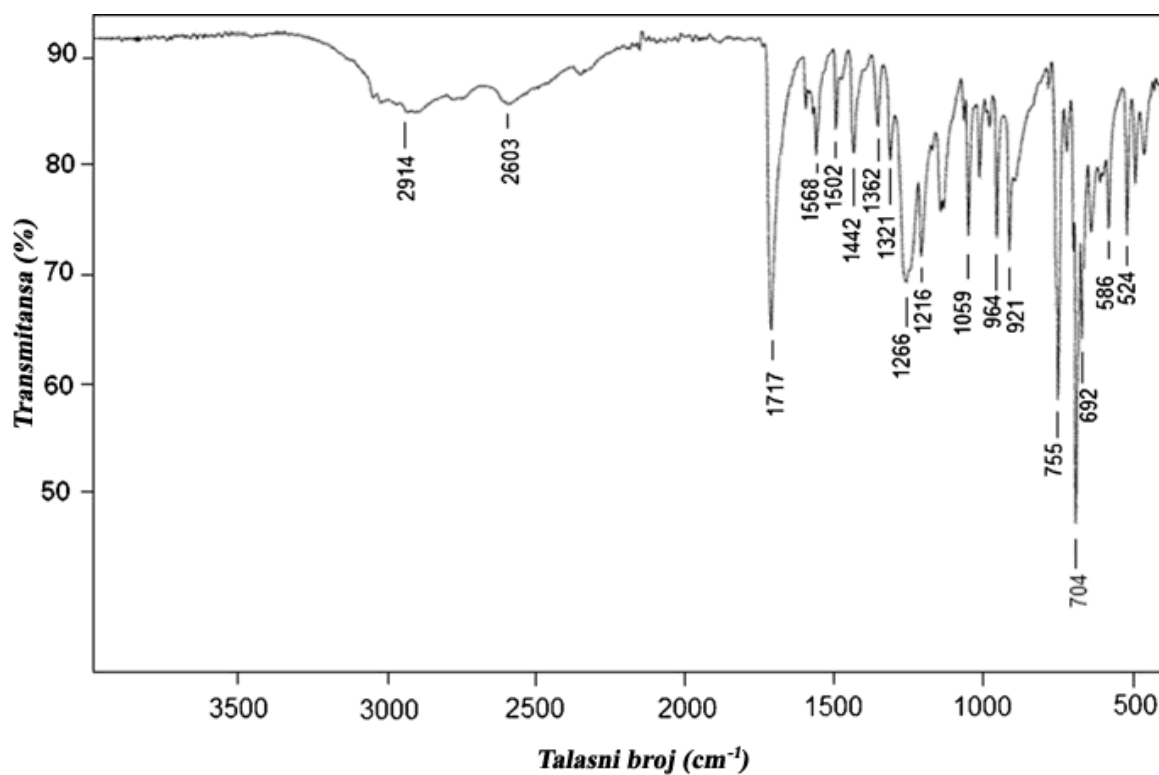


Slika 11. 3D prikaz za HOMO i LUMO molekulske orbitale kod oksaprozina [122].

Osnovne molekulske vibracije oksaprozina potiču od kiselinskog dela koji se sastoje iz C=O, C–O i O–H grupa, vibracija fenilnog prstena i CH₂ grupa. Eksperimentalni Ramanov i infracrveni (IC) spektar prikazani su na slikama 12 i 13.



Slika 12. Ramanski spektar dimera oksaprozina



Slika 13. IC-spektar dimera oksaprozina

Molekuli karboksilnih kiselina najčešće se javljaju kao centrosimetrični dimeri u kristalima sa centrom inverzije u osmočlanom prstenu koji formiraju karboksilne grupe. Najznačajnija razlika između FT-IC spektara monomera i dimera je promena u frekvenciji COOH traka. Kod dimera, frekvencija istezanja O–H grupe pomera se ka nižim talasnim dužinama. Pošto se tipične frekvencije vibracije istezanja slobodne O–H grupe javljaju na oko 3600 cm^{-1} , traka za O–H grupu, koja se javlja na nižim talasnim dužinama od očekivanih ukazuje da se uspostavljaju intermolekulske vodonične veze između molekula kiselina. Usled formiranja dimera javlja se vrlo široka traka ili više njih između $2500\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$.

2.3. Koordinaciona jedinjenja

Aktuelne teme XXI veka u koordinacionoj hemiji polaze od aspekata o mogućnosti korišćenja jedinstvenih osobina prelaznih metala (primena u katalizi, kod optičkih i magnetnih uređaja). U okviru modernog pristupa modelovanju i sintezi lekova, prelazni metali i njihovi kompleksi sa odgovarajućim ligandima nalaze se u središtu interesovanja u medicinskoj hemiji, gde su koordinaciona jedinjenja našla primenu u hemoterapiji, lečenju inflamacija i mnogih drugih oboljenja.

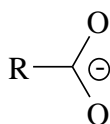
Koordinaciona jedinjenja sastoje se od koordinacionog centra (jona metala) i molekula ili jona liganada koji su vezani za centralni atom koordinativnom vezom. Skup liganada oko metalnog centra čini koordinacionu sferu. Broj liganada koji su direktno vezani za centralni metal zove se koordinacioni broj (KB). On zavisi od prirode centralnog atoma, od njegove elektronske konfiguracije i veličine, ali i od koordinacione sposobnosti liganda. Koordinacioni broj može biti 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8, ali je najčešći 4 i 6. Pri ostvarivanju odgovarajuće koordinacije dolazi do izmene kako osobina centralnog atoma, tako i osobina liganda. Homoleptički kompleksi su oni kod kojih su svi ligandi istog tipa, u suprotnom su heteroleptički. Kompleksi mogu biti katjonski, anjonski ili neutralni u zavisnosti od sume naelektrisanja centralnog jona metala i liganda [123, 124a].

Atom liganda koji je direktno vezan za centralni jon metala zove se donorski atom. Ligandi koji imaju samo jedan donorski atom (NH_3 , H_2O , Cl^- , CN^-) i koji su za graditelja kompleksa vezani pomoću samo jednog elektronskog para zovu se monodentatni ligandi. Postoje i ligandi sa više od jednog donorskog atoma i oni se

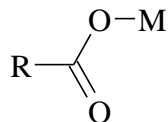
zovu polidentatni ligandi. U zavisnosti od broja donorskih atoma, ligandi mogu biti bidentatni (karboksilatni jon, oksalatni jon, etilendiamin itd), tridentatni (dietiltriamin), tetradentatni (trietiltertaamin), itd. Ovi ligandi se još zovu i helatni ligandi [124a].

Zbog prisustva jedne karboksilne grupe, molekul oksaprozina poseduje dva potencijalna donorska O^- atoma i pri koordinaciji ovog liganda može nastati niz kompleksa različite građe. Pošto se karboksilat-grupa može vezati na više načina, broj mogućnosti za njihovo koordiniranje je veoma veliki. Načini koordinacije COO^- -grupa prikazani su na slici 14.

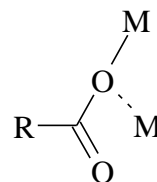
1. Nekoordinirana karboksilat-grupa



2. Monodentatna koordinacija



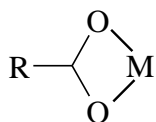
a) jedan akceptor



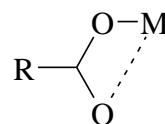
b) dva akceptora
(asimetrično mostovno ponašanje)^a

3. Bidentatna koordinacija

3.1. Helatno ponašanje

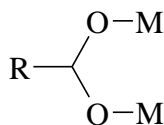


a) simetrično

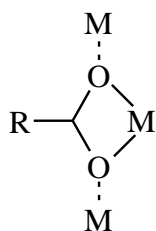


b) asimetrično

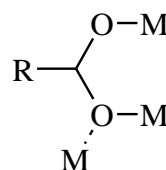
3.2. Mostovno ponašanje
(prikazano je simetrično ponašanje^b)



4. Polidentatna koordinacija



a) mostovno ponašanje



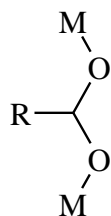
b) kombinovano ponašanje

Slika 14. Mogućnosti koordinacije COO^- -grupa, usklađeno u odnosu na referencu [125a].

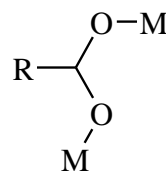
^a Simetrično ili asimetrično vezivanje određuje se na osnovu dužine veze metal–kiseonik (duža veza je prikazana isprekidanom linijom).

^b Kao i kod tipa 3.1. moguće je asimetrično i simetrično ponašanje.

Pored navedenih načina koordinacije COO^- -grupe, u zavisnosti od položaja metala u koordinativnoj vezi postoji i takozvani *sin*- odnosno *anti*-položaji (slika 15.). Ovi položaji određuju se u odnosu na vrednost torzionog ugla M-O-C-O . *Sin-sin* položaj prikazan je na slici 14, primer 3.2.



a) *anti-anti*



b) *anti-sin*

Slika 15. Različiti položaji centralnog atoma M u polikarboksilat-ligandu.

2.3.1. Svojstva koordinacionih jedinjenja

Mnoga svojstva koordinacionih jedinjenja (na primer magnetizam, obojenost) u direktnoj su vezi sa elektronskom konfiguracijom kompleksa. Za objašnjenje i proračun hemijske veze kompleksnih jedinjenja postoje četiri kvantno-mehaničke metode:

- *metoda valentne veze* pretpostavlja da su veze kovalentne i da nastaju po tzv. donorsko-akceptorskom mehanizmu, koji pretpostavlja sposobnost centralnog atoma da primi elektronski par i sposobnost atoma liganda da preda elektronski par;
- *teorija kristalnog polja* zasnovana je na elektrostatičkom modelu. Ovde se razmatraju promene u elektronskom oblaku centralnog atoma, koje nastaju pod uticajem liganda;
- *teorija ligandnog polja* je u osnovi teorija kristalnog polja, ali sa izvesnim dodatkom za kovalentni udeo veza;
- *metoda molekulskih orbitala* objašnjava vezivanje centralnog jona i liganda preklapanjem atomskih orbitala centralnog jona sa atomskim orbitalama liganda.

Magnetna svojstva koordinacionih jedinjenja [124b]

Magnetna svojstva koordinacionih jedinjenja mogu biti od značaja za određivanje tipa simetrije kristala, a na taj način i rasporeda elektrona u d orbitalama. Veličina koja karakteriše magnetne osobine materijala je magnetna susceptibilnost (χ). Uobičajeno je da se supstance dele na dija-, para- i feromagnetike.

Dijamagnetizam se javlja kod materijala koji ne poseduju permanentne magnetne dipole. Kod njih su svi elektroni sparni, te se spinski i orbitalni magnetni momenti poništavaju. Pod uticajem primenjenog magnetnog polja dolazi do indukcije magnetnih dipola. Za dijamagnetne supstance $\chi < 0$.

Paramagnetizam se javlja kod supstanci koje poseduju permanentne magnetne dipole, odnosno paramagnetizam potiče od orijentisanja stalnih orbitalno-spinskih momenata u spoljašnjem magnetnom polju. Za paramagnetike $\chi > 0$.

Kod bi- i polimetalnih kompleksa, u kojem svaki metalni centar pojedinačno poseduje neparan broj elektrona, situacija je nešto drukčija. Ako postoji interakcija (direktna ili preko liganda) između dva (ili više) metalna centra, elektroni se mogu antiferomagnetno ili feromagnetno kuplovati.

Obojenost koordinacionih jedinjenja [124c,126]

Koordinaciona jedinjenja čiji su graditelji d-elementi (prelazni metali), često su obojena. Obojenost kompleksa posledica je selektivne apsorpcije vidljive svetlosti, tj. elektronskih prelaza u sistemu usled apsorpcije svetlosti. Većina elektronskih prelaza koji se javljaju kod obojenih kompleksa su d-d prelazi ili intramolekulski prelazi naelektrisanja (engl. charge transfer, CT). Kod d-d prelaza, elektron je iz d orbitale pod dejstvom svetlosti (fotona) ekscitovan u drugu d orbitalu više energije. Nasuprot tome, kod CT prelaza dolazi do prelaza elektrona iz d orbitale metalna u nepopunjenu orbitalu liganda (engl. Metal to Ligand Charge Transfer, MLCT) ili obrnuto (engl. Ligand to Metal Charge Transfer, LMCT).

2.3.2. Karakteristike elemenata prvog niza prelaznih metala*Mangan* [125b]

Mn se javlja u nekoliko oksidacionih stanja od kojih je dvovalentno stanje (Mn(II)) najčešće i najstabilnije oksidaciono stanje. U tabeli 2 prikazane su moguće geometrije kompleksa za Mn(II).

Tabela 2. Stereohemija dvovalentnog mangana.

Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
Mn ^{II} , d^5	2	Linearna
	4	Tetraedarska
	4	Kvadratno planarna
	5	Trigonalna bipiramidalna (<i>tbp</i>), pseudo <i>tbp</i>
	6 ^a	Oktaedarska
	7	Pentagonalna bipiramidalna (<i>pbp</i>)
	8	Dodekaedarska

^a najčešći KB i geometrija

Visokospinska d^5 konfiguracija svakako ima jedinstvene osobine i Mn(II) je najistaknutiji primer ove konfiguracije. Većina Mn(II) kompleksa su visokospinski. U oktaedarskom polju ova konfiguracija omogućava samo spin-zabranjene i sparno-

-zabranjene prelaze, pa je stoga boja ovih kompleksa bela. Pored toga, kod visokospinskih d^5 Mn(II)-kompleksa javlja se temperaturno nezavisni magnetni moment sa vrednošću oko 5,9 BM.

Kobalt [125c]

Co se javlja u nekoliko oksidacionih stanja, pri čemu su najstabilniji kompleksi gde je centralni atom Co(II) ili Co(III). U tabeli 3 prikazane su moguće geometrije kompleksa za Co(II).

Tabela 3. Stereohemija dvovalentnog kobalta

Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
Co ^{II} , d^7	3	Trigonalna
	4 ^a	Tetraedarska
	4	Kvadratno planarna
	5	<i>tbp</i> , kvadratno piramidalna (<i>kp</i>)
	6 ^a	Oktaedarska
	8	Dodekaedarska

^a najčešći KB i geometrija

Kako Co(II) može da gradi veliki broj različitih kompleksa, spektralna i magnetna svojstva Co(II)-kompleksa biti veoma različita. Kod visokospinskih oktaedarskih Co(II)-kompleksa može se uočiti tipična svetlocrvena ili ljubičasta boja i vrednost efektivnog magnetnog momenta na sobnoj temperaturi u intervalu između 4,7 i 5,2 BM. Niskospinski oktaedarski kompleksi Co(II) su retki i imaju tendenciju da otpuštaju ligande i na taj način formiraju jedinjenja sa nižim KB (4 ili 5).

Nikl [125d]

Kako se i kod Ni javlja trend opadanja stabilnost viših oksidacionih stanja, tako se i Ni(II) javlja kao najzastupljeniji jon kod najvećeg broja jedinjenja. U tabeli 4 prikazane su moguće geometrije kompleksa za Ni(II).

Tabela 4. Stereochemija dvovalentnog nikla.

Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
Ni ^{II} , d^8	3	Trigonalna planarna
	4 ^a	Tetraedarska
	4 ^a	Kvadratno planarna
	5	<i>tbp</i>
	5	<i>kp</i>
	6 ^a	Oktaedarska
	6	Trigonalna prizma

^a najčešći KB i geometrija

Ni formira veliki broj kompleksa sa KB 4 i 6. Kod oktaedarskih Ni(II) kompleksa može se uočiti karakteristična plava ili ljubičasta boja koja potiče od tri spin-dozvoljena elektronska prelaza. Magnetna svojstva kompleksa Ni(II) su relativno jednostavna i efektivni magnetni momenti su u intervalu od 2,9 do 3,4 BM.

Bakar [125e]

Cu se javlja u tri stabilna oksidaciona stanja: Cu(I), Cu(II) i Cu(III) pri čemu geometrija centralnog atoma zavisi od oksidacionog stanja (tabela 5). Cu(0) jedinjenja nisu potvrđena kao stabilna, međutim mogu se naći kao reaktivni intermedijeri.

Zbog relativno niskog stepena simetrije kod jedinjenja gde je Cu(II) centralni jon, često dolazi do komplikacija pri detaljnoj interpretaciji apsorpcionih spektara i magnetnih svojstava kompleksa. Skoro svi Cu(II) kopmleksi su plavi ili zeleni, a magnetni momenti relativno jednostavnih kompleksa su nezavisni od temperature (osim na ekstremno niskim temperaturama, $T < 5$ K) i nalaze se u intervalu od 1,75 do 2,20 BM.

Tabela 5. Stereochemija dvovalentnog bakra.

Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
$\text{Cu}^{\text{II}}, d^9$	3	Trigonalna planarna
	4 ^{a,b}	(Pseudo)tetraedarska
	4 ^{a,b}	Kvadratno planarna
	5	<i>tbp, kp</i>
	6 ^{a,b}	(Pseudo)oktaedarska
	7	Pentagonalna bipiramidalna (<i>pbp</i>)
	8	(Pseudo)dodekaedarska

^a najčešći KB i geometrija^b ova tri stanja se često ne mogu jasno razlikovati**Cink** [125f]

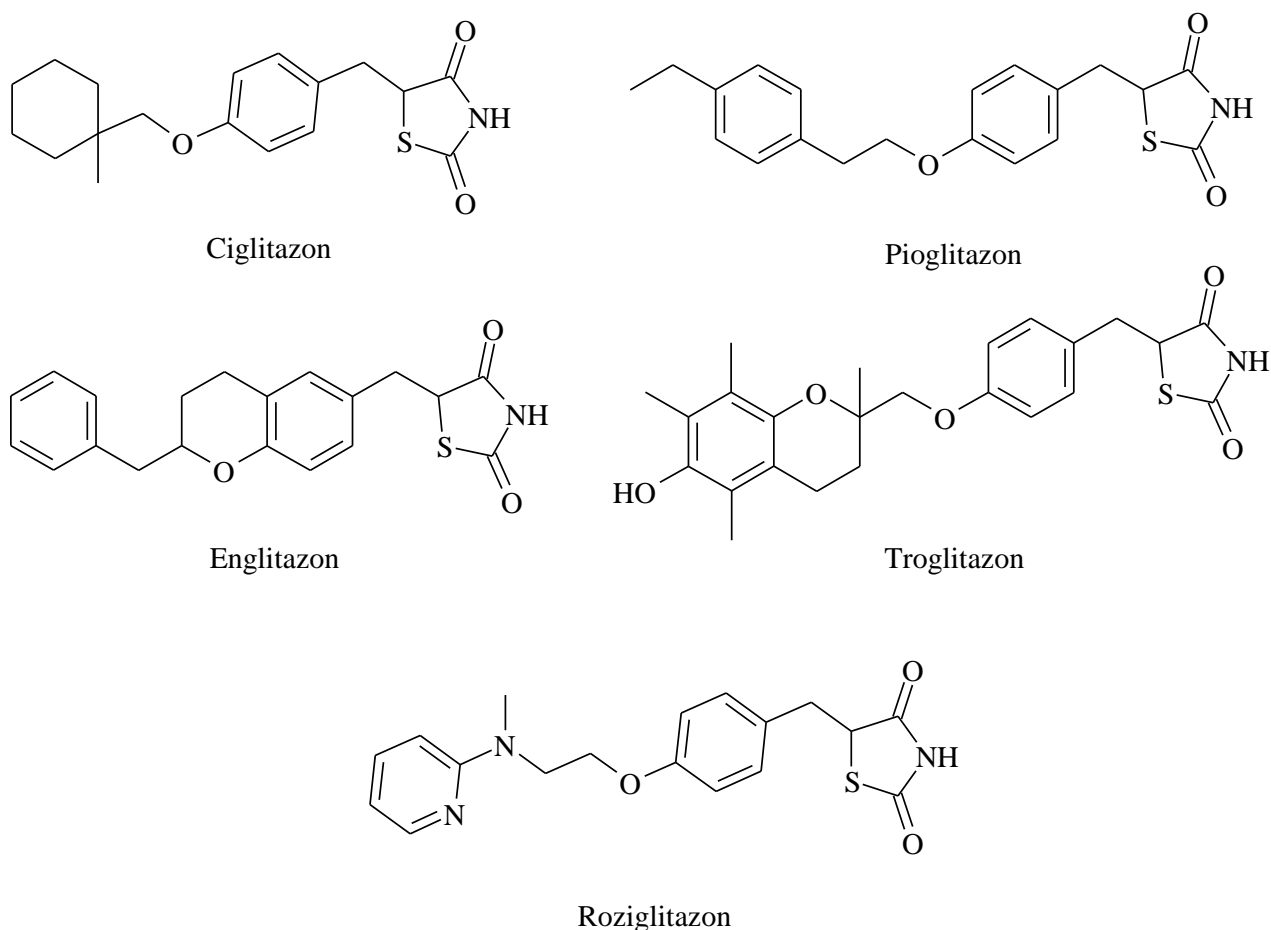
Zn pripada 12. grupi Periodnog sistema elemenata. Iako se nalazi odmah iza bakra, cink se ne može klasifikovati u grupu prelaznih metala, ali i pored toga on formira veliki broj kompleksa. Oksidaciono stanje II je jedino bitno za Zn (tabela 6). Najčešći KB Zn(II)-kompleksa su 4, 5 i 6, pri čemu je 5 posebno zastupljen. Svi Zn(II)-kompleksi su beli i ponašaju se kao dijamagnetici.

Tabela 6. Stereochemija dvovalentnog cinka

Oksidaciono stanje	Koordinacioni broj	Geometrija
$\text{Zn}^{\text{II}}, d^{10}$	2	Linearna
	3	Trigonalna planarna
	4	Tetraedarska, Kvadratno planarna
	5	<i>tbp, kp</i>
	6	Oktaedarska
	7	(pseudo) <i>pbp</i>
	8	(Pseudo)kvadratnaantiprizma, dodekaedarska

2.4. Derivati tiazolidindiona

Tiazolidindioni (TZD) su derivati tiazolidina koji pripadaju važnoj grupi heterocikličnih jedinjenja i koji poseduju karbonilnu grupu u položajima 2 i 4 ili 5. 2,4-Tiazolidindioni su interesantna strukturna jedinica u medicinskoj hemiji. Upravo je TZD jezgro odgovorno za mnogobrojna farmakološka svojstva i biološku aktivnost odgovarajućih agenasa. Osnovna primena derivata TZD (slika 16) je u tretmanu obolelih od dijabetesa tipa II [127]. Međutim, pored svoje osnovne primene u lečenju dijabetesa, nova istraživanja pokazala su i potencijalnu primenu velikog broja derivata TZD kao antiartritis, antiinflamatornih [128], antibakterijskih [129] i antitumorskih [130] agenasa.



Slika 16. Hemijska struktura derivata TZD.

Prvi derivat TZD, ciglitazon, sintetizovan je 1982. godine [131] i njegova biološka svojstva u lečenju dijabetesa otkrivena su nešto kasnije [132]. Ubrzo posle toga su sintetizovana i biološki ispitivana mnoga druga jedinjenja koja sadrže TZD grupu, što je rezultiralo u otkriću novih biološki aktivnih agenasa: pioglitazona, englitazona, troglitazona i rozigitazona. Prvi lek iz ove klase jedinjenja koji je našao komercijalnu primenu bio je troglitazon koji je uveden na tržište u SAD 1997. godine.

Mehanizam delovanja TZD kao antidijabetes lekova nije do kraja razjašnjen, ali se dovodi u vezu sa posedovanjem velikog afinitet vezivanja za PPAR- γ , što izaziva aktivaciju gena koji regulišu metabolizam šećera i masti. Takođe, TZD ispoljavaju povoljan biološki efekat i kroz mehanizme koji su nezavisni od PPAR- γ , tj. aktivacijom određenih članova mitogenom-aktiviranih proteinskih (MAP) kinaza [133].

2.4.1. Sinteza derivata tiazolidindiona

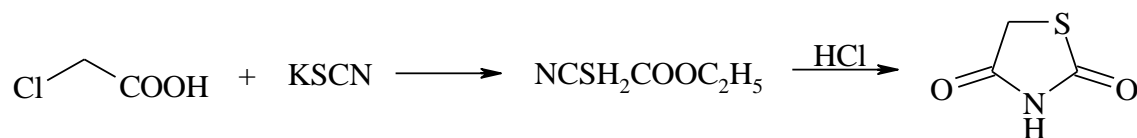
1,3-Tiazolidin-2,4-dioni su derivati tiazolidina sa dve karbonilne grupe u položaju 2 i 4. Supstituenti u položaju 3 i 5 mogu biti veoma različiti, pa je samim tim spektar izvodljivih reakcija veoma širok.

2.4.1.1. Sinteza 2,4-tiazolidindiona

TZD prsten može biti sintetizovan nekom od mnogobrojnih konvencionalnih metoda kao i upotrebom mikrotalasnog zračenja.

Reakcija sa alkalnim tiocijanatima

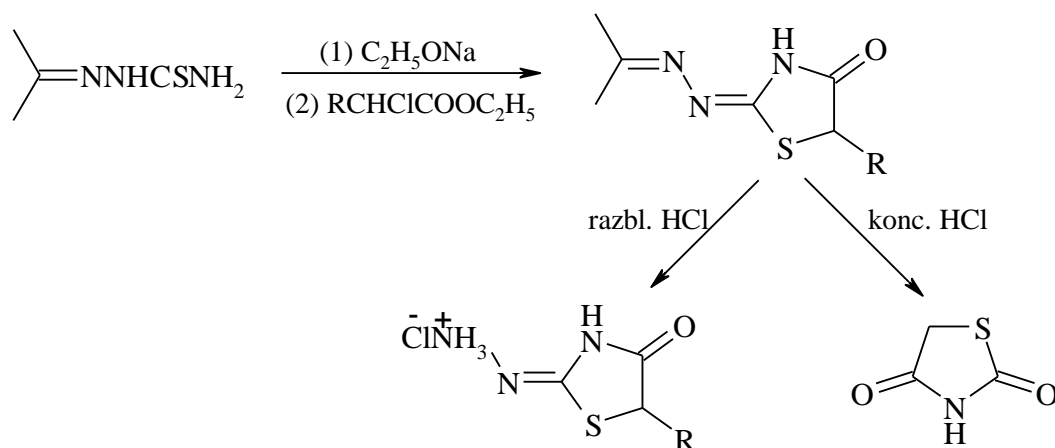
Prvi 4-tiazolidindion koji je sintetizovan bio je 2,4-tiazolidindion. Hajnc (Heintz) je 1865. godine sintetizovao željeni proizvod u reakciji 2-hloretanske kiseline sa kalijum-tiocijanatom u prisustvu razblažene hlorovodonične kiseline (slika 17) [134].



Slika 17. Prva sinteza 2,4-tiazolidindiona.

Reakcija sa tiosemikarbazonima

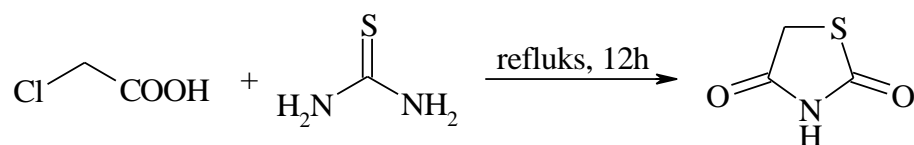
Kada se tiosemikarbazon prevede u natrijumovu so pomoću natrijum-etoksida i reaguje sa estrom 2-hloroetanske kiseline ili višeg homologa, proizvod je ketonski derivat 2-hidrazino-4-tiazolidinona. Ostale mogućnosti za kondenzaciju su zagrevanje alkoholnog rastvora tiosemikarbazona sa 2-hloroetanskom kiselinom i natrijum-acetatom, sa etil-hloroacetatom i N-etilpiperidinom, ili sa hloroacetanilidom u etanolu ili 1-butanolu. Refluks 4-okso-2-tiazolin-2-ilhidrazona 15 minuta sa razblaženom hlorovodoničnom kiselinom daje so 2-hidrazino-4-tiazolidindinona, dok refluktovanje uz duži vremenski period sa koncentrovanom kiselinom daje 2,4-tiazolidindion (slika 18) [135].



Slika 18. Sinteza TZD u reakciji sa tiosemikarbazonima.

Reakcija sa tioureom

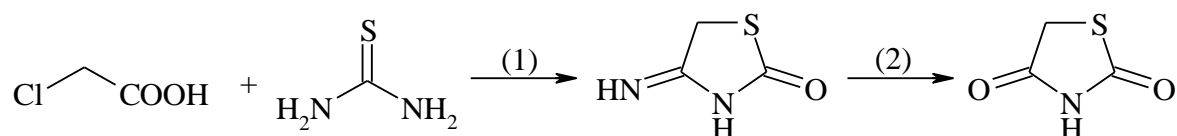
TZD se može sintetisati i reakcijom kondenzacije između 2-hloroetanske kiseline i tiouree u prisustvu vode kao rastvarača uz refluks u trajanju od 12h (slika 19) [136].



Slika 19. Sinteza TZD u reakciji sa tioureom.

Mikrotalasna sinteza

Mikrotalasna sinteza TZD prstena odigrava se u dva stupnja. U prvom stupnju reakcije, 2-hloretanska kiselina i tiourea mešaju se na sniženoj temperaturi kako bi se kao intermedijer dobio 2-imino-tiazolidin-4-on, koji se zatim u drugom stupnju izlaže mikrotalasnom zračenju (250 W, 5 minuta) i nakon toga dobio željeni prooizvod (slika 20) [137.].



Slika 20. Mikrotalasna sinteza TZD prstena: (1) 0–5 °C, voda, mešanje 15 minuta; (2) mikrotalasno zračenje – 250 W, 5 minuta.

2.4.1.2. Reakcije 2,4-tiazolidindiona [135]

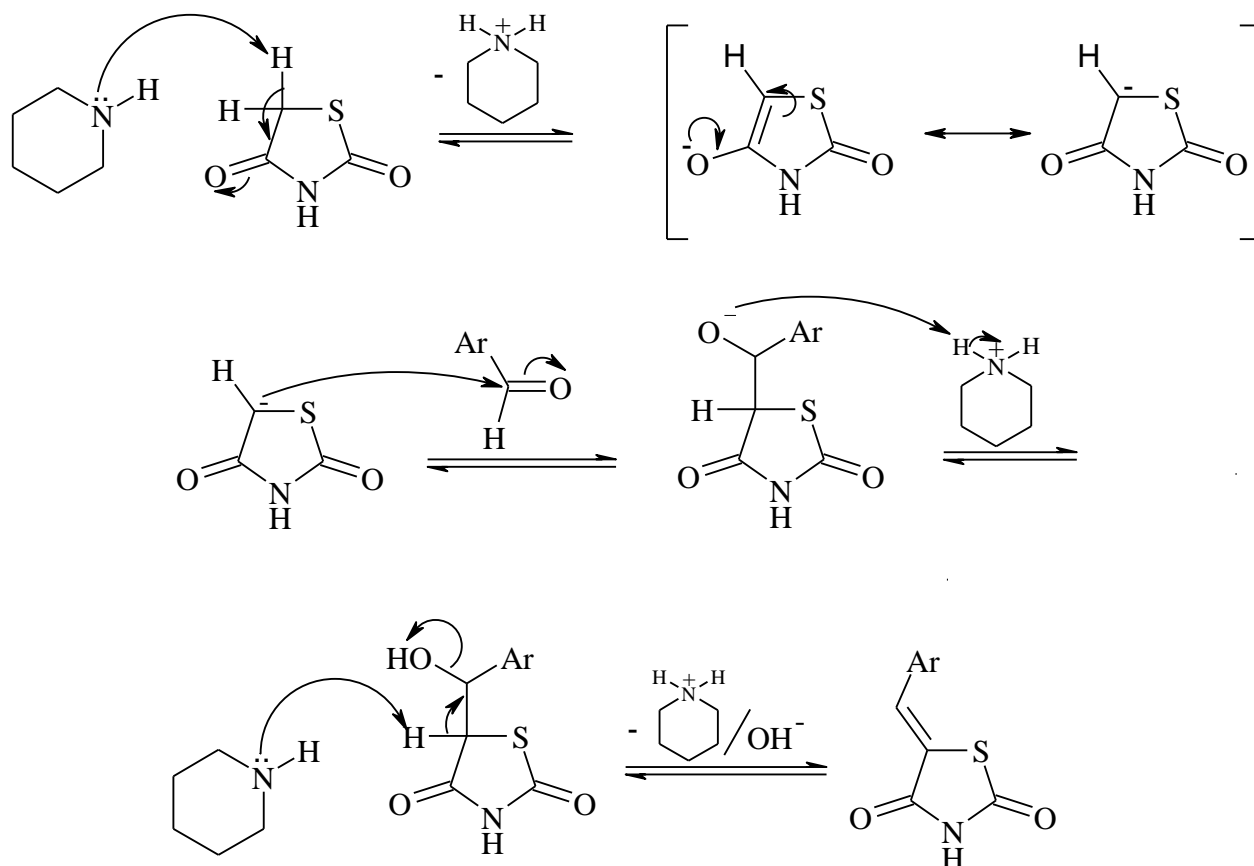
2,4-Tiazolidindioni podležu reakcijama koje su uslovljene nukleofilnom aktivnošću metilenskog ugljenikovog atoma u položaju 5 i kiselim protonom u položaju 3. Kako je broj mogućih reakcija veliki, biće opisane samo reakcije od značaja za ovu disertaciju.

Metilenski ugljenik u položaju 5 jedinjenja 2,4-tiazolidindiona poseduje nukleofilnu aktivnost i sposobnost da napadne neki elektrofilni centar. Ako je strukturno moguće, reakcioni proizvod gubi vodu, pri čemu nastaje 5-nezasićeni derivat 2,4-tiazolidindiona. Reakcija nekoleofilne adicije (kondenzacija) odigrava se prema Knoevenagelovom (Knoevenagel) mehanizmu, najčešće u prisustvu baze kao katalizatora, pri čemu nastaje anjon 2,4-tiazolidindiona kao aktivna čestica.

Lakoća formiranja anjona, a samim tim i stepena nukleofilne aktivnosti metilenskog ugljenika, zavisi ne samo od elektron-akceptorske sposobnosti susedne karbonilne grupe i sumpora, već i od prirode baze koja se koristi kao katalizator.

Reakcija koju treba istaći i koja privlači veliku pažnju jeste aldolna kondenzacija metilenske grupe sa karbonilnom grupom aldehida ili ketona. Proizvod reakcije sadrži α,β -nezasićenu karbonilnu grupu koja utiče na niz posebnih svojstava ovih molekula.

Aromatični aldehidi reaguju sa TZD i kao proizvod kondenzacije nastaje odgovarajući 5-ariliden-2,4-tiazolidindion. Mehanizam Knoevenagelove kondenzacije prikazan je na shemi 4.

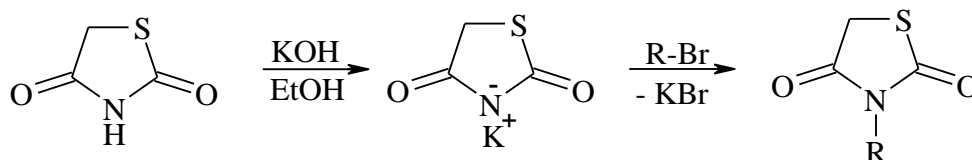


Shema 4. Mehanizam Knoevenagelove kondenzacije između TZD i odgovarajućeg aldehida.

Postojanje imidnog protona u položaju 3 na atomu azota u TZD prstenu definiše kiselina i bazna svojstva TZD. 2,4-Tiazolidindion je slaba kiselina sa konstantom kiselosti $1,46 \cdot 10^{-7}$ na $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ i $1,81 \cdot 10^{-7}$ na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ako se 2,4-tiazolidindion ili 5-supstituisani derivat TZD pretvori u so i reaguje sa odgovarajućim alkil- ili aril-halogenidima, dolazi do formiranja N-alkilovanih derivata TZD-a prema mehanizmu bimolekulske nukleofilne supstitucije ($\text{S}_{\text{N}}2$). Za dobijanje odgovarajućih soli TZD korišćeni su metalni natrijum rastvoren u metanolu, kalijum-hidroksid rastvoren u etanolu, vodeni rastvor natrijum-hidroksida, kalijum-

karbonat rastvoren u suvom acetonu ili alkalni rastvor srebro-nitrata. Alkil-halogenidi mogu se dodavati direktno alkoholnom rastvoru, ali se bolji prinosi dobijaju ako se so TZD izoluje, a zatim suspenduje u dimetilformamidu i naknadno tretira odgovarajućim alkil-halogenidom (slika 21).



Slika 21. Sinteza N-alkilovanih derivata TZD-a.

2.5. Elektrohemijske metode u ispitivanju farmaceutskih preparata

Osnovu elektrohemije čine hemijske reakcije u kojima je aktivan učesnik elektron kao osnovna čestica elektriciteta i električne struje. Interakcija između elektrona i molekula ili jona izaziva redukciju ukoliko supstanca prima elektron ili oksidaciju ukoliko ga odaje. Elektroдна reakcija se uvek odigrava na graničnoj površini elektroda-elektrolit [138a].

Osnovni element elektrohemijskog sistema je elektrohemijska ćelija koja sadrži najmanje dve elektrode i rastvor elektrolita. Na jednoj elektrodi, katodi, odigrava se elektroredukcija, a na drugoj, anodi elektrooksidacija. Rastvor elektrolita služi kao nosilac supstance koja reaguje, ali i kao prenosilac električne energije u delu električnog kola koje čini ćelija [138a].

Po opšteprihvaćenoj podeli, elektroanalitičke metode se uopšteno dele na faradejske i nefaradejske. Kod faradejskih metoda dolazi do direktne razmene elektrona između elektroaktivne vrste i radne elektrode. Zbog toga kod ovih metoda se govori o radnim elektrodama, a naziv faradejske potiče od toga što kroz elektrolitičku ćeliju protiče struja (faradejska struja) određenog intenziteta. Kod nefaradejskih metoda prema pravilu nema direktne razmene elektrona između elektroaktivne vrste i indikatorske elektrode.

2.5.1. Voltometrija

Voltometrija je faradejska elektroanalitička metoda koji se zasniva na merenju zavisnosti struja-potencijal u elektrohemijским ćelijama. Ona obuhvata sve metode gde se koriste stacionarne ili fiksne radne elektrode kao što su npr. viseća živina elektroda (engl. hanging mercury drop electrode, HMDE), elektroda presvučena tankim filmom žive (engl. thin mercury film electrode, TMFE), elektroda od staklastog ugljenika (engl. glassy carbon electrode, GCE), elektroda od ugljenične paste (engl. carbon paste electrode, CPE), elektroda od zlata, elektroda od platine, elektroda od srebra itd [139].

Voltometrija obuhvata skup elektroanalitičkih metoda kod kojih se podaci o analitu dobijaju iz merenja jačine struje u zavisnosti od priključenog napona pri uslovima koji izazivaju polarizaciju stacionarne elektrode ili fiksirane radne elektrode [140].

U voltometriji se promenljivi potencijal koji se naziva ekscitacijski signal dovodi na elektrohemijšku ćeliju koja sadrži radnu elektrodu. Ekscitacijski signal stvara odgovor struje (faradejske) koja protiče kroz ćeliju u toku reakcije analita na radnoj elektrodi [140]. Detaljnije posmatranje struja koje teku kroz radnu elektrodu pokazuje da se one sastoje od dve komponente, faradejske struje, koja potiče od redukcije ili oksidacije analita i nefaradejske (kapacitivne ili kondenzatorske struje) koja nastaje usled pražnjenja elektrohemijškog dvostrukog sloja na površini radne elektrode [140].

Kapacitivna ili kondenzatorska struja nastaje zbog toga što se radna elektroda ponaša kao kondenzator. Jednu ploču tog kondenzatora čini naelektrisanje na površini radne elektrode, a drugu suprotno naelektrisani joni ili dipoli rastvarača neposredno uz samu elektrodu. Ovo predstavlja električni ili elektrohemijški dvojni sloj [138a].

Sredinom 60-ih godina prošlog veka došlo je do modifikacije klasične voltometrije koja je postala znatno osetljivija i selektivnija. Tada je primena voltometrije postala mnogo značajnija za određivanje velikog broja jedinjenja naročito u farmaciji. Postoji mnogo načina da se elektrodi zada određeni potencijal i u zavisnosti od toga postoje različite vrste voltometrije [140]:

- Voltometrija sa linearnom promenom potencijala;
- Cilkična voltometrija;
- Voltometrija sa taloženjem i rastvaranjem (engl. stripping voltammetry);
- Diferencijalna pulsna voltometrija i normalna pulsna voltometrija;

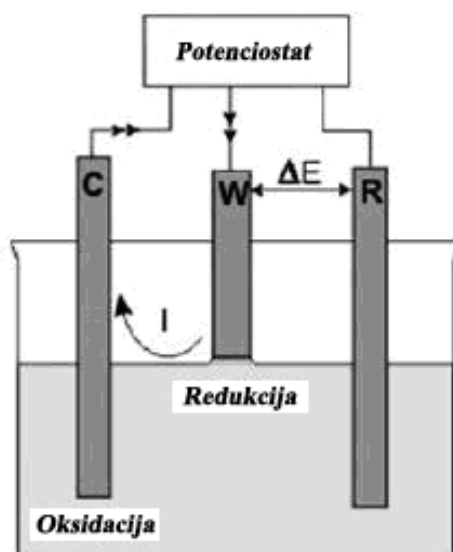
- Voltometrija sa pravougaonim impulsima (engl. square wave).

Voltometrijski sistem sastoji se od tri elektrode uronjene u rastvor analita i viška elektrolita koji ne reaguje (osnovni elektrolit). Jedna od tri elektrode je radna elektroda čiji se potencijal održava na određenoj poznatoj vrednosti ili se kao u voltimetriji sa linearnom promenom potencijala menja sa vremenom [140]:

Radna elektroda je elektroda na kojoj se ispituje željena pojava [138a]. Elektroda je male površine čime se povećava njena sklonost ka polarizaciji. Često je napravljena od inertnih metala kao što su plemeniti metali (zlato, platina) ili staklasti ugljenik i pirolitički grafit [140].

Druga elektroda je *referentna elektroda* čiji potencijal je poznat i stabilan [140]. Referentna elektroda se u ćeliju uvodi preko *Luginove kapilare*. Vrh elektrode treba da se postavi na što je moguće kraće rastojanje od radne elektrode kako bi otpornost elektrolita između elektrode i vrha kapilare mogla da se svede na zanemarljivu vrednost, s obzirom na to da kada teče struja javlja se pad potencijala na tom rastojanju koji se sabira sa potencijalom elektrode, te mereni potencijal ne odgovara vrednosti elektrodnog potencijala koji se želi meriti ili nametnuti elektrodi. Referentna elektroda treba da se odvoji od rastvora koji se nalazi u ćeliju pomoću elektrolitičkog mosta, da elektrolit iz ćelije ne bi prodirao u elektrolit referentne elektrode i obrnuto [138a].

Treća elektroda je *kontra elektroda* (pomoćna elektroda) koja je često žica od platine ili zlata koja omogućava tok struje od izvora kroz rastvor do radne elektrode [138a]. Kontra elektroda se stavlja na veću ili manju udaljenost od radne elektrode. Na slici 22 prikazan je jedan voltometrijski sistem.



Slika 22. Prikaz voltametrijskog sistema (C-kontra elektroda; W-radna elektroda; R-referentna elektroda).

Kao što je navedeno, voltametrijske metode se zasnivaju na promeni potencijala stacionarne radne elektrode sa vremenom i merenja odgovarajuće struje koja se javlja kao posledica oksido-redukcionih procesa, a ispitivana vrsta na elektrodu dospeva procesom difuzije.

U toku preliminarnih istraživanja elektrohemijaskog ponašanja ispitivanog sistema, voltametrijske tehnike su upravo one koje se koriste jer dobijeni voltagram predstavlja skup informacija koji pokazuje potencijale na kojima se dešavaju oksidacioni ili redukcionni procesi, učešće homogenih reakcija u ukupnom elektrohemijaskom procesu, adsorpciju elektroaktivnih vrsta i slične informacije o ponašanju ispitivanog sistema [138a].

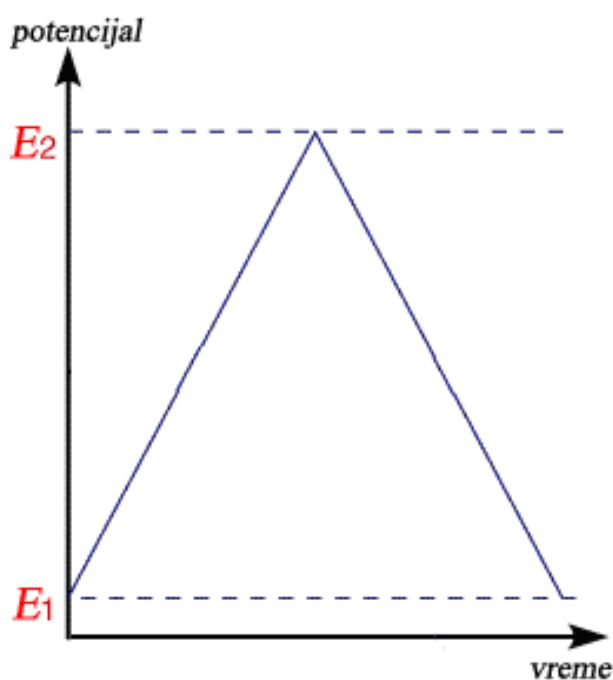
2.5.1.1. Ciklična voltametrija

Ciklična voltametrija predstavlja metodu koja se široko koristi za sagledavanje elektrohemijaskog sistema u celini, svih procesa koji se u njemu odigravaju u širokom opsegu potencijala, potencijala pri kojem se odigrava svaki pojedinačni proces kao i struja, kao odraz brzine tih procesa u datim uslovima. To se postiže jednostrukim korišćenjem ili višestrukim ponavljanjem trougaonog pulsa potencijala, tako što se

potencijal menja linearno u opsegu potrebnom da se sagledaju svi procesi, a ograničenom u vodenim rastvorima, izdvajanjem vodonika na nekom negativnom ili kiseonika na nekom pozitivnom potencijalu.

Kada se dostigne potencijal na kome određeni proces može da se odigrava primetnom brzinom, struja počinje naglo (eksponencijalno) da raste. Sa nastupanjem difuzione polarizacije dolazi do usporavanja tog procesa, da bi se dostigao maksimum posle koga struja za taj proces opada na nulu, ali registrovana struja zadržava neku minimalnu vrednost (određenu kapacitetom elektrohemijškog dvosloja koji se puni usled stalne promene potencijala) ukoliko se nije dostigao potencijal započinjanja sledećeg procesa [138b].

Snimanje cikličnih voltagrama se sastoji od reverzne promene potencijala od vrednosti E_1 do vrednosti E_2 pa ponovo do vrednosti E_1 odgovarajućom brzinom skeniranja (slika 23).



Slika 23. Promena potencijala sa vremenom kod ciklične voltametrije

Za proces oksidacije obično se polazi od elektrodnog potencijala na kome nema oksidacije i u toku snimanja elektrodni potencijal se menja ka pozitivnijim vrednostima. Obrnuto, za proces redukcije polazi se od elektrodnog potencijala na kome nema redukcije i elektrodni potencijal se menja ka negativnijim vrednostima.

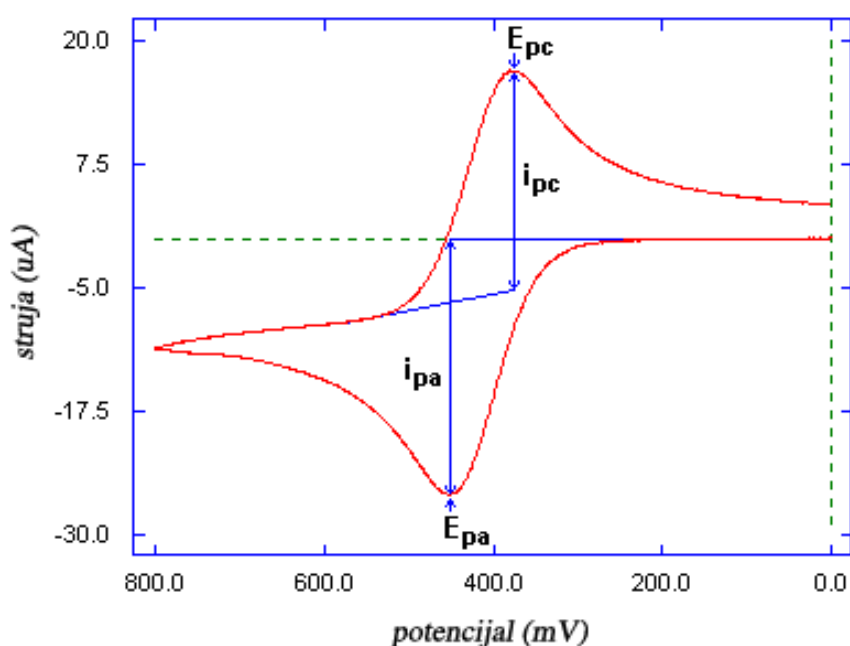
Elektrodni potencijal u određenom trenutku ima vrednost:

$$E(t) = E_i + vt \quad (1)$$

Nakon postizanja konačne vrednosti elektrodnog potencijala koja se za primer oksidacije postavlja obično na vrednost nešto manju od potencijala oksidacije rastvarača ili osnovnog elektrolita, elektrodnog potencijal se vraća na početnu vrednost, a elektrodnog potencijal u određenom trenutku ima vrednost:

$$E(t) = E_i - vt \quad (2)$$

Prilikom povratka potencijala redukuje se deo vrste koja je oksidovana u direktnom snimanju. Brzina promene potencijala v , brzina polarizacije ili brzina skeniranja kreće se u intervalu od nekoliko mV/s do nekoliko miliona V/s. Tipičan ciklični voltogram za reverzibilni proces dat je na slici 24.



Slika 24. Izgled cikličnog voltograma reverzibilnog procesa

Uobičajeno je da reduktivnom procesu odgovara negativna struja, a oksidacionom pozitivna.

Svaki proces karakterišu potencijal vrha maksimuma struje i strujni vrh na voltogramu. Za ciklične voltograme tj. za mnoge reakcije koje se ispituju cikličnom

voltametrijom karakteristična je veća ili manja naspramnost pikova. U tome se razlikuju povratni (reverzibilni) i nepovratni (ireverzibilni) procesi [138b].

Povratnim (Nernstovskim) procesom smatra se proces koji ima dovoljnu vrednost konstante brzine da se za korišćenu brzinu promene potencijala (*eng.* sweep rate) na svakom postignutom potencijalu uspostavi ravnoteža između reaktanta i produkta u prielektrodnom sloju čija je koncentracija određena isključivo difuzijom. U takvom slučaju moglo bi se izvesti da je rastojanje između anodnog i katodnog vrha određeno isključivo brojem elektrona razmenjenih u svakom pojedinačnom događaju elektrohemijske reakcije [138b].

Ako se razmotri jednostavna reverzibilna reakcija redukcije oksidovane vrste A u redukovanu vrstu B, koja se može predstaviti jednačinom:



može se izvesti *Randles-Ševićova* jednačina:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 A n^{3/2} D^{1/2} \nu^{1/2} C_0 \quad (4)$$

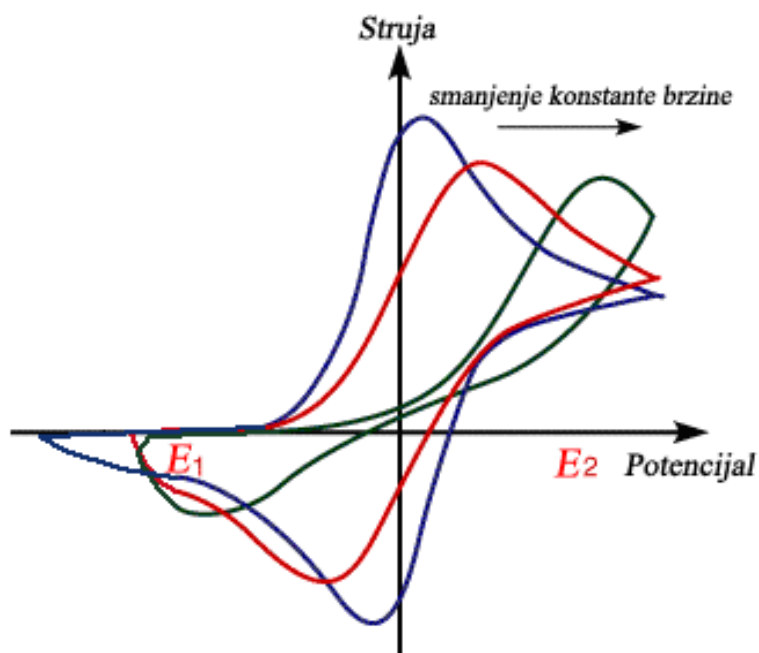
gde je i_p - struja pika izražena u amperima, A - površina elektrode izražena u cm^2 , n - broj izmenjenih elektrona, D - difuzioni koeficijent izraženu jedinici cm^2s^{-1} , ν - brzina promene potencijala izražena u Vs^{-1} i C_0 - koncentracija oksidovanog oblika izražena u mol cm^{-3} .

Iz *Randles-Ševićove* jednačine proizilazi da struja pika zavisi od:

- koncentracije elektroaktivne vrste
- difuzionog koeficijenta
- broja izmenjenih elektrona
- veličine površine elektrode, i
- brzine promene potencijala.

Kada je brzina prenosa elektrona nedovoljna da omogući površinsku ravnotežu i oblik cikličnih voltograma se menja i zavisi od brzine polarizacije. Pri nižim vrednostima brzine polarizacije prenos elektrona je brži od masenog transporta elektroaktivne vrste što se manifestuje dobijanjem cikličnog voltograma kao za reverzibilni proces. Međutim, sa porastom brzine polarizacije raste i brzina masenog

transpotra tako da ove dve veličine postaju uporedive i dolazi do remećenja ravnoteže na površini elektrode. Najvidljiviji efekat ovakvog ireverzibilnog ponašanja je povećanje razlike potencijala katodnog i anodnog pika sa povećanjem brzine polarizacije (slika 25) [138b, 141].



Slika 25. Ciklični voltagrami pri različitim konstantama brzine (reverzibilni proces-plava; kvazireverzibilni proces-crvena; ireverzibilni proces-zelena).

Moguće je da se isti elektrodni proces pri nižim brzinama promene potencijala ponaša kao reverzibilni, a da pri većim brzinama postaje ireverzibilan. Između ta dva slučaja postoji oblast u kojoj se elektrohemijski proces odvija kao *kvazireverzibilan*. Kvazireverzibilni proces se javlja kada postoji ograničenje u brzini prenosa naelektrisanja. Najsigurnija identifikacija ireverzibilnog procesa je odsustvo reverzibilnog pika na cikličnom voltagramu.

Ciklična voltometrija je jedna od metoda za izučavanje mehanizama elektrodnih reakcija, homogenih reakcija, elektrokatalize i adsorpciono-desorpcionih procesa. Takođe, ciklična voltometrija može da se koristi za određivanje nekih supstanci *in vivo*. Tipičan primer je primenjena elektroda od ugljenične paste za ispitivanje askorbinske kiseline u mozgu pacova [142]. Pored toga, postoje i brojna istraživanja u kojima je

korišćena ciklična voltometrija za određivanje konstante vezivanja raznih lekova za proteine [143,144], kao i za DNK [145,146].

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ovog rada sastoji se iz tri tematske celine:

- Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost serije novih Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) i Zn(II) kompleksa sa oksaprozinom, nesteroidnim antiinflamatornim lekom;
- Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost serije novih 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanskih kiselina i odgovarajućih metil estara;
- Elektrohemijsko ispitivanje oksaprozina i određivanje konstante vezivanja za bovin serum albumin (BSA).

3.1. Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost kompleksa prelaznih metala sa oksaprozinom

Za sintezu jedinjenja korišćene su sledeće hemikalije: benzoin, $C_{14}H_{12}O_2$, p. a. (*Fluka*); ćilibarna kiselina, $C_4H_6O_4$, p. a. (*Fluka, Switzerland*); amonijum-acetat, CH_3COONH_4 , p. a. (*Fluka, Switzerland*); mangan(II)-nitrat-heksahidrat, $Mn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, p. a. (*Carlo Erba, Italy*); kobalt(II)-nitrat-heksahidrat, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, p. a. (*Merck, Germany*); nikal(II)-nitrat-heksahidrat, $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, p. a. (*Merck, Germany*); bakar(II)-nitrat-trihidrat, $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, p. a. (*Fluka, Switzerland*); zink(II)-nitrat-heksahidrat, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, p. a. (*Kemika, Croatia*); natrijum-karbonat, Na_2CO_3 , p. a. (*Fluka, Switzerland*); natrijum-hidroksid, NaOH, p. a. (*Fluka, Switzerland*).

Svi reagensi upotrebljavani su bez dopunskog prečišćavanja.

Osim navedenih hemikalija u čvrstom stanju, korišćeni su i različiti organski rastvarači: metanol, etanol, dietil etar, dimetilsulfoksid (DMSO), glacijalna sirćetna kiselina i svi su bili p. a. čistoće.

Osnovni vodeni rastvori Mn(II)-, Co(II)-, Ni(II)-, Cu(II)- i Zn(II)-nitrata pripremani su u koncentracijama 1 M. Potrebna zapremina osnovnog rastvora razblaživana je pre svake sinteze do željene koncentracije.

3.1.1. Sinteza oksaprozina

Oksaprozin (Hoxa) je sintetizovan prema postupku iz literature [116] (shema 2).

I faza

Reakciona smeša benzoina (21,2 g) i anhidrida ćilibarne kiseline (10,0 g) zagrevana je 6 h na temperaturi od 120 °C. Posle hlađenja do sobne temperature proizvod je rastvaran u etru, a zatim ekstrahovan rastvorom natrijum-karbonata. Osnovni sloj je ispiran još jednom etrom, a zatim zakišljen koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom. Dobijeni proizvod u formi ulja ekstrahuje se etrom, potom ispere vodom i suši preko noći sa magnezijum-sulfatom. Uparavanjem rastvarača dobija se željeni hemisukcinat kao polazni reagens za sledeću fazu.

II faza

U 100 mL glacijalne sirćetne kiseline rastvoreno je 15 g hemisukcinata i amonijum-acetata. Reakciona smeša je zagrevana uz refluks 1,5 h. Posle hlađenja do sobne temperature, rastvor je izlivan u višestruko veću zapreminu vode. Formirani talog se izdvaja ceđenjem na vakuumu, ispira vodom i rekristališe iz metanola.

3.1.2. Sinteza kompleksa prelaznih metala

Svi kompleksi prelaznih metala sa Hoxa sintetizovani su na sledeći način: u 50 mL vode rastvori se 2,0 mmol NaOH i potom doda ekvimolarna količina Hoxa. Rastvor se kontinualno meša 2 h na temperaturi od 40 °C, sve dok se ne formira bistar rastvor natrijumove soli Hoxa (Naoxa). Zatim se u 9 mL (0,1 M) vodenog rastvora $M(\text{NO}_3)_2$ (9 mmol), $M = \text{Mn(II)}, \text{Co(II)}, \text{Ni(II)}, \text{Cu(II)}$ i Zn(II) , lagano ukapava rastvor Naoxa uz energično mešanje 1 h. Dobijeni proizvod se ostavi da prenoći na sobnoj temperaturi. Formirani talog se izdvaja ceđenjem na vakuumu, ispira vodom i apsolutnim etanolom, a potom suši vakuumom na sobnoj temperaturi.

Takođe, sintetizovan je monokristal kompleksa Cu sa Hoxa. Odgovarajući monokristal dobijen je metodom spore difuzije iz razblaženog vodenog i DMSO rastvora. U epruveti malog poprečnog preseka nalazio se razblaženi DMSO rastvor ($c \approx 0,01 \text{ M}$) koji sadrži $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. U ovaj rastvor je zatim pažljivo i sporo, zbog

minimalnog mešanja, dodavan pipetom razblaženi vodeni rastvor Naoxa. Prvi kristali pojavili su se nakon sedam dana, monokristali odgovarajuće veličine nastali su na dodirnoj površini rastvora (blizu prvobitne granice faza) posle približno 5 nedelja. Monokristali su profiltrirani i isprani malom količinom vode. Stabilni su na vazduhu i nerastvorni u uobičajenim organskim rastvaračima.

3.1.3. Karakterizacija

Lek i kompleksi okarakterisani su elementarnom i TG analizom, FT-IC, ^1H NMR, ^{13}C NMR, UV-Vis spektroskopijom i merenjem magnetne susceptibilnosti.

C, H, N-analize svih jedinjenja rađene su klasičnim mikroanalitičkim metodama na Elemental Vario EL III mikroanalizeru.

Termijske analize (TG i DSC) rađene su na instrumentu SDT Q600 TGA/DSC od sobne temperature do 1000 °C. Uzorci mase manje od 10 mg zagrevani su u atmosferi azota, pri protoku gasa od 100 cm³ min⁻¹ i brzini grejanja 20 °C min⁻¹.

Infracrveni spektri jedinjenja snimani su na instrumentu Bomem MB 100 spektrofotometru u oblasti 4000–400 cm⁻¹ korišćenjem KBr tehnike.

NMR spektri sintetisanih jedinjenja su snimljeni na aparatu Bruker AC 250 uz tetrametilsilan (TMS) kao interni standard na 200 MHz za ^1H NMR i 50 MHz za ^{13}C NMR. Svi spektri su snimljeni na sobnoj temperaturi u DMSO-*d*₆. Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm u odnosu na TMS ($\delta_{\text{H}} = 0$ ppm) u ^1H NMR spektrima, odnosno rezidualni signal rastvarača ($\delta_{\text{C}} = 39,5$ ppm) u ^{13}C NMR spektrima.

Apsorpcioni spektri su snimljeni na spektrofotometru Shimadzu 1700 u DMSO spektroskopske čistoće (Fluka).

Magnetni momenti, tj. magnetna susceptibilnost sintetizovanih kompleksa određena je na sobnoj temperaturi na magnetnoj vagi MSB-MK1, Sherwood Scientific Ltd., Cambridge, England. Magnetni momenti korigovani su za vrednosti dijamagnetnih susceptibilnosti.

Oxaprozin (Hoxa): bela supstanca, prinos 72 %, t.t.:162–163 °C; Izračunato za $C_{18}H_{15}NO_3$ (%): C, 73,71; H, 5,15; N, 4,78. Nađeno (%): C, 73,70; H, 5,36; N, 4,90. 1H -NMR (DMSO-*d*₆): 12,36 (s, 1H, O–H), 7,30–7,59 (m, 10H, 2Ph-H), 3,06 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz, $CH_2CH_2CO_2H$), 2,79 (t, 2H, $J = 7$ Hz, $CH_2CH_2CO_2H$); ^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆): 173,5 (C1), 162,7 (C4), 144,9 (C5), 134,6 (C12), 132,3 (C13), 129,2 (C15, C17), 129,1 (C6), 128,9 (C8, C10), 128,7 (C16), 128,4 (C10), 127,7 (C14, C18), 126,6 (C7, C11), 30,5 (C2), 23,2 (C3). Odabrani FT-IC podaci (KBr) cm^{-1} : 3034 [$\nu(CH)$], 2930 [$\nu(CH)$], 2611 [$\nu(CH_2)$], 1720 [$\nu(C=O)$], 1568 [$\nu(CC)$], 1502 [$\nu(CC)$], 1443 [$\delta(CO)$, $\delta(CH_2)$], 1362 [$\omega(CH)$, $\nu(CC)$], 1275 [$\omega(CH_2)$, $\delta(COH)$], 1060 [$\delta(CCC)$, $\omega(CH)$], 965 [$\tau(HCCH)$], 922 [$\gamma(OHO)$], 757 [$\delta(CH_2)$, $\gamma(COC)$], 586 [$\tau(CCOH)$, $\gamma(O=COH)$], 524 [$\gamma(CC)$].

$[Mn(H_2O)_2(oxa)_2] \cdot 2H_2O$ (**K1**): bela supstanca, prinos 62 %. Izračunato za $C_{36}H_{36}MnN_2O_{10}$ (%): C, 60,76; H, 5,10; N, 3,94. Nađeno (%): C, 60,53; H, 5,10; N, 3,97. Odabrani FT-IC podaci (KBr) cm^{-1} : 3294 [$\nu(OH)$], 3058 [$\nu(CH)$], 2943 [$\nu(CH)$], 1566 [$\nu_{as}(COO)$], 1549 [$\nu_{as}(COO)$], 1447 [$\nu_s(COO)$], 1431 [$\nu_s(COO)$], 760 [$\delta(CH_2)$, $\gamma(COC)$], 696 [$\delta(CH)$, $\gamma(CH)$], 443 [$\nu(MnO)$].

$[Co(H_2O)_2(oxa)_2] \cdot 2H_2O$ (**K2**): roze supstanca, prinos 57 %. Izračunato za $C_{36}H_{36}CoN_2O_{10}$ (%): C, 60,42; H, 5,07; N, 3,92. Nađeno (%): C, 60,32; H, 4,94; N, 3,94. Odabrani FT-IC podaci (KBr) cm^{-1} : 3381 [$\nu(OH)$], 3277 [$\nu(OH)$], 3031 [$\nu(CH)$], 2949 [$\nu(CH)$], 1568 [$\nu_{as}(COO)$], 1549 [$\nu_{as}(COO)$], 1502 [$\nu(CC)$], 1446 [$\nu_s(COO)$], 1414 [$\nu_s(COO)$], 760 [$\delta(CH_2)$, $\gamma(COC)$], 696 [$\delta(CH)$, $\gamma(CH)$], 675 [$\delta(CCC)$], 445 [$\nu(CoO)$]. UV-Vis spektar (nm): 478, 510, 560, 621.

$[Ni(H_2O)_2(oxa)_2] \cdot 2H_2O$ (**K3**): svetloplava supstanca, prinos 79 %. Izračunato za $C_{36}H_{36}N_2NiO_{10}$ (%): C, 60,44; H, 5,07; N, 3,92. Nađeno (%): C, 60,22; H, 5,06; N, 3,91. Odabrani FT-IC podaci (KBr) cm^{-1} : 3389 [$\nu(OH)$], 3277 [$\nu(OH)$], 3032 [$\nu(CH)$], 2951 [$\nu(CH)$], 1568 [$\nu_{as}(COO)$], 1545 [$\nu_{as}(COO)$], 1502 [$\nu(CC)$], 1444 [$\nu_s(COO)$], 1414 [$\nu_s(COO)$], 760 [$\delta(CH_2)$, $\gamma(COC)$], 696 [$\delta(CH)$, $\gamma(CH)$], 675 [$\delta(CCC)$], 447 [$\nu(NiO)$]. UV-Vis spektar (nm): 422, 714, 790.

$[Cu_2(H_2O)_2(OH)(oxa)_3] \cdot 2H_2O$ (**K4**): plava supstanca, prinos 72 %. Izračunato za $C_{54}H_{51}Cu_2N_3O_4$ (%): C, 59,33; H, 4,70; N, 3,84. Nađeno (%): C, 59,05; H, 5,00; N, 3,88. Odabrani FT-IC podaci (KBr) cm^{-1} : 3420 [$\nu(OH)$], 3057 [$\nu(CH)$], 2924 [$\nu(CH)$], 1628 [$\nu_{as}(COO)$], 1614 [$\nu_{as}(COO)$], 1570 [$\nu(CC)$], 1437 [$\nu_s(COO)$], 764 [$\delta(CH_2)$], $\gamma(COC)$], 694 [$\delta(CH)$], $\gamma(CH)$], 443 [$\nu(CuO)$]. UV-Vis spektar (nm): 721.

$[Zn(H_2O)_2(oxa)_2] \cdot 1,5H_2O$ (**K5**): bela supstanca, prinos 65 %. Izračunato za $C_{36}H_{35}N_2O_{9,5}Zn$ (%): C, 60,64; H, 4,95; N, 3,93. Nađeno (%): C, 60,5; H, 4,92; N, 3,94. Odabrani FT-IC podaci (KBr) cm^{-1} : 3383 [$\nu(OH)$], 3275 [$\nu(OH)$], 3057 [$\nu(CH)$], 2949 [$\nu(CH)$], 1568 [$\nu_{as}(COO)$], 1547 [$\nu_{as}(COO)$], 1444 [$\nu_s(COO)$], 1414 [$\nu_s(COO)$], 762 [$\delta(CH_2)$], $\gamma(COC)$], 696 [$\delta(CH)$], $\gamma(CH)$], 445 [$\nu(ZnO)$].

3.1.4. Rendgenska strukturna analiza

Kristalografski podaci su prikupljeni na difraktometru Oxford Gemini S opremljenim sa Mercury CCD detektorom na 293 K. Za snimanje monokristala korišćeno je zračenje Mo $K\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) i multi-sken korekcija za apsorpciju. Struktura je rešena direktnim metodama (SIR92 [147]) i utačnjavana metodom najmanjih kvadrata (SHELXL97 [148] i WinGX [149]). Parametri pomeranja svih atoma, osim atoma vodonika, utačnjeni su anizotropno. Atomi vodonika su smešteni u geometrijski izračunate položaje i utačnjavani su korišćenjem modela „jašućeg atoma“ sa utvrđenim dužinama C–H veza. Atomi vodonika su utačnjeni izotropno.

3.1.5. Određivanje antiproliferativne aktivnosti oksaprozina i njegovih kompleksa metala

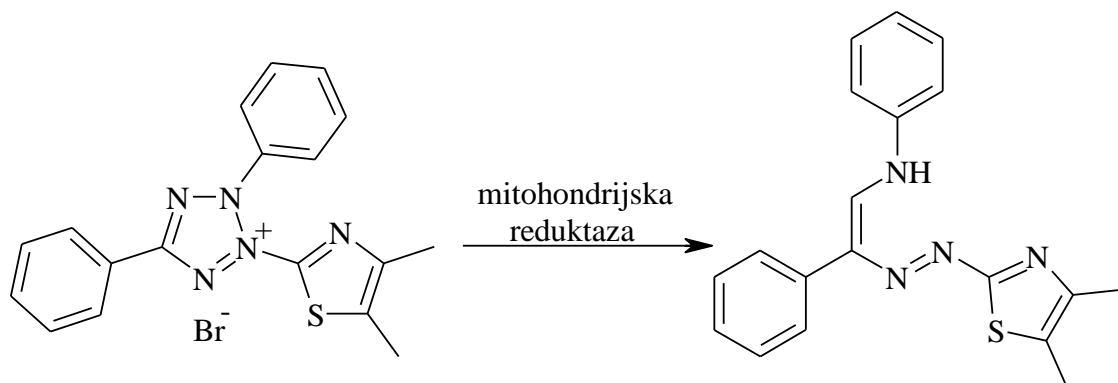
Antiproliferativni potencijal proučavanih jedinjenja prema ćelijskim linijama humanog karcinoma kolona (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231), humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i melanoma (Fem-X) određen je MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid, Sigma Aldrich, SAD) testom. Sve ćelije su pripremane i kultivisane u tečnom medijumu DMEM (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen, SAD) koji sadrži L-glutamin i 4,5 g/L glukoze. Neposredno pre upotrebe u 0,5 L medijuma dodavano je 2,5 mL antibiotika 100 U/ml penicilina i 100 mg/mL streptomocina (PAA, Austrija) i 50 mL fetalnog goveđeg

seruma (engl. Fetal Bovine Serum, FBS) (PAA, Austrija) inaktivisanog 30 minuta na 37 °C u vodenom kupatilu (finalno 10 % (v/v)).

Sve ćelije su bile tretirane rastvorima proučavanih jedinjenja koncentracija 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 i 50 µM tokom 48 h. Prvo je napravljen osnovni rastvor za sva jedinjenja u radnoj koncentraciji od 1 M. Sva jedinjenja su rastvarana u DMSO. Nakon toga su pravljena razblaženja do željenih koncentracija u medijumu za kultivaciju ćelija. Netretirane ćelije su služile kao kontrola.

MTT test je kolorimetrijska metoda za procenu proliferacije ćelija. Test se zasniva na sposobnosti živih ćelija da preuzmu MTT i mitohondrijalnom reduktazom redukuju ovu so do formazana (slika 26), soli nerastvorne u vodi. Količina redukovano formazana proporcionalna je direktno broju živih ćelija. Vidljivi rezultat reakcije je promena boje od žute ka tamno smeđoj do sive, koju zapravo daje redukovani formazan. Rastvaranje formazana postiže se dodavanjem rastvora 1 % SDS-HCl (10 mL 10 % SDS i 0,1 mL 0,1 M HCl). U mikrotitarske ploče u kojima su gajene ćelije (oko 1×10^5) u 200 µL medijuma doda se po 20 µL MTT rastvora u koncentraciji 5 mg/mL. Ploče se dodatno inkubiraju 180 minuta na 37 °C. Nakon toga se reakcija zaustavlja i formazan se rastvara dodavanjem 20 µL 1 % SDS-HCl rastvora u svaki bunarić mikrotitarske ploče. Intenzitet boje je direktno srazmeran količini aktivnih enzima, odnosno vijabilnosti ćelija. Apsorbanca se meri na ELISA spektrofotometru (ELISA reader Optic System 2100-C) na talasnoj dužini od 570 nm i referentnoj od 650 nm. Procenat vijabilnih ćelija je izračunat kao odnos između apsorpcije pri svakoj od koncentracija proučavanih jedinjenja i apsorpcije kontrole $\cdot 100$.

Korišćen je SPSS program za statističku obradu podataka. Statistička obrada rezultata urađena je jednofaktorskim ANOVA testom, pri čemu je $p < 0,05$ smatrana statistički značajnom razlikom.



Slika 26. Redukcija MTT

3.2. Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline

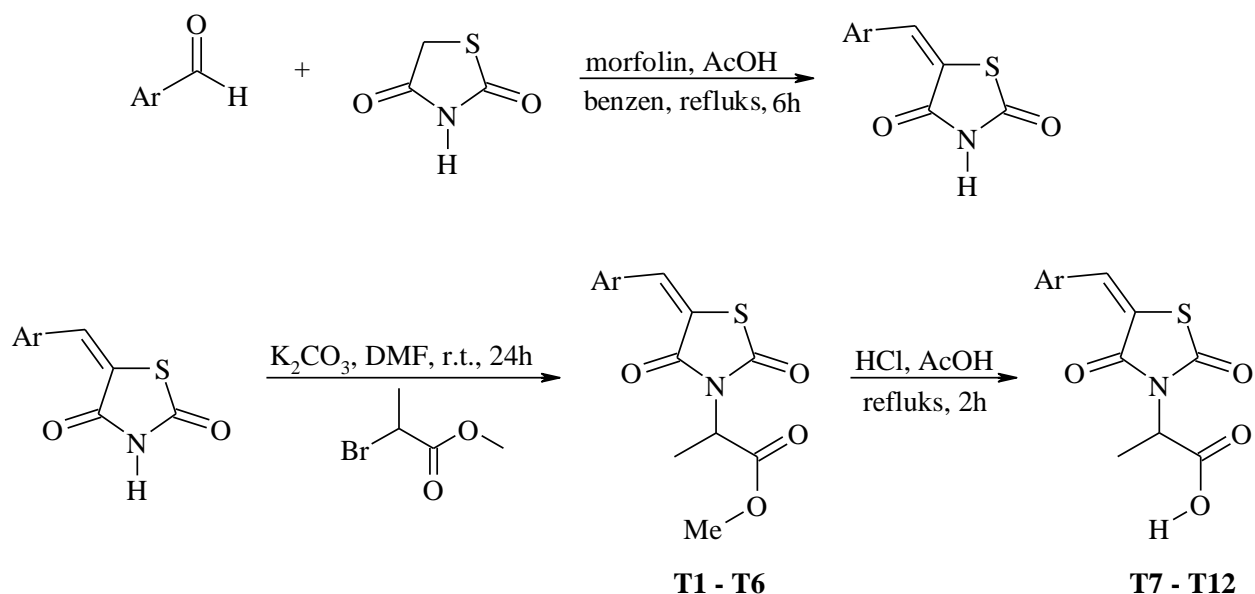
Za sintezu jedinjenja korišćene su sledeće hemikalije: tiourea, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$, p. a. (*Fluka, Switzerland*); 2-hloretanske kiseline, $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Cl}$, p. a. (*Fluka, Switzerland*); aromatični aldehidi, p.a. (*Fluka, Switzerland*); morfolin, $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$, p. a. (*Fluka, Switzerland*); kalijum-karbonat, K_2CO_3 , p. a. (*Aldrich, Switzerland*); metil-2-bromopropionat, $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_2\text{Br}$, p. a. (*Aldrich, Switzerland*); hlorovodonična kiselina, HCl , (*Fluka, Switzerland*); natrijum-hidroksid, NaOH , p. a. (*Fluka, Switzerland*).

Svi reagensi upotrebljavani su bez dopuskog prečišćavanja.

Osim navedenih hemikalija, korišćeni su i različiti organski rastvarači: etanol, etil-acetat, *N,N*-dimetilformamid (DMF), glacijalna sirćetna kiselina, benzen i svi su bili p. a. čistoće.

3.2.1. Sinteza derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline

Tok sinteze svih derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline prikazan je na shemi 5.



Shema 5. Sinteza derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline (**T1–T12**).

3.2.1.1. Sinteza 2,4-tiazolidindiona [150]

Tiourea (0,48 mol) se dodaje rastvoru 2-hloretanske kiseline (0,5 mol) i koncentrovane hlorovodonične kiseline (80,6 mL, 36 %) uz mešanje. Reakciona smeša se zagreva uz refluks 14 h. Posle hlađenja do sobne temperature, dolazi do formiranja taloga koji se zatim filtrira, suši i prekrystalise iz vode kako bi se dobio željeni proizvod.

3.2.1.2. Sinteza 5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazola [151]

U balon od 100 mL koji je opremljen Din-Štarkovom (Dean-Starck) aparaturom za azeotropsko uklanjanje vode stavljeni su odgovarajući aldehid (0,025 mol), 2,4-dioksotetrahidrotiazol (0,025 mol), benzen (15 mL), glacialna sirćetna kiselina (0,5 mL) i morfolin (1 mL). Reakciona smeša je zagrevana uz refluks 4 h. Posle hlađenja do sobne temperature dolazi do formiranja taloga koji se zatim filtrira, suši i prekrystalise iz DMF kako bi se dobio željeni proizvod.

3.2.1.3. *Sinteza metil-2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazolo-3-il)propionata (T1–T6)*

U 60 mL DMF rasvori se 0,010 mol odgovarajućeg 5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazola i potom doda 0,12 mol kalijum-karbonata i 0,011 mol metil-2-bromopropionata. Reakciona smeša se meša tokom 24 h na sobnoj temperaturi. Potom se izlije u trostruko veću zapreminu vode i vrši se ekstrakcija etil-acetatom. Organski sloj se ispira 5 % rastvorom natrijum-hidroksida i vodom, a zatim suši preko noći magnezijum-sulfatom. Rastvarač se ukloni destilacijom, a izdvojeni čvrsti proizvod se prečišćava rekristalizacijom iz etanola.

Takođe, sintetizovan je monokristal **T2**. Bezbojni prizmatični monokristal dobijen je sporim uparavanjem rastvora etanola u zamrzivaču. Prvi kristali pojavili su se nakon dve nedelje, a monokristal odgovarajućih dimenzija nakon mesec dana.

3.2.1.4. *Sinteza 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazolo-3-il)propanske kiseline (T7–T12)*

U 40 mL glacijalne sirćetne kiseline rastvori se 0,010 mol odgovarajućeg metil-2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazolo-3-il)propionata i doda koncentrovana hlorovodonična kiselina (10 mL). Reakciona smeša se zagreva uz refluks 2 h. Nakon vakuum uparavanja do suva, doda se još 40 mL glacijalne sirćetne kiseline i 10 mL koncentrovane hlorovodonične kiseline i zagreva uz refluks još 2 h. Nakon vakuum uparavanja do suva, sirov proizvod je ispran vodom i rekristalisan iz etanola kako bi se dobio čist proizvod.

3.2.2. Karakterizacija

Sva jedinjenja (**T1–T12**) okarakterisana su temperaturom topljenja, elementarnom analizom, FT-IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom. Aparati korišćeni za karakterizaciju jedinjenja navedeni su u poglavlju 3.1.

Temperatura topljenja, FT-IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri jedinjenja **T1–T6** u skladu su sa literaturnim podacima [152] i nesumnjivo potvrđuju njihove strukture.

2-(5-benziliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanska kiselina (T7):

bela supstanca, prinos: 54 %; t.t.: 177–178 °C; Izračunato za C₁₃H₁₁NO₄S (%): C, 56,31; H, 4,00; N, 5,05. Nađeno (%): C, 56,36; H, 3,98; N, 5,04; FT-IC: ν (KBr): 3421, 2930, 1713, 1691, 1607, 1370, 1179, 1127 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,95 (s, 1H, –CH=), 7,65–7,51 (m, 5H, C₆H₅), 5,02 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H, CH₃CHCO₂H), 1,51 (d, *J* = 7,4 Hz, 3H, CH₃CHCO₂H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 170,4 (CO₂H), 167,0 (C=O), 165,2 (C=O), 134,1 (C₆H₅), 133,1 (–CH=), 131,1 (C₆H₅), 130,5 (C₆H₅), 129,7 (C₆H₅), 120,8 (=C–S), 50,6 (CH₃CHCO₂H), 14,2 (CH₃CHCO₂H) ppm.

2-(5-(4-metoksibenziliden)-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanska kiselina (T8):

svetložuta supstanca, prinos: 51 %; t.t.: 201–203 °C; Izračunato za C₁₄H₁₃NO₅S (%): C, 54,72; H, 4,26; N, 4,56. Nađeno (%): C, 54,69; H, 4,23; N, 4,58; FT-IC: ν (KBr): 3448, 2925, 1736, 1683, 1596, 1512, 1360, 1257, 1178 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,90 (s, 1H, –CH=), 7,58 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, C₆H₄), 7,10 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, C₆H₄), 5,14 (q, *J* = 6,8 Hz, 1H, CH₃CHCO₂H), 3,82 (s, 3H, CH₃OC₆H₅), 1,51 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃CHCO₂H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 170,5 (CO₂H), 167,1 (C=O), 165,4 (C=O), 161,6 (C₆H₅), 134,1 (–CH=), 132,7 (C₆H₅), 125,6 (C₆H₅), 117,6 (=C–S), 115,3 (C₆H₅), 55,8 (CH₃OC₆H₅), 50,6 (CH₃CHCO₂H), 14,2 (CH₃CHCO₂H) ppm.

2-(5-(4-fluorobenziliden)-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanska kiselina (T9):

svetložuta supstanca, prinos: 55 %; t.t.: 200–201 °C; Izračunato za C₁₃H₁₀FNO₄S (%): C, 52,88; H, 3,41; N, 4,74. Nađeno (%): C, 52,93; H, 3,40; N, 4,73; FT-IC: ν (KBr): 3432, 2927, 1719, 1679, 1596, 1376, 1242, 1176 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,97 (s, 1H, –CH=), 7,69 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, C₆H₄), 7,37 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, C₆H₄), 5,02 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H, CH₃CHCO₂H), 1,51 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃CHCO₂H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 170,4 (CO₂H), 167,0 (C=O), 165,2 (C=O), 133,1 (–CH=), 133,0 (C₆H₅), 117,1 (C₆H₅), 116,9 (C₆H₅), 120,7 (=C–S), 50,7 (CH₃CHCO₂H), 14,2 (CH₃CHCO₂H) ppm.

2-(5-(4-Dimetilaminobenziliden)-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanska kiselina (T10):

žuta supstanca, prinos: 58 %; t.t.: 233–235 °C; Izračunato za C₁₅H₁₆N₂O₄S (%): C, 56,24; H, 5,03; N, 8,74. Nađeno (%): C, 56,23; H, 5,00; N, 8,75; FT-IC: ν (KBr): 3441, 2922, 1742, 1716, 1683, 1584, 1531, 1363, 1304, 1194 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,79 (s, 1H, –CH=), 7,44 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H, C₆H₄), 6,80 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, C₆H₄), 4,98 (q, *J* = 7,4 Hz, 1H, CH₃CHCO₂H), 3,00 (s, 6H, (CH₃)₂N), 1,49 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H, CH₃CHCO₂H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 170,6 (CO₂H), 167,3 (C=O), 165,4 (C=O), 151,9 (C₆H₄), 135,1 (–CH=), 132,8 (C₆H₄), 120,0 (=C–S), 112,8 (C₆H₄), 112,4 (C₆H₄), 50,3 (CH₃CHCO₂H), 39,8 ((CH₃)₂N), 14,3 (CH₃CHCO₂H) ppm.

2-(5-(5-metil-2-furfuriliden)-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanska kiselina (T11):

žuta supstanca, prinos: 53 %; t.t.: 170–172 °C; Izračunato za C₁₂H₁₁NO₅S (%): C, 51,24; H, 3,94; N, 4,98. Nađeno (%): C, 51,20; H, 3,93; N, 5,00; FT-IC: ν (KBr): 3431, 2925, 1725, 1681, 1618, 1567, 1515, 1368, 1235, 1174 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 7,67 (s, 1H, –CH=), 7,06 (d, *J* = 3,2 Hz, 1H, C₄H₂O), 6,40 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, C₄H₂O), 4,97 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H, CH₃CHCO₂H), 2,38 (s, 3H, CH₃C₄H₂O), 1,49 (d, *J* = 3,4 Hz, 3H, CH₃CHCO₂H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 170,5 (CO₂H), 167,9 (C=O), 165,1 (C=O), 158,3 (C₄H₂O), 148,2 (C₄H₂O), 121,7 (–CH=), 120,3 (=C–S), 115,6 (C₄H₂O), 110,8 (C₄H₂O), 50,4 (CH₃CHCO₂H), 14,3 (CH₃CHCO₂H), 14,0 (CH₃C₄H₂O) ppm.

2-(5-(1-naftiliden)-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanska kiselina (T12):

žuta supstanca, prinos: 48%; t.t.: 163–165 °C; Izračunato za C₁₇H₁₅NO₄S (%): C, 61,99; H, 4,59; N, 4,25. Nađeno (%): C, 70,04; H, 4,62; N, 4,22; FT-IC: ν (KBr): 3446, 2930, 1737, 1663, 1595, 1370, 1227, 1176 cm⁻¹; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): 8,57 (s, 1H, CH=), 8,13–8,00 (m, 4H, C₁₀H₉), 7,71–7,60 (m, 5H, C₁₀H₉), 5,07 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H, CH₃CHCO₂H), 1,55 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H, CH₃CHCO₂H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): 170,4 (CO₂H), 167,3 (C=O), 164,7 (C=O), 133,5 (–CH=), 131,4 (C₁₀H₉), 131,2 (C₁₀H₉), 131,0 (C₁₀H₉), 130,3 (C₁₀H₉), 129,2 (C₁₀H₉), 127,8 (C₁₀H₉), 127,2 (C₁₀H₉), 126,8 (C₁₀H₉), 125,9 (C₁₀H₉), 124,5 (C₁₀H₉), 123,7 (=C–S), 50,6 (CH₃CHCO₂H), 14,2 (CH₃CHCO₂H) ppm.

3.2.3. Rendgenska strukturna analiza

Kristalografski podaci su prikupljeni na istom aparatu koji je naveden u poglavlju 3.1. Za snimanje monokristala korišćeno je zračenje Mo K α ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) i multi-sken korekcija za apsorpciju. Struktura je rešena direktnim metodama (SIR92 [147]) i utačnjavana metodom najmanjih kvadrata (SHELXL97 [148] и WinGX [149]). Parametri pomeranja svih atoma, osim atoma vodonika, utačnjeni su anizotropno. Atomi vodonika su smešteni u geometrijski izračunate položaje i utačnjavani su korišćenjem modela „jašućeg atoma“ sa utvrđenim dužinama C–H veza. Položaji atoma vodonika H81 i H121 su navedeni u ΔF mapi i ovi atomi vodonika su utačnjeni izotropno.

3.2.4. Određivanje antiproliferativne aktivnosti derivata tiazolidindiona

Antiproliferativni potencijal proučavanih jedinjenja je određen MTT testom prema ćelijskim linijama humanog karcinoma kolona (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231) i mijeloidne leukemije (K-562). Postupak je opisan u poglavlju 3.1. Sve ćelije su bile tretirane rastvorima proučavanih jedinjenja koncentracija 0,01, 0,1, 1, 10, 50 i 100 μM tokom 24 h.

3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti derivata tiazolidindiona

Standardni sojevi *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i klinički izolovanih *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans* su korišćeni za pripremanje bakterijskih suspenzija. Zamućenost početnih bakterijskih suspenzija je korigovana dodavanjem 0,5 Mefarlandovog (McFarland) standarda, a potom su razblaženi u odnosu 1:100 u sterilnom 0,85 % rastvoru.

Difuzioni metod je kvalitativan test koji omogućava klasifikaciju mikroorganizama kao osetljivih ili otpornih na proučavane supstance na osnovu veličine prečnika zone inhibicije [153]. Petri ploče sa Miler–Hintonovim (Müller–Hinton) agarom su inokulisane odgovarajućim bakterijskim suspenzijama. Površina medijuma je sušena 3–5 min na sobnoj temperaturi. Potom su sterilnim metalnim cilindrom napravljeni otvori koji su napunjeni sa po 100 μL rastvora proučavanih jedinjenja koncentracije 1000 μM . Antibakterijska aktivnost je procenjena na osnovu merenja

prečnika zone inhibicije (IZ). Svi testovi su ponovljeni po tri puta. Negativna kontrola je pripravljena sa istim rastvaračem koji je korišćen za rastvaranje proučavanih jedinjenja (5 % DMSO) da bi se pokazalo da rastvarač ne utiče na rast bakterija. Svaki test je vršen uz kontrolu rasta i kontrolu sterilnosti.

Minimalna inhibirajuća koncentracija (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) određene su mikrodilutacionim metodom [154]. Rastvori su serijski razblaživani Miler–Hintonovim rastvorom. Razblažene bakterijske suspenzije (10 μL) su dodavane svakom uzorku da bi se postigla koncentracija od $5 \cdot 10^5 \text{ CFU mL}^{-1}$. Na kraju je dodato 10 μL indikatorskog rastvora resazurina. Resazurin (7-hidroksi-3H-fenoksazin-3-on-10-oksid) je oksido–redukциони indikator za procenu rasta mikroba. To je plava nefluorescentna boja koja postaje ružičasta i fluorescira kada se redukuje do resorufina oksidoreduktazama živih ćelija (slika 27). Inokulisane ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 h. MIC se definiše kao najniža koncentracija proučavane supstance koja sprečava promenu boje resazurina iz plave u ružičastu. Svaki test podrazumevao je kontrolu rasta i kontrolu sterilnosti. Svi testovi su ponovljeni po tri puta i MIC vrednosti su bile konstantne. MBC je određen dodavanjem po 10 μL uzoraka kod koga nije došlo do promene boje indikatora, na hranljivi agarski medijum. Na kraju perioda inkubacije, najniža koncentracija bez vidljivog rasta se definiše kao MBC.



Slika 27. Redukcija resazurina

3.3. Elektrohemijsko ispitivanje oksaprozina

Sledeća jedinjenja su elektrohemijski ispitivana: sintetizovan oksaprozin [116]; oksaprozin standard, p. a. (*Sigma Aldrich*); tableta oksaprozina, Duraprox[®], (*Tramedico, Netherlands*); natrijum-hidrogenkarbonat, NaHCO₃, p. a. (*Merck*); Bovin serum albumin, BSA (*Sigma Aldrich*); monobazni natrijum-fosfat, NaH₂PO₄, p. a. (*Sigma Aldrich*); dvobazni natrijum-fosfat, Na₂HPO₄, p. a. (*Sigma Aldrich*); demineralizovana voda, 18 MΩ (*IHTM, Beograd*).

Sva navedena jedinjenja su korišćena bez dopunskog prečišćavanja.

Za merenje pH-vrednosti fosfatnog pufera korišćen je Mettler Toledo (FiveGo) pH-metar. Za prečišćavanje vode korišćen je Milli-Q sistem.

Sintetizovan lek, njegov analitički standard i tableta Duraprox[®] elektrohemijski su ispitivani tako što je napravljen štok rastvora jedinjenja u odgovarajućem elektrolitu (0,05 M NaHCO₃ ili fosfatni pufer, pH 7,4). Odgovarajuće zapremina štok rastvora jedinjenja dodavane se u elektrolit (100 mL) kako bi se dobile željene koncentracije u ispitivanom opsegu.

U svim eksperimentima korišćena je komercijalna Tacusell staklena ćelija. Polikristalna elektroda od zlata koristi se kao radna elektroda (Pine, 0,5 cm²), žica od zlata kao pomoćna (kontra) elektroda i zasićena kalomelova elektroda (engl. saturated calomel electrode, SCE) kao referentna elektroda. Svi potencijali dati su prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi (vs. SCE). Pre dodavanja ispitivanih jedinjenja, rastvor elektrolita je degaziran provođenjem azota (30 minuta). Svi eksperimenti su izvođeni na sobnoj temperaturi. Pre početka rada polikristalna elektroda od zlata (površine 0,5 cm²) polirana je aluminijumskom pastom, očišćena mešavinom 18 MΩ vode i sumporne kiseline u ultrazvučnom kupatilu i na kraju isprana 18 MΩ vodom.

Priprema modifikovane elektrode

BSA modifikovana elektroda od zlata pripremljena je na sledeći način: kap od 20 μL BSA rastvora nanešena je na radnu površinu elektrode od zlata i ostavljena da se osuši na vazduhu preko noći. Elektroda je zatim potopljena 4 h u demineralizovanu vodu (18 MΩ) kako bi se uklonio sav neadsorbovan BSA [155].

4. REZULTATI I DISKUSIJA

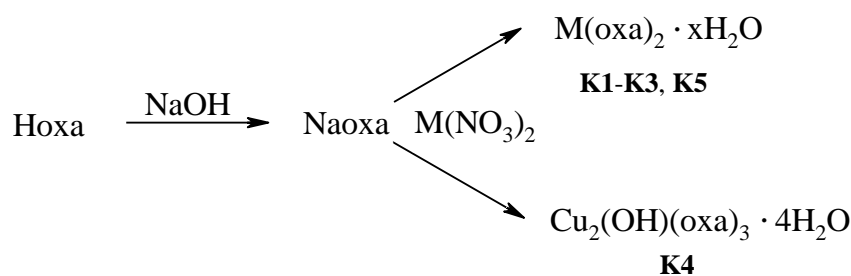
Ovo poglavlje sastoji se iz tri tematske celine u kojima su obrađeni i diskutovani dobijeni rezultati. Tema i cilj prva dva poglavlja je sinteza novog potencijalnog antiproliferativnog agensa. Treba naglasiti da su sva jedinjenja okarakterisana i da su rezultati analiza prikazani u poglavlju 3. Takođe, svi dobijeni rezultati detaljno su analizirani u cilju rešavanja struktura i definisanju svojstava sintetizovanih jedinjenja. U okviru trećeg poglavlja obrađena je elektrohemijska karakterizacija oksaprozina i određen njegov afinitet vezivanja za biomakromolekule (BSA).

4.1. Sinteza, karakterizacija i antiproliferativna aktivnost kompleksa prelaznih metala sa 3-(4,5-difenil-1,3-oksazol-2-il)propanskom kiselinom (oksaprozinom)

U ovom poglavlju, prikazano je istraživanje usmereno ka sintezi novih jedinjenja koja bi posedovala potencijalnu antiproliferativnu aktivnost. Kao što je naglašeno ranije u poglavlju 2, lekovi sa dva ili više mehanizama delovanja imaju potencijal da se primenjuju u lečenju različitih bolesti. Upravo iz tog razloga ispitivana je potencijalna antiproliferativna aktivnost Hoxa (NSAIL-a) i njegovih kompleksa sa prelaznim metalima.

Sintetizovano je pet novih kompleksa prelaznih metala sa Hoxa (slika 28) [156], čije su formule, rezultati hemijske analize i prinos prikazani u odeljku 3.1. U svim slučajevima rezultati hemijske analize pokazuju dobra slaganja teorijskih i eksperimentalnih vrednosti. Kompleksi prelaznih metala sa Hoxa u daljem tekstu će biti obeležavani odgovarajućim oznakama iz odeljka 3.1.3.

Formule dobijenih kompleksa određene na osnovu elementarne analize pokazuju da molski odnos jona metala i liganda u svim jedinjenjima iznosi 1:2, osim kod kompleksa **K4** gde taj odnos jona metala i liganda iznosi 2:3. Jedinjenja **K1–K3** i **K5** mogu se prikazati opštom formulom $[M(H_2O)_2(oxa)_2] \cdot xH_2O$, gde je $x = 2$ za $M = Mn, Co$ i Ni i $x = 1,5$ za Zn , dok je formula **K4** jedinjenja $[Cu_2(H_2O)_2(OH)(oxa)_3] \cdot 2H_2O$ (slika 28).



Slika 28. Sinteza kompleksa prelaznih metala sa Hoxa, gde je M = Mn, Co, Ni, Zn; x = 4 za **K1–K3** i x = 3,5 za **K5**

Svi sintetizovani kompleksi nerastvorni su u vodi, metanolu, EtOH, acetonitrilu, dietil etru, acetonu, DMF, dok je umerena rastvorljivost jedino zabeležena u DMSO. Nerastvorljivost kompleksa može se objasniti na nekoliko načina [157a]. Prvenstveno prisustvo nekoordinirane vode uslovljava veliki broj vodoničnih veza unutar struktura, a ovaj faktor deluje u pravcu smanjenja rastvorljivosti, jer povećava stabilnost kristalne rešetke. Drugi faktor koji takođe utiče na smanjenje rastvorljivosti jeste formiranje neutralnih kompleksa (unutrašnjih kompleksnih soli) što smanjuje energiju solvatacije. Na smanjenu rastvorljivost utiče broj atoma metala koji grade komplekse (binuklearni, trinuklearni, itd.), tako da je slaba rastvorljivost kod binuklearne jedinice (**K4**) očekivana.

4.1.1. Termička svojstva ispitivanih kompleksa

Dehidracija sintetizovanih kompleksa

U ovom delu rada opisano je termičko ponašanje kompleksa **K1–K5**. Rezultati TG i DSC analize prikazani su u tabeli 7, dok su TG- i DSC-krive prikazane na slici 29. Iako se često ne mogu u potpunosti razdvojiti pojedinačni procesi koji se odigravaju tokom termičkog tretmana uzoraka, zasebno će biti razmatrani procesi dehidracije i razlaganje anhidrovanih jedinjenja.

Svi kompleksi se mogu dobiti kao anhidrovane supstance. Osim dehidracije kompleksa **K1** koji se odigrava u jednom koraku, dehidracija se kod svih ostalih kompleksa **K2–K5** odigrava u dva koraka. Rezultati TG analize pokazali su razliku između koordiniranih i nekoordiniranih molekula H₂O. Dehidracija kompleksa **K2–K4** odigrava se u dva koraka koji nisu jasno razdvojeni, ali su gubici mase u ova dva stupnja

skoro jednaki. Sa druge strane, dehidratacija kompleksa **K5** odigrava se u dva jasno razdvojena koraka, ali gubici mase nisu jednaki u ova dva stupnja (v. kasnije).

Tabela 7. Rezultati TG- i DSC-analiza kompleksa **K1–K5** [temperaturni opseg dehidratacije ($t_{op,dh}$), temperatura maksimuma DTG-pika (t_{max}), entalpija dehidratacije ($\Delta_{deh}H_m^0$) i početna temperatura razlaganja anhidrovanih jedinjenja ($t_{dec,i}$)].

Kompleks	Sadržaj H ₂ O/%, nađeno (izračunato)	$t_{op,dh}$ (°C)	t_{max} (°C)	$\Delta_{deh}H_m^0$ (kJ mol ⁻¹)	$t_{dec,i}$ (°C)
K1	9,7 (10,1)	30,0–140,6	103,9	358,6	243,6
K2	9,4 (10,1)	45,1–193,4	107,2 131,0	400,1	240,9
K3	10,2 (10,1)	33,3–158,6	72,8 113,6	322,8	254,3
K4	6,6 (6,6)	25,0–118,1	64,8 90,5	294,6	191,0
K5	8,3 (8,8)	29,9–200,1	56,8 99,8	35,1 ^a ; 108,6 ^b (143,7) ^c	265,0

^aMolarna entalpija dehidratacije posle uklanjanja 1,5 mol H₂O.

^bMolarna entalpija dehidratacije posle uklanjanja 2 mol H₂O.

^c Ukupna molarna entalpija dehidratacije.

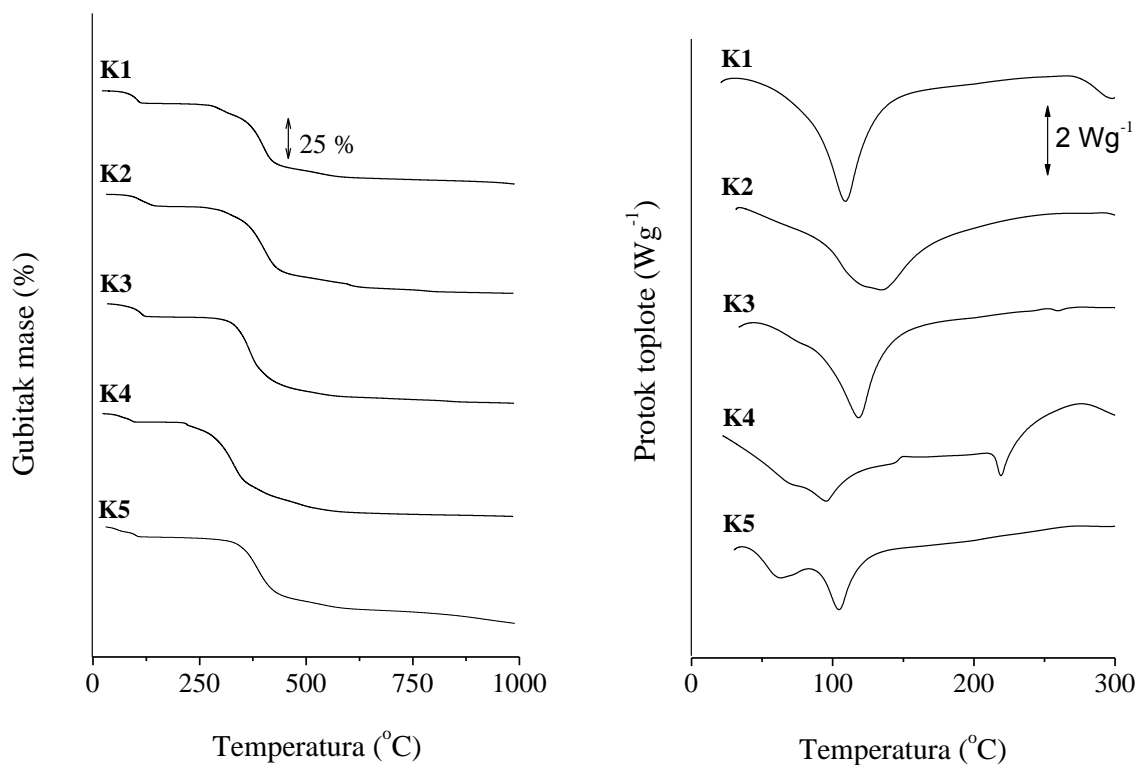
Dehidratacija kompleksa **K1** je proces koji se odigrava u jednom koraku i do završne temperature dehidratacije od 140,6 °C (tabela 7) dolazi do uklanjanja 4 molekula H₂O. Dobijeni podaci u vezi sa dehidratacijom kompleksa **K1** i ukupnim sadržajem H₂O u njemu, u saglasnosti su sa rezultatima elementarne analize.

U temperaturnom intervalu 45–115 °C pri dehidrataciji kompleksa **K2** dolazi do uklanjanja 2 molekula H₂O, dok se do 193,4 °C uklone preostala 2 molekula H₂O (tabela 7). Pri dehidrataciji kompleksa **K3** do 80,8 °C dolazi do uklanjanja 2 molekula H₂O, a preostala 2 molekula H₂O gube se do 158,6 °C kada se dehidratacija i završava.

Dobijeni podaci u vezi sa dehidratacijom kompleksa **K2** i **K3** i ukupnim sadržajem H_2O u njima, u saglasnosti su sa rezultatima elementarne analize.

U prvom koraku pri dehidrataciji kompleksa **K4** ($25-73,8\text{ }^\circ\text{C}$) dolazi do uklanjanja 2 molekula H_2O , dok se ostala 2 molekula H_2O gube do $118,1\text{ }^\circ\text{C}$ (tabela 4.3.1). Komplex **K4** ističe se po najnižoj vrednosti završne temperature dehidratacije ($118,1\text{ }^\circ\text{C}$), što se može pripisati drukčijoj građi ovog kompleksa od ostalih (v. kasnije).

Dehidratacija kompleksa **K5** odigrava se u dva razdvojena stupnja: u prvom stupnju u temperaturnom intervalu $29,9-77,8\text{ }^\circ\text{C}$ dolazi do uklanjanja 1,5 molekula H_2O , a preostala 2 molekula H_2O se eliminišu iz koordinacione sfere zagrevanjem do $200,1\text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 29. TG- i DSC-krive kompleksa **K1–K5**.

Svi TG- i DSC-podaci (sa izuzetkom jedinjenja **K1**), zajedno sa temperaturnim opsezima dehidratacije i položajima DTG maksimuma, pokazuju da se razlika energija vezivanja između koordiniranih i nekoordiniranih molekula H_2O povećava tj. entalpija dehidratacije generalno smanjuje. Analizom DSC-krivih očekivani pik koji definiše

endotermni efekat dehidracije utvrđen je kod svih kompleksa (slika 29), a iz njega su izračunate vrednosti entalpija dehidracije ($\Delta_{\text{deh}}H_{\text{m}}^0$, tabela 7). Vrednosti $\Delta_{\text{deh}}H_{\text{m}}^0$ za svih pet kompleksa nalaze se u opsegu 143,7–400,1 kJ mol⁻¹ (tabela 7).

DSC-krivu jedinjenja **K1** karakteriše jedinstven, oštar i dominantan pik, što je u saglasnosti sa jednostepenom dehidracijom ovog kompleksa. Sa druge strane, DSC-krive kompleksa **K2–K4**, karakteriše jedan i relativno širok pik. Dehidracija ovih jedinjenja odvija u dva koraka koja nisu jasno razdvojena, stoga se može zaključiti da se DSC-krive (slika 29) kompleksa **K2–K4** sastoje iz velikog broja preklapljenih pikova, tj. da je proces dehidracije ovih jedinjenja vrlo složen i da se odvija u najmanje dva koraka koja se ne mogu jasno razdvojiti. Kako se dehidracija kompleksa **K5** odigrava u dva jasno razdvojena stupnja (analiza TG- DTG-krivih) i kod DSC-krive ovog jedinjenja uočena su dva jasno razdvojena pika, pri čemu je piku sa manjim sadržajem energije pripisana dehidracija nekoordiniranih molekula H₂O, a piku sa većim sadržajem energije dehidracija koordiniranih molekula H₂O. Kao opšti zaključak, izuzimajući **K1**, ustanovljeno je da se ukupna energija (entalpija dehidracije) potrebna za kompletnu dehidraciju kompleksa smanjuje u nizu Co – Ni – Cu – Zn prateći pri tome redosled elemenata u periodnom sistemu elemenata.

Razlaganje anhidrovanih jedinjenja

Posle izvršene dehidracije kompleksa **K1–K5**, njihova termička svojstva (termička degradacija) ispitivana su zagrevanjem uzoraka do ≈ 1000 °C. Karakteristično za sve komplekse je da se nijedan nije u potpunosti degradirao do očekivanih oksida i/ili karbida. Sva ispitivana jedinjenja mogu se dobiti kao anhidrovane supstance, a na njihovu termičku stabilnost ukazuje horizontalni plato koji se uočava na TG-krivama posle završene dehidracije (slika 29).

Na osnovu početne temperature razlaganja anhidrovanih jedinjenja, $t_{\text{dec},i}$, (tabela 7) utvrđeno je da stabilnost kompleksa **K1–K5** raste u nizu:



pri čemu na sam niz dosta utiče građa kompleksa (v. kasnije), tako da odstupanje niza od redosleda elemenata u periodnom sistemu elemenata je u skladu sa očekivanjima.

Posle dehidratacije i zagrevanja iznad $t_{dec,i}$ na TG-krivama svih kompleksa **K1**–**K5** se uočava nagli gubitak mase do 650 °C, koji znatno otežava detaljniju analizu degradacije. Do završne temperature (≈ 1000 °C) dolazi do blagog gubitka mase. Analizom DTG- i DSC-krivih u oblasti dekompozicije jedinjenja, utvrđena je potencijalna defragmentacija kod svih kompleksa, pri čemu je obrazac razgradnje veoma sličan kod svih. Defragmentacija kompleksa odigrava se u nekoliko koraka koji su delimično preklapljeni tako da se ne može sa sigurnošću definisati jasna temperaturna granica između svakog procesa dekompozicije.

U prvom koraku degradacije kod anhidrovanih kompleksa, izuzev kompleksa **K4**, dolazi do dekarboksilacije i uklanjanja po dva molekula CO. Kod kompleksa **K4** u prvom koraku degradacije eliminišu se tri molekula CO i jedna OH grupa. Mase ostatka koje odgovaraju nakon prvog koraka degradacije (dekarboksilacije) su navedene:

- kompleks **K1** do oko 326 °C (nađeno: 81,64 %; izračunato: 82,00 %);
- kompleks **K2** do oko 336 °C (nađeno: 81,17 %; izračunato: 82,10 %);
- kompleks **K3** – nije jasno definisana granica razlaganja;
- kompleks **K4** do oko 273 °C (nađeno: 84,19 %; izračunato: 84,16 %);
- kompleks **K5** – nije jasno definisana granica razlaganja.

Posle dehidratacije i dekarboksilacije, daljim zagrevanjem kompleksi se verovatno razlažu u dva stupnja, pri čemu je moguće da u prvom dolazi do eliminacije fenilnih jezgara (C_6H_5), a u drugom do degradacije samog oksazolovog jezgra.

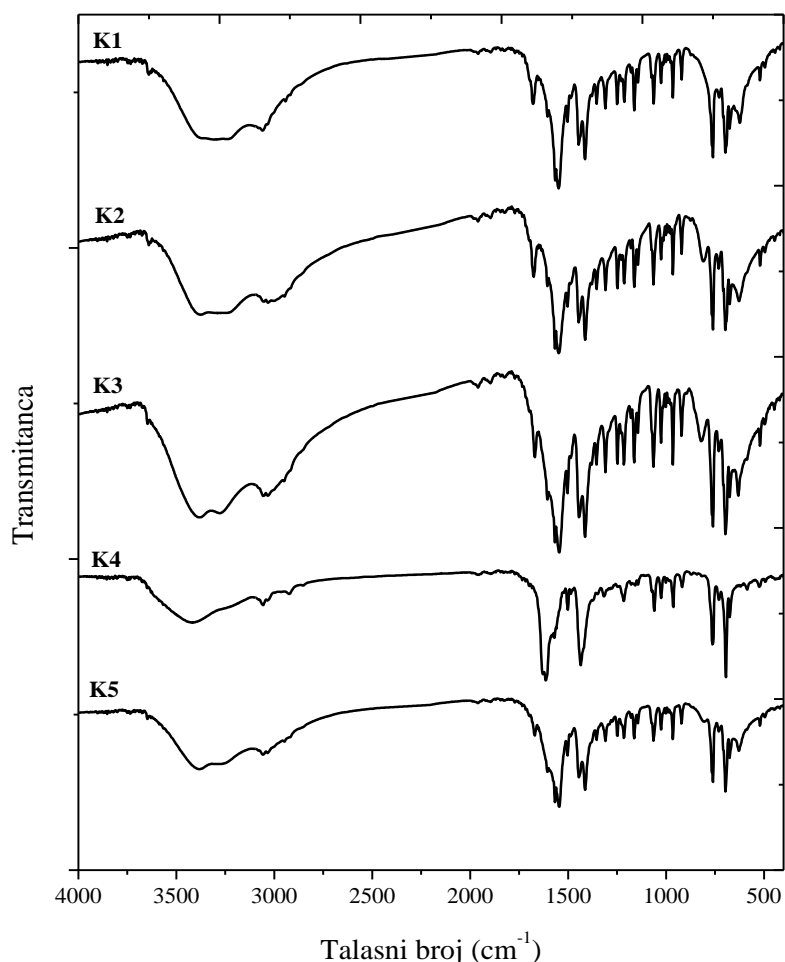
Kod svih kompleksa, izuzev kompleksa **K4**, u drugom stupnju moguće je da dolazi do eliminacije četiri C_6H_5 grupe, dok kod kompleksa **K4** dolazi do eliminacije još dve dodatna C_6H_5 grupe, u skladu sa pretpostavljenom strukturom (v. kasnije). Mase ostatka koje odgovaraju nakon drugog koraka degradacije:

- kompleks **K1** do oko 496 °C (nađeno: 38,74 %; izračunato: 37,72 %);
- kompleks **K2** do oko 460 °C (nađeno: 38,87 %; izračunato: 39,00 %);
- kompleks **K3** do oko 440 °C (nađeno: 38,00 %; izračunato: 38,98 %);
- kompleks **K4** do oko 400 °C za četiri C_6H_5 grupe (nađeno: 39,66 %; izračunato: 39,47 %); kompleks **K4** do oko 562 °C za dva C_6H_5 grupe (nađeno: 25,21 %; izračunato: 25,37 %);
- kompleks **K5** do oko 542 °C (nađeno: 39,87 %; izračunato: 40,05 %).

U trećem stupnju degradacije ispitivanih kompleksa pretpostavlja se da dolazi do fragmentisanja oksazolovog jezgra, pri čemu stepen fragmentacije zavisi od dostignute maksimalne temperature zagrevanja. Kod kompleksa **K1** nakon zagrevanja do oko 988 °C, masa ostatka odgovara uklanjanju dva fragmenta $-C=C-N=$ iz oksazolovog prstena (nađeno: 28,38 %; izračunato: 27,97 %). Kod kompleksa **K2**, **K3** i **K5** nakon zagrevanja do oko 986 °C, masa ostatka kod sva tri jedinjenja odgovara uklanjanju dva fragmenta $-O-C=C-N=$ iz oksazolovog prstena: za **K2** (nađeno: 23,93 %; izračunato: 23,91 %); za **K3** (nađeno: 23,57 %; izračunato: 23,88 %); **K5** (nađeno: 25,78 %; izračunato: 24,90 %). Kod kompleksa **K4** nakon zagrevanja do oko 985 °C, masa ostatka odgovara uklanjanju jednog fragmenta $-O-C=C-N=$ iz oksazolovog prstena (nađeno: 20,98 %; izračunato: 20,43 %).

4.1.2. IC-spektroskopija

Za IC-spektre novosintetisanih kompleksa prelaznih metala sa Hoxa (slika 30) tipična je velika međusobna sličnost i prisustvo relativno velikog broja širokih i intezivnih apsorpcionih maksimuma. Spektri su dosta složeni, jer istovremeno prisustvo koordinisane i nekoordinirane vode, kao i složenost samog liganda (FT-IC spektar Hoxa, slika 13) koji poseduje različite funkcionalne grupe dovodi do preklapanja nekih apsorpcionih traka i na taj način sprečava jasno definisanje određenih pikova. Iako IC-spektri ne mogu dokazati pretpostavljenu građu kompleksnih jedinaka, oni mogu potvrditi i/ili pružiti informacije o načinu koordinacije liganada, i prisustvu ili odsustvu kristalizacije vode. Pri analizi FT-IC spektara najviše pažnje posvećeno je položaju, kao i razdvajanju asimetričnih, ν_{as} , i simetričnih, ν_s , COO^- -vibracija, jer se na osnovu ovih vrednosti može odrediti način koordinacije COO^- -grupa.

Slika 30. IC-spektri kompleksa **K1–K5**.

Opšta karakteristika IC-spektara kristalohidrata [158] jeste prisustvo apsorpcione trake koja potiče od valencionih $\nu(\text{O-H})$ vibracija i nalazi se u oblasti $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. Zavisno od broja prisutnih molekula H_2O , oblik i položaj ovih pikova varira kod ispitivanih kompleksa i nalazi se u opsegu $3450\text{--}3197\text{ cm}^{-1}$ (slika 30).

Na slici 30 jasno se uočava da je kod kompleksa **K1–K3** koji imaju po 4 molekula H_2O , oblik i položaj ovih pikova vrlo sličan. Pored toga jasno se mogu uočiti različiti položaji apsorpcionih maksimuma za koordinirani i nekoordinirani molekuli H_2O (javljaju se na različitim talasnim brojevima) i na taj način napraviti razlika u energiji vezivanja koju ovi molekuli H_2O ostvaruju u kompleksu (saglasno sa

analizom TG krivih). Pik za nekoordinirane molekule H₂O (koji su slabije vezani) javlja se na nižim frekvencijama i to kod **K1** na oko 3238 cm⁻¹, kod **K2** na oko 3326 cm⁻¹, a kod **K3** na oko 3278 cm⁻¹. Sa druge strane, pik za koordinirane molekule H₂O javlja se pri višim talasnim brojevima (veći sadržaj energije) i to na oko 3377 cm⁻¹ kod **K1**, 3377 cm⁻¹ kod **K2** i 3382 cm⁻¹ kod **K3**.

Kod jedinjenja **K4** ne postoji jasna razlika između pikova koordiniranih i nekoordiniranih molekula H₂O, već su oba preklapljeni i superponirani u jednom. Analizu ovog dela spektra dodatno komplikuje postojanje pika koji je pripisan valencionim

v(O–H) vibracijama prisutnog OH⁻ liganda u ovom kompleksu **K4** (v. kasnije).

Pored velike sličnosti sa FT-IC spektrima kompleksa **K1–K3**, analizom IC-spektra jedinjenja **K5**, može se uočiti razlika u intezitetu između apsorpcionih pikova koordiniranih i nekoordiniranih molekula H₂O. Svaki položaj apsorpcionog pika u IC-spektru karakterističan je za određenu funkcionalnu grupu (kvalitativna determinacija), dok je za relativnu kvantitativnu determinaciju, intezitet pika presudan. Pikovi koordiniranih i nekoordiniranih molekula H₂O kod jedinjenja **K1–K3** poseduju gotovo indentične transmitance i na osnovu toga može se zaključiti da je broj molekula H₂O koji se nalaze u i van koordinacione sfere ovih kompleksa jednak. Sa druge strane, kod **K5** uočena je razlika u transmitanci pikova koordiniranih i nekoordiniranih molekula H₂O što potvrđuje predložene strukture kompleksa u kojima je sadržaj H₂O kod **K5** manji u odnosu na komplekse **K1–K3**. Apsorpcioni pik koji definiše 1,5 molekul nekoordinirane H₂O javlja se na frekvenciji oko 3265 cm⁻¹, dok se pik za 2 molekula koordinirane H₂O javlja na 3382 cm⁻¹.

Najistaknutiji i najintenzivniji pikovi kod svi sintetizovanih kompleksa jesu nesumnjivo oni koji potiču od asimetričnih, $\nu_{as}(\text{COO})$ i simetričnih, $\nu_s(\text{COO})$ vibracija i nalaze se u oblasti oko 1625–1420 cm⁻¹ (slika 30). Položaj ovih traka, kao i njihova razlika $\Delta\nu$, prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Položaji COO-vibracija i magnetni momenti sintetizovanih kompleksa.

Kompleks	Boja	$\nu_{as}(\text{COO})$ (cm^{-1})	$\nu_s(\text{COO})$ (cm^{-1})	$\Delta\nu(\text{COO})$ (cm^{-1})	μ_{ef} (μ_B)
K1	bela	1557	1431	126	5.82
K2	roze	1557	1430	127	4.70
K3	svetloplava	1556	1427	129	3.08
K4	plava	1621	1437	184	1.40
K5	bela	1556	1429	127	–

U literaturi [157b,158] detaljno su diskutovani načini koordinacije COO^- -grupa i međusobne razlike u tipu koordinacije utvrđene na osnovu IC-spektroskopije. Tako je poznato da pri jonizaciji karboksilnih-grupa u IC-spektrima nestaju apsorpcione trake na oko 1700, $\nu(\text{C}=\text{O})$ -vibracija, i oko 1300 cm^{-1} , $\nu(\text{C}-\text{O})$ -vibracija, kao i da dolazi do pojave dva nova maksimuma koji se označavaju kao asimetrična, $\nu_{as}(\text{COO})^-$, i simetrična,

$\nu_s(\text{COO})$ -vibracija. Razdvajanje ovih vibracija, $\Delta\nu = \nu_{as} - \nu_s$, ima veliki praktični značaj u koordinacionoj hemiji karboksilat-jedinjenja, jer ukazuje na tip koordinacije karboksilat-
-jona. Postupak uključuje poređenje $\Delta\nu$ vrednosti sa odgovarajućom vrednošću za slobodni jon ($\Delta\nu_j$) i glavni zaključci su sledeći:

- za $\Delta\nu > \Delta\nu_j$ tipična je monodentatna koordinacija COO^- -grupa (obrnuto ne važi);
- za $\Delta\nu < \Delta\nu_j$ tipično je postojanje helatnih ili mostovnih COO^- -grupa;
- vrlo male vrednosti $\Delta\nu$ ukazuju na helatno ili kombinaciju helatnog i mostovnog ponašanja COO^- -grupa.

U dopunu iznetim tvrdnjama, treba imati na umu i sledeće: ako vrednosti $\Delta\nu$ ne odgovaraju stavovima b) i c) ne treba isključiti postojanje mostovnih ili helatnih COO^- -grupa (zbog prisustva vodoničnih veza, preklapanja sa trakama drugih liganada i dr.).

IC-spektri ispitivanih kompleksa poređeni su sa IC-spektrom NaOxa, koji je sintetizovan neutralizacijom Hoxa (slika 28), gde $\Delta\nu_j$ iznosi 144 cm^{-1} ($\nu_{as} = 1576$ i $\nu_s = 1432$ cm^{-1}). Kod spektara svih kompleksa, pikovi COO^- -grupa su široki i pomereni

u odnosu na nekoordinirani NaOxa što je dodatna potvrda uspostavljene koordinativne veze.

$\Delta\nu$ -vrednosti kompleksa **K4** (tabela 8) veće su od vrednosti $\Delta\nu_j$, što ukazuje na monodentatnu koordinaciju COO⁻-grupa u sintetizovanom jedinjenju ili kombinovani način koordinacije i to helatni i (asimetrično) bidentatno-mostovni. Sa druge strane, $\Delta\nu$ -vrednosti kompleksa **K1–K3** i **K5** su manje od $\Delta\nu_j$, što nesumnjivo ukazuje na helatni način koordinacije kod ovih kompleksa.

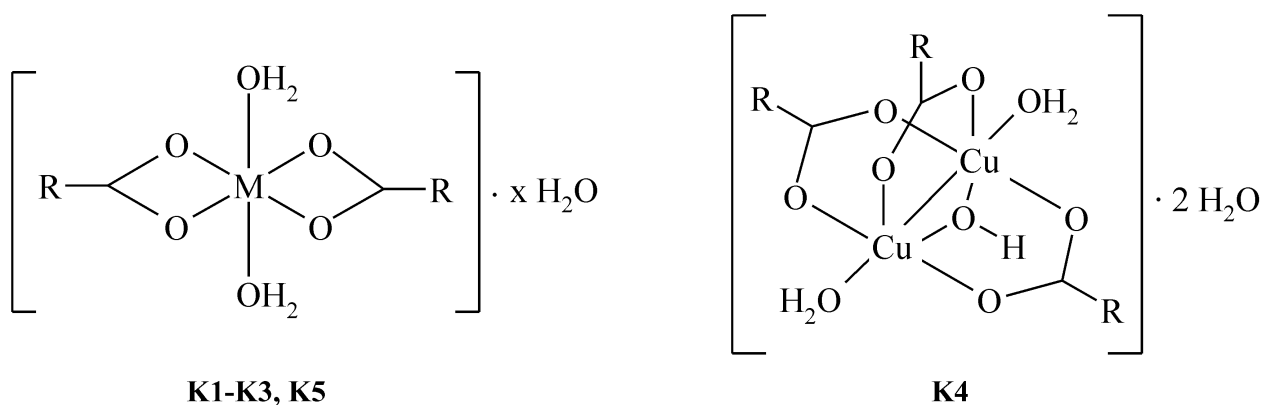
U oblasti ispod 1500 cm⁻¹, poznatoj kao „otisak prsta” (engl. fingerprint region) javljaju se pikovi koji odgovaraju organskim polifunkcionalnim ligandima i koji su karakteristični i jedinstveni za svako jedinjenje. U ovoj oblasti spektri svih kompleksa su međusobno vrlo slični, što se može uzeti kao potvrda prisustva željenog liganda (Hoxa) u svim sintetizovanim kompleksima.

Osim toga, u IC-spektrima svih jedinjenja prisutan je veći broj slabih pikova u oblasti ispod 1000 cm⁻¹. Pojava ovih traka povezana je sa činjenicom da u kompleksima postoje molekuli vode direktno koordinirani za jone metala, mada se ovo ne može sa sigurnošću tvrditi, jer su trake relativno slabog intenziteta.

Kod svih IC-spektara novosintetisanih kompleksa **K1–K5**, u oblasti ispod 500 cm⁻¹ dolazi do pojave nove apsorpcione trake u poređenju sa spektrima Hoxa i NaOxa. Ova nova, slaba po intenzitetu, apsorpciona traka koja se javlja u intervalu od 450 cm⁻¹ do 440 cm⁻¹ može se pripisati vibracijama istezanja M–O veze i na taj način poslužiti kao potvrda koordinacije Oxa⁻-jona kao O,O–donorskog liganda [159].

4.1.3. Geometrija graditelja kompleksa

Geometrija graditelja ispitivanih kompleksa određena je na osnovu boje kompleksa (tabela 8), UV-Vis apsorpcionih spektara (slika 31) i vrednosti magnetnih momenata izmerenih na sobnoj temperaturi (tabela 8). Na osnovu analitičkih i spektralnih podataka, TG analize i pod pretpostavkom da je KB za sve jone prelaznih metala 6, utvrđena je građa svih kompleksa i šematski prikazana na slici 30.



Slika 30. Strukture kompleksa **K1–K5** (M = Mn, Co, Ni, Zn; x = 2 za **K1–K3** i x = 1,5 za **K5**).

Boja i vrednosti magnetnih momenata svih kompleksa nalaze se u opsegu eksperimentalnih vrednosti (poglavlje 2.3.3.) poznatih koordinacionih jedinjenja ispitivanih prelaznih metala sa (deformisanom) oktaedarskom geometrijom (KB = 6).

U skladu sa tim da su većina Mn(II)-kompleksa visokospinski i da u oktaedarskom polju ova konfiguracija omogućava elektronske prelaze takve da je boja kompleksa bela, za kompleks **K1**, dobijeni magnetni moment (tabela 8) i njegova bela boja direktno ukazuju na oktaedarsku građu.

Kao što je bilo očekivano, sintetizovani Co(II)- i Ni(II)-kompleksi su visokospinski, a vrednosti efektivnih magnetnih momenata, μ_{ef} , (tabela 8) za oba kompleksa (**K2** i **K3**) nalaze se u oblasti karakterističnoj za deformisane oktaedarske komplekse (poglavlje 2.3.3.). Za **K2** ova vrednost je veća od vrednosti za spinski moment ($3,88 \mu_{\text{B}}$), što govori u prilog činjenici da postoji manje ili više izraženo učešće orbitalnog magnetnog momenta. Takođe, kod **K3** zbog veće vrednosti μ_{ef} od vrednosti za spinski moment ($2,83 \mu_{\text{B}}$) postoji učešće orbitalnog magnetnog momenta, kao i kod Co(II)-kompleksa. Boje kompleksa **K2** i **K3** u saglasnosti su sa obojenjima većine oktaedarskih Co- i Ni kompleksa (poglavlje 2.3.3.).

Sa druge strane, vrednost efektivnog magnetnog momenta jedinjenja **K4** značajno je niža od vrednosti za spinski moment ($1,73 \mu_{\text{B}}$), što ukazuje na jake antiferomagnetne interakcije između dva susedna Cu(II)-jona. Duta i saradnici [112], dobili su skoro identičnu vrednost za magnetni moment za veoma slični Cu(II)-

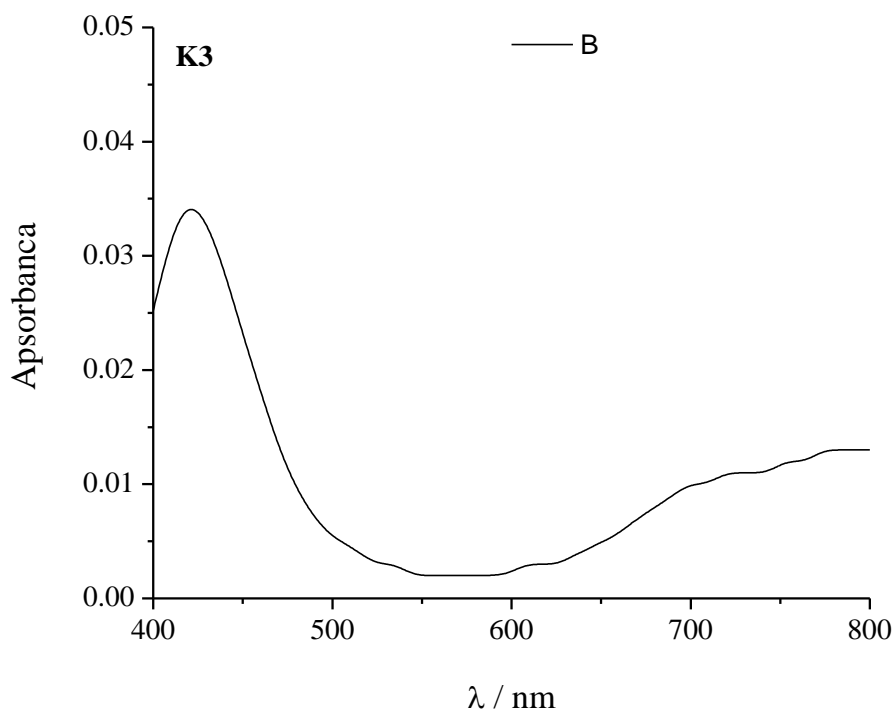
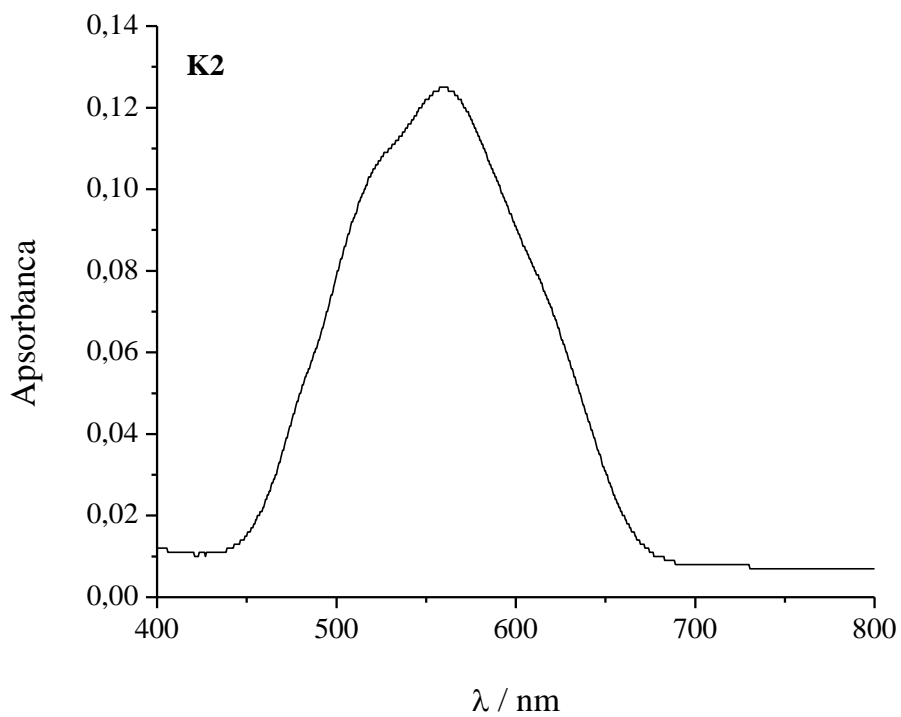
kompleks opšte formule $[\text{Cu}_2(\text{DMSO})_2(\text{oxa})_4]$ za veoma malo Cu–Cu rastojanje od 2,61 Å.

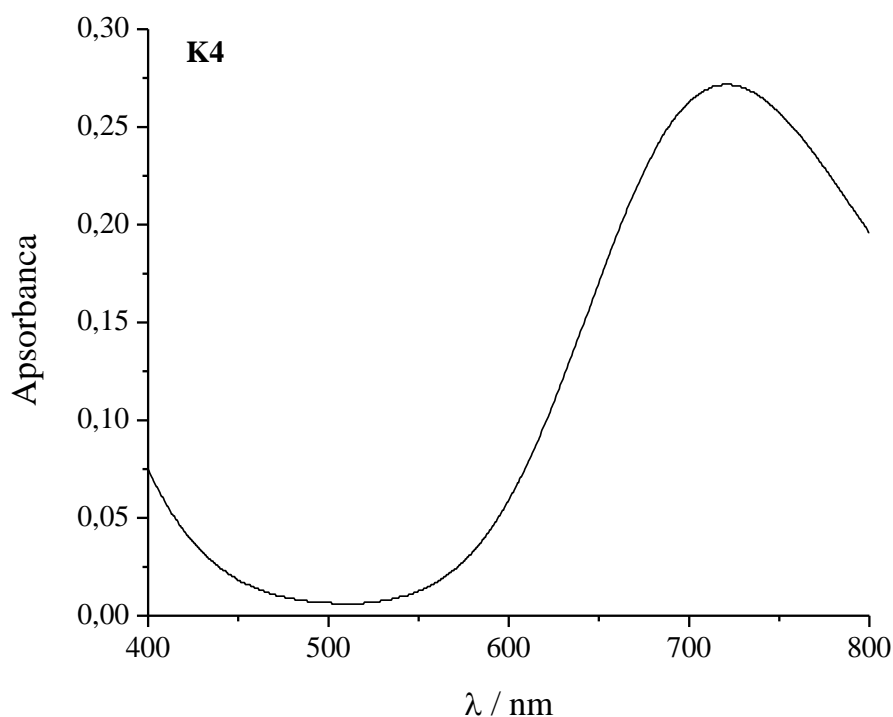
Analizom UV-Vis apsorpcionih spektara (slika 31) dobijena je dodatna potvrda u vezi sa geometrijom graditelja kompleksa [160]. UV-Vis spektroskopska analiza nije rađena za jedinjenja **K1** i **K5** zbog njihove bele boje.

UV-Vis apsorpcioni spektar za **K2** definisan je sa jednim širokim pikom, pod kojim su nakon izvršene dekonvolucije definisana četiri pika (jedan dominantan pik sa maksimumom na 560 nm i tri ramena (engl. shoulders) na 478 nm, 510 nm i 621 nm). U elektronskom spektru kompleksa **K2** najviši energetski prelaz ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{T}_{1g}(\text{P})$, koji je karakterističan za deformisanu oktaedarsku geometriju Co(II)-jona, uočen je na talasnoj dužini od 478 nm. Traka kojoj odgovaraju zabranjeni prelazi dva elektrona (engl. two-electron transition) pojavljuje se na 621 nm kao desno rame. Takođe, mogu se primetiti spin-dozvoljeni prelazi koji su pripisani ${}^4\text{T}_{1g}(\text{F}) \rightarrow {}^4\text{A}_{2g}(\text{F})$ energetskom prelazu na 560 nm i još jedan spin-zabranjen prelaz na 510 nm koji potiče iz ${}^2\text{G}$ stanja.

Kod jedinjenja **K3** uočene su tri apsorpcione trake: ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{P})$ energetski prelaz na 422 nm, ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{1g}(\text{F})$ energetski prelaz na 714 nm i ${}^3\text{A}_{2g} \rightarrow {}^3\text{T}_{2g}$ energetski prelaz na 790 nm, koji pokazuju deformisano oktaedarsko okruženje oko Ni(II)-jona.

U elektronskom spektru jedinjenja **K4** dobijena je umereno jaka, široka i asimetrična apsorpciona traka na 721 nm. Pozicija ove apsorpcione trake ukazuje na O_6 hromoforu sa D_2 ili C_{2v} simetrijom.





Slika 31. UV-Vis apsorpcioni spektri jedinjenja **K2–K4**.

Rezultati dobijeni detaljnom analizom UV-Vis apsorpcionih spektara, izračunati magnetni momenati i boje sintetizovanih jedinjenja nesumnjivo potvrđuju oktaedarsku ili deformisanu oktaedarsku koordinacionu geometriju kod svih kompleksa (**K1–K5**) kao što je prikazano na slici 30.

U nastavku istraživanja sintetisan je monokristal kompleksa Cu sa Hoxa (*mono-K4*) kako bi se detaljnije analizirala struktura kompleksa. Monokristal je sintetisan po postupku navedenom u poglavlju 3.1.2. Kako se postupci sinteze *mono-K4* i **K4** dosta razlikuju, može se očekivati da se struktura monokristala i pretpostavljena struktura za kompleks **K4** razlikuju. Nakon izvršenih preliminarnih ispitivanja monokristala može se zaključiti da je dobijeno novo jedinjenje (*mono-K4*) čija je struktura dosta slična strukturi koju je Duta et al. [112] objavio i koja je prikazana u poglavlji 2.2.1.

4.1.4. Biološka studija

Prvi korak u biološkoj karakterizaciji svih ispitivanih jedinjenja (Hoxa, **K1–K5**) jeste evaluacija njihove nespecifične citotoksične aktivnosti. U ovom delu istraživanja pokazano je da sva sintetizovana jedinjenja ne ispoljavaju citotoksičan efekat (nespecifično ubijanje ćelija) prema peritonealnim makrofagima (rezultati nisu prikazani). Na ovaj način stekli su se neophodni uslovi kako bi se nastavilo sa daljim istraživanjima u vezi sa potencijalnom antiproliferativnom aktivnošću Hoxa i sintetizovanih kompleksa.

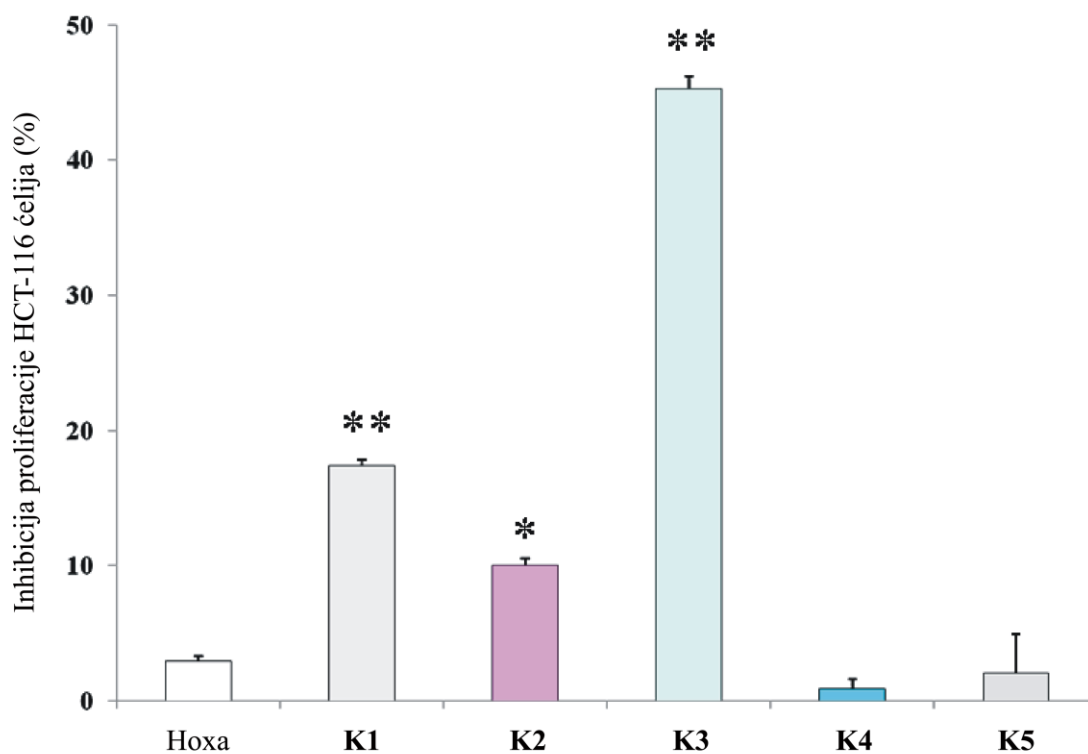
Antiproliferativni efekat liganda Hoxa i novih kompleksa **K1–K5** ispitivan je prema ćelijskim linijama humanog karcinoma kolona (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231), humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i melanoma (Fem-x) u opsegu koncentracija 0,001–50 μM tokom 48 h.

Statistički značajnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji humanog karcinoma debelog creva HCT-116, Hoxa je ispoljio samo u opsegu koncentracija 0,1–10 μM (tabela 9). Antiproliferativna aktivnost Hoxa pri najvišoj koncentraciji od 50 μM nije mogla da se izmeri zbog problema pri rastvaranju Hoxa u medijumu korišćenom za ćelisku kultivaciju. Sa druge strane, kompleksi **K1–K3** ispoljili su statistički značajnu aktivnost u celom opsegu ispitivanih koncentracija (tabela 9). Najbolji efekat inhibicije proliferacije HCT-116 ćelija pri najnižoj koncentraciji (0,001 μM) ispoljio je kompleks **K3** (slika 32), pri čemu je stepen inhibicije proliferacije na ovoj koncentraciji najviši u poređenju i sa ostalim vrednostima koje je ovaj kompleks ispoljio (tabela 9). Statistički značajan inhibitorni potencijal prema HCT-116 ćelijama, kompleks **K4** ispoljio je u opsegu koncentracija 1–50 μM , dok je kompleks **K5** svoju antiproliferativnu aktivnost ispoljio samo pri koncentracijama 0,1 μM i 50 μM .

Rezultati inhibitorne aktivnosti Hoxa i **K1–K5** prema drugoj ispitivanoj ćelijskoj liniji, MDA-231, prikazani su u tabeli 9. Statistički značajan inhibitorni efekata Hoxa, **K1**, **K3** i **K4** ispoljili su u celom opsegu ispitivanih koncentracija, dok je **K2** ispoljio svoj biološki potencijal samo pri najvišoj koncentraciji, a **K5** pri koncentraciji od 0,1 μM i 50 μM .

Rezultati prikazani u tabeli 9 ukazuju na značajan antiproliferativan efekat ispitivanih jedinjenja. Povećana antiproliferativna aktivnost koordinacionih jedinjenja pri najnižim koncentracijama, u odnosu na inhibitorni potencijal samog liganda, u

skladu je sa literaturnim podacima i očekivanjima da kompleksi prelaznih metala sa odgovarajućim ligandom poseduju značajno bolja biološka svojstva (poglavlje 2.1.3. i 2.2.1.). Posebno treba istaći odličnu antiproliferativnu aktivnost **K1** i **K3** prema HCT-116 ćelijskoj liniji, kao i antiproliferativnu aktivnost **K1**, **K3** i **K4** prema MDA-231 ćelijskoj liniji za ceo set ispitivanih koncentracija.



Slika 32. Antiproliferativni efekat Hoxa i **K1–K5** prema HCT-116 ćelijskoj liniji pri koncentraciji od 0,001 μM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; vs. netretirane ćelije.)

Tabela 9. Antiproliferativni efekat jedinjenja Hoxa i **K1–K5** prema HCT-116 i MDA-231 ćelijskim linijama.

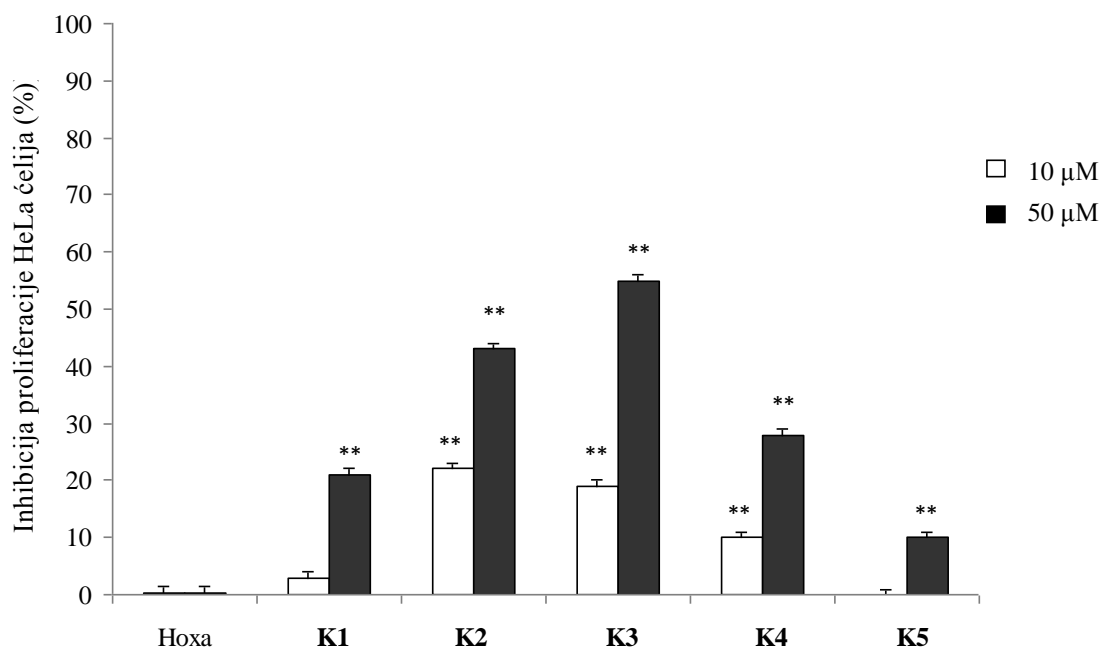
Koncentracija (μM)	Inhibicija proliferacije HCT-116 ćelija (%)					
	Hoxa	K1	K2	K3	K4	K5
0,001	2,9 \pm 0,4	17,4 \pm 0,4 **	10,0 \pm 0,5 *	45,3 \pm 0,9 **	0,9 \pm 0,7	2,0 \pm 2,9
0,01	1,0 \pm 1,2	12,7 \pm 0,8 **	13,5 \pm 0,7 *	7,1 \pm 0,5 *	1,3 \pm 1,4	1,1 \pm 2,25
0,1	15,5 \pm 0,9 *	13,7 \pm 0,3 **	8,9 \pm 0,4 *	19,5 \pm 0,2 **	2,6 \pm 1,1	14,4 \pm 0,68 *
1	32,1 \pm 0,7 **	12,8 \pm 0,6 *	9,6 \pm 0,4 *	14,6 \pm 0,3 **	9,4 \pm 0,3 *	0,8 \pm 1,4
10	52,7 \pm 0,8 **	17,2 \pm 0,3 **	9,9 \pm 0,4 *	27,8 \pm 1,1 *	15,1 \pm 0,6 *	0,9 \pm 0,4
50	– ^a	2,9 \pm 0,4	18,6 \pm 0,9 *	38,1 \pm 0,7 **	25,4 \pm 0,4 **	18,6 \pm 0,4 **
	Inhibicija proliferacije MDA-231 ćelija (%)					
0,01	15,7 \pm 0,5 **	22,8 \pm 0,2 **	4,5 \pm 0,8	17,8 \pm 0,2 *	19,9 \pm 0,1 **	16,5 \pm 0,5 *
1	42,9 \pm 0,4 **	26,7 \pm 0,6 *	12,1 \pm 0,5	19,2 \pm 0,2 *	19,6 \pm 0,4 *	13,1 \pm 0,4
50	– ^a	65,6 \pm 0,2 **	61,4 \pm 0,1 ***	60,5 \pm 0,2 **	52,8 \pm 0,3 ***	41,8 \pm 0,2 ***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. netretirane ćelije.

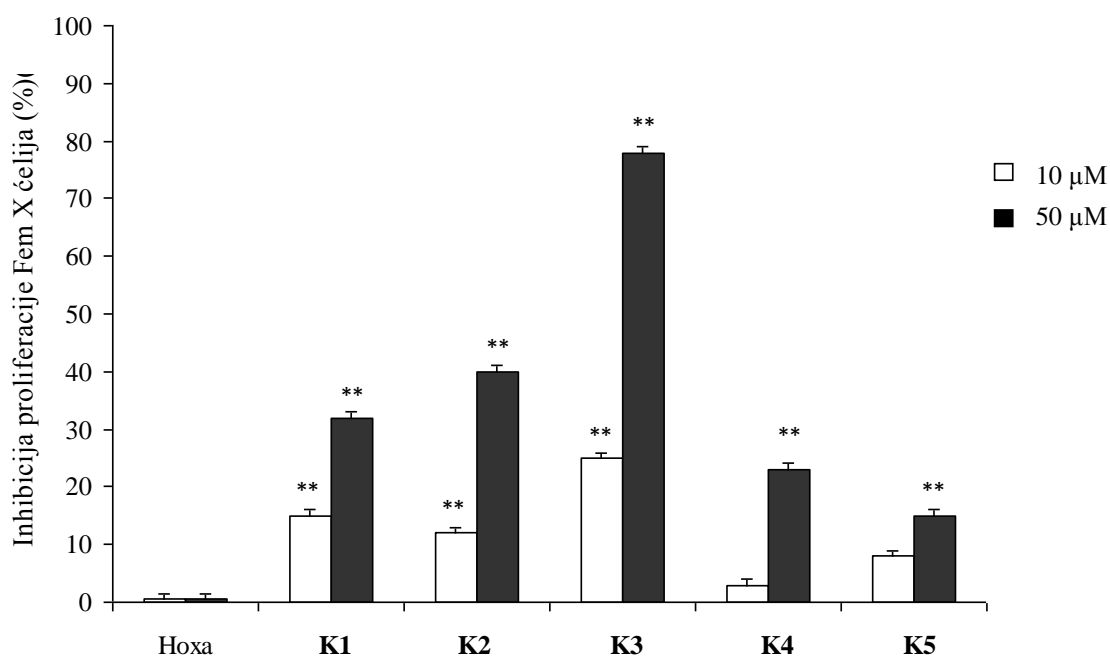
^a Pri ovoj koncentraciji antiproliferativni efekat nije moguće izmeriti zbog slabe rastvorljivosti Hoxa.

Dozno-zavisni antiproliferativni efekat prema HCT-116 ćelijskoj liniji uočen je samo kod Hoxa i **K4**. Jedinjenja **K1–K3** nisu ispoljila dozno-zavisni efekat inhibicije proliferacije, ali njihova odlična antiproliferativna aktivnost u celom opsegu ispitivanih koncentracija (izuzev **K1** pri najvišoj koncentraciji) je izuzetno značajna. Posebno značajan rezultat predstavlja visok stepen inhibicije proliferacije HCT-116 ćelija od 45,3 % koju ispoljava **K3** i to pri nanomolarnoj koncentraciji (0,001 μM). Za ovako neočekivano dobar rezultat koji je pokazao **K3** prema HCT-116 ćelijskoj liniji, može se pretpostaviti da je posledica različitih mogućih mehanizama apoptoze koji su opisani u poglavlju 2, ali konkretni zaključci mogli bi da se donesu tek nakon detaljnih bioloških ispitivanja u vezi sa mehanizmom delovanja ovog kompleksa. Ono što treba istaći, jeste da dozno-zavisni antiproliferativni efekat prema MDA-231 ćelijskoj liniji ispoljavaju sva ispitivana jedinjenja osim **K2** i **K5**.

U nastavku istraživanja bioloških svojstava sintetizovanih jedinjenja, na slikama 33 i 34 prikazan je antiproliferativni efekat Hoxa i njegovih kompleksa (**K1–K5**) prema ćelijskim linijama humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i melanoma (Fem-x). Prikazani su samo rezultati pri koncentraciji od 10 μM i 50 μM jer pri nižim koncentracijama (1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM i 0,001 μM) nije utvrđena statistički značajna antiproliferativna aktivnost. Sa slika 33 i 34 uočava se da Hoxa ne ispoljava antiproliferativni efekat na proliferaciju HeLa i Fem X ispitivane ćelijske linije, za razliku od inhibicionog efekta koji je Hoxa ispoljio prema HCT-116 i MDA-231 ćelijskim linijama. Sa druge strane, svi ispitivani kompleksi (**K1–K5**) pokazali su značajan antiproliferativni efekat prema HeLa i Fem X ćelijskim linijama pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (50 μM). U koncentraciji od 10 μM statistički značajan antiproliferativni efekat prema HeLa i FemX ćelijskoj liniji ispoljili su kompleksi **K2** i **K3**, dok je pri istoj koncentraciji antiproliferativni inhibicioni efekat kompleks **K4** ispoljio prema HeLa ćelijama, a kompleks **K1** prema Fem X ćelijama. Analizom antiproliferativnog efekta koji ispoljavaju ispitivani kompleksi, uočava se da kompleks **K3** ispoljava najbolji efekat prema HeLa i Fem X ćelijskim linijama, a odmah za njim po jačini efekta je kompleks **K2**. Kompleksi **K1** i **K4** ispoljavaju sličan antiproliferativni efekat prema HeLa i Fem X ćelijskim linijama, dok kompleks **K5** ima najmanji efekat.



Slika 33. Antiproliferativni efekat Hoxa i **K1–K5** prema HeLa ćelijskoj liniji pri koncentraciji od 10 μM i 50 μM.



Slika 34. Antiproliferativni efekat Hoxa i **K1–K5** prema Fem X ćelijskoj liniji pri koncentraciji od 10 μM i 50 μM.

Sagledavanjem svih dobijenih bioloških podataka u vezi sa antiproliferativnom aktivnošću sintetizovanih molekula, statistički značajni antiproliferativni efekat ispoljila su sva jedinjenja prema barem jednoj od četiri korišćene tumorske ćelijske linije, a da pri tome nije ispoljen nespecifičan citotoksičan efekat prema normalnim peritonealnim makrofagima. Iako Hoxa pripada klasi NSAIL-ova i njegova osnovna primena je u lečenju inflamatornih oboljenja, u ovom delu rada pokazana je njegova moguća potencijalna primena u lečenju karcinoma. Treba dodati da su novosintetisani kompleksi prelaznih metala sa Hoxa, u skladu sa očekivanjima, značajno aktivniji od samog liganda i da lečenje tumora u budućnosti treba da se bazira na primeni koordinacionih jedinjenja. Takođe, treba istaći da se kompleks **K3** najviše istakao po značajnosti i stepenu inhibicije proliferacije kod svih ćelijskih linija, stoga u daljem razvoju potencijalnih antiproliferativnih koordinacionih agenasa, prelazni metal kojem treba posvetiti posebnu pažnju jeste Ni(II).

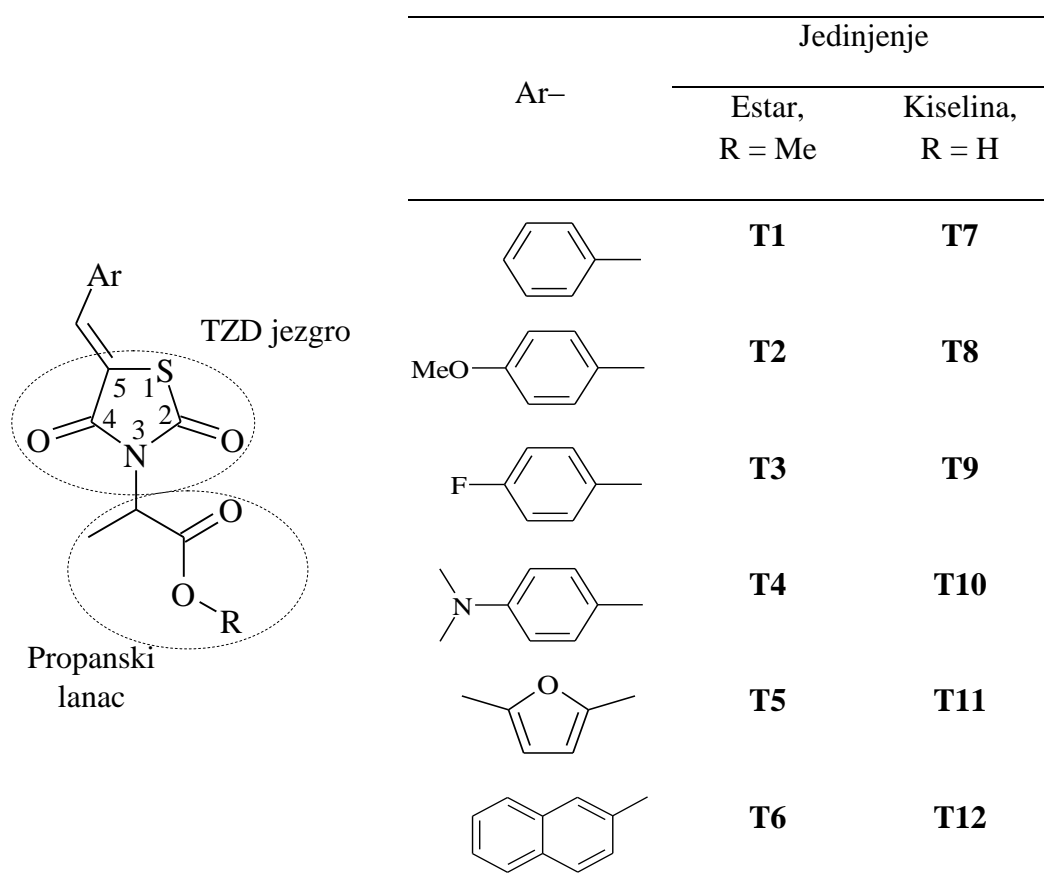
4.2. Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidro- tiazol-3-il)propanskih kiselina i odgovarajućih metil estara

U okviru ovog dela rada, kao i u prethodnom, cilj istraživanja bio je pronalaženje novog antiproliferativnog agensa ili model molekula koji će poslužiti kao osnova za dalji razvoj leka sa željenim antiproliferativnim efektom. Kao što je navedeno u poglavlju 2.4., TZD predstavlja voma interesantno heterociklično jezgro za koje se pokazalo da je odgovorno za brojna biološka svojstva odgovarajućih derivata TZD. Nekoliko studija je, pored osnovne primene TZD kao antidijabetes lekova, pokazalo na njihovu moguću i raznoliku farmaceutsku primenu kao baktericida [161], pesticida [162], fungicida [163], insekticida [164], antiproliferativnih [165] i antikonvulzivnih agenasa [166]. Sa druge strane, derivati propanske kiseline (ibuprofen, naproksen, ketoprofen itd.) koji pripadaju klasi NSAIL-ova (tabela 1), pored svoje osnovne namene kao antiinflamatornih agenasa, pokazali su i značajan potencijal u prevenciji i lečenju tumora.

Imajući u vidu da TZD i NSAIL-ovi mogu indukovati aktivaciju PPAR γ koji učestvuju u apoptozi ćelije (osnovni mehanizam delovanja TZD; COX nezavisni mehanizam delovanja NSAIL-ova), sinteza molekula koji će sadržati TZD jezgro i propanski lanac veoma je obećavajuća, uzimajući u obzir potencijalni kumulativni antiproliferativni efekat ovakvog novosintetisanog molekula.

U ovom delu istraživanja sintetizovana je serija od šest novih 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanskih kiselina i šest njima odgovarajućih metil estara (slika 35). U cilju ispitivanja potencijalnog antiproliferativnog agensa prvi put za sva jedinjenja je određena njihova antiproliferativna aktivnost prema ćelijskim linijama humanog karcinoma kolona (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231) i mijeloidne leukemije (K-562). Dodatno je *in vitro* ispitivana antimikrobna aktivnost sintetisanih molekula prema *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i klinički izolovanim *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*.

Sva jedinjenja (T1–T12) okarakterisana su temperaturom topljenja, elementarnom analizom, FT-IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom i na osnovu analize dobijenih podataka nesumnjivo su potvrđene njihove strukture (odjeljak 3.2.).



Slika 35. Hemijske strukture derivata 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanske kiseline (**T1–T12**).

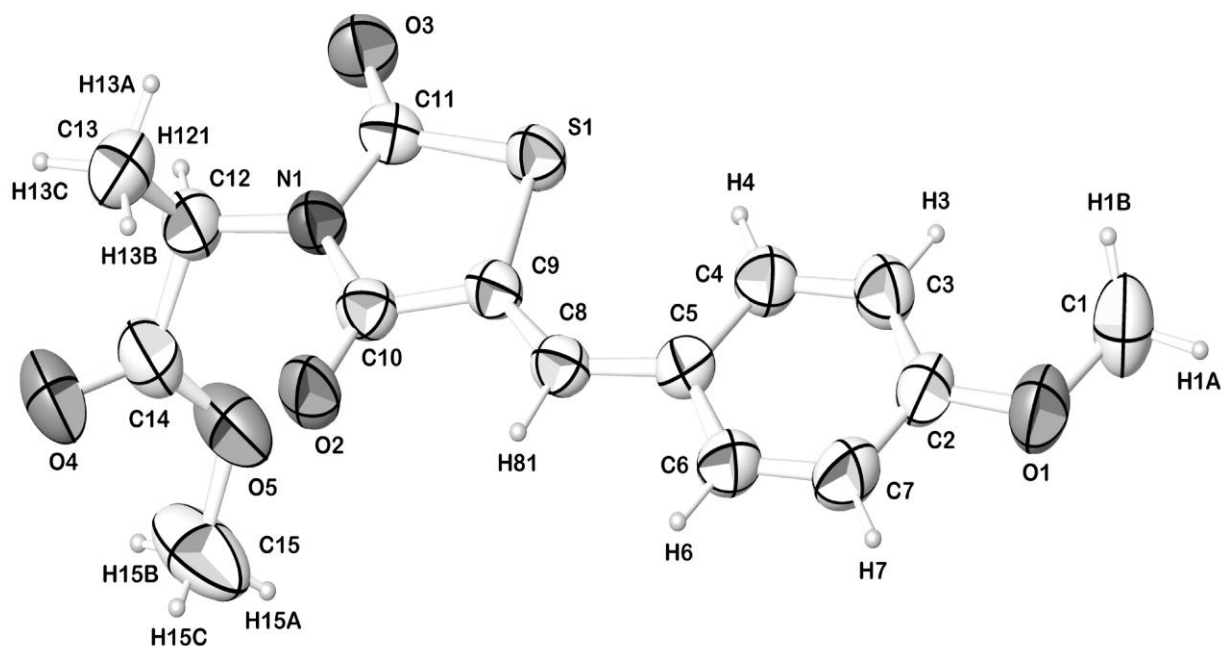
4.2.1. Kristalna struktura metil-2-(5-(4-metoksifenil)metilen-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propionata

U nastavku istraživanja izvršena je rendgenska strukturna analiza sintetizovanog monokristala **T2**, koja služi kao finalna potvrda strukture molekula. Iz podataka dobijenih rendgenskom strukturnom analizom, može se diskutovati o konfiguraciji samog molekula i na osnovu toga zaključiti o istom ili sličnom obrascu ponašanja cele klase jedinjenja.

Kristalografski podaci su prikazani u tabeli 10. Molekulska struktura jedinjenja **T2** sa označenim atomima prikazana je na slici 36.

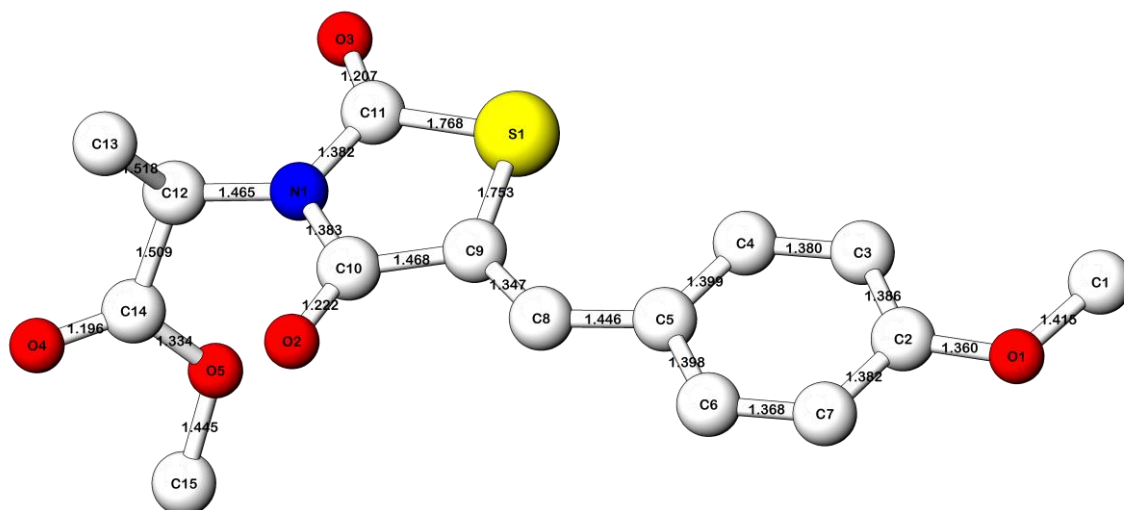
Tabela 10. Kristalografski podaci za jedinjenje **T2**.

Hemijska formula	$C_{15}H_{15}NO_5S$
M_r	321,34
Talasna dužina (Å)	0,71073
Kristalni sistem	Rombični
Prostorna grupa	<i>Pbcn</i>
a (Å)	16,7715(4)
b (Å)	7,5358(8)
c (Å)	24,9575(13)
V (Å ³)	3154,3(4)
Z	8
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1,353
$F(000)$	1344
Dimenzija kristala (mm ³)	0,17 × 0,08 × 0,07
Absorpcioni koeficijent (mm ⁻¹)	0,227
Granični Milerovi indeksi	$-20 \leq h \leq 20, -9 \leq k \leq 7, -30 \leq l \leq 30$
Broj izmerenih / nezavisnih refleksija	19033 / 2981 [$R(\text{int}) = 0,0365$]
Interval za prikupljene refleksije (°)	2,03 – 25,68
Primećene refleksije / ograničenja / parametri utičnjavanja	2981 / 0 / 207
Faktor slaganja, S	1,149
$R [I > 2\sigma(I)]$	$R_1 = 0,0530, wR_2 = 0,1310$
R (svi podaci)	$R_1 = 0,0614, wR_2 = 0,1378$
$\Delta\rho_{\text{max}} / \Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0,165 / -0,194



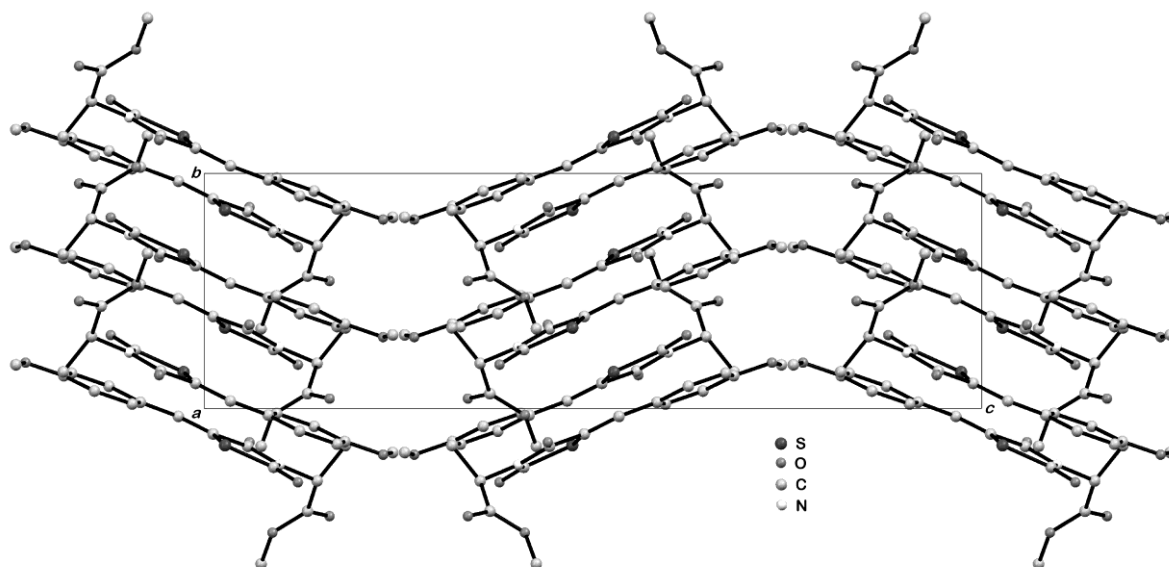
Slika 36. Molekulska struktura jedinjenja **T2** sa oznakama atoma (elipsoidi su prikazani sa verovatnoćom od 50 %). Atomi vodonika su prikazani kao male sfere izabranog prečnika.

Dužine veza (slika 37) i uglovi TZD prstena kod **T2** su slični kao i kod svih jedinjenja koja poseduju TZD jezgro [167]. TZD i Ar prstenovi su gotovo koplanarni sa diedarskim uglom od samo $3,77^\circ$. Postojanje koplanarnosti između ova dva prstena jedan je od glavnih razloga ostvarene delokalizacije elektrona između TZD i Ar jezgra, preko C5–C8 i C8–C9 veza u molekulu. Takođe, zbog postojanja egzociklične dvostuke veze (vinilne) dolazi do konfiguracione izomerije, pri čemu se kod jedinjenja **T2** uočava Z konfiguracija. Sve ove navedene karakteristike mogu se očekivati da su iste kod svih sintetizovanih jedinjenja (**T1–T12**). Pored toga, vrednost ugla između C12/C14/O4/O5 ravni i TZD prstena iznosi $68,93^\circ$. Vrednost torzionog ugla O4–C14–O5–C15 u propanskom lancu iznosi samo $0,54^\circ$, što može biti jedan od glavnih razloga povoljnih bioloških svojstava ove klase jedinjenja.



Slika 37. Dužine veza (Å) između atoma u molekulu **T2**. Atomi vodonika nisu prikazani.

Na slici 38 prikazano je kristalno pakovanje molekula **T2**. U kristalnoj rešetki molekuli su međusobno povezani van der Valsovim silama gradeći talasaste pseudo-lance duž *a*-ose. Pseudo-lanci se povezuju gradeći trodimenzionalnu mrežu preko slabih π - π interakcija tipa „licem u lice“ (engl. face to face) koje se ostvaruju između Ar prstenova (najkraće rastojanje između Ar prstenova susjednih molekula C3–C7 iznosi 3,384(4) Å) i TZD jezgara susjednih molekula (najkraće rastojanje između TZD jezgara susjednih molekula S1–C9 iznosi 3,576(2) Å).



Slika 38. Prikaz pakovanja jedinjenja **T2** duž *a*-ose (*c*-osa je horizontalna).

4.2.2. Biološka studija

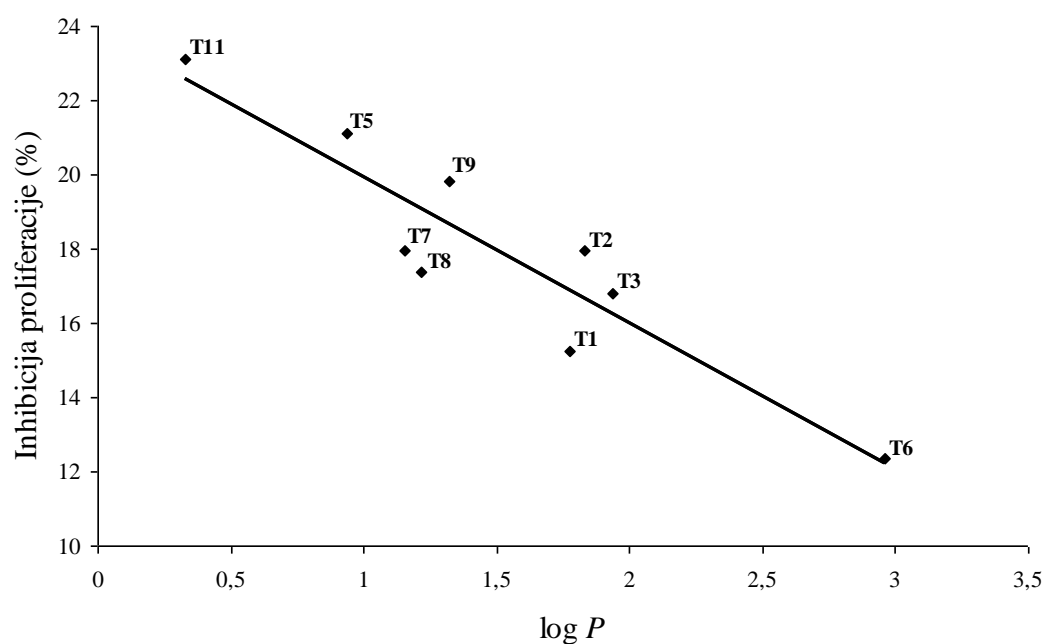
Prvi korak u biološkoj karakterizaciji ispitivanih jedinjenja (**T1–T12**) bila je evaluacija njihove nespecifične citotoksične aktivnosti. U ovom delu istraživanja pokazano je da sva sintetizovana jedinjenja ne ispoljavaju citotoksičan efekat (nespecifično ubijanje ćelija) prema peritonealnim makrofagima (rezultati nisu prikazani) i da su na taj način stekli neophodan uslov kako bi se nastavilo sa daljim istraživanjima u vezi sa njihovom potencijalnom antiproliferativnom aktivnošću.

Antiproliferativni efekat supstanci **T1–T12** ispitivan je prema ćelijskim linijama humanog karcinoma debelog creva (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231) i mijeloidne leukemije (K-562) u opsegu koncentracija 0,01–100 μM tokom 24 h.

Sva proučavana jedinjenja, izuzev **T1** i **T8** pri najnižoj koncentraciji (0,01 μM), ispoljavaju statistički značajnu antiproliferativnu aktivnost prema ćelijskoj liniji humanog karcinoma debelog creva HCT-116 u celom opsegu ispitivanih koncentracija (tabela 11). Analizom korelacija između koncentracije jedinjenja i stepena inhibicije proliferacije ćelija koju je to jedinjenje izazvalo, kao i upoređivanjem korelacija odgovarajućih parova, ester / kiselina, uočeno je da je u svim slučajevima dobijeno da je koeficijent korelacije (R) za estere u odnosu na odgovarajuće kiseline veći (za sva ispitivana jedinjenja R je veći od 0,90). Kod para **T1** / **T7**, pokazana je eksponencijalna zavisnost koja ukazuje na dozno-zavisni efekat ovih jedinjenja. Takođe, parovi **T4** / **T10**, **T5** / **T11** i **T6** / **T12** poseduju dozno-zavisni antiproliferativni efekat jer je pokazana linearna zavisnost. Sa druge strane, kod parova **T2** / **T8** i **T3** / **T9** dobijena je kvadratna funkcionalna zavisnost između koncentracije i stepena inhibicije proliferacije, što bi moglo ukazati na različite mehanizme delovanja pri nižim i višim koncentracijama. Moglo bi se pretpostaviti da parovi **T2** / **T8** i **T3** / **T9** pri višim koncentracijama pokazuju dozno-zavisni antiproliferativni efekat i da ispoljavaju isti mehanizam delovanja kao ostali ispitani parovi, a da pri nižim koncentracijama svoj antiproliferativni efekat ispoljavaju po potpuno drugim mehanizmima.

U literaturi su poznati brojni pokušaji uspostavljanja veze između biološke aktivnosti molekula i nekog fizičko-hemijskog parametra koji opisuje taj molekul. Sposobnost organskih molekula da uspostavljaju vodonične veze (hidrofilne ili lipofilne karakteristike molekula) značajno utiču na mnoga njihova svojstva, uključujući

rastvorljivost u vodi, intestinalnu apsorpciju, nespecifično vezivanje za proteine plazme i sl. Lipofilnost proučavanih jedinjenja procenjena je izračunavanjem vrednosti $\log P$ (particioni koeficijent za sistem oktanol–voda) primenom programskog paketa Molinspiration Property Calculator. Ispitivanjem korelacije izračunate vrednosti $\log P$ i stepena inhibicije proliferacije ćelija koju su ispitivana jedinjenja izazvala pokazana je linearna zavisnost (slika 39, jednačina 5). Zadovoljavajući korelacioni koeficijent dobijen je samo u analizi ispitivanih jedinjenja pri koncentraciji od 50 μM (iz korelacije su isključena jedinjenja **T4**, **T10** i **T12**). Neuspelo uspostavljanje linearne funkcije za ostale ispitivane koncentracije može biti posledica različitih mehanizama delovanja jedinjenja pri istim uslovima (u prethodnom pasusu objašnjeno) ili da faktor lipofilnosti nije jedini faktor koji utiče na opisivanje i uspostavljanje korelacije između biološke aktivnosti i strukture jedinjenja.



Slika 39. Korelacija inhibicije proliferacije (IP) ćelija i $\log P$ pri koncentraciji od 50 μM (iz korelacije su isključena jedinjenja **T4**, **T10** i **T12**).

$$IP = -3,942 (\pm 0,6198) \cdot \log P + 23,868 (\pm 1,0240) \quad (5)$$

$$R = 0,923; F = 40; sd = 1,305; n = 9$$

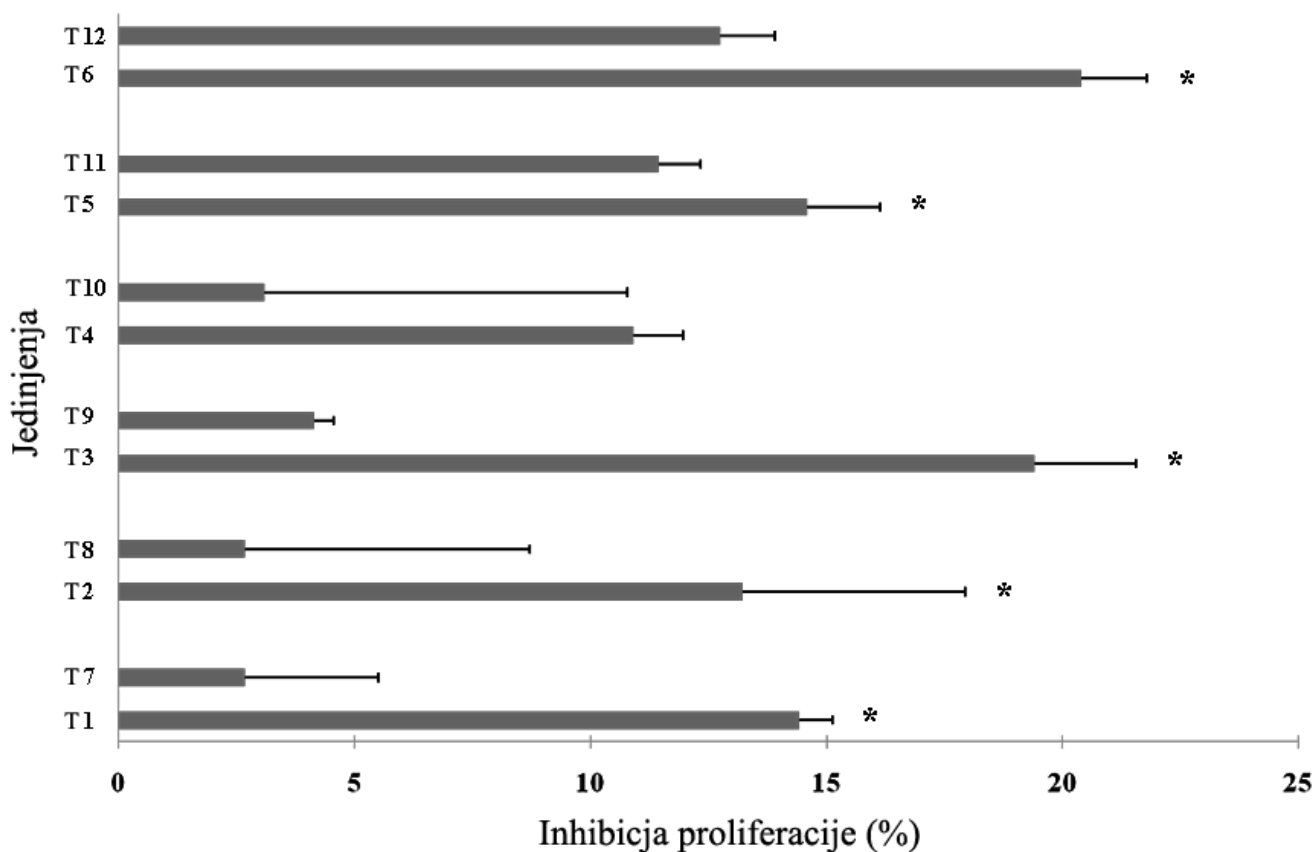
(R -korelacioni koeficijent; F -Fišerov test; sd -standardna devijacija; n -broj jedinjenja)

Table 11. Antiproliferativni efekat jedinjenja **T1–T12** prema HCT-116 ćelijskoj liniji.

No. / Konc.	Inhibicija proliferacije HCT-116 ćelija (%)					
	100 μ M	50 μ M	10 μ M	1 μ M	0,1 μ M	0,01 μ M
T1	16,69 \pm 2,89 *	15,24 \pm 2,35 *	11,27 \pm 4,69 *	10,85 \pm 4,02 *	8,66 \pm 2,59 *	4,80 \pm 0,50
T2	16,90 \pm 1,88 *	17,97 \pm 6,16 *	9,67 \pm 2,70 *	10,32 \pm 2,41 *	14,65 \pm 2,49 *	11,15 \pm 3,58 *
T3	15,18 \pm 1,48 *	16,79 \pm 1,69 *	13,35 \pm 2,66 *	14,12 \pm 1,97 *	9,79 \pm 3,80 *	11,51 \pm 3,48 *
T4	36,06 \pm 1,95 *	25,86 \pm 3,46 *	14,83 \pm 5,54 *	19,45 \pm 3,24 *	17,02 \pm 2,78 *	13,94 \pm 0,67 *
T5	32,80 \pm 1,25 *	21,12 \pm 5,46 *	15,60 \pm 2,11*	12,69 \pm 3,70 *	11,98 \pm 2,00 *	11,80 \pm 3,73 *
T6	27,76 \pm 7,76 *	12,34 \pm 2,20 *	11,15 \pm 4,26 *	12,63 \pm 2,16 *	9,02 \pm 4,47 *	10,79 \pm 2,85 *
T7	17,32 \pm 3,82 *	21,35 \pm 2,14 *	14,53 \pm 6,05 *	15,30 \pm 4,27 *	13,52 \pm 2,27*	9,55 \pm 3,34 *
T8	18,27 \pm 1,78 *	17,38 \pm 4,11 *	6,47 \pm 1,79 *	7,83 \pm 1,85 *	11,33 \pm 4,47 *	6,76 \pm 2,26
T9	18,86 \pm 7,18 *	19,81 \pm 6,27 *	12,75 \pm 5,05 *	17,91 \pm 0,54 *	12,10 \pm 2,74 *	13,05 \pm 4,58 *
T10	25,74 \pm 0,54*	28,05 \pm 4,52 *	20,11 \pm 6,03 *	14,89 \pm 2,29 *	13,94 \pm 4,92 *	16,31 \pm 4,22 *
T11	25,62 \pm 0,47 *	18,86 \pm 4,68 *	16,79 \pm 4,52 *	23,13 \pm 4,93 *	18,92 \pm 3,47 *	14,23 \pm 3,02 *
T12	8,24 \pm 3,60 *	7,83 \pm 0,62 *	4,03 \pm 1,87 *	11,98 \pm 4,04 *	12,81 \pm 2,05 *	12,63 \pm 2,02 *

* p < 0,05 vs. netretirane ćelije

Sa druge strane, statistički zadovoljavajuća inhibitorna aktivnost proliferacije MDA-231 ćelijske linije, uočena je samo kod određenog broj ispitivanih jedinjenja i to samo pri najvišoj koncentraciji (100 μ M). Kao što je i pokazano na slici 40, estri **T1–T3**, **T5** i **T6** ispoljavaju značajan antiproliferativni efekat prema MDA-231 ćelijskoj liniji, za razliku od odgovarajućih kiselina. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno urađenom analizom kod HCT-116 ćelijske linije, gde je pokazano da estri poseduju bolji antiproliferativni potencijal u odnosu na kiseline. Takođe, može se primetiti da je stepen inhibicije niži u poređenju sa inhibitornim efektom istih jedinjenja prema HCT-116 ćelijskoj liniji.



Slika 40. Antiproliferativni efekat proučavanih jedinjenja (**T1–T12**) prema MDA-231 ćelijskoj liniji pri koncentraciji od 100 μ M (* $p < 0,05$ vs. netretirane ćelije).

Kod treće ćelijske linije (K-562) koja je korišćena u istraživanju antiproliferativnog efekta sintetizovanih jedinjenja (**T1–T12**) dobijen je isti trend

biološke aktivnosti kao i kod prethodne dve ćelijske linije. Statistički značajni antiproliferativni efekti pri koncentraciji 100 μM dobijeni su za sledeća jedinjenja: **T1** (10 %), **T3** (4 %), **T5** (12 %), **T6** (12 %), **T9** (3 %) i **T12** (8 %). Takođe, treba naglasiti da je jedinjenje **T1** pokazalo statistički značajne rezultate pri koncentracijama 50 μM (8 %) i 10 μM (7 %), jedinjenje **T5** u svim koncentracijama osim pri najnižoj [50 μM (10 %), 10 μM (6 %), 1 μM (6 %), 0,1 μM (3 %)], a jedinjenje **T12** pri koncentracijama 50 μM (6 %), 1 μM (6 %) i 0,1 μM (10 %).

Sagledavanjem svih dobijenih bioloških podataka u vezi sa antiproliferativnom aktivnošću sintetizovanih molekula, statistički značajni antiproliferativni efekat ispoljila su sva jedinjenja prema barem jednoj od tri korišćene tumorske ćelijske linije, a da pri tome nije ispoljen nespecifičan citotoksičan efekat prema normalnim peritonealnim makrofagima. Treba naglasiti da su estri pokazali bolji antiproliferativni efekat u odnosu na njihove odgovarajuće kiseline i da iz tog razloga modelovanje postojećih i sintezu novih jedinjenja treba razvijati u tom smeru.

Pored ispitivanja antiproliferativne aktivnosti, dodatno je ispitana potencijalna antimikrobna aktivnost svih sintetizovanih jedinjenja (**T1–T12**) prema standardnim sojevima *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i klinički izolovanim slojevima *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*, ali očekivani antimikrobne efekat nije pokazao nijedan sintetizovan molekul.

4.3. Elektrohemijska karakterizacija oksaprozina na elektrodi od zlata i elektrodi modifikovanoj bovin serum albuminom

Iako je Hoxa jedan od najprodavanijih i najefikasnijih NSAIL-ova na Američkom tržištu, kompletna karakterizacija leka, koja uključuje i podatke o elektrohemijskom ispitivanju, nije u potpunosti i do kraja istražena. Postoji nekoliko hromatografskih metoda koje su poznate u literaturi u determinaciji Hoxa i njegovih nečistoća kod komercijalno dostupnih lekova i u biološkim fluidima [168,169]. Elektroforeza, kao kvantitativna metoda za određivanje sadržaja Hoxa, takođe je poznata u literaturi [170].

Međutim, literaturni podaci o elektrohemijskoj aktivnosti Hoxa, kao jedinstvenom pečatu svake supstance, nisu bili poznati do sada. U ovom poglavlju biće opisana prva elektrohemijska karakterizacija Hoxa koja je urađena cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata. Pored toga određena je konstanta vezivanja Hoxa za BSA primenom ciklične voltetrije [171].

Polikristalna elektroda od zlata izabrana je kao optimalna radna elektroda za ispitivanje farmaceutskih jedinjenja. Ona je definisana sa potpuno reproduktivnim cikličnim voltagramima i činjenicom da se sve elektrohemijske reakcije koje se odigravaju na radnoj elektrodi mogu pripisati isključivo ispitivanom molekulu [172,173]. Kao što je opisano u odeljku 3.3, elektroda od zlata se za eksperimente priprema poliranjem, što može da utiče na hrapavost same radne površine. Međutim, promene kod elektrode od zlata nastale usled mehaničkih poliranja mogu se primetiti samo na nano nivou. Upravo iz tog razloga, ciklični voltagrami kod kojih je korišćena elektroda od zlata uvek su identični i mogu se reprodukovati pri istovetnim eksperimentalnim uslovima, za razliku od elektrode od staklastog ugljenika. Kod elektrode od staklastog ugljenika, mehaničko poliranje najčešće dovodi do strukturnih promena na elektrodi koje za posledicu imaju nereproduktivne ciklične voltagrame.

Za elektrohemijsko ispitivanje sintetizovanog Hoxa, njegovog analitičkog standarda i tableta Duraprox[®], kao elektrohemijski inertan medijum (elektrolit) korišćen je rastvor 0,05 M NaHCO₃, čija pH-vrednost od 8,4 značajno olakšava rastvaranje slabo kiselog Hoxa, a pri tome ne utiče na njegovu elektrohemijsku aktivnost. Rastvori ispitivane koncentracije su dodavani jedan po jedan u elektrolit. Za svaku ispitivanu

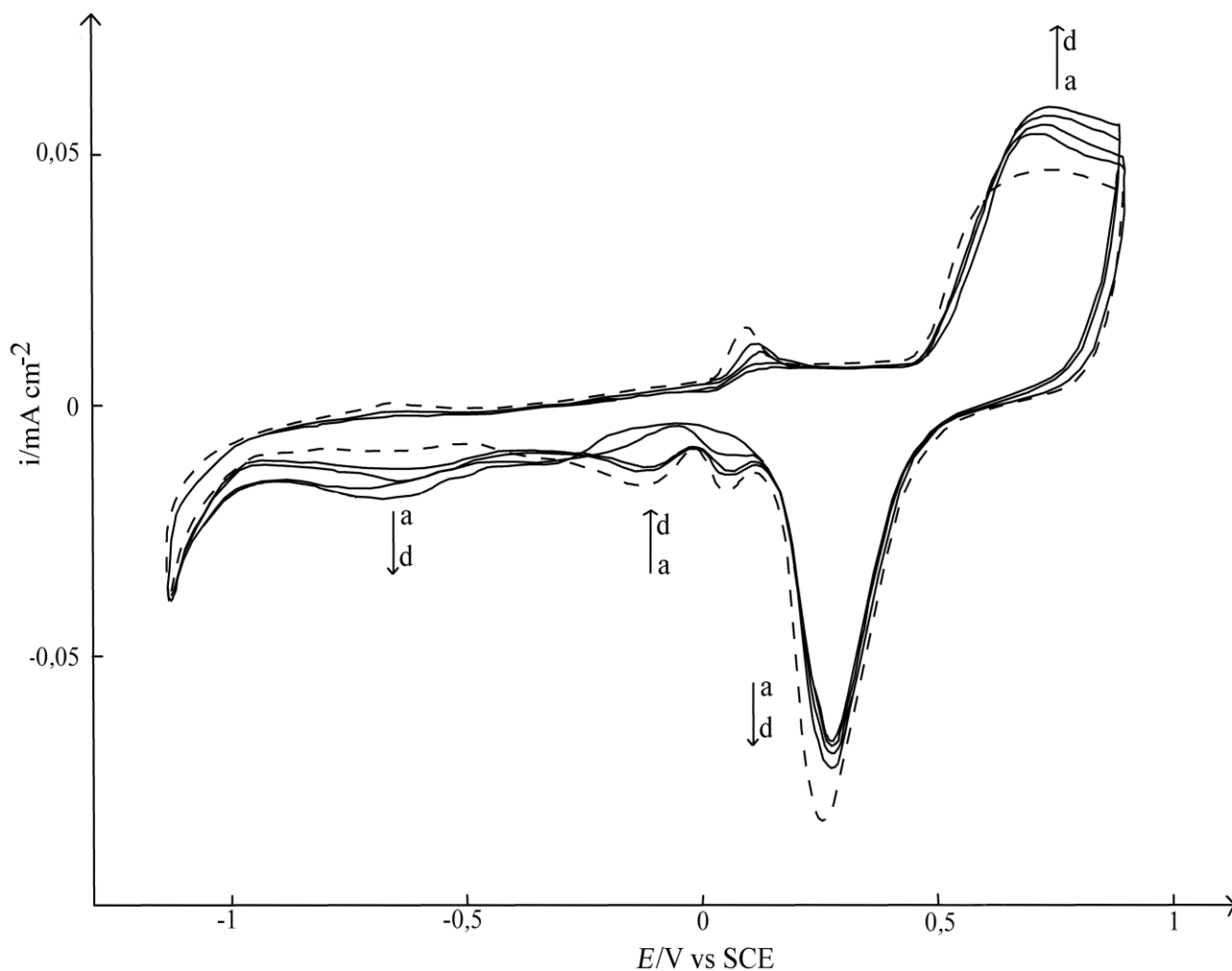
koncentraciju sniman je samo prvi sweep. Između dve analizirane ispitivane koncentracije elektroda nije ponovo čišćena.

Pri elektrohemijским ispitivanjima sintetizovanog Hoxa cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata dobijeni su identični ciklični voltagrami kao i pri elektrohemijском ispitivanju njegovog analitičkog standarda (*Sigma Aldrich*) (na slici 41, prikazani su ciklični voltagrami analitičkog standarda Hoxa). Ovi rezultati ukazuju na izuzetnu čistoću sintetizovanog molekula i efikasnost samog postupka sinteze Hoxa [116].

Nakon dodavanja analitičkog standarda Hoxa, u oblasti potencijala od $-1,10$ V do $+0,90$ V (vs. SCE), na cikličnom voltagramu zapaža se pojava reakcije oksidacije, u oblasti formiranja oksida zlata, sa velikim strujnim anodnim platom u intervalu od $+0,60$ V do $+0,90$ V za sve ispitane i prikazane koncentracije. U poređenju sa čistom elektrodom u povratnom sweep-u, strujni pik reakcije redukcije, na potencijalu $+0,25$ V, koji potiče od oksida zlata, se smanjuje u prisustvu standarda Hoxa, ali ne postoji linearna zavisnost od koncentracije Hoxa. Ovaj pad strujnog pika može biti pripisan reakciji redukcije proizvoda formiranih u anodnom procesu. Takođe, u katodnom pravcu povratnog sweep-a pojavljuju se još dva dodatna strujna pika kao posledica redukcionih reakcija proizvoda formiranih u anodnom procesu kao i samog molekula. Prvi katodni pik se javlja na $-0,20$ V i drugi katodni pik se javlja na $-0,55$ V. Katodni pik na $-0,20$ V, fenomenološki se objašnjava kao posledica redukcije proizvoda nastalih anodnim procesima. Međutim, katodni pik na $-0,55$ V je potpuno nezavisan od formiranih proizvoda oksidacije anodnog pravca. Na ovom potencijalu intenzitet struje se povećava sa povećanjem koncentracije standarda Hoxa ali linearna zavisnost struje od koncentracije nije definisana.

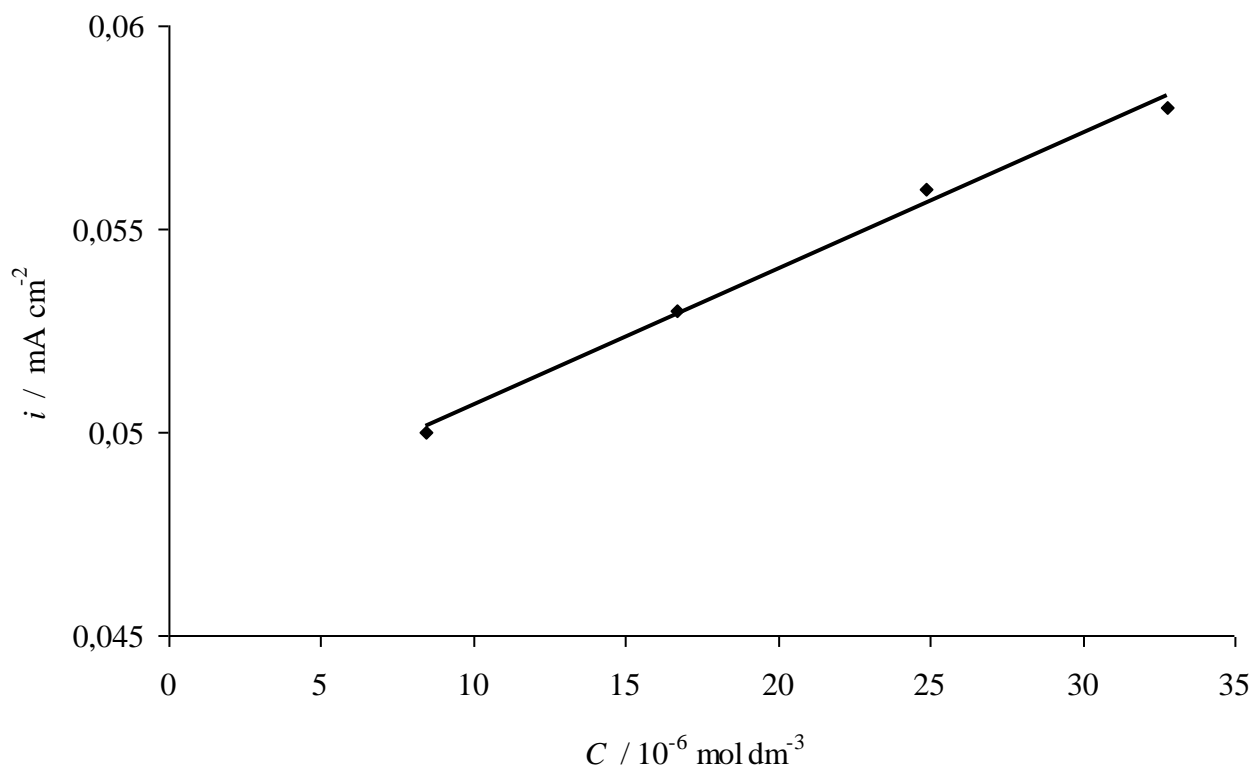
Zavisnost redukcionih pikova od proizvoda formiranih u anodnom pravcu, utvrđena je analizom cikličnog voltagrama u oblasti potencijala od $-1,10$ V do $+0,05$ V (vs. SCE). U ovom opsegu potencijala ne postoji mogućnost formiranja proizvoda oksidacije Hoxa. Katodni pik koji se javljao na $-0,20$ V se nije pojavio pri ovim uslovima, što je direktno ukazalo na vezu između ovog redukcionog pika i anodnih procesa.

Nasuprot njemu, katodni pik na $-0,55$ V se pojavio, na isti način kao i na cikličnom voltagramu u oblasti potencijala od $-1,10$ V do $+0,90$ V, i time pokazao svoju nezavisnost od proizvoda oksidacije formiranih pri višim potencijalima (oblasti potencijala $+0,60$ V do $+0,90$ V).



Slika 41. Ciklični voltamogrami elektrode od zlata u $0,05$ M NaHCO_3 (---) i posle dodavanja analitičkog standarda Hoxa (puna linija) u opsegu koncentracija: $a = 8,44 \cdot 10^{-6}$ M; $b = 16,71 \cdot 10^{-6}$ M; $c = 24,83 \cdot 10^{-6}$ M; $d = 32,78 \cdot 10^{-6}$ M, brzina promena potencijala 50 mV s^{-1} . Sniman je prvi sweep.

Vrednost oksidativnih struja analitičkog standarda Hoxa na potencijalu + 0,83 V (vs, SCE) u 0,05 M NaHCO₃, pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹ je linearna funkcija koncentracija u opsegu 8,44 – 32,78·10⁻⁶ M (slika 42).



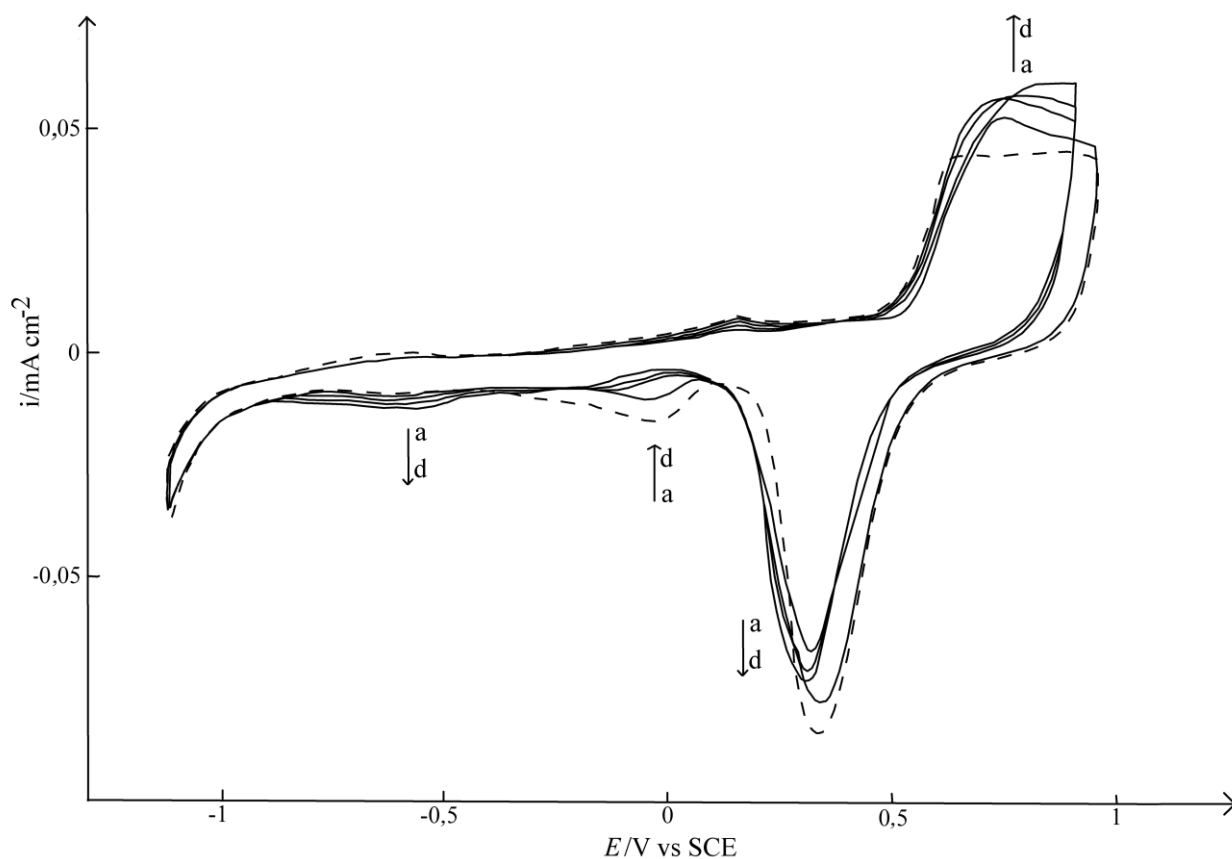
Slika 42. Zavisnost strujnog pika reakcije oksidacije analitičkog standarda Hoxa na potencijalu + 0,83 V od ispitivanih koncentracija u opsegu 8,44 – 32,78 M, pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹.

Linearna zavisnost struja od ispitivanih koncentracija Hoxa prikazana je sledećom jednačinom:

$$i_p = 0,0474 (\pm 0,00044) + 0,0003 (\pm 0,000002) \cdot C \quad (6)$$

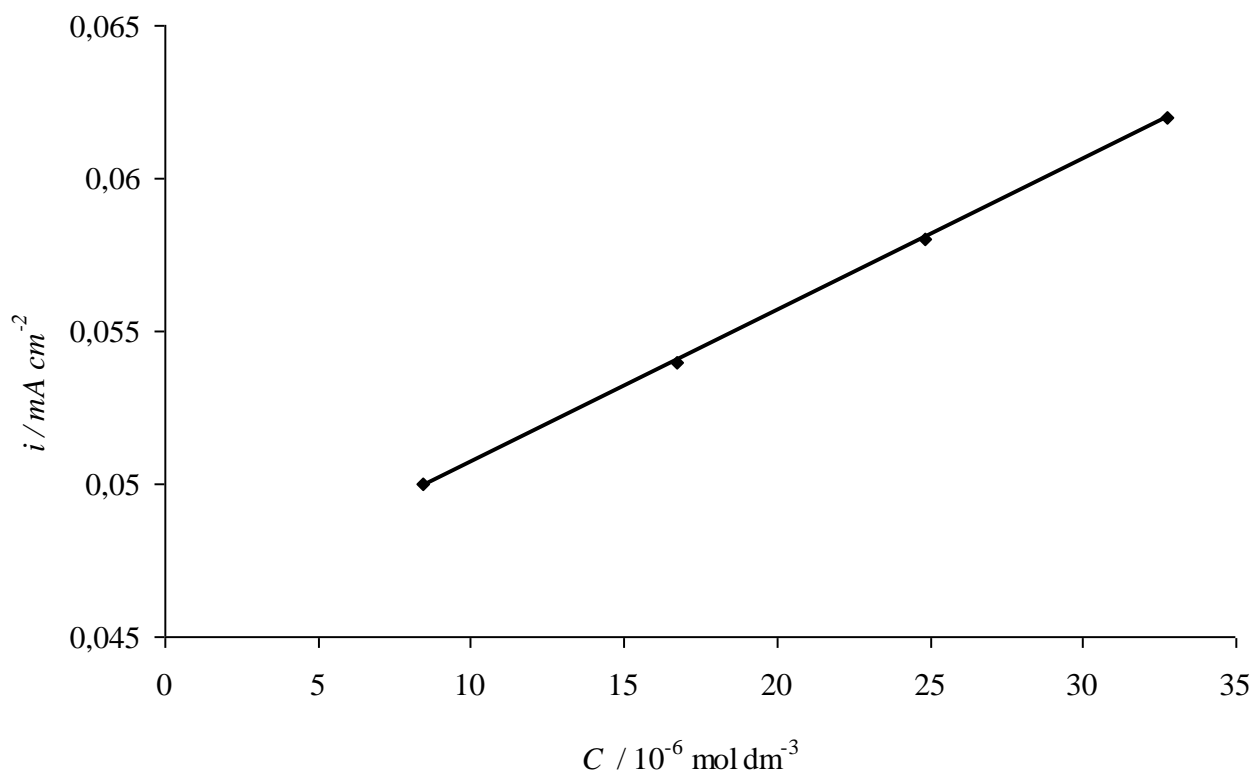
$$R = 0,997; F = 293; sd = 0,00035$$

Pored elektrohemijske karakterizacije analitičkog standarda i sintetizovanog Hoxa, izvršeno je i elektrohemijsko ispitivanje Hoxa kao aktivne supstance u tableti Duraprox[®]. Ciklični voltagrami Hoxa kao standarda i kao aktivne supstance u tableti Duraprox[®] pokazali su identičnu elektrohemijsku aktivnost navedenih supstanci, što nedvosmisleno ukazuje da prisutni ekscipijenti u tableti nemaju nikakav uticaj na elektrohemijsku aktivnost Hoxa. Ekscipijenti su ispitivani odvojeno i nisu pokazali nikakvu elektrohemijsku aktivnost pri eksperimentalnim uslovima u kojima je vršena karakterizacija tableta. Na slici 43 prikazani su ciklični voltagrami Hoxa kao aktivne supstance u tableti Duraprox[®].



Slika 43. Ciklični voltagrami elektrode od zlata u 0,05 M NaHCO₃ (- - -) i posle dodavanja tablete Duraprox[®] (puna linija) u opsegu koncentracija: a = $8,44 \cdot 10^{-6}$ M; b = $16,71 \cdot 10^{-6}$ M; c = $24,83 \cdot 10^{-6}$ M; d = $32,78 \cdot 10^{-6}$ M, brzina promena potencijala $50\ mV\ s^{-1}$. Sniman je prvi sweep.

Analizom anodnih struja Hoxa kao aktivne supstance u tableti Duraprox[®] na potencijalu od + 0,85 V u opsegu koncentracija 8,44 – 32,78 · 10⁻⁶ M utvrđena je koncentraciona zavisnost (slika 44).



Slika 44. Zavisnost anodnih struja reakcija oksidacije Hoxa kao aktivne supstance u tableti Duraprox[®] na potencijalu + 0,85 V od ispitivanih koncentracija u opsegu 8,44 – 32,78 M, pri promeni brzine potencijala 50 mV s⁻¹.

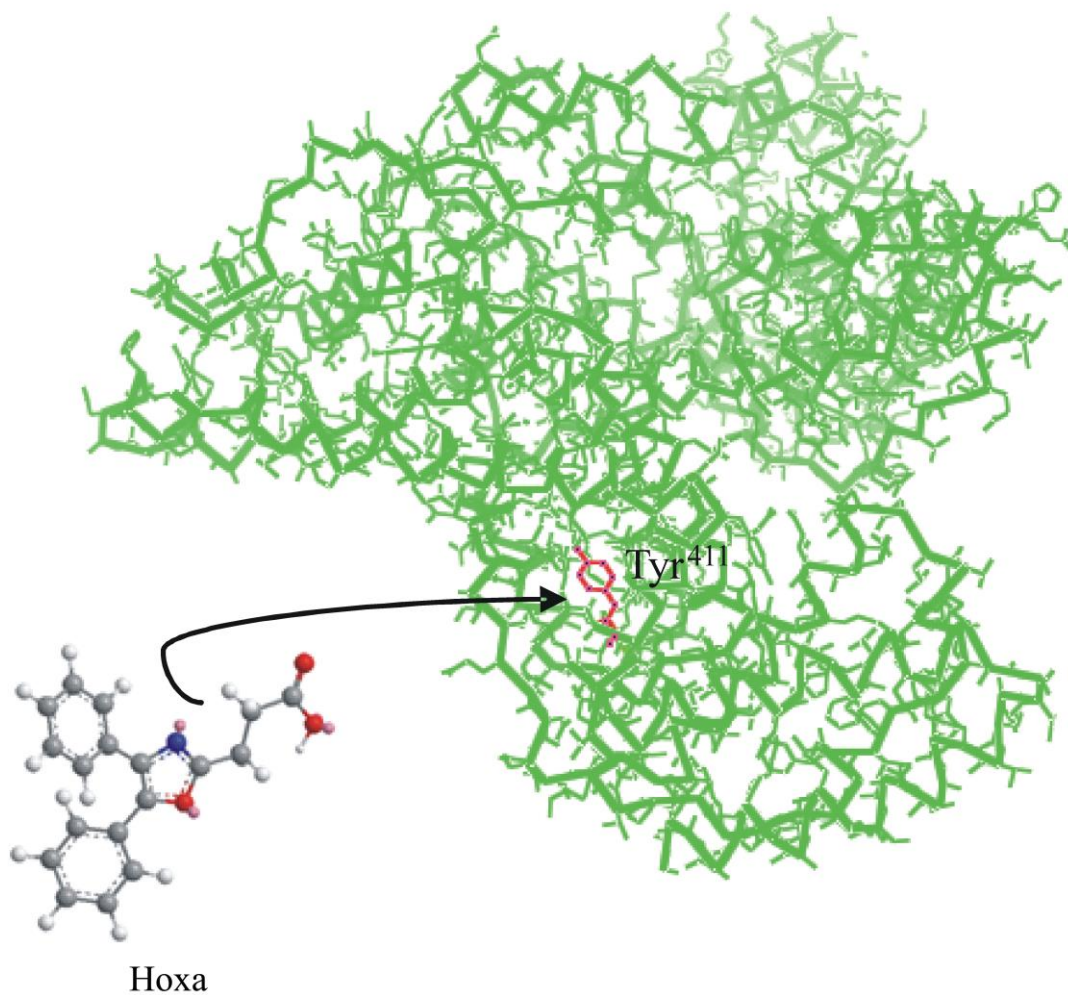
Linearna zavisnost struja od ispitivanih koncentracija Hoxa kao aktivne supstance u tableti Duraprox[®] prikazana je sledećom jednačinom:

$$i_p = 0,0458 (\pm 0,00006) + 0,0005 (\pm 0,000003) \cdot C \quad (7)$$

$$R = 0,999; F = 25697; sd = 0,000005$$

Vezivanje leka za protein ima jednu od odlučujućih uloga na farmakokinetička i farmakodinamička svojstva lekova. Albumin je jedan od najzastupljenijih serum

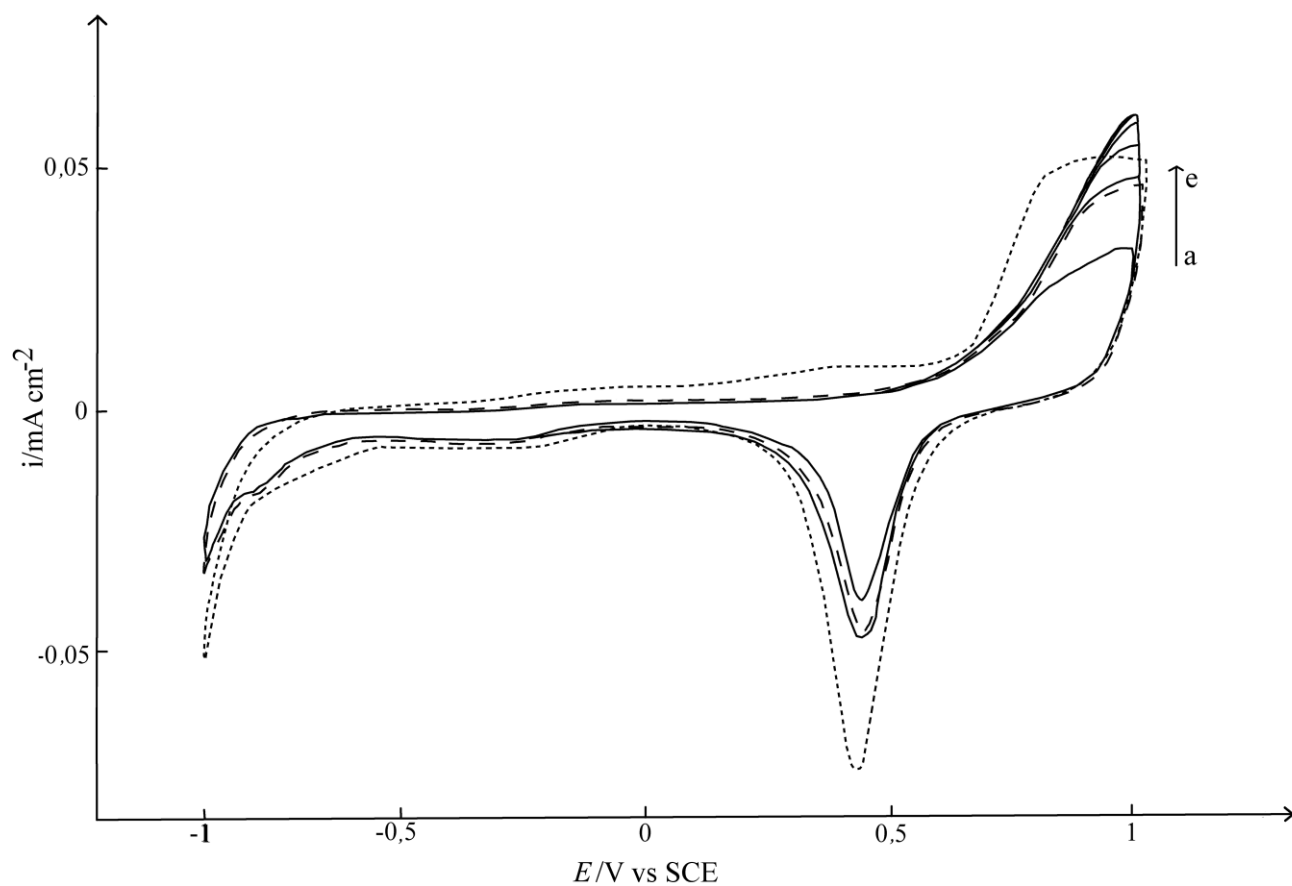
proteina koji služi kao osnovni nosilac lekova pri njihovom transportu kroz krv do različitih ciljnih lokacija. Njegova funkcija kao jednog od osnovnih transportera kroz organizam posledica je njegove odlične rastvorljivosti u plazmi. Amino kiselina za koju se većina lekova vezuje pri transportu ovim serumskim proteinom je tirozin. Uočeno je da tirozinski ostatak na albuminu (Tyr 411, mesto II) deluje kao nukleofil u kovalentnoj interakciji sa Hoxa (slika 45).



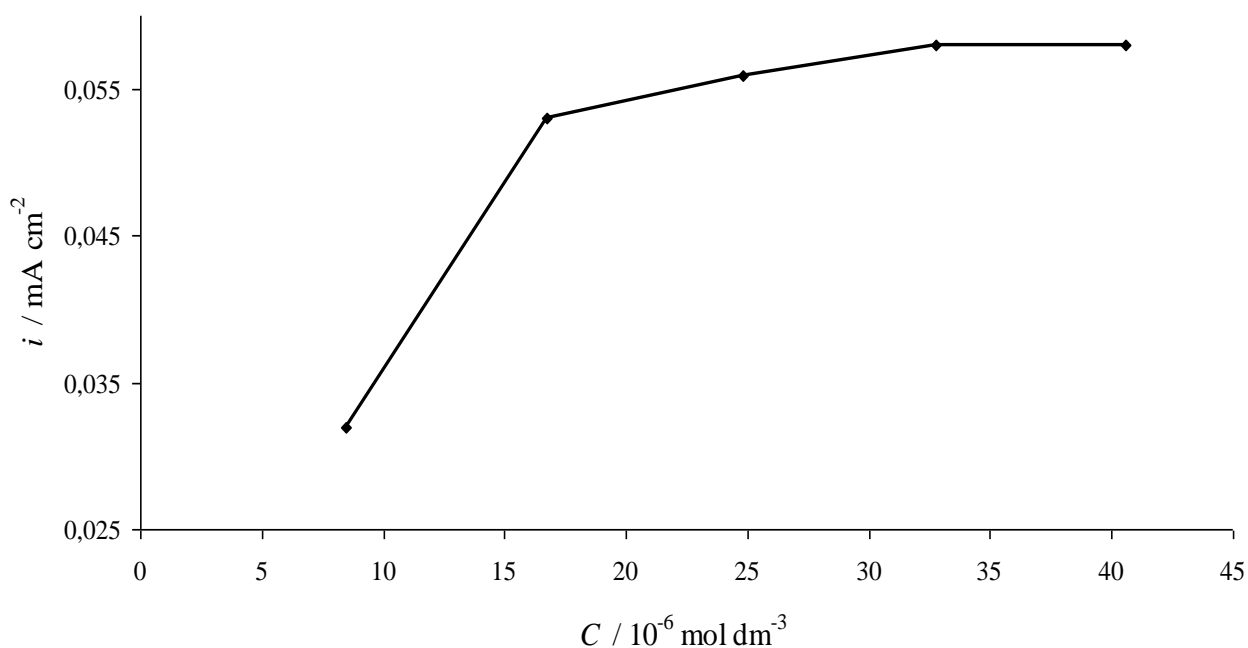
Slika 45. Interakcija Hoxa i serum albumina, 3D struktura proteina dobijena je korišćenjem programa Pymol vs. 0,99 i podataka dobijenih iz banke podataka proteina (engl. Protein Data Bank, PDB), PDB kod serum albumina je 2BXM.

Za definisanje interakcija leka i serum proteina razvijene su različite tehnike, ali još uvek postoji rastuća tendencija ka unapređenju postojećih kao i razvoju novih metoda. Interakcije dva derivata oksaprozina (oksaprozina-E i oksaprozina-P) sa BSA do sada su proučavane spektroskopskim metodama (fluorescencija i UV-Vis spektroskopija) [174,175]. Iako se korišćenjem ovih spektroskopskih metoda dobijaju relativno precizni parametri vezivanja leka za protein i informacije o strukturi proteina nakon vezivanja leka, njihova primena je ograničena zbog nižeg praga osetljivosti i potrebe za većom količinom leka i proteina. Sa druge strane, elektrohemijske metode se smatraju bržim, jeftinijim i superiornijim u odnosu na konvencionalne metode i iz tog razloga u poslednje vreme često se upravo ove metode koriste za istraživanja vezivanja lekova za proteine, kao i za DNK.

Elektroda od zlata je modifikovana adsorpcijom BSA (BSA / Au elektroda) kao što je navedeno u poglavlju 3.2., što je omogućilo definisanje konstante vezivanja Hoxa za BSA primenom ciklične voltometrije. U 0,1 M fosfatnom puferu (pH 7,4) ispitana je koncentraciona zavisnost anodnih struja za analitički standard oksaprozina na BSA / Au elektrodi (slika 46). Na slici 46 jasno se vidi da voltamogram modifikovane BSA / Au elektrode pokazuje nižu vrednost struja u celom opsegu ispitivanog potencijala u odnosu na nemodifikovanu elektrodu od zlata. Ova činjenica direktno ukazuje na jaku adsorpciju BSA na površinu elektrode od zlata. Na slici 46 jasno se vidi da se struje u anodnom delu voltograma postepeno povećavaju sa porastom koncentracije Hoxa u intervalu od $8,44 - 24,83 \cdot 10^{-6}$ M, a da zatim dostiže tačku zasićenja pri koncentraciji $32,78 \cdot 10^{-6}$ M, što ukazuje na to da je vezivanje Hoxa za BSA dostiglo svoju ravnotežu (slika 47).



Slika 46. Ciklični voltamogrami čiste elektrode od zlata (\cdots), modifikovane BSA / Au elektrode ($- - -$) i posle dodavanja analitičkog standarda Hoxa (puna linija) u opsegu koncentracija: a = $8,44 \cdot 10^{-6}$ M; b = $16,71 \cdot 10^{-6}$ M; c = $24,83 \cdot 10^{-6}$ M; d = $32,78 \cdot 10^{-6}$ M; e = $40,59 \cdot 10^{-6}$ M u 0,1 M fosfatnom puferu (pH = 7,4), brzina promena potencijala 50 mV s^{-1} . Sniman je prvi sweep.



Slika 47. Zavisnost anodnih struja reakcija oksidacije analitičkog standarda Hoxa na potencijalu + 0,95 V na BSA / Au elektrodi od ispitivanih koncentracija u opsegu 8,44 – 40,59 M, pri promeni brzine potencijala 50 mV s^{-1} .

Analizom dobijenih voltograma može se zaključiti da se vezivanje Hoxa za BSA ponaša u skladu sa Lengmirovom (Langmuir) adsorpcionom izotermom, pri čemu se može uzeti u obzir da adsorpciona mesta (Tyr 411) nisu dovoljno blizu, tako da slobodna energija adsorpcije ne bi trebalo da zavisi od stepena pokrivenosti. To znači da bi stepen interakcija između adsorbenata trebalo da bude minimalan i da se mogu zanemariti. U skladu sa ovim zaključcima, adsorpciona konstanta (konstanta vezivanja) Hoxa na modifikovanu BSA / Au elektrodu može se izračunati korišćenjem Lengmirove adsorpcione termodinamičke jednačine [176]:

$$\frac{C}{i} = \frac{1}{K \cdot i_{max}} + \frac{C}{i_{max}} \quad (8)$$

gde je i – struju anodnog pika, i_{max} – maksimalna vrednost anodnih struja, C – koncentracija Hoxa, K – konstanta vezivanja Hoxa za modifikovanu BSA / Au elektrodu.

Iz jednačine 8, ako je veza između C/i i C linearna, mogu se iz nagiba i odsečka prave naći vrednosti za i_{max} i K .

Nakon konstrukcije dijagrama C/i naspram C dobijena je sledeća linearna jednačina:

$$C/i = 13,94 \cdot C + 113,59 \quad (9)$$

$$R = 0,989; F = 137$$

Primenom jednačina 8 i 9 izračunata je maksimalna vrednost struje anodnog pika ($i_{max} = 0,0717$ mA) i konstanta vezivanja Hoxa za modifikovanu BSA / Au elektrodu

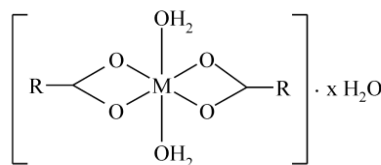
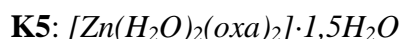
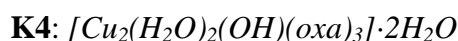
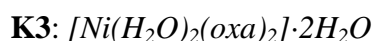
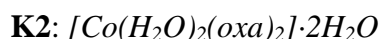
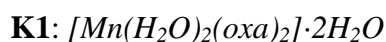
($K = 1,23 \cdot 10^5$ dm³ mo⁻¹). Dobijena vrednost konstante vezivanja Hoxa, ukazuje na to da Hoxa ima veći afinitet vezivanja za BSA u odnosu na njegove derivate (oksaprozin-E i oksaprozin-P).

5. ZAKLJUČAK

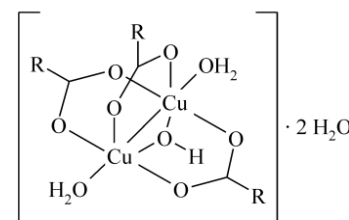
U cilju proučavanja potencijalne biološke aktivnosti derivata propanske kiseline u ovom radu sintetisane su dve grupe jedinjenja.

1. U prvoj grupi jedinjenja, sintetisana je serija novih Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) i Zn(II) kompleksa sa oksaprozinom (Hoxa), nesteroidnim antiinflamatornim lekom. Lek i kompleksi okarakterisani su elementarnom i TG analizom, FT-IC, ^1H NMR, ^{13}C NMR, UV-Vis spektroskopijom i merenjem magnetne susceptibilnosti.

Na osnovu analitičkih i spektralnih podataka, TG analize i pod pretpostavkom da je za sve jone prelaznih metala [Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II)] koordinacioni broj 6, određene su formule i utvrđena građa svih novosintetisanih kompleksa sa Hoxa:



K1-K3, K5



K4

Formule dobijenih kompleksa određene na osnovu elementarne analize pokazuju da molaski odnos jona metala i liganda u svim jedinjenjima iznosi 1:2, osim kod kompleksa **K4** gde odnos jona metala i liganda iznosi 2:3. Nerastvorljivost ispitivanih kompleksa u velikom broju organskih rastvarača, izuzev DMSO, objašnjava se prisustvom nekoordiniranih molekula vode, koji uslovljavaju veliki broj vodoničnih veza unutar struktura i na taj način povećavaju stabilnost kristalne rešetke.

Na osnovu FT-IC spektara dobijene su informacije o načinu koordinacije liganda i prisustvu kristalizacione vode. Najistaknutiji i najintenzivniji pikovi kod svi sintetizovanih kompleksa jesu nesumnjivo oni koji potiču od asimetričnih, $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ i simetričnih, $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ vibracija i nalaze se u oblasti oko $1625\text{--}1420\text{ cm}^{-1}$. $\Delta\nu$ -vrednosti kompleksa **K4** veće su od vrednosti $\Delta\nu_j$, što ukazuje na monodentatnu koordinaciju COO^- -grupa u sintetizovanom jedinjenju ili kombinovani način koordinacije i to helatni i (asimetrično) bidentatno-mostovni. Sa druge strane, $\Delta\nu$ -vrednosti kompleksa **K1–K3** i **K5** su manje od $\Delta\nu_j$, što nesumnjivo ukazuje na helatni način koordinacije kod ovih kompleksa. U zavisnosti od broja prisutnih molekula H_2O kod ispitivanih kompleksa, oblik i položaj pikova na FT-IC spektrima varira i nalazi se u opsegu 3450--

3197 cm⁻¹. Jasno su uočeni različiti položaji apsorpcionih maksimuma za koordinirani i nekoordinirani molekul H₂O (javljaju se na različitim talasnim brojevima) i na taj način napravljena razlika u energiji vezivanja koju molekuli H₂O ostvaruju u kompleksu

Na osnovu elektronskih spektara i magnetnih momenata za sve komplekse utvrđena je (pseudo)oktaedarska geometrija. Binuklearni Cu(II)-kompleks, ispoljava snažne Cu–Cu interakcije antiferomagnetnog tipa.

Rezultati TG- DTG- i DSC-analize ispitivanih jedinjenja, pokazali su da se svi kompleksi mogu dobiti kao anhidrovane supstance na temperaturi do 200 °C, a na njihovu termičku stabilnost ukazuje horizontalni plato koji se uočava na TG-krivama. Osim dehidratacije Mn(II)-kompleksa koja se odigrava u jednom koraku, dehidratacija kod svih ostalih kompleksa odigrava se u dva koraka. Rezultati TG-analize pokazali su postojanje razlike između koordiniranih i nekoordiniranih molekula vode. Takođe, svi TG- i DSC-podaci (sa izuzetkom Mn(II)-kompleksa), zajedno sa temperaturnim opsezima dehidratacije i položajima DTG maksimuma, pokazali su da se razlika energija vezivanja između koordinisanih i nekoordinisanih molekula vode generalno povećava. Analizom DSC-krivih, iz pika koji definiše endotermni efekat dehidratacije, kod svih kompleksa izračunate su vrednosti entalpija dehidratacije ($\Delta_{\text{deh}}H_{\text{m}}^{\circ}$) i nalaze se u opsegu 143,7–400,1 kJ mol⁻¹. Kao opšti zaključak, izuzimajući **K1**, ustanovljeno je da se ukupna energija (entalpija dehidratacije) potrebna za kompletnu dehidrataciju kompleksa smanjuje u nizu Co – Ni – Cu – Zn prateći pri tome redosled elemenata u periodnom sistemu elemenata. U natavku je praćen tok termičkog razlaganja anhidrovanih jedinjenja. Na osnovu početne temperature razlaganja anhidrovanih jedinjenja utvrđeno je da stabilnost kompleksa **K1–K5** raste u nizu:



pri čemu na sam niz dosta utiče građa kompleksa, tako da odstupanje niza od redosleda elemenata u periodnom sistemu elemenata je u skladu sa očekivanjima. Karakteristično za sve komplekse je da se nijedan nije u potpunosti degradirao do očekivanih oksida i/ili karbida, već da je došlo do parcijalne fragmentacije liganda ($x \text{ CO} + y \text{ C}_6\text{H}_5 + z (-\text{O})-\text{C}=\text{C}-\text{N}=\text{}$).

U ovom radu je prvi put ispitana *in vitro* antiproliferativna aktivnost Hoxa i sintetisanih kompleksa prema ćelijskim linijama humanog karcinoma debelog creva (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231), humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i melanoma (Fem-x). Sagledavanjem podataka o ovom biološkom efektu sintetizovanih molekula, statistički značajni antiproliferativni efekat ispoljila su sva jedinjenja prema barem jednoj od korišćenih tumorskih ćelijskih linija, a da pri tome nije ispoljen nespecifičan citotoksičan efekat prema normalnim peritonealnim makrofagima pacova. Iako Hoxa kao NSAIL ima osnovnu primenu u lečenju inflamatornih oboljenja, u ovom radu pokazana je njegoa potencijalna primena i u lečenju karcinoma. Treba istaći da su novosintetisani kompleksi prelaznih metala sa Hoxa, značajno aktivniji od samog liganda i da bi u lečenju karcinoma, koordinaciona jedinjenja u budućnosti mogla da nađu veću upotrebu. Ni(II)-kompleks (**K3**) pokazao se kao najpotentniji antitumorski agens zbog svog izuzetnog antiproliferativnog efekta koji je ispoljio prema svim ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama, čak i pri nanomolarnim koncentracijama (HCT-116: $c = 1$ nM, IP = 45,3 %; MDA-231: $c = 50$ μ M, IP = 60,5 %; HeLa: $c = 50$ μ M, IP = 55 %; Fem X: $c = 50$ μ M, IP = 78 %).

2. U radu je takođe, sintetisana serija šest novih 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanskih kiselina i odgovarajućih metil estara. Sva jedinjenja okarakterisana su temperaturom topljenja, elementarnom analizom, FT-IC, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopijom i na osnovu analize dobijenih podataka nesumnjivo su potvrđene njihove strukture.

Kristalna struktura metil-2-(5-(4-metoksifenil)metilen-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propionata potvrđena je rendgenskom strukturnom analizom. Dužine veza i uglovi TZD prstena kod sintetizovanog monokristala slični su kao i kod svih jedinjenja koja poseduju TZD jezgro. TZD i Ar prstenovi su gotovo koplanarni sa diedarskim uglom od samo 3,77°. Takođe, zbog postojanja egzociklične dvostuke veze (vinilne) dolazi do konfiguracione izomerije, pri čemu se kod jedinjenja **T2** uočava Z konfiguracija. U kristalnoj rešetci molekuli su međusobno povezani van der Valsovim silama gradeći talasaste pseudo-lance duž *a*-ose. Molekuli jedinjenja **T2** se umrežavaju u trodimenzionalnu kristalnu strukturu preko slabih π - π interakcija tipa „licem u lice“

koje se ostvaruju između Ar prstenova i TZD jezgara susjednih molekula. Na osnovu strukture metil-2-(5-(4-metoksifenil)metilen-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propionata zaključeno je da se navedene karakteristike sintetizovanog monokristala očekuju kod svih sintetizovanih molekula iz ove klase jedinjenja.

U radu je prvi put ispitana antiproliferativna aktivnost sintetisanih jedinjenja (**T1–T12**) na ćelijskim linijama humanog karcinoma debelog creva (HCT-116), humanog karcinoma dojke (MDA-231) i mijeloidne leukemije (K-562). Sagledavanjem podataka o ovom biološkom efektu sintetizovanih molekula, statistički značajni antiproliferativni efekat ispoljila su sva jedinjenja prema barem jednoj od korišćenih tumorskih ćelijskih linija, a da pri tome nije ispoljen nespecifičan citotoksičan efekat prema normalnim peritonealnim makrofagima pacova. Treba istaći da su estri pokazali bolji antiproliferativni efekat u odnosu na odgovarajuće kiseline i da iz tog razloga modelovanje postojećih i sintezu novih lekova treba razvijati u tom smeru.

Korelaciom lipofilnosti proučavanih jedinjenja ($\log P$) i stepena inhibicije proliferacije ćelija koju su ispitivana jedinjenja izazvala, dobijena je linearna zavisnost samo u analizi ispitivanih jedinjenja pri koncentraciji od 50 μM . Neuspelo uspostavljanje linearne funkcije za ostale ispitivane koncentracije može biti posledica različitih mehanizama delovanja koja ova klasa jedinjenja poseduje ili da faktor lipofilnosti nije jedini faktor koji utiče na opisivanje i uspostavljanje korelacije između biološke aktivnosti i strukture jedinjenja.

Pored ispitivanja antiproliferativne aktivnosti, dodatno je ispitana potencijalna antimikrobna aktivnost svih sintetizovanih jedinjenja (**T1–T12**) prema standardnim sojevima *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i klinički izolovanim slojevima *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicanssu*, ali očekivani antimikrobni efekat nije pokazao nijedan sintetizovan molekul.

3. U radu je takođe, prvi put urađena elektrohemijska karakterizacija Hoxa, cikličnom voltametrijom na elektrodi od zlata u 0,05 M NaHCO_3 . Sintetizovan lek, njegov analitički standard i sadržaj aktivne supstance u tableti Duraprox® okarakterisan je jednom oksidacionom i tri redukcionim reakcijama. Pri elektrohemijskim ispitivanjima sintetizovanog i analitičkog standarda dobijeni su identični ciklični voltamogrami, što

ukazuje na izuzetnu čistoću sintetizovanog molekula, kao i efikasnost samog postupka sinteze. Utvrđena je linearna koncentraciona zavisnost anodnih struja na 0,83 V za analitički standard leka i na 0,85 V za tabletu Duraprox®.

U cilju analiziranja interakcija lekaova sa biomakromolekulima, prvi put je određena konstanta vezivanja Hoxa za BSA. Elektroda od zlata modifikovana je adsorpcijom BSA u 0,1 M fosfatnom puferu (pH = 7,4) i ispitana je koncentraciona zavisnost anodnih struja za analitički standard oksaprozina na BSA / Au elektrodi. Korišćenjem Lengmirove adsorpcione termodinamičke jednačine izračunata je konstanta vezivanja Hoxa za BSA / Au elektrodu ($K = 1,23 \cdot 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$). Dobijena vrednost konstante vezivanja Hoxa, ukazuje na to da Hoxa ima veći afinitet vezivanja za BSA u odnosu na njegove derivate (oksaprozin-E i oksaprozin-P).

Rezultati ostvareni u ovoj disertaciji doprinose razvoju fundamentalnih znanja iz oblasti sinteze, strukture i aktivnosti derivata propanske kiseline. Pokazani antiproliferativni efekat, Ni(II)-kompleksa sa oksaprozinom i metil estara 2-(5-ariliden-2,4-dioksotetrahidrotiazol-3-il)propanskih kiselina, ukazuju na činjenicu da su ova jedinjenja ispunila uslove da budu kandidati za lekove i kvalifikovala se za dalju fazu bioloških ispitivanja.

6. LITERATURA

- [1] V.K.Ahluwalia, Madhu Chopra, Medicinal Chemistry, Ane Books India, 1st ed., New Delhi, 2008, str. 239.
- [2] M.K.Buczowska, *Synthesis, characterization, antitumor and antimicrobial activities of heterocyclic transition metal complexes*, PhD thesis, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Germany, 2011, str. 7.
- [3] J. Ferlay, H.R. Shin, F.Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, GLOBOCAN 2008 v2,0, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet], Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010, dostupno na <http://globocan.iarc.fr>.
- [4] E.J. Dean, M. Ranson, F. Blackhall, S.V. Holt, C. Dive, *Cancer. Treat. Rev.*, **33** (2007) 203–212.
- [5] V.T. DeVita, Jr.E. Chu, *Cancer. Res.*, **68** (2008) 8643-8653.
- [6] C. Avendano, J.C. Menendez, *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier, 1st ed., Amsterdam, 2008, str. 1–7.
- [7] P.C. Elwood, *Clin. Med.*, **1** (2001) 132–137.
- [8] J.E. Manson, M.J. Stampfer, G.A. Colditz, W.C. Willett, B. Rosner, F.E. Speizer, C.H. Hennekens, *J. Am. Med. Assoc.*, **266** (1991) 521–527.
- [9] S.H. Goodnight, *Curr. Opin. Hematol.*, **3** (1996) 355–360.
- [10] P.C. Elwood, C. Hughes, J.R. O'Brien, *Postgrad. Med. J.*, **74** (1998) 587–591.
- [11] D.C. Farrow, T.L. Vaughan, P.D. Hansten, J.L. Stanford, H.A. Risch, M.D. Gammon, W.H. Chow, R. Dubrow, H. Ahsan, S.T. Mayne, J.B. Schoenberg, A.B. West, H. Rotterdam, J.F. Fraumeni, W.J. Blot, *Cancer Epidem. Biomar.*, **7** (1998) 97–102.

- [12] M.E. Deutsch, *N. Engl. J. Med.*, **7** (1992) 1289–1291.
- [13] J.M. Thun, M.M. Namboodiri, E.E. Calle, W.D. Flanders, C.W. Heath, *Cancer Res.*, **53** (1993) 1322–1327.
- [14] D.M. Schreinemachers, R.B. Everson, *Epidemiology*, **5** (1994) 138–146.
- [15] K.M. Egan, M.J. Stampfer, E. Giovannucci, B.A. Rosner, G.A. Colditz, *J. Natl. Cancer Inst.*, **88** (1996) 988–993.
- [16] L. Rosenberg, *J. Natl. Cancer Inst.*, **88** (1996) 941–942.
- [17] C. Bucher, P. Jordan, V. Nickleit, J. Torhorst, M.J. Mihatsch, *Clin. Nephrol.*, **51** (1999) 67–72.
- [18] D.W. Cramer, B.L. Harlow, L. Titus-Ernstoff, K. Bohlke, W.R. Welch, E.R. Greenberg, *Lancet*, **351** (1998) 104–107.
- [19] P.A. Craven, F.R. DeRubertis, *Carcinogenesis*, **13** (1992) 541–546.
- [20] T. Kawamori, C.V. Rao, K. Seibert K, B.S. Reddy, *Cancer Res.*, **58** (1998) 409–412.
- [21] F.A. Attiga FA, P.M. Fernandez, A.T. Weeraratna, M.J. Manyak, S.R. Patierno, *Cancer Res.*, **60** (2000) 4629–4637.
- [22] D.S. Alberts, L. Hixson, D. Ahnen, C. Bogert, J. Einspahr, N. Paranka, K. Brendel, P.H. Gross, R. Pamukcu, R.W. Burt, *J. Cell. Biochem. Suppl.*, **22** (1995) 18–23.
- [23] A. Lupulescu, *Prostag. Leukotr. Ess.*, **54** (1996) 83–94.
- [24] H. Sano, Y. Kawahito, R.L. Wilder, A. Hashiramoto, S. Mukai, K. Asai, S. Kimura, H. Kato, M. Kondo, T. Hla, *Cancer Res.*, **55** (1995) 3785–3789.
- [25] A. Ristimäki, N. Honkanen, H. Jänkälä, P. Sipponen, M. Härkönen, *Cancer Res.*, **57** (1997) 1276–1280.

- [26] T. Hida, Y. Yatabe, H. Achiwa, H. Muramatsu, K. Kozaki, S. Nakamura, M. Ogawa, T. Mitsudomi, T. Sugiura, T. Takahashi, *Cancer Res.*, **58** (1998) 3761–3764.
- [27] D. Hwang, D. Scollard, J. Byrne, E. Levine, *J. Natl. Cancer Inst.*, **90** (1998) 455–460.
- [28] H. Wolff, K. Saukkonen, S. Anttila, A. Karjalainen, H. Vainio, A. Ristimäki, *Cancer Research.*, **58** (1998) 4997–5001.
- [29] H. Koga, S. Sakisaka, M. Ohishi, T. Kawaguchi, E. Taniguchi, K. Sasatomi, M. Harada, T. Kusaba, M. Tanaka, R. Kimura, Y. Nakashima, O. Nakashima, M. Kojiro, T. Kurohiji, M. Sata, *Hepatology*, **29** (1999) 688–696.
- [30] O.N. Tucker, A.J. Dannenberg, E.K. Yang, F. Zhang, L. Teng, J.M. Daly, R.A. Soslow, J.L. Masferrer, B.M. Woerner, A.T. Koki, T.J. Fahey, *Cancer Res.*, **59** (1999) 987–990.
- [31] K.C. Zimmermann, M. Sarbia, A.A. Weber, F. Borchard, H.E. Gabbert, K. Schror, *Cancer Res.*, **59** (1999) 198–204.
- [32] W. Dempke, C. Rie, A. Grothey, H.J. Schmoll, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **127** (2001) 411–417.
- [33] X.C. Xu, *Anticancer Drugs*, **13** (2002) 127–137.
- [34] B. Rigas, I.S. Goldman, L. Levine, *J. Lab. Clin. Med.*, **122** (1993) 518–523.
- [35] K. Uefuji, T. Ichikura, H. Mochizuki, *Clin. Cancer Res.*, **6** (2000) 135–138.
- [36] P.H. Rolland, P.M. Martin, J. Jacquemier, A.M. Rolland, M. Toga, *J. Natl. Cancer Inst.*, **64** (1980) 1061–1070.
- [37] I. Tegeder, J. Pfeilschifter, G. Geisslinger, *FASEB J.*, **15** (2001) 2057–2072.
- [38] Y.C. Ou, C.R. Yang, C.L. Cheng, S.L. Raung, Y.Y. Hung, C.J. Chen, *Eur. J. Pharmacol.*, **563** (2007) 49–60.

- [39] M.T. Yip-Schneider, C.M. Schmidt, *Pancreas*, **27** (2003) 337–344.
- [40] P.L. Rice, R.J. Goldberg, E.C. Ray, L.J. Driggers, D.J. Ahnen, *Cancer Res.*, **61** (2001) 1541–1547.
- [41] P.L. Rice, K.S. Beard, L.J. Driggers, D.J. Ahnen, *Cancer Res.*, **64** (2004) 8148–8151.
- [42] J.Y. Liou, D. Ghelani, S. Yeh, K.K. Wu, *Cancer Res.*, **67** (2007) 3185–3191.
- [43] S.J. Baek, J.S. Kim, S.M. Moore, S.H. Lee, J. Martinez, T.E. Eling, *Mol. Pharmacol.*, **67** (2005) 356–364.
- [44] C. Wahl, S. Liptay, G. Adler, R.M. Schmid, *J. Clin. Invest.*, **101** (1998) 1163–1174.
- [45] C.C. Ho, X.W. Yang, T.L. Lee, P.H. Liao, S.H. Yang, C.H. Tsai, M.Y. Chou, *Eur. J. Clin. Invest.*, **33** (2003) 875–882.
- [46] H. Lissauer, *Berl. Klin. Wochenschr.*, **2** (1865) 403–404.
- [47] G. Tarchiani, S. Vitale, *Clin. Ter.*, **31** (1964) 101–116.
- [48] W.A. Collier, F. Krauss, *Krebsforsch*, **34** (1931) 526.
- [49] B. Rosenberg, *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a leading Anticancer Drug*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich, Switzerland, 1999, str. 3–27.
- [50] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, *Nature*, **222** (1969) 385–386.
- [51] P.C.A. Bruijninx, P.J. Sadler, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12** (2008) 197–206.
- [52] K.H. Thompson, C. Orvig, *Dalton Trans.*, **6** (2006) 761–764.
- [53] N.J. Farrer, L. Salassa, P.J. Sadler, *Dalton Trans*, **48** (2009) 10690–10701.
- [54] Y. Iizuka, E. Sakurai, Y. Tanaka, *Riken Review*, **35** (2001) 3–4.

- [55] S.J. Lippard, J.M. Berg, *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, 1994, str. 411.
- [56] R.K. Szilagyi, P.A. Bryngelson, M.J. Maroney, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon, *J. Am. Chem. Soc.*, **126** (2004) 3018–3019.
- [57] M.H. Stipanuk, *Biochemical, Physiological & Molecular Aspects of Human Nutrition*, 2nd ed., W. B. Saunders Company, New York, 2006, str. 1043–1067.
- [58] M. Kobayashi, S. Shimizu, *Eur. J. Biochem.*, **261** (1999) 1–9.
- [59] H. Tapiero, T.M. Townsend, K.D. Tew, *Biomed. Pharmacother.*, **57** (2003) 386–398.
- [60] N. Law, M. Caudle, V. Pecoraro, *Adv. Inorg. Chem.*, **46** (1998) 305–440.
- [61] J.G. Voet, D. Voet, *Biochemistry*, New York, Wiley & Sons, 1995, str. 675.
- [62] B. Krautler, *Met. Ions Life Sci.*, **6** (2009) 1–51.
- [63] M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, *Am. J. Clin. Nutr.*, **63** (1996) 797S–811S.
- [64] C. Fierke, *J. Nutr.*, **130** (2000) 1437S–1446S.
- [65] P. Lay, T. Hambley, WO Patent 109843 (2007).
- [66] G. Tamasi, M. Casolaro, A. Magnani, A. Sega, L. Chiasserini, L. Messori, C. Gabbiani, S.M. Valiahdi, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, M.B. Hursthouse, R.J. Cini, *J. Inorg. Biochem.*, **104** (2010) 799–814.
- [67] R. Cini, *Comments Inorg. Chem.*, **22** (2000) 151–186.
- [68] D. Kovala-Demertzi, M. Staninska, A. Castineiras, I. Garcia-Santos, M.A. Demertzis, *J. Inorg. Biochem.*, **105** (2011) 1187–1195.
- [69] G. Rubner, K. Bendorf, A. Wellner, B. Kircher, S. Bergemann, I. Ott, R. Gust, *J. Med. Chem.*, **53** (2010) 6889–6898.

- [70] F. Dimiza, A.N. Papadopoulos, V. Tangoulis, V. Psycharis, C.P. Raptopoulou, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, **107** (2012) 54–64.
- [71] F. Dimiza, S. Fountoulaki, A.N. Papadopoulos, C.A. Kontogiorgis, V. Tangoulis, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, A. Terzis, D.P. Kessissoglou, G. Psomas, *Dalton Trans.*, **40** (2011) 8555–8568.
- [72] D.K. Saha, S. Padhye, S. Padhye, *Metal-Based Drugs*, **8** (2001) 73–77.
- [73] S. Chakraborty, E. Sehanobish, M. Sarkar, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **17** (2012) 475–487.
- [74] A. Tarushi, X. Totta, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, G. Psomas, D.P. Kessissoglou, *Dalton Trans.*, **41** (2012) 7082–7091.
- [75] T.W. Hambley, *Science*, **318** (2007) 1392–1393.
- [76] C. Yu, K. Markan, K.A. Temple, D. Deplewski, M.J. Brady, R.N. Cohen, *J. Biol. Chem.*, **280** (2005) 13600–13605.
- [77] L. Michalik, J. Auwerx, J.P. Berger, V.K. Chatterjee, C.K. Glass, F.J. Gonzalez, P.A. Grimaldi, T. Kadowaki, M.A. Lazar, S. O'Rahilly, C.N. Palmer, J. Plutzky, J.K. Reddy, B.M. Spiegelman, B. Staels, W. Wahli, *Pharmacol. Rev.*, **58** (2006) 726–741.
- [78] C.E. Clay, A.M. Namen, G. Atsumi, M.C. Willingham, K.P. High, T.E. Kute, A.J. Trimboli, A.N. Fonteh, P.A. Dawson, F.H. Chilton, *Carcinogenesis*, **20** (1999) 1905–1911.
- [79] M. Li, T.W. Lee, A.P. Yim, T.S. Mok, G.G. Chen, *J. Cell Physiol.*, **209** (2006) 428–438
- [80] W.C. Chen, M.S. Lin, X. Bai, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, **118** (2005) 1477–1481.
- [81] C. Zang, H. Liu, M. Waechter, J. Eucker, J. Bertz, K. Possinger, H.P. Koeffler, E. Elstner, *Cell Cycle*, **5** (2006) 2237–2243.

- [82] N.P. Nunez, H. Liu, G.G. Meadows, *Cancer Lett.*, **236** (2006) 133–141.
- [83] J.R. Weng, C.Y. Chen, J.J. Pinzone, M.D. Ringel, C.S. Chen, *Endocr. Relat. Cancer*, **13** (2006) 401–413.
- [84] C.W. Shiau, C.C. Yang, S.K. Kulp, K.F. Chen, C.S. Chen, J.W. Huang, C.S. Chen, *Cancer Res.*, **65** (2005) 1561–1569.
- [85] S. Han, J. Roman, *Mol. Cancer Ther.*, **5** (2006) 430–437.
- [86] S. Altiok, M. Xu, B.M. Spiegelman, *Gene. Dev.*, **11** (1997) 1987–1998.
- [87] L. Michalik, B. Desvergne, W. Wahli, W., *Nat. Rev. Cancer*, **4** (2004) 61–70.
- [88] R. Udassin, I. Ariel, Y. Haskel, N. Kitrassky, M. Chevion, *Free Radical Bio. Med.*, **10** (1991) 1–6.
- [89] D.J. Schmeling, R.A. Drongowski, A.G. Koran, *Prog. Clin. Bio. Res.*, **299** (1989) 53–61.
- [90] J. Schreiber, G.L. Foureman, M.F. Hughes, R.P. Mason, T.E. Eling, *J. Biol. Chem.*, **264** (1989) 7936–7943.
- [91] J.R.J. Sorenson, *Prog. Med. Chem.*, **26** (1989) 437–568.
- [92] D.L. Dewitt, E.A. El-Harith, S.A. Kraemer, M.J. Andrews, E.F. Yao, R.L. Armstrong, L.W. Smith, *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 5192–5198.
- [93] P. Prasit, D. Riendeau, *Annu. Rep. Med. Chem.*, **32** (1997) 211–220.
- [94] H.R. Herschman, *Biochim. Biophys. Acta*, **1299** (1996) 125–40.
- [95] M. Beuk, *Angew. Chem. Int. Edit.*, **38** (1999) 631–33.
- [96] N.M. Davies, J.Y. Saleh, N.M. Skjodt, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **3** (2000) 137–55.
- [97] Merck Index, An Encyclopedia of Chemical and Pharmaceuticals, 13th ed., Merc & Co Inc Whitehouse station, New Jersey, 2005, str. 1095.

- [98] J.J. Talley, D.L. Brown, J.S. Carter, M.J. Graneto, C.M. Koboldt, J.L. Masferrer, W.E. Perkins, R.S. Rogers, A.F. Shaffer, Y.Y. Zhang, B.S. Zweifel, K. Seibert, *J. Med. Chem.*, **43** (2000) 775–777.
- [99] K. Brown, J.F. Cavalla, D. Green, A.B. Wilson, *Nature*, **219** (1968) 164.
- [100] L.Jr. Winter, *J. Int. Med. Res.*, **11** (1983) 308–314.
- [101] W.F. Kean, *Curr. Med. Res. Opin.*, **20** (2004) 1275–1277.
- [102] <http://www.medicinenet.com/oxaprozin/article.htm>
- [103] L. Ottonello, M. Bertolotto, F. Montecucco, G. Bianchi, F. Callegri, *Brit. J. Pharmacol.*, **157** (2009) 294–306.
- [104] F. Dallegri, M. Bertolotto, L. Ottonello, *Expert Opin. Pharmacother.*, **6** (2005) 777–785.
- [105] N. M. Davies, *Clin. Pharmacokinet.*, **35** (1998) 425–436.
- [106] R. Rothstein, *Am. J. Med.*, **105** (1998) 39–43.
- [107] S.R. Kethu, S. Rukkanagari, C.L. Lansford, *Ann. Pharmacother.*, **33** (1999) 942–944.
- [108] C. Puig, M.I. Crespo, N. Godessart, J. Feixas, J. Ibarzo, J.M. Jiménez, L. Soca, I. Cardelús, A. Heredia, M. Miralpeix, J. Puig, J. Beleta, J.M. Huerta, M. López, V. Segarra, H. Ryder, J.M. Palacios, *J. Med. Chem.*, **43** (2000) 214–223.
- [109] X. Zhao, M. Zhang, W. Sun, X. Yang, G. Wang, D. Sui, W. Yu, S. Qu, *Biol. Pharm. Bull.*, **32** (2009) 1986–90.
- [110] L. Franco, D. Doria, *Pharmacol. Res.*, **36** (1997) 395–99.
- [111] J.R.J. Sorenson, *J. Med. Chem.*, **19** (1976) 135–48.
- [112] S. Dutta, S. Padhye, V. McKee, *Inorg. Chem. Commun.*, **7** (2004) 1071–1074.

- [113] R.P. Nickell, US Patent 0264530 A1 (2009).
- [114] R.P. Nickell, US Patent 0233970 A1 (2009).
- [115] J.W. Cornfort, *Heterocyclic Compounds*, John Wiley and Sons, New York, Vol. **5**, 1957, str. 312–13.
- [116] K. Brown, US Patent 3578671 (1971).
- [117] F.Y. Wang, S.L. Li, Q. Wang, *Progr. Pharm. Sci.*, **28** (2004) 485–89.
- [118] B.H. Norman, L.S. Lee, J.L. Masferrer, J.J. Talley, US 5719163 (1998).
- [119] A.J. Lewis, R.P. Carlson, H. Fletcher, US 4659728 (1985).
- [120] G. Breviglieri, G. Bruno, S. Contrini, C. Assanelli, US 6096896 (2000).
- [121] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00991>
- [122] S.G. Sagdinc, A. Esme, *Spectrochim. Acta A*, **75** (2010) 1370–1376.
- [123] W.K. Li, G.D. Zhou, T. Mak, *Advanced Structural Inorganic Chemistry*, International Union of Crystallography, Oxford University Press Inc, New York, 2008, str. 261.
- [124] M. Dragojević, M. Popović, S. Stević, V. Šćepanović, *Opšta hemija I*, 4. izdanje, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2007, [a] str. 354–8; [b] str. 372–3; [c] str. 374–6.
- [125] F.A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, 5th ed., Interscience, New York, 1988, [a] str. 483; [b] str. 697–702; [c] 724–731; [d] 741–745; [e] 755–774; [f] 597–601.
- [126] D. Harris, M. Bertolucci, *Symmetry and Spectroscopy*, Dover Publications, New York, 1989, str. 395.

- [127] N.D. Oakes, C.J. Kennedy, A.B. Jenkins, D. Ross-Laybutt, D.J. Chisholm, E.W. Kraegen, *Diabetes*, **43** (1994) 1203–1210.
- [128] D. Steinhilber, C. Carlberg, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **9** (1999) 281–290.
- [129] T. Tomašić, N. Zidar, M. Mueller-Premru, D. Kikelj, L. Peterlin Mašić, *Eur. J. Med. Chem.*, **45** (2010) 1667–1672.
- [130] F. Herrera, J.C. Mayo, V. Martin, R.M. Sainz, I. Antolin, C. Rodriguez, *Cancer Lett.*, **211** (2004) 47–55.
- [131] T. Sohda, K. Mizuno, E. Imamiya, Y. Sugiyama, T. Fujita, Y. Kawamatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **30** (1982) 3580–3600.
- [132] T. Fujita, Y. Sugiyama, S. Taketomi, Y. Kawamatsu, H. Iwatsuka, Z. Suzuoki, *Diabetes*, **32** (1983) 804–810.
- [133] O.S. Gardner, B.J. Dewar, H.S. Earp, J.M. Samet, L.M. Graves, *J. Biol. Chem.*, **278** (2003) 46261–46269.
- [134] W. Heintz, *Annal. Chem. Pharm.*, **136** (1865) 223.
- [135] F.C. Brown, *Chem. Rev.*, **61** (1961) 463–521.
- [136] O. Bozdag, G. Ayhan-Kilcigil, M. Tuncibilek, R. Ertan, *Turk. J. Chem.*, **23** (1999) 163–169.
- [137] B.R. Prashantha Kumar, M.D. Karvekar, L. Adhikary, M.J. Nanjan, B. Suresh, *J. Heterocycl. Chem.*, **43** (2006) 897–903.
- [138] A. Despić, *Elektrohemijske tehnike i tehnologije*, Srpska akademija nauke i umetnosti, Beograd, 2005, [a] str. 5–21, [b] str. 347–352.
- [139] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry Principles, Methods and Applications*, Oxford University Press, New York, 1994, 129–135.

- [140] A. Scoog, D.M. West, F.J. Holler, *Analytical Chemistry*, Saunders College Publishing, 1991, 453–487.
- [141] V.S. Bagotsky, *Fundamentals of Electrochemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, A.N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry Russian Academy of Sciences, 2006, 19–32.
- [142] A. Bard, L. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, 2001, 226–260.
- [143] Y.M. Chen, L.H. Guo, *J. Environ. Sci.*, **21** (2009) 373–379.
- [144] S.S. Kalanur, J. Seetharamappa, U. Katrahalli, *Colloid. Surface. B*, **75** (2010) 75–79.
- [145] A.J. Lewis, R.P. Carlson, J. Chang, S.C. Gilman, S. Nielsen, M.E. Rosenthale, F.W. Janssen, H.W. Ruelius, *Curr. Ther. Res.*, **34** (1983) 777–794.
- [146] N.M. Queck, W.S. Law, H.F. Lau, J.H. Zhao, P.C. Hauser, S.F.Y. Li, *Electrophoresis*, **29** (2008) 3701–3709.
- [147] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacobazzo, A. Guagliardi, M.C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Cryst.*, **27** (1994) 435–436.
- [148] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. A*, **64** (2008) 112–122.
- [149] L.J. Farrugia, *J. Appl. Cryst.*, **32** (1999) 837–838.
- [150] A. Andreani, M. Rambaldi, A. Locatelli, A. Leoin, R. Bossa, M. Chiericozzi, I. Galatulas, G. Salvatore, *Eur. J. Med. Chem.*, **28** (1993) 825–829.
- [151] K. Popov-Pergal, Z. Čeković, M. Pergal, *Zh. Obshch. Khim.*, **61** (1991) 2112–2116.
- [152] K. Popov-Pergal, L. Čučković, M. Rančić, M. Pergal, D. Đoković, *Chem. Heterocycl. Com.*, **39** (2003) 1090–1093.

- [153] C. Perez, M. Paul, P. Bazerque, *Acta. Bio. Med. Exp.*, **15** (1990) 113–115.
- [154] S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, *Methods*, **42** (2007) 321–324.
- [155] W.Y. Liu, K.J. Zhang, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **6** (2011) 1066–1074.
- [156] B. Božić, J. Rogan, D. Poleti, N. Trišović, B. Božić, G. Ušćumlić, *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (2012) 865–869.
- [157] J. Rogan, *Strukturne karakteristike koordinacionih jedinjenja kobalta(II), nikla(II) i bakra(II) sa anjonima izoftalne, tereftalne i piromelitne kiseline*, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2007, [a] str. 51, [b] str. 135.
- [158] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th ed., Wiley, New York, Part B, 1997, str. 54–62.
- [159] Y. Sadaf, A. Saqib, M. Bushra, A. Fiaz, S. Saira, *J. Coord. Chem.*, **62** (2009) 3463–3470
- [160] B.P. Lever, *Inorganic Electronic Spectroscopy*, 2nd ed., Elsevier, Amsterdam, 1984, str. 480–505; 507–544; 554–568.
- [161] O. Bozdog-Dundar, E.J. Verspohl, N. Das-Evcimen, R.M. Kaup, K. Bauer, M. Sarikaya, B. Evranos, R. Ertan, *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (2008) 6747–6751.
- [162] J.S. Eun, K.S. Kim, H.N. Kim, S.A. Park, T. Ma, K.A. Lee, D.K Kim, H.K Kim, I.S. Kim, Y.H. Jung, O.P. Zee, D.J. Yoo, Y.G. Kwak, *Arch. Pharm. Res.*, **30** (2007) 155–160.
- [163] M. Mori, M. Takagi, C. Noritake, S. Kagabu, *J. Pestic. Sci.*, **33** (2008) 357–363.
- [164] S.K. Sahu, M. Banerjee, S.K. Mishra, R.K. Mohanta, *Acta Pol. Pharm. Drug. Res.*, **64** (2007) 121–126.

- [165] S. Salamone, C. Colin, I. Grillier-Vuissoz, S. Kuntz, S. Mazerbourg, S. Flament, H. Martin, L. Richert, Y. Chapleur, M. Boisbrun, *Eur. J. Med. Chem.*, **51** (2012) 206-215.
- [166] C. Dwivedi, T.K. Gupta, S.S. Parmar, *J. Med. Chem.*, **15** (1972) 553–554.
- [167] H.S. Sun, Y.M. Xu, W. He, S.G. Tang, C. Guo, *Acta Crystallogr. E*, **64** (2008) o524.
- [168] C.H.F. Wong, F.P.W. Tang, T.S.M. Wan, *Anal. Chim. Acta*, **697** (2011) 48–60.
- [169] M. Starek, J. Krzek, M. Tarsa, *JPC – J. Planar. Chromat.*, **23** (2010) 298–303.
- [170] N.M. Queck, W.S. Law, H.F. Lau, J.H. Zhao, P.C. Hauser, S.F.Y. Li, *Electrophoresis*, **29** (2008) 3701–3709.
- [171] B. Božić, M. Avramov Ivić, N. Trišović, S. Petrović, G. Ušćumlić, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **7** (2012) 11609–11616.
- [172] M. Avramov Ivić, S. Petrović, D. Mijin, P. Živković, I. Kosović, K. Drljević, M. Jovanović, *Electrochim. Acta.*, **51** (2006) 2407–2416.
- [173] K. Drljević-Đurić, V. Jović, U. Lačnjevac, M. Avramov Ivić, S. Petrović, D. Mijin, S. Đorđević, *Electrochim. Acta.*, **56** (2010) 47–52.
- [174] S.F. Sun, B. Zhou, H.N. Hou, Y. Liu, G.Y. Xiang, *Int. J. Biol. Macromol.*, **39** (2006) 197–200.
- [175] S. Sun, G. Xiang, *Chem. J. Internet*, **9** (2007) 25.
- [176] H.X. Ju, Y.K. Ye, Y.L. Zhu. *Electrochim. Acta*, **50** (2005) 1361–1367.

7. BIOGRAFIJA KANDIDATA

Bojan Božić je rođen 12. oktobra 1984. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Na Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu upisao se školske 2003/04. godine. Diplomirao je 2009. godine, na smeru Organska hemijska tehnologija i inženjerstvo polimera (prosečna ocena položenih ispita 8,76) odbranivši diplomski rad na temu „Uticaj rastvarača i supstituenata na azo / hidrazon tautomeriju kod 5-(4-supstituisanih fenilazo)-6-hidroksi-4-fenil-3-cijano-2-piridona“ sa ocenom 10. Školske 2009/10. godine upisao je doktorske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu u Beogradu, na studijskom programu Hemijsko inženjerstvo na Katedri za organsku hemiju, pod mentorstvom prof. dr Gordane Ušćumlić. U okviru doktorskih studija položio je sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 10, kao i završni ispit na temu „Proučavanje sinteze, strukture i svojstava potencijalno biološki aktivnih derivata propanske kiseline“ sa ocenom 10. Uporedo sa polaganjem ispita na doktorskim studijama intenzivno se bavi naučno-istraživačkim radom.

U toku školske 2009/10 angažovan je kao asistent u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Osnovi organske hemije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U toku školske 2010/11 i 2011/2012 bio je angažovan za izvođenje vežbi na predmetu Principi fizičke organske hemije. U toku školske 2011/2012. i 2012/2013. angažovan je kao asistent u izvođenju eksperimentalnih vežbi iz predmeta Hemija na Šumarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Angažovan je na izradi doktorskih disertacija libijskih doktoranata. Uključen je u realizaciju naučno-istraživačkog projekta u oblasti osnovnih istraživanja (172013) koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Bojan Božić je koautor osam radova objavljenih u međunarodnim časopisima (M21 – 1 rad, M22 – 2 rada, M23 – 5 rada), pet radova saopštenih na međunarodnim skupovima i devet radova saopštenih na nacionalnim skupovima. Iz oblasti istraživanja iz koje je predložena tema doktorske disertacije, kandidat je publikovao 2 naučna rada u istaknutom međunarodnom časopisu i 1 stručni rada objavljen u međunarodnom časopisu i 6 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima.

Bojan Božić govori engleski i italijanski jezik. Član je Srpskog hemijskog društva.

8. IZJAVA O AUTORSTVU

Potpisani-a БОЈАН БОЖИЋ

broj upisa 4011/2009 (studenti upisuju br. indeksa, a doktoranti koji su direktno prijavili doktorsku disertaciju ostavljaju prazno)

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

СИНТЕЗА, СТРУКТУРА И СВОЈСТА ПОТЕНЦИЈАЛНО БИОЛОШКИ АКТИВНИХ
ДЕРИВАТА ПРОПАНСКЕ КИСЕЛИНЕ

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.08.2013.

Bojan Božić

9. IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE

Ime i prezime autora BOJAN BOŽIĆ

Broj upisa 4011/2009

Studijski program ХЕМИЈСКО ИНЖЕЊЕРСТВО

Naslov rada СИНТЕЗА, СТРУКТУРА И СВОЈСТВА ПОТЕНЦИЈАЛНО БЕЛОПОВИКИ
АКТИВНИХ ДЕРИВАТА ПРОЛАНСКЕ КИСЕЛИНЕ

Mentor ПРОФ ДР ГОРДАНА ЈИЋИЋИЋ

Potpisani Gordana Jicic

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 21.08.2013.

Bojan Božić

10. IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

СИНТЕЗА ЦИРКУЛАРА У ОБЈЕКТА ПОТЕЖУЈАМО ЕКОНОМКУ АКТИВНОУ
ДЕПУБАТА ПРОВАХЕНЕ КУЦЕЈУНЕ

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 21.08.2013.

Potpis doktoranda

Bojan Božić