

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Aleksandra R. Božić

***N*-HETEROAROMATIČNI HIDRAZONI I
DIHIDRAZONI DIHIDRAZIDA UGLJENE
I TIOUGLJENE KISELINE:
KARAKTERIZACIJA,
KVANTNOMEHANIČKA STUDIJA I
BIOLOŠKA AKTIVNOST**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Aleksandra R. Božić

***N*-HETEROAROMATIC HYDRAZONES
AND DIHYDRAZONES OF
DIHYDRAZIDES CARBONIC AND
THIOCARBONIC ACID:
CHARACTERIZATION, QUANTUM
MECHANICAL STUDY AND
BIOLOGICAL ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

Dr Aleksandar D. Marinković, docent
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

Dr Nenad Filipović, vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

ČLANOVI

KOMISIJE:

Dr Dušan Antonović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

Dr Suzana Dimitrijević, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški
fakultet

Dr sc. med. Snežana Bjelogrić, naučni saradnik
na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije

DATUM ODBRANE:

ZAHVALNICA

Ova disertacija je urađena na Katedri za organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu, a deo eksperimenata je urađen na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i Institutuu Pluridisciplinaire Hubert Curien, Univerziteta u Strazburu.

Pre svega zahvaljujem profesoru dr Aleksandru Marinkoviću, mentoru, za sve stručne savete, trud, razumevanje, nesebičnu podršku i znanje koje mi je pružio tokom izrade ove disertacije. Veliku zahvalnost dugujem i mentoru profesoru dr Nenadu Filipoviću koji me je uveo u svet hemije hidrazona, i svojim iskustvom, znanjem, dobronamernim sugestijama nadahnuo i ohrabrio da tu ostanem i nastavim dalje. Sa ogromnim zadovoljstvom bih se zahvalila dr Snežani Bjelogrić na aktivnom učestvovanju u realizaciji dela doktorske disertacije koji se odnosi na biološku aktivnost, analizi dobijenih rezultata, kao i na značajnim savetima u svim segmentima naučno-istraživačkog rada. Dr Tamari Todorović se zahvaljujem na velikoj pomoći i nesebičnim stručnim savetima koje mi je uputila u toku izrade ove disertacije i optimizmu kojim me je uvela u svet kristalografije. Profesorki dr Tatajani Verbić i dr Iliji Cvijetiću zahvaljujem se na prijatnoj saradnji i velikoj pomoći, koji su svojim znanjem i iskustvom nesebično doprineli povećanju kvaliteta ove disertacije. Veliko hvala profesorima dr Dušanu Antonoviću i dr Suzani Dimitrijević na korisnim sugestijama koji su doprineli kvalitetnijem oblikovanju ovog rada, i vedrini kojom su me nadahnuli. Bilo je zadovoljstvo sarađivati sa njima.

Zahvaljujem se svim kolegama sa katedre za Organsku hemiju na profesionalnoj i prijateljskoj pomoći u najtežim trenucima, podršci, razumevanju i dobroj radnoj atmosferi.

Neizmerno bih se zahvalila svojoj porodici prijateljima na bezrezervnoj podršci i razumevanju, koji su svo vreme bili uz mene i kada to nije bilo tako lako, a najiskrenije bih se zahvalila Živojinu koji je uz mene poneo najveći teret ove disertacije.

***N*-Heteroaromatični hidrazoni i dihidrazoni dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline: karakterizacija, kvantnomehanička studija i biološka aktivnost**

IZVOD

U okviru disertacije, sintetisane su dve serije jedinjenja: *N*-heteroaromatični hidrazoni i dihidrazoni dihidrazida ugljene (dhO) i tiougljene kiseline (dhS). Jedan od predmeta istraživanja se odnosio na potpunu strukturnu karakterizaciju *N*-heteroaromatičnih monohidrazona dihidrazida ugljene kiseline (*mh*-UK) primenom različitih eksperimentalnih metoda i kvantnohemijskih proračuna. Eksperimentalne metode podrazumevaju rendgensku strukturnu analizu (RSA) i FT-IR (infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom), NMR (nuklearna magnetna rezonancija) i UV-Vis spektroskopiju (ultravioletna-vidljiva spektroskopija). Optimizovane geometrije u vakumu izračunate su pomoću B3LYP/6-311++G(d,p) metode. UV-Vis apsorpcioni spektri, elektronski prelazi i veličine intramolekulskog prenosa naelektrisanja (ICT) su proračunom D_{CT} (rastojanje prenosa naelektrisanja) i Q_{CT} (količina prenetog naelektrisanja) vrednosti, kao i AIM (analiza raspodele elektronske gustine na atomima u molekulu) analiza intramolekulske vodonične veze u osnovnom stanju za *mh*-UK dobijeni pomoću vremenski zavisne DFT metode (TD-DFT, teorija funkcionala gustine u zavisnosti od vremena). Primećeno je da se najjači ICT javlja u *E* obliku 4-piridinil supstituisanih jedinjenja. Analizirani su UV-Vis apsorpcioni spektri u različitim rastvaračima i ispitivan je njihov uticaj na položaj apsorpcionih maksimuma. Takođe, analiziran je uticaj prirode i položaja supstituenata i "aza" atoma azota u heteroaromatičnom jezgru i supstituenata na azometisnom atomu ugljenika na apsorpcione spektre.

Za kvantitativnu ocenu uticaja rastvarača na apsorpcione maksimume svih jedinjenja, primenjeni su principi LSER analize (linearna korelacija solvacionih energija) i to *Kamlet-Taft*-ovog i *Catalán*-ovog model. Pozitivan znak koeficijenta *a* za sva jedinjenja osim za ona koja u svojoj strukturi sadrže hinolinski prsten kod kojih su prisutni supstituenti u položaju 8 ukazuje da je hipsokromni (plavi pomak) uzrokovan veličinom elektron-donorskog efekta supstituenta i jačine vodonične veze koja utiče na

elektronsku distribuciju ispitivanih molekula. Dobijeni rezultati ukazuju na bolju stabilizaciju osnovnog stanja u odnosu na pobuđeno stanje.

Kvantitativna analiza uticaja supstituenata na apsorpcione maksimume *N*-heteroaromatičnih hidrazona urađena je pomoću LFER (linearna korelacija slobodne energije) modela i to primenom jednoparametarske *Hammett*-ove jednačine (SSP). Pored toga, primenom *Hammett*-ove jednačine LFER model je primenjen i u ispitivanju uticaja elektronskih efekata supstituenata na ^1H i ^{13}C NMR pomeranja i eksperimentalno određene $\text{p}K_{\text{a}}$ vrednosti. Rezultati dobijeni primenom LSER-a ukazuju da promena supstituenata i rastvarača utiče na pomeranje elektronske gustine, tj. konjugaciju, kao i na karakter ICT-a u toku ekscitacije. Prenos elektronskih efekata supstituenata odvija se kroz lokalizovane π -elektronske jedinice i celokupni konjugovani sistem proučavanih *mh*-UK.

Na osnovu podataka dobijenih rendgenskom strukturnom analizom, kao i kvantnohemijjskih proračuna utvrđeno je da je *trans*, odnosno (*E*) oblik *mh*-UK, stabilniji za većinu jedinjenja. Korišćenjem 2D NOESY (dvodimenzionalna spektroskopija nuklearnog Overhauserovog efekta) NMR spektroskopije utvrđeno je da se sva ispitivana jedinjenja nalaze u *E* obliku, osim [fenil(2-piridinil)metilen]dihidrazid ugljene kiseline (*mh*UK_(2-bp)) kod koga je dominantan *Z* oblik u DMSO-u.

U slučaju jedinjenja sa 2-hidroksifenil i 2-piridinil grupama supstituisanim na azometinskom ugljeniku analiziran je uticaj intramolekulske vodonične veze na *E*- i *Z*-fotoizomerizaciju, a pokazano je i da proces sledi kinetiku prvog reda. Za definisanje puteva fragmentacije ove grupe jedinjenja korišćena je višefazna masena spektrometrija (MS-MSⁿ). Prikazana sveobuhvatna eksperimentalna i teorijska analiza predstavlja veoma vredne rezultate korisne za QSAR (kvantitativna korelacija između strukture i reaktivnosti) analizu i objašnjenje biološke aktivnosti jedinjenja.

Uporedna studija antitumorske aktivnosti monohidrazona i dihidrazona dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline (*h*-(T)UK) na bazi hinolina ispitivana je nizom testova na dve humane maligne ćelijske linije: akutna monocitna leukemija (THP-1) i matične ćelije humanog adenokarcinoma pankreasa (AsPC-1). Hidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline (*h*-TUK) su pokazali bolju proapoptotsku aktivnost od hidrazona dihidrazida ugljene kiseline (*h*-UK) na obe ispitivane ćelijske linije. Programirana ćelijska smrt izazvana *h*-TUK je delimično kaspaza-zavisna, uglavnom vezana za

kasparu-8. Osim na standardnim 2-D modelima, testiranje na AsPC-1 ćelijama je urađeno i na 3-D modelima koji predstavljaju mikrotivne tumorske formacije i omogućavaju znatno precizniju procenu antitumorske aktivnosti u odnosu na 2-D kulture. Dva od tri testirana dihidrazona dihidrazida tiougljene kiseline (*dh*-TUK) uspešno su stimulisala apoptozu praćenu smanjenjem veličine tretiranih sfera. Dodatno, svi *dh*-TUK indukovali su znaćajan pad procenta CD44 ekspresije AsPC-1 ćelija koje ukazuju na njihovu sposobnost da indukuju reprogramiranje fenotipa matićnih kancer ćelija (CSCs). U cilju pronalaženja novih lekova iz grupe ispitivanih hinolinskih jedinjenja, na osnovu pokazane aktivnosti i na osnovu pravila Lipinskog testirana je sposobnost izabranog jedinjenja da se vezuje za humani serum albumin (HSA). Primenom doking studija su ponuđeni mogući unutarćelijski ciljani molekuli kao vezna mesta preko kojih se jedinjenje vezuje za HSA. Dobijene vrednosti termodinamićkih parametara vezivanja HSA i njihovi znakovi, ukazuju da su *Van der Waals*-ove sile ili fomiranje vodonićnih veza dominantni za vezivanje 1,5-bis(8-hinolilmetilen) dihidrazida tiougljene kiseline za HSA.

U nastavku istraživnja sprovedeno je sistematsko ispitivanje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti obe serije sintetisanih jedinjenja. Predmet istraživnja se odnosio na utvrđivanje uticaja tipa supstituenta na azometinskom ugljenikovom atomu, kao i vrste heteroaromatićnog prstena, odnosno položenja azota u prstenu, kao i prirode halkogenog atoma na biološku aktivnost. Zatim je izvršeno ispitivanje antimikrobne aktivnosti supstanci primenom disk difuzione metode, kao i njihove sposobnosti da hvataju slobodne radikale primenom metode inhibicije pomoću DPPH (1,1-difenil-2-pikril hidrazil) radikala. Dobijeni rezultati antimikrobne i antioksidativne aktivnosti su povezani sa strukturama ispitivanih jedinjenja. *h*-TUK su pokazali bolju i antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost, i za ovu grupu jedinjenja je izvršena detaljna analiza odnosa između strukture i biološke aktivnosti primenom 3D-QSAR tehnike molekuskog modelovanja. 3D-QSAR zasnovan na GRIND (GRid nezavisni deskriptori) metodologiji pokazao se veoma korisnim u pronalaženju farmakofornih taćaka neophodnih za antibakterijsku aktivnost *h*-TUK. Dobijena su tri statistićki znaćajna modela koja se mogu koristiti za dizajn aktivnijih struktura na bazi *h*-TUK.

Ključne reči: *N*-heteroaromatični hidrazoni; Kvantnohemijski proračuni; Solvatohromizam; Uticaj supstituenata; 3D-QSAR, GRIND metodologija; Antimikrobna aktivnost; Antioksidativna aktivnost; Antikancer aktivnost; HSA.

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Organska hemija

UDK broj: 547.288.3

***N*-Heteroaromatic hydrazones and dihydrazones of dihydrazides carbonic and thiocarbonic acid: characterization, quantum mechanical study and biological activity**

ABSTRACT

In this thesis, two series of *N*-Heteroaromatic hydrazones and dihydrazones of dihydrazides carbonic (dhO) and thiocarbonic acid (dhS) have been synthesized. One of the subject this research related to combined experimental and theoretical characterization of the synthesized *N*-Heteroaromatic monocarbohydrazones (*mh*-UK), Experimental methods include X-ray single-crystal analysis (XRD), as well as FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), NMR (Nuclear Magnetic Resonance) and UV-Vis (Ultraviolet–Visible) spectroscopy. Optimized geometries in vacuum have been obtained using B3LYP/6-311++G(d,p) model. Theoretical UV-Vis absorption spectra calculation and intramolecular charge transfer (ICT) evaluation was defined with the aid of the charge-transfer distance (D_{CT}) and the amount of transferred charge (Q_{CT}) calculation as well as AIM (Atoms in Molecules) analysis have been calculated using TD-DFT (Time Dependant - Density Functional Theory) method. It is noticeable that the strongest ICT occurs in 4-pyridyl substituted compounds. The UV-Vis absorption spectra in various solvents were analyzed and their influence on the position of absorption maxima was examined. The effects of the nature and the position of the substituent and "aza" nitrogen in heteroaromatic ring on UV-Vis spectra in different solvents have been examined, as well as the impact of different substituents on the azomethine carbon. For quantitative evaluation of the solvent effects on the UV-Vis absorption maxima, the principles of the linear solvation energy relationships (LSER) was applied, i.e. models proposed by Kamlet–Taft and Catalán. The positive sign of coefficient a for all compounds, except for quinoline based compounds wherein a substituent is present in position 8, indicates a hypsochromic (blue) shift relative to increased solvent hydrogen-bond donating capability. This suggests better stabilization of the ground state relative to the excited state.

Linear free energy relationships (LFER) are applied to the UV-Vis absorption spectra and correlation of absorption frequencies with Hammett substituent constants are performed using using SSP (Single Substituent Parameter) model. Furthermore, the LFER model was applied for investigation of the influence of the electronic nature of the substituents on ^1H and ^{13}C NMR shifts and $\text{p}K_{\text{a}}$ value. It was found that both substituents and solvents influence electron density shift, i.e. extent of conjugation, and affect ICT character in the course of excitation. Presented results showed that transmission of substituent electronic effects through π -resonance units takes place through localized π -electronic unit and overall conjugated system of studied *mh*-UK.

According to crystallographic data and quantum chemical calculations, the *trans* (*E*) form was found to be more stable for most compounds. Using 2D NOESY (Nuclear Overhauser Spectroscopy) NMR spectra, it was found that all tested compounds was in the *E* form, [(phenyl(2-pyridinyl) methylene)]dihydrazide carbonic acid which was in *Z* dominant form in DMSO.

Based on test results of photochromism of compounds with 2-hydroxyphenyl and 2- pyridinyl groups substituted at azomethine carbon it was analyzed role of an intramolecular hydrogen bond in the *E* and *Z* isomerization, and it is shown that the process follows first-order kinetics. Multiple stage mass spectrometry (MS-MS^{n}) analysis was applied to define main fragmentation pathways. Presented comprehensive experimental and theoretical study on *mh*-UK offered a wealth valuable results useful in future QSAR analysis.

A comparative study of antitumor activity of mono- and bis- quinoline based hydrazones and dihydrazones of dihydrazides carbonic and thiocarbonic acid (*h*-(*T*)UK)) was investigated by a series of tests on two human malignant cell lines: acute monocytic leukemia (THP-1) and pancreatic adenocarcinoma cancer stem cells (AsPC-1). Hydrazones of dihydrazides thiocarbonic acid (*h*-TUK) revealed superior proapoptotic activity over hydrazones of dihydrazides carbonic acid (*h*-UK) on both tested cell phenotypes, also displaying multi-target profile activities. Programmed cell death triggered by TCHs was partially caspase-dependent, mainly caspase-8 related. Activity against cancer stem cells (CSCs) was evaluated on 2D monolayers and 3D spheroidal models. Two out of three tested dihydrazones of dihydrazides thiocarbonic acid (*dh*-TUK) successfully stimulated apoptosis accompanied by a reduction in size of treated

spheres. Additionally, all *dh*-TUK induced significant decrease in percentage of CD44-expressing AsPC-1 cells that indicate on their ability to induce reprogramming of CSC phenotype. In order to find new drugs from the group of test quinoline compounds here we explored performed experimental and docking analysis protocol to obtain information on selected (based on the activity and Lipinsky rule) *h*-TUK interaction with za human serum albumin (HSA). Examination of the parameters of the thermodynamic binding of HSA, the negative enthalpy and negative entropy indicate that the Van der Waals forces or hydrogen bonding are dominant for 1,5-bis(8-quinolylmethylene) dihydrazides thiocarbonic acid.

Further research was carried out through systematic testing of the antimicrobial and antioxidative activity of the both series of synthesized compounds. Object of the study was to determine the influence of type of substituents on a azomethine carbon as well as the kind of the heteroaromatic ring, and a position of the nitrogen in the ring is, and the nature of chalcogen atoms on the biological activity. The compounds were tested *in vitro* against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi, antioxidative activity was investigated using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical inhibition assay, and their activity was discussed in relation to the structure of investigated compounds. *h*-(T)UK showed better antimicrobial and antioxidative activity. The rationalization of structure-activity relationships *h*-TUK was done using 3D-QSAR molecular modeling technique. 3D-QSAR based on GRIND methodology proved to be very useful in finding pharmacophoric hot spots which explained antibacterial activity of *h*-TUK. Obtained three models might be used for the design of more active structures based on *h*-TUK molecules.

Key words: *N*-Heteroaromatic hydrazones; Quantum-chemical calculations; Solvatochromism; Substituent effect; 3D-QSAR; GRIND methodology; Antimicrobial activity; Antioxidant activity; Anticancer activity; HSA.

Academic Expertise: Chemical Sciences

Major in: Organic Chemistry

UDC number: 547.288.3

SPISAK SKRAĆENICA I SIMBOLA

A – Apsorbanca

ACD – Akcidentalna ćelijska smrt (*eng.* Accidental Cell Death)

AD – Domen primenjivosti (*eng.* Applicability Domain)

ADMET – Apsorpcija, raspodela, metabolizam, eliminacija i toksičnost (*eng.* Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity)

adh-(T)UK – Asimetrični dihidrazoni dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline

adh-TUK – Asimetrični dihidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline

AIM – Analiza raspodele elektronske gustine na atomima u molekulu (*eng.* Atoms in Molecules)

AsPC-1 – Matične ćelije adenokarcinoma pankreasa (*eng.* Pancreatic Adenocarcinoma Cancer Stem Cells)

AU – Arbitrarna jedinica (*eng.* Arbitrary Units)

ATCC – Američka kolekcija ćelijskih kultura (*eng.* American Type Culture Collection)

BCP – Kritična tačka veze (*eng.* Bond Critical Point)

BSA – Govedi serum albumin (*eng.* Bovine Serum Albumin)

CoMFA – Komparativna analiza molekulskih polja (*eng.* Comparative Molecular Field Analysis)

COSY – Korelaciona spektroskopija

CSCs – Matične ćelije kancera (*eng.* Cancer Stem Cells)

¹³C NMR – Nuklearna magnetna rezonanca ugljenika

CT – Prenos naelektrisanja (*eng.* Charge Transfer)

CV – metoda unakrsne validacije (*eng.* Cross-Validation)

D_{CT} – Rastojanja prenosa naelektrisanja (*eng.* Charge-Transfer Distance)

dhO – Dihidrazid ugljene kiseline

dhS – Dihidrazid tiougljene kiseline

dh-UK – Dihidrazoni dihidrazida ugljene kiseline

dh-TUK – Dihidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline

dh-(T)UK – Dihidrazoni dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline

DFT – Teorija funkcionala gustine (*eng.* Density functional Theory)

DCM – Dihlormetan

DMSO – Dimetil-sulfoksid

DMSO- d_6 – Deuterisani dimetil-sulfoksid

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (*eng.* 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

2D NMR – Dvodimenziona nuklearna magnetna rezonancija

EAP – Spoljašnja putanja prenošenja apoptoznih signala (*eng.* Extrinsic Apoptotic Pathway).

E_{gap} – Energetska razlika između HOMO i LUMO (*eng.* Energy gap between *HOMO* and LUMO)

FFD – Frakcionog dizajn faktora (*eng.* Fractional Factorial Design)

FT-IR – Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (*eng.* Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

FFD – Frakcioni faktorski dizajn (*eng.* Fractional Factorial Design)

GRIND – Deskriptori nezavisni od međusobnog prostornog svrstavanja molekula (*eng.* GRid Independent Descriptors)

GGA – Uopštena gradijentna aproksimacija (*eng.* Generalized-Gradient Approximation)

GUI – Grafički korisnički *interfejs* (*eng.* Graphical User *Interface*).

HBA – Atom ili atomska grupa koja prima proton pri uspostavljanju vodonične veze (*eng.* Hydrogen-Bonding Acceptor)

HBD – atom ili atomska grupa koja daje proton pri uspostavljanju vodonične veze (*eng.* Hydrogen-Bond Donor)

HMBC – Heteronuklearna korelaciona spektroskopija preko više hemijskih veza

^1H NMR – Protonska nuklearna magnetna rezonanca

HOMO – Najviša popunjena molekulska orbitala (*eng.* Highest Occupied Molecular Orbital)

HSA – Humani serum albumin (*eng.* Human serum albumin)

HSQC – Heteronuklearna jednokvantna korelaciona spektroskopija

h-UK – Hidrazoni dihidrazida ugljene kiseline

h-TUK – Hidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline

h-(T)UK – Hidrazoni dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline

h-UK – hidrazoni dihidrazida ugljene kiseline

IAP – Unutrašnja putanja prenošenja apoptoznih signala (*eng.* Intrinsic Apoptotic Pathway).

ICT – Intramolekulski prelaz naelektrisanja (*eng.* Intramolecular Charge Transfer)

IP – Tačka preseka (*eng.* Isobestic Point)

LFER – Linearna korelacija slobodne energije (*eng.* Linear Free Energy Relationships)

LSER – Linearna korelacija energija solvatacije (*eng.* Linear Solvation Energy Relationship)

LUMO – Najniža nepopunjena molekulska orbitala (*eng.* Lowest Unoccupied Molecular Orbital)

LOO – Unakrsna validacija sa izostavljenim jednim objektom u toku analize (*eng.* Leave One Out)

LTO – Unakrsna validacija sa izostavljena dva objekta u toku analize (*eng.* Leave Two Out)

LDA – Aproksimacija lokalne gustine (*eng.* Local Density Approximation)

LV – Latentne promenljive

MACC-2 – (*eng.* Maximum Auto- and Cross Covariance)

MS/MSⁿ – Višestepena masena spektrometrija

MIC – Minimalna inhibitorna koncentracija (*eng.* Minimal Inhibitory Concentration)

MIF – Polja molekulskih interakcija (*eng.* Molecular Interaction Fields)

MFI – Srednji intenzitet fluorescencije (MFI, *eng.* Median Fluorescence Intensity)

MBC – Minimalna baktericidna koncentracija (*eng.* Minimal Bactericidal Concentration)

MMPA – Analize preklopljenih parova molekula (*eng.* Matched Molecular Pairs Analysis)

MeOH – Metanol

mh-UK – Monohidrazoni dihidrazida ugljene kiseline

mh-TUK – Monohidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline

mh-(T)UK – Monohidrazoni dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline

NCCD – Nomenklaturu tipova ćelijske smrti (*eng.* Nomenclature Committee on Cell Death)

NMR – Nuklearna magnetna rezonancija (*eng.* Nuclear Magnetic Resonance)

¹⁵N NMR – Nuklearna magnetna rezonanca azota

NOESY – Dvodimenzionalna spektroskopija Nuklearnog Overhauserovog efekta (*eng.* Nuclear Overhauser Spectroscopy)

OECD – Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (*eng.* Organizations for Economic Cooperation and Development)

PC – Glavne komponente (*eng.* Principal Components)

PCA – Analiza glavnih komponentata (*eng.* Principal Components Analysis)

PCM – Model polarizabilnog kontinuuma (*eng.* Polarizable Continuum Model)

PCD – Programirana ćelijska smrt (*eng.* Programmed Cell Death)

PDB – Proteinska baza podataka (*eng.* Protein Data Bank)

PLS – Analiza delimičnih najmanjih kvadrata (*eng.* Partial Least Squares)

PI – Propidijum jodid

PV – Matrice doprinosa

Q^2 – Unakrsna procena kvadrata korelacionog koeficijenta (*eng.* Cross-Validation Squared Correlation Coefficient)

Q^2_{acc} – Indeks prediktivne sposobnosti modela

QSAR – Kvantitativna korelacija strukture i reaktivnosti (*eng.* Quantitative Structure Activity Relationship)

QSPR – Kvantitativna korelacija strukture i svojstava (*eng.* Quantitative Structure Property Relationship)

Q_{CT} – Količina prenetog naelektrisanja (*eng.* Amount of Transferred Charge)

R^2_{acc} – Indeks fitovanja modela

RCD – Kontrolisana ćelijska smrt (*eng.* Regulated Cell Death)

ROS – Reaktivne kiselonične vrste, (*eng.* Reactive Oxygen Species)

RNS – Reaktivne azotne vrste (*eng.* Reactive Nitrogen Species)

RSS – Reaktivne sumporne vrste (*eng.* Reactive Sulfur Species)

RSA – Rendgenska strukturna analiza (*eng.* X-ray diffraction)

SCS – Hemijska pomeranja uslovljena prisustvom supstituenta (*eng.* Substituent induced Chemical Shift)

SCF – Metod samousaglašenog polja (*eng.* Self-Consistent Field)

SDEP – Predviđanja greške standardnom devijacijom (*eng.* Standard Deviation of Error of Calculation)

SSP – Jednoparametarska (*eng.* Single Substituent Parameter)

TD-DFT – Teorija funkcionala gustine u zavisnosti od vremena (*eng.* Time Dependant - Density Functional Theory)

THP-1 – Kancer ćelije humane akutne monocitne leukemije (*eng.* Acute Monocytic Leukemia Cells)

TMS – Tetrametilsilan

T – Matrice skorova

UV-Vis – Ultravioletna-vidljiva spektroskopija (*eng.* Ultraviolet–Visible Spectroscopy)

WIZ – Merenje zone inhibicije u mm (*eng.* Width of Inhibition Zone)

X – Nezavisne promenljive

Y – Zavisne promenljive

Z-VAD-fmk – Inhibitor kaspaze širokog spektra delovanja (*eng.* Z-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone)

SPISAK SLIKA

Slika 2. 1 Reakcija nastajanja <i>Shiff</i> -ovih baza	6
Slika 2. 2 Klasifikacija aktivnih centara hidrazona.....	7
Slika 2. 3 Struktura a) mono- b) di-, c) tri- i d) tetra- hidrazona.....	8
Slika 2. 4 dhO i dhS	8
Slika 2. 5 Tautomerija dhS.....	10
Slika 2. 6 Hidrazoni dhO i dhS	11
Slika 2. 7 Sinteza a) <i>mh</i> -(T)UK, b) <i>dh</i> -(T)UK, c) <i>adh</i> -(T)UK.....	12
Slika 2. 8 Sinteza (A) i prekrystalizacija (B) <i>dhUK</i> _(sal)	13
Slika 2. 9 Sinteza <i>dh</i> -UK "zelenom metodom"	14
Slika 2. 10 Sinteza <i>dh</i> -UK iz kalijum-karbonata	15
Slika 2. 11 Tautomerni oblici <i>mhUK</i> _(sal)	17
Slika 2. 12 Izomerni oblici <i>mh</i> -(T)UK: a) <i>E</i> -izomer, b) <i>Z</i> -izomer.....	17
Slika 2. 13 Promena apsorbance na UV-Vis spektru <i>mhUK</i> _(sal) u DMSO-u i smeši rastvarača DMSO/voda.....	18
Slika 2. 14 Ciklična stuktura <i>mh</i> -(T)UK.....	19
Slika 2. 15 Keto-enolna tautomerija <i>dh</i> -(T)UK i <i>adh</i> -(T)UK.....	20
Slika 2. 16 Opšte formule izomernih oblika <i>dh</i> -(T)UK: a) <i>E/E</i> -izomer b) <i>Z/Z</i> -izomer c) <i>E/Z</i> -izomer.....	21
Slika 2. 17 Strukture jedinjenja koja utiču na stabilnost izomernih oblika <i>dh</i> -TUK	21
Slika 2. 18 Ciklizacija <i>dh</i> -(T)UK u prisustvu olovo(II)-acetata	22
Slika 2. 19 Polja molekulskih interakcija: a) sterne konture, b) elektrostatičke konture	41
Slika 2. 20 a) Korelogrami promenljivih proizvoljno izabranog jedinjenja izračunati u programu Pentacle, b) Hitmapa serije jedinjenja sortiranih prema rastućoj biološkoj aktivnosti (svaki red hitmape predstavlja jedno jedinjenja, dok svaka kolona predstavlja jednu promenljivu)	44
Slika 2. 21 Grafik PCA rezultata za molekule iz nekoliko strukturno različitih grupa	46
Slika 2. 22 a) TU (PLS) grafik, b) Grafik PLS skorova.....	48
Slika 2. 23 a) Grafik koji pokazuje intenzitet izabrane promenljive za svako jedinjenja u setu, za izabrani broj LV u PLS modelu, b) Grafik PLS koeficijenata	49
Slika 2. 24 Triacetazon.....	54

Slika 2. 25 <i>adh</i> -TUK derivata henodezoksiholne kiseline.....	55
Slika 2. 26 Humani serum albumin.....	67
Slika 3. 1 Opšta procedura za sintezi <i>mh</i> - i <i>dh</i> - (T)UK.....	69
Slika 4. 1 NOESY spektar <i>mhUK</i> _(2pyc) snimljen u DMSO- <i>d</i> ₆	102
Slika 4. 2 NOESY spektar <i>mhUK</i> _(3pya) snimljen u DMSO- <i>d</i> ₆	102
Slika 4. 3 ¹ H- ¹⁵ N HMBC spektar <i>mhUK</i> _(2pyc) snimljen u DMSO- <i>d</i> ₆	103
Slika 4. 4 NOESY spektar <i>mhUK</i> _(2pyb) snimljen u DMSO- <i>d</i> ₆	103
Slika 4. 5 ¹ H- ¹⁵ N HMBC spektar <i>mhUK</i> _(2pyb) snimljen u DMSO- <i>d</i> ₆	104
Slika 4. 6 Ravnoteža tautomernih oblika <i>mhUK</i> _(2pyb) u rastvoru DMSO-a.....	104
Slika 4. 7 ORTEP prikaz struktura dobijenih na osnovu RSA analize: a) <i>mhUK</i> _(4pyc) i b) <i>mhUK</i> _(4pya) sa oznakama atoma (elipsoidi su prikazani sa verovatnoćom od 50 % i H atomi su prikazani kao sfere proizvoljnog prečnika).....	106
Slika 4. 8 Strukturno preklapanje <i>mhUK</i> _(4pyc) (crvena) sa <i>mhUK</i> _(4pya) (crna).....	106
Slika 4. 9 <i>E/Z</i> izomerizacija <i>mhUK</i> _(2pyc) u rastvoru DMSO-a.....	109
Slika 4. 10 Apsorpcioni spektar <i>mh</i>-UK : a) etanol, b) DMSO, c) acetonitril i d) THF	113
Slika 4. 11 Promena UV apsorpcionog spektra tokom ozračivanja rastvora a) <i>mhUK</i> _(2pyc) i b) <i>mhUK</i> _(2pya) (1,0 · 10 ⁻⁵ M) u DCM	122
Slika 4. 12 Promena UV apsorpcionog spektra tokom zračenja rastvora a) <i>mhUK</i> _(3pya) i b) <i>mhUK</i> _(4pya) (1,0 · 10 ⁻⁵ M) u DCM.....	123
Slika 4. 13 Ravnoteža tautomernih oblika i geometrijskih izomera <i>mhUK</i> _(sal)	124
Slika 4. 14 Zavisnost ln[(A [∞] - A ₀)/(A [∞] - A _t)] sa vremenom potrebnim za izomerizaciju a) <i>mhUK</i> _(2pyc) , b) <i>mhUK</i> _(2pya) i c) <i>mhUK</i> _(4pya) primenom UV zraka talasne dužine od 364,0 nm.....	125
Slika 4. 15 a) Teoretski UV-Vis spektar <i>E</i> - i <i>Z</i> - izomera <i>mhUK</i> _(2pya) , b) Eksperimentalni UV-Vis spektar pre i posle UV zračenja <i>mhUK</i> _(2pya)	125
Slika 4. 16 Promena UV apsorpcionog spektra tokom zračenja rastvora <i>mhUK</i> _(sal) : a) DCM, b) MeOH (1,0 · 10 ⁻⁵ M)	126
Slika 4. 17 UV-Vis spektar <i>mhUK</i> _(2pyb) u DMSO i smeši rastvarača DMSO/voda ...	129

Slika 4. 18 Dijagrami raspodele: a) $mhUK_{(3pyc)}$, b) $mhUK_{(8OH2qc)}$ (α = molarna frakcija) dobijeni iz eksperimentalno izračunatih pK_a vrednosti.....	132
Slika 4. 19 Višestruko fazni fragmentacioni spektri (MS-MS ⁵) dobijeni za $mhUK_{(sal)}$	135
Slika 4. 20 Prikaz HOMO/LUMO orbitala i E_{gap} mh -UK (E oblik) u DMSO-u	138
Slika 4. 21 ICT procesi u supstancama mh -UK (E oblik) (Sa leve strane prikazana je razlika u gustini ekcitolanog i pobuđenog stanja (crveno-gustina raste i plavo – gustina opada); Sa desne strane prikazane su pozicije bari centara za gubitak naelektrisanja (plavi krug) i porast naelektrisanja (ljubičasti krug) pri prelazima).....	141
Slika 4. 22 Optimizovane geometrije derivata mh - i dh - (T)UK na bazi hinolina.....	143
Slika 4. 23 Odgovor ćelijske smrti na THP-1 ćelijama mereno posle 24 h inkubacija sa ispitivanim h -(T)UK pomoću dvojne metode bojenja Aneksinom V i PI.....	146
Slika 4. 24 Odgovor ćelijske smrti na AsPC-1 ćelijama mereno posle 24 h inkubacija sa ispitivanim h -(T)UK pomoću dvojne metode bojenja Aneksinom V i PI.....	147
Slika 4. 25 Distribucija u fazama mitoze podele THP-1 ćelije (A) i ASPC-1 ćelija (B) određena nakon 24 h inkubacije sa ispitivanim jedinjenjima. Promene u zastupljenosti ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su ocenjeni u istim uzorcima prethodno analiziranim na Aneksinu V / PI. Učestalost ćelija nađenih u G0/G1 (crna), S (bela) i G2/M (siva) fazama su određene u odnosu na netretirane kontroln uzorke.....	149
Slika 4. 26 Stepen zavisnosti ćelijske smrti od aktivnosti kaspaza u THP-1 (A) i AsPC-1 ćelijama (B) nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima.....	152
Slika 4. 27 Aktivacija kaspaze-8 i -9 u THP-1 (A) i AsPC-1 ćelijama (B), određeno nakon 6 h inkubacije sa ispitivanim jedinjenjima dodatim na ćelije u njihovim ED ₅₀ koncentracijama.....	154
Slika 4. 28 Procenat THP-1 (A), AsPC-1 (B) ćelija pozitivnih na mitohondrijalne O [•] nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima, i u obe ćelijske linije nakon tretmana $dhUK_{(8qc)}$ (C). U graficima su predstavljeni rezultati netretiranih uzoraka (tanka linija) i tretiranih uzoraka (debela linija).....	156
Slika 4. 29 Promena u ekspresiji CD44 površinskog markera na AsPC-1 ćelijama nakon 72 h inkubacije sa supstancama $dhTUK_{(8qc)}$ (A), $dhTUK_{(8OH2qc)}$ (B) i $dhTUK_{(2qc)}$ (C). Tanka isprekidana linija predstavlja negativnu kontrolu bojeni sa anti-IgG-FITC antitelima, debela crna linija predstavlja rezultat dobijen u netretiranim kontrolnim	

uzorcima bojenim sa anti-CD44-FITC, sivo polje predstavlja rezultat tretiranih ćelija bojenih sa anti-CD44-FITC.....	158
Slika 4. 30 Promene u veličini i morfologiji 3D kulture AsPC-1 ćelija posle 8 dana tretmana (A). Stope rasta ne-tretiranih i tretiranih AsPC-1 sferoida tokom 8 dana trajanja eksperimenta (B).....	160
Slika 4. 31 Promena apsorpcionog spektra $dhTUK_{(8qc)}$ posle dodatka HSA. ($c(\mu M)$) Spektar je snimljen u 30 mM fosfatnom puferu (PBS), pH 7,36).....	161
Slika 4. 32 Promene u emisionom fluorescentnom spektru HSA nakon dodatka $dhTUK_{(8qc)}$ u koncentracijama od (0,0; 0,35; 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5; 4,9, 6,3) $\cdot 10^{-6}$ M (T = 310 K; 30 mM PBS, pH = 7,4).....	162
Slika 4. 33 Dvoparametarska kriva za određivanje konstante vezivanja (Kb), i broja mesta vezivanja za HSA- $dhTUK_{(8qc)}$ interakciju.....	163
Slika 4. 34 Zavisnost $\ln Kb$ od $1/T$ za određivanje interakcije $dhTUK_{(8qc)}$ sa HSA	164
Slika 4. 35 $dhTUK_{(8qc)}$ (narandžasti) dokovan u poddomen IB (a), IIA (b), and IIIA (c) HSA Ostaci aminokiselina koje interaguju sa $dhTUK_{(8qc)}$, prikazani su kao štapići sa obojenim atomima. Najvažnije polarne interakcije su istaknute zelenim tačkama i obeleženim razdaljinama	165
Slika 4. 36 PCA skorovi jedinjenja aktivnih na bakteriji <i>S. aureus</i>	177
Slika 4. 37 Grafik PLS koeficijenata (modela sa 2 LV). Najinformativnije promenljive su označene brojevima i dalje diskutovane u tekstu.....	178
Slika 4. 38 Promenljive sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja predstavljene na jedinjenju $dhTUK_{(2pya)}$ kao aktivnijem (levo, crvene linije) i sa negativnim uticajem $dhTUK_{(sal)}$ na aktivnost (desno, plave linije)	180
Slika 4. 39 Grafik PLS koeficijenata (model sa 3 LV) za bakteriju <i>P. aeruginosa</i>	181
Slika 4. 40 Promenljive sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja, predstavljene na jedinjenju $dhTUK_{(2pyc)}$ kao aktivnijem (levo, crvene linije) i sa smanjenom aktivnošću $dhTUK_{(2pyc)}$ (desno, plave linije).....	182
Slika 4. 41 Grafik PLS koeficijenata (model sa 2 LV) za kvasac <i>C. albicans</i>	184
Slika 4. 42 Promenljive sa najvećim uticajem na antifungalnu aktivnost jedinjenja, predstavljene na $dhTUK_{(2pyc)}$ kao najaktivnijem (crvene linije)	184
Slika 4. 43 Promenljive sa najvećim uticajem na antifungalnu aktivnost jedinjenja, predstavljene na $mhTUK_{(4pyc)}$ sa smanjenom aktivnošću (plave linije)	184

Šema 4. 1 Torzioni uglovi <i>mh</i> -UK korišćeni u konformacionoj analizi	109
Šema 4. 2 Protolitička ravnoteža <i>mhUK</i> _(3pyc) u rastvoru vode.....	131
Šema 4. 3 Protolitička ravnoteža <i>mhUK</i> _(8OH2qc) u smeši rastvarača MeOH/voda	131

SPISAK TABELA

Tabela 2. 1 Poređenje "metode rastvarača" sa "zelenom metode" pri sintezi <i>dh</i> -UK	14
Tabela 2. 2 Termodinamička svojstva keto-enolnih tautomera <i>mhUK</i> _(sal) u gasnoj fazi i DMSO-u	38
Tabela 4. 1 Kristalografski podaci za jedinjenja <i>mhUK</i> _(4pyc) i <i>mhUK</i> _(4pya)	105
Tabela 4. 2 Izabrane dužine veza (Å) i uglova(°) <i>mhUK</i> _(4pyc) i <i>mhUK</i> _(4pya)	107
Tabela 4. 3 Energije optimizovanih struktura <i>mh</i> -UK.....	108
Tabela 4. 4 Geometrijski podaci za stabilniji oblik <i>E</i> izomera <i>mh</i> -UK dobijen MP2/6-311G(d,p) metodom	111
Tabela 4. 5 Apsorpcioni maksimumi <i>E</i> oblika proučavanih jedinjenja u odgovarajućim rastvaračima.....	114
Tabela 4. 6 Rezultati korelacione za <i>E</i> izomere isitivani jedinjenja dobijenih primenom <i>Kamlet-Taft</i> -ove jednačine.....	116
Tabela 4. 7 Rezultati korelacione za <i>E</i> izomere isitivani jedinjenja dobijenih primenom <i>Catalán</i> -ove jednačine.....	118
Tabela 4. 8 Rezultati LFER korelacija <i>E</i> izomera <i>mh</i> -UK dobijenih pomoću <i>Hammett</i> -ove jednačine	119
Tabela 4. 9 Rezultati korelacije NMR podataka <i>mh</i> -UK sa σ konstantama dobijenih primenom <i>Hammett</i> -ove jednačine 2.12.....	121
Tabela 4. 10 Rezultati ω B97X-D/6-311G(d,p) reoptimizacije i AIM proračuni za <i>mhUK</i> _(sal) , <i>mhUK</i> _(2pyc) i <i>mhUK</i> _(2pya) u DCM i MeOH	127
Tabela 4. 11 Eksperimentalno određene (pK_{aexp}) i izračunate (pK_{acalc}) pK_{a} vrednosti <i>E</i> izomera <i>mh</i> -UK	130
Tabela 4. 12 Rezultati LFER korelacija pK_{a} vrednosti <i>E</i> izomera <i>mh</i> -UK sa σ_{pH^+} konstantama korišćenjem <i>Hammett</i> -ove jednačine	133
Tabela 4. 13 Rezultati TD-DFT proračuna za prelaze iz osnovnog u prvo vertikalno pobuđeno stanje u DMSO.....	139

Tabela 4. 14 Izračunate D_{CT} i Q_{CT} vrednosti <i>mh</i> -UK u toku ekcitacije elektrona.....	140
Tabela 4. 15 ED50 koncentracija (μ M) postignuta posle 24 h tretmana na THP-1 i AsPC-1 ćelijama sa <i>h</i> -(T)UK	145
Tabela 4. 16 Lipinskijeve farmakokinetičke osobine ispitivanih jedinjenja	161
Tabela 4. 17 Konstanta vezivanja (<i>Kb</i>) i broj vezujućih mesta <i>dhTUK</i> _{(8qc) za HSA na tri temperature}	163
Tabela 4. 18 Termodinamički parametri vezivanja <i>dhTUK</i> _{(8qc) sa HSA.....}	164
Tabela 4. 19 Doking rezultati vezivanja <i>dhTUK</i> _{(8qc) u poddomenima IB, IIA i IIIA. 165}	
Tabela 4. 20 Antioksidativna aktivnost jedinjenja	167
Tabela 4. 21 <i>In vitro</i> antimikrobna aktivnost supstanci testiranih agar difuzionom metodom izražena WIZ ^a	171
Tabela 4. 22 <i>In vitro</i> antifungalna aktivnost supstanci testirania agar difuzionom metodom izražena WIZ	173
Tabela 4. 23 Antimikrobna aktivnost <i>h</i> -TUK.....	175
Tabela 4. 24 Matrica međukorelacije (<i>r</i> vrednosti) WIZ i pMIC vrednosti	175
Tabela 4. 25 Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon dva FFD ciklusa (od 610, u modelu je zadržano 301 promenljivih).....	176
Tabela 4. 26 Statistički parametri PLS modela sa dve LV nakon primene tri različite CV procedure. Podešavanja: FFD-LV = 3, 20 % veštačkih promenljivih, 20 nasumičnih ciklusa, 4 nasumične grupe, 2 ciklusa FFD.	177
Tabela 4. 27 Pregled promenljivih sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja na <i>S. aureus</i>	179
Tabela 4. 28 Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon dva FFD ciklusa (od 590, u modelu je zadržano 364 promenljivih).....	180
Tabela 4. 29 Statistički parametri PLS modela sa tri LV nakon primene tri različite CV procedure. Podešavanja: FFD-LV = 3, 20 % veštačkih promenljivih, 20 nasumičnih ciklusa, 4 nasumične grupe, 2 ciklusa FFD.	181
Tabela 4. 30 Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon dva FFD ciklusa (od 600, u modelu je zadržano 316 promenljivih).....	183
Tabela 4. 31 Statistički parametri PLS modela sa tri LV nakon primene tri različite CV procedure. Podešavanja: FFD-LV = 3, 20 % veštačkih promenljivih, 20 nasumičnih ciklusa, 4 nasumične grupe, 2 ciklusa FFD.	183

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DEO	6
2.1 Struktura i klasifikacija <i>N</i> -heteroaromatičnih hidrazona i dihidrazona dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline	6
2.1.1 <i>Shiff</i> -ove baze	6
2.1.2 Hidrazoni	6
2.1.3 Dihidrazidi ugljene i tiougljene kiseline (dhO(S))	8
2.1.3.1 Sinteza dhO(S).....	9
2.1.3.2 Fizička svojstva dhO(S).....	10
2.1.3.3 Hemijska svojstva dhO(S).....	10
2.1.4 Sinteza <i>h</i> -(T)UK	12
2.2 Izomerija <i>h</i> -(T)UK.....	16
2.2.1 Primena NMR, FT-IR i UV-Vis spektroskopije u ispitivanju izomerije <i>h</i> -(T)UK	16
2.2.1.1 Monohidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline	16
2.2.1.2 Dihidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline	20
2.2.2 Primena rendgenske strukturne analize u ispitivanju konformacije.....	22
2.3 Korelaciona analiza u organskoj hemiji	23
2.3.1 Efekti supstituenata i linearna korelacija slobodnih energija	23
2.3.2 <i>Hammett</i> -ova jednačina	24
2.3.2.1 Modifikovana i proširena Hammet-ova jednačina	26
2.3.3 Primena <i>Hammett</i> -ove jednačine.....	27
2.4 Linearna korelacija solvatacionih energija	27
2.4.1 Solvatohromizam organskih molekula	27
2.4.2 Efekat rastvarača-višeparametarski pristup	28
2.4.2.1 <i>Kamlet-Taft</i> -ova skala polarnosti.....	29

2.4.2.2 <i>Catalán</i> -ova skala polarnosti	30
2.5 Teorija funkcionala gustine (DFT)	31
2.5.1 Aproksimacioni funkcionali	33
2.5.2 Bazisni skupovi	35
2.5.3 Molekulski deskriptori.....	36
2.5.4 HOMO, LUMO, HOMO-LUMO energetski prelaz.....	36
2.5.5 Spektroskopija i spektroskopske veličine.....	37
2.5.6 Primena kvantnohemijskih proračuna u ispitivanju izomerije <i>h</i> -(T)UK.....	37
2.6 Pručavanje kvantitativne veze između strukture i svojstava molekula	38
2.6.1 3D-QSAR analiza	39
2.6.2. Polje molekulskih interakcija – GRID metod.....	40
2.6.2.1 GRID polje sila, kalibracija	41
2.6.3. GRIND deskriptori izvedeni iz MIF-ova.....	42
2.6.3.1 Osnovna svojstva GRIND deskriptora	43
2.6.4 Trodimenzionalna analiza odnosa strukture i aktivnosti (3D-QSAR) zasnovana na poljima molekulskih interakcija.....	45
2.6.5 Interpretacija PLS modela	48
2.7. Biološka aktivnost	49
2.7.1 pK_a vrednost kao parametar biološke aktivnosti	50
2.7.2 Antimikrobna aktivnost	52
2.7.2.1 Antimikrobna aktivnost <i>h</i> -(T)UK.....	53
2.7.3 Antioksidativna aktivnost	56
2.7.3.1 Antioksidativna aktivnost <i>h</i> -(T)UK.....	58
2.7.4 Antikancer aktivnost.....	59
2.7.4.1 Određivanje tipova ćelijske smrti	59
2.7.4.2 Određivanja faza ćelijskog ciklusa	61

2.7.4.3 Utvrđivanje uloge kaspaza u apoptozi izazvanoj ispitivanim jedinjenjima	62
2.7.4.4 Kvantitativno određivanje superoksidnih radikala u mitohondrijama ...	63
2.7.4.5 Utvrđivanje sposobnosti ispitivanih jedinjenja da stimulišu diferencijaciju matičnih ćelija kancera	64
2.7.4.6 Ispitivanje aktivnosti jedinjenja na 3D modelu	65
2.7.4.7 Osnovni principi analize ćelija metodom protočnog citometra.....	65
2.7.4.8 Antikancer aktivnost <i>h</i> -(T)UK.....	66
2.7.5 Humani serum albumin	66
3. EKSPERIMENTALNI DEO	68
3.1. Sinteza <i>mh</i> -(T)UK i <i>dh</i> -(T)UK.....	68
3.1.1. Opšta procedura dobijanja	68
3.2. Karakterizacija sintetisanih jedinjenja.....	70
3.3 Rendgenska strukturna analiza	87
3.4 Korelaciona analiza	87
3.5 Masena spektrometrija, MS/MS ⁿ	88
3.6 Potenciometrijsko određivanje konstanti kiselosti	89
3.7 Molekulsko modelovanje	90
3.7.1 Kvantnomehanički proračuni, predikcija NMR-a i lipofilnost.....	90
3.7.2 Teorijski proračuni <i>mh</i> -UK	90
3.7.3 3D-QSAR modelovanje zasnovano na deskriptorima izvedenim iz MIF-ova primenjeno na antimikrobnu aktivnost <i>h</i> -TUK	91
3.7.4 Doking vezivanja <i>dh</i> TUK _(8qc) za HSA	91
3.8 Metode ispitivanja biološke kativnost	92
3.8.1 Ispitivanje anticancer aktivnosti	92
3.8.2 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti, DPPH inhibicija.....	96
3.8.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	97

3.8.4 Vezivanje $dhTUK_{(8qc)}$ za HSA.....	98
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	101
4.1. Strukturna i spektralna analiza mh -UK	101
4.1.1. Rendgenska strukturna analiza	105
4.1.2 Optimizovane geometrije mh -UK	108
4.2 UV-Vis spektralna analiza.....	112
4.2.1 Solvatohromizam mh -UK.....	112
4.2.2 LSER analiza	115
4.2.3 LFER analiza primenjena na vrednosti UV-Vis spektralnih podataka mh -UK	118
4.2.4 LFER analiza primenjena na vrednosti 1H i ^{13}C NMR pomeranja mh -UK	120
4.2.5. Izomerizacija mh -UK	121
4.2.5.1 Fotoizomerizacija mh -UK	121
4.2.5.2 Ispitivanje mogućnosti izomerizacije jedinjenja $mhUK_{(2pyb)}$ u smeši DMSO/voda.....	128
4.3 Određivanje konstanti kiselosti	129
4.3.1 LFER analiza primenjena na pK_a vrednosti molekula mh -UK.....	133
4.4 Masena spektrometrija.....	133
4.5. TD-DFT proračuni: priroda graničnih molekulskih orbitala i kvantifikacija ICT	137
4.6. Kvantnohemijsko proučavanje stabilnosti hinolinskih derivata h - (T)UK.....	142
4.7. Ispitivanje biološke aktivnosti mh - i dh - (T)UK	144
4.7.1 Antikancer aktivnost hinolinskih derivata mh - i dh - (T)UK	144
4.7.1.1 Pro-apoptotski potencijal (T)CSs jedinjenja.....	145
4.7.1.2 Promene zastupljenosti ćelija po fazama ćelijske deobe.....	148
4.7.1.3 Utvrđivanje korelacije između structure jedinjenja i aktivnosti kaspaza tokom apoptozne smrti	150

4.7.1.4 Utvrđivanje dominantnog kaspaznog puta u procesu iniciranja apoptozne smrti.....	153
4.7.1.5 Utvrđivanje pro-oksidativne aktivnosti	155
4.7.1.6 Sposobnost indukcije reprogramiranja fenotipa matičnih ćelija kancera	157
4.7.1.7 Aktivnost na 3D ćelijskom modelu	159
4.7.2 Vezivanje <i>dhTUK</i> _(8qc) za HSA.....	160
4.7.2.1 Spektrofluorimetrijsko merenje interakcije HSA sa <i>dhTUK</i> _(8qc)	162
4.7.2.2 Termodinamički parametri vezivanja.....	164
4.7.2.3 Molekulski doking vezivanja <i>dhTUK</i> _(8qc) za HSA.....	165
4.7.3 Antioksidativno dejstvo.....	166
4.7.4 Antimikrobno dejstvo	170
4.7.5 Tehnike molekuskog modelovanja u cilju racionalizacije odnosa između strukture i antimikrobne aktivnosti.....	174
4.7.5.1 Ispitivanje primenljivosti 3D-QSAR metode izvedene iz GRIND metodologije	174
5. ZAKLJUČAK	185
6. LITERATURA	190
7. PRILOG	203
Prilog 7. A Tabele i slike	203
Prilog 7. B NMR spektri.....	220

1. UVOD

Hidrazoni predstavljaju proizvode kondenzacije hidrazina ili njegovih alkil, acil ili aril analoga sa karbonilnim jedinjenjima. Zbog svog širokog spektra biološke i farmakološke aktivnosti, pre svega antituberkularnog, analgetskog, antikancer, antibakterijskog, antifungalnog i antiinflamatornog dejstva, predstavljaju cilj mnogobrojnih istraživanja u medicinskoj hemiji.¹⁻⁶

S obzirom da veliki broj biohemijski važnih supstanci i lekova u svojoj strukturi sadrži heterociklični prsten, proučavanje strukture i svojstava heterocikličnih jedinjenja postalo je nezamenljivo u naučnim i medicinskim istraživanjima.⁷⁻¹¹ Poznato je da mnoga hemijska jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju piridinski prsten poseduju raznovrsnu biološku aktivnost, a osim toga brojne supstance su čak i u kliničkoj upotrebi i imaju sve veći primenu u savremenoj medicini¹². Poslednjih nekoliko godina *N*-heteroaromatični hidrazonski derivati predmet su mnogih studija jer je utvrđeno da poseduju raznorodne terapeutske aktivnosti. Odabir i siteza jedinjenja za koja se na osnovu hemijske strukture i sličnosti sa aktivnim jedinjenjima predviđa da će imati odgovarajuće fizičko-hemijske karakteristike i biološku aktivnost, predstavlja jedan od zadataka današnje medicinske hemije. Prema dosadašnjim istraživanjima, elektronska struktura u molekulu i mogućnost upostavljanja vodoničnih veza sa ciljnim mestima nalaze se u osnovi mehanizma biološkog dejstva jedinjenja. Veoma je bitno pri ispitivanju identifikovati onaj strukturni element koji je odgovoran za povećanje ili smanjenje biološkog dejstva određenog jedinjenja.¹³

U cilju proučavanja sinteze, strukture i bioloških svojstava sintetisane su serije *N*-heteroaromatičnih monihidrazona i dihidrazona na bazi dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline (*h*-(T)UK). Za veliki broj ovih jedinjenja ne postoje literaturni navodi koji se odnose na ispitivanje njihovih solvatrohromnih i fizičko hemijskih svojstava. Sinteza je izvršena reakcijom kondenzacije navedenih dihidrazida sa različitim *N*-heteroaromatičnim karbonilnim jedinjenjima na bazi piridina i hinolina. Ovako dobijena jedinjenja se međusobno razlikuju prema položaju iminske grupe u odnosu na piridinski i hinolinski atom azota, prema tipu supstituenata vezanih na azometinskom ugljeniku (vodonik, metil i fenil grupa) kao i prisustvu atoma kiseonika, odnosno sumpora. Osim toga, proučavana jedinjenja se međusobno razlikuju po broju aromatičnih prstenova u

svojoj strukturi (monohidrazoni/dihidrazoni). Radi ispitivanja uticaja zamene "aza" atoma azota fenolnom OH grupom na biološku aktivnost, sintetisani su mono- i di- hidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline (*mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK) i koji na azometinskom ugljenikovom atomu imaju 2-hidroksifenil grupu. Struktura jedinjenja je potvrđena na osnovu elementalne analize, UV-Vis, FT-IR, ^1H i ^{13}C NMR spektara.

U okviru prve serije jedinjenja, monohidrazona na bazi dihidrazida ugljene kiseline (*mh*-UK), urađena je detaljna eksperimentalna i teorijska analiza strukture i svojstava jedinjenja, a rendgenska strukturna analiza (RSA) je primenjena na dva jedinjenja. Kvantnohemijskim proračunom dobijene su optimizovane geometrije, elementi geometrije i torzioni uglovi koji su u skladu sa kristalografskim podacima. Upotrebom NMR i UV-Vis spektroskopije u ovoj disertaciji je dokazano da je dominantan *E* oblik *mh*-UK, a kvantnohemijskim izračunavanjima predviđen je redosled stabilnosti ovih izomernih oblika. Optimizovani geometrijski parametri dobijeni za *h*-(T)UK na bazi hinolina kao i teorijski NMR spektri su takođe u skladu sa eksperimentalnim podacima.

Jedan od ciljeva ove disertacije se odnosio na proučavanje uticaja rastvarača, tipa halkogenog elementa, kao i supstituenata na aromatičnim jezgrima i iminskoj vezi, na pomeranja UV-Vis apsorpcionih maksimuma. Radi detaljnije i potpunije analize u cilju upoređivanja promena u odnosu na nesupstituisano jedinjenje naknadno su sintetisana dva *mh*-UK kondenzacijom benzaldehida (*mh*UK_(ba)) i acetofenona (*mh*UK_(af)) sa dihidrazidom ugljene kiseline (*dh*O). Dobijeni rezultati su analizirani primenom linearnih korelacija solvatacionih energija (LSER, *eng.* Linear Solvation Energy Relationship) korišćenjem Kamlet-Taftove solvatohromne jednačine i modelom koji je predložio Catalán na osnovu kojih se procenjuje doprinos efekata specifičnih i nespecifičnih interakcija između rastvorenih molekula i rastvarača.

Pri analizi uticaja supstituenata na konjugaciju i karakter intramolekulskog prenosa naelektrisanja u molekulima značajno je pomogla interpretacija eksperimentalnih rezultata pomoću kvantnohemijskih metoda, *ab initio* MP2 i DFT metoda. Uticaj efekata supstituenata, solvatohromizam i promene u distribuciji ukupnog naelektrisanja u osnovnom i ekcitanom stanju na osnovu proračuna HOMO/LUMO (HOMO – najviša popunjena molekulska orbital, *eng.* Highest Occupied Molecular Orbital) LUMO – najniža nepopunjena molekulska orbital, *eng.* Lowest Unoccupied Molecular Orbital))

energija ($E_{\text{HOMO}}/E_{\text{LUMO}}$) i E_{gap} analizirana je primenom TD-DFT (teorija funkcionala gustine u zavisnosti od vremena *eng.* Time Dependant - Density functional Theory) metode. Osim toga kao dodatni rezultati iz proračuna prikazane su vrednosti oscilatorne jačine, vertikalne energije ekscitacije i elektronski prelazi. TD-DFT metoda je korišćen i za kvantifikaciju intramolekulsog prenosa naelektrisanja (ICT, *eng.* Intramolecular Charge Transfer) proračunom vrednosti rastojanje prenosa naelektrisanja (D_{CT} , *eng.* Charge-Transfer Distance) i količine prenetog naelektrisanja (Q_{CT} , *eng.* Amount of Transferred Charge).

Primena metode lineranih korelacija slobodnih energija (LFER, *eng.* Linear Free Energy Relationships) na eksperimentalne vrednosti ^1H NMR i ^{13}C NMR hemijskih pomeranja kao i $\text{p}K_{\text{a}}$ vrednosti daje uvid o uticaju strukture na prenošenje elektronskih efekata supstituenata. Na osnovu LFER analize ostvaruju se nova saznanja o načinima prenošenja polarnih (induktivni/efekat polja) i rezonacionih efekata supstituenata i njihovih uticaja na stanje ravnoteže izomernih oblika ispitivanih jedinjenja. Posebna pažnja je posvećena razdvajanju polarnih i rezonacionih efekata i njihova kvantifikacija korišćenjem principa korelacije strukture i svojstava ispitivanih jedinjenja, tako da je LFER analiza primenjena i na ispitivanje uticaja efekata supstituenata na pomeranja vrednosti ν_{max} . Dobijeni rezultati su interpretirani u cilju rasvetljavanja uticaja efekta supstituenata na stabilizaciju/destabilizaciju molekulskih orbitala u osnovnom i pobuđenom stanju, odnosno vrednosti E_{gap} (energetska razlika između HOMO i LUMO (*eng.* Energy gap between *HOMO* and *LUMO*), tj pomeranje ν_{max} . Vrednost negativnog logaritma konstante kiselosti ($\text{p}K_{\text{a}}$) biološki aktivnih molekula su veoma važne za tačno utvrđivanje stanja ravnoteže koja se odnosi na protonovanje/deprotonovanje ispitivanih molekula na različitim pH vrednostima. Dobijeni rezultati imaju veliki značaj u određivanju i predviđanju njihovih ADMET osobina (adsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost; *eng.* Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity). U okviru ove disertacije, eksperimentalno su određene konstante kiselosti serije *mh*-UK *E* oblika. S' obzirom da bi u MS-MSⁿ (višestepena masena spektrometrija) spektima u pozitivnom i negativnom modu neki procesi protonacije/deprotonacije trebalo da ukazuju na pretežno bazna/kisela mesta u strukturi jedinjenja ova metoda je primenjena u cilju lakšeg tumačenja rezultata. Njenom

primenom detaljno su definisani fragmentacioni putevi i strukture fragmenata uz diskusiju o uticaju supstituenata na način fragmentisanja.

U skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju da različiti geometrijski izomeri ne poseduju istu biološku aktivnost,¹⁴ kao i poznatim fenomenom *E/Z*- fotoizomerizacije semikarbazona na bazi piridina¹⁵, u ovoj disertaciji je bilo od interesa istražiti faktore koji utiču na promenu konformacije odabranih jedinjenja. Ispitivanje je izvršeno UV zračenjem jedinjenja u različitim rastvaračima na odgovarajućim talasnim dužinama i u određenom vremenskom periodu. Ispitivan je uticaj rastvarača, položaja azota u heteroaromatičnom jezgru i prisustva metil grupe na azometinskom ugljeniku na proces izomerizacije. Dodatno je ispitivan uticaj mogućnosti formiranja intra- i intermolekulske vodonične veze na reverzibilnost procesa uz praćenje kinetike reakcije.

Hinolinsko jezgro predstavlja privilegovanu strukturnu jedinicu u koja se javlja u određenom broju supstanci koje ispoljavaju antikancer aktivnost¹⁶. Veliki broj do sada testiranih (tio)semikarbazona koji u svojoj strukturi sadrže hinolinsko jezgro pokazali su obećavajuće rezultate pri testiranju na različitim kancer ćelijskim linijama¹⁷⁻²². Strukturno bliski tio(semi)karbazonima su *mh*-(T)UK koji se razlikuju po tome što umesto (tio)amidne grupe sadrže (tio)hidrazidnu grupu koja omogućava lako građenje bisderivata, odnosno dihidrazona¹⁷⁻²². U ovoj disertaciji su prikazni rezultati prvog organizovanog ispitivanja antitumorske aktivnosti *mh*-(T)UK i njihovih odgovarajućih bis analoga, *dh*-(T)UK na bazi hinolina. Ispitivanja su urađena na kulturama humane akutne monocitne leukemije (THP-1) i humanog adenokarcinoma pankreasa (AsPC-1). Od posebnog značaja je ćelijska kultura AsPC-1 koja spada u kategoriju matičnih ćelija malignog tkiva koje su uzrok nastanka metastatskih tumora i povratka bolesti nakon uspešnog lečenja hirurškim uklanjanjem prvobitnog tumora i citostatskom terapijom.²³ Osim na standardnim 2-D modelima, testiranje na AsPC-1 ćelijama je urađeno i na 3-D modelima koji predstavljaju mikrotkivne tumorske formacije i omogućavaju znatno precizniju procenu antitumorske aktivnosti u odnosu na 2-D kulture. Da bi se dobila informacija o vezivanju i interakciji izabranog najjaktivnijeg jedinjenja sa humani serum albumin (HAS, *eng.* Human serum albumin) izveden je eksperiment i protokol doking analize, uz određivanje termodinamičkih parametara. Kriterijum koji je korišćen za izbor jedinjenja i ispitivanje vezivanja za HSA je anticancer aktivnost jedinjenja na obe ćelijske linije i lipofilnost kao jedan od najvažnijih faktora koji određuju obim vezivanja leka.

Osim antikancer testova u cilju ispitivanja uticaja strukture na aktivnost jedinjenja sprovedeno je sistematsko testiranje antimikrobne i antioksidativne aktivnosti sintetisanih *h*-(T)UK. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti je urađeno na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, kao i na patogenim gljivicama primenom disk difuzione metode, dok je antioksidativna aktivnost ispitana metodom sposobnosti hvatanja slobodnih radikala u sistemu sa DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalima. Diskutovano je o uticaju strukture ispitivanih jedinjenja na dobijene rezultate biološke aktivnosti.

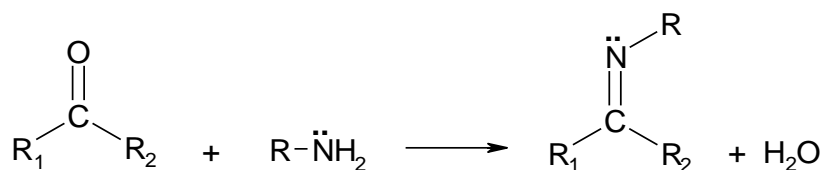
U okviru ove disertacije posebna pažnja posvećena je primeni tehnika molekuskog modelovanja zasnovanih na poljima molekulskih interakcija (MIF, *eng.* Molecular Interaction Fields) u svrhu objašnjavanja i racionalizacije rezultata bioloških ispitivanja i dizajna aktivnijih jedinjenja. Za korelaciju između strukture i antimikrobne aktivnosti hidrazona dihidrazida tiougljene kiseline (*h*-TUK) korišćen je metod kvantitativne korelacije između strukture i svojstava (QSAR, *eng.* Quantitative Structure Property Relationship) zasnovan na molekuskim deskriptorima nezavisnim od međusobnog prostornog svrstavanja molekula (GRIND, *eng.* GRid Independent Descriptors). Dobijena su tri statistički značajna modela koja se mogu koristiti za dizajn aktivnijih struktura na bazi *h*-TUK.

2. TEORIJSKI DEO

2.1 Struktura i klasifikacija *N*-heteroaromatičnih hidrazona i dihidrazona dihidrazida ugljene i tiougljene kiseline

2.1.1 *Shiff*-ove baze

Nemački hemičar i nobelovac Hugo Shiff je otkrio *Shiff*-ove baze (imine) 1864. godine. Ova vrsta jedinjenja predstavlja azotove analoge aldehida i ketona kod kojih je karbonilna grupa zamenjena imino grupom²⁴. Najčešće se formiraju reakcijom kondenzacije primarnih amina sa aldehydima i ketonima i predstavljaju važan intermedijer za sintezu različitih biološki aktivnih jedinjenja (Slika 2.1). Reakcija ovog tipa spada u reakciju nukleofilne adicije jer je stvaranje veze između nukleofilnog azotovog atoma i karbonilnog ugljenikovog atoma najvažnija promena koja se dešava u toku reakcije.



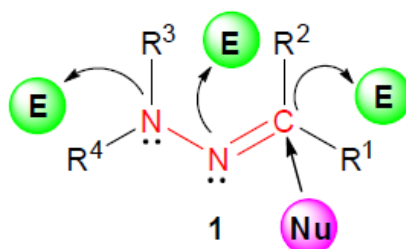
Slika 2. 1 Reakcija nastajanja *Shiff*-ovih baza

Stabilnost i način sinteze *Shiff*-ovih baza zavisi od vrste alkil ili aril grupe u aldehydima i ketonima. Aromatični aldehydi i ketoni značajno stabilišu imine efektom konjugacije^{25,26}, dok *Shiff*-ove baze alifatičnih karbonilnih jedinjenja zbog svojstva polimerizacije ih dodatno destabilišu^{27,28}. Formiranje *Shiff*-ovih baza iz aldehyda i ketona je reverzibilna reakcija i može se odvijati u baznoj i kiseljoj sredini ili uz zagrevanje, pri čemu je brzina nastajanja imina najbrža pri pH vrednostima između 3 i 5²⁹.

2.1.2 Hidrazoni

Osim primarnih amina, hidrazin (N₂H₄) i njegovi derivati takođe podležu reakciji kondenzacije sa aldehydima i ketonima u kiseljoj sredini pri kojoj nastaju *hidrazoni*. Hidrazin predstavlja hidrid azota(II) koji se u vodenim rastvorima ponasa kao baza. Njegovi alkil i aril derivati su *hidrazini* (R-NHNH₂), dok se acil derivati nazivaju *hidrazidi* (RCONHNH₂)³⁰.

Jednostavna način sinteze, hidrolitička stabilnosti i tendencija ka kristalčnosti su razlog zbog čega se hidrazoni izučavaju već dugi niz godina, ali i pored toga veliki deo hemije hidrazona nije dovoljno ispitan. Najviše se koriste u dizajnu lekova i sintezi heterocikličnih supstanci, a zbog svoje sposobnosti da reaguju sa metalnim jonima veoma često se koriste kao ligandi u metalnim kompleksima³¹. U osnovi strukture hidrazona nalaze se dva atoma azota (hidrazinski i iminski) različitih osobina i azometinska (imino, C=N) dvostruka veza koja je konjugovana sa slobodnim elektronskim parom. Ove strukturne karakteristike su uglavnom odgovorne za fizičko-hemijska svojstva hidrazona. Oba atoma azota su nukleofilna (Nu), s tim što je hidrazinski tip azota reaktivniji, a atom ugljenika ima i elektrofilni (E) i nukleofilni karakter (Nu)³¹ (Slika 2.2).

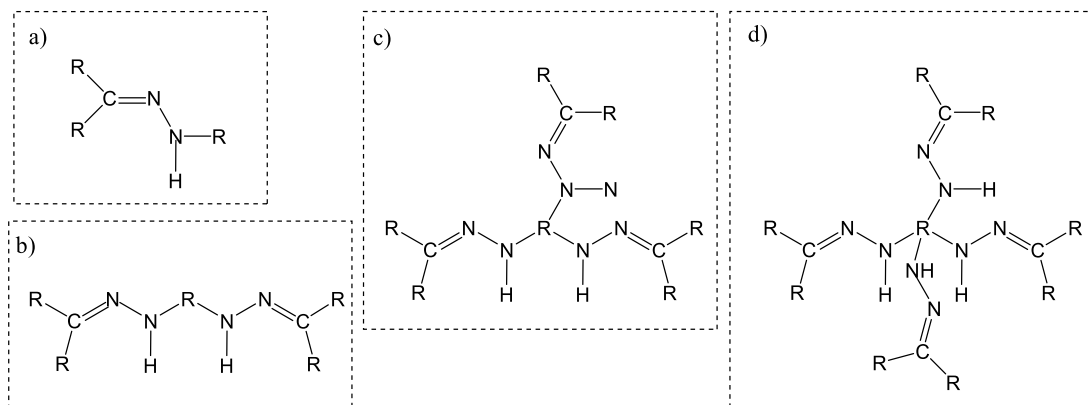


Slika 2. 2 Klasifikacija aktivnih centara hidrazona³¹

Zbog svoje sposobnosti da reaguju i sa nukleofilnim i elektrofilnim agensima hidrazoni imaju široku primenu u organskoj sintezi³¹, a uvođenje funkcionalnih grupa u njihovim molekulima proširuje spektar njihove primene. Prisustvo halogena u hidrazonima potpomaže sintezu nitril imina i 1,2-diaza-1,3-butadiena koji predstavljaju aktivne intermedijere u hemiji cikloadicije³¹.

Kontrolisanjem molskog odnosa hidrazina ili derivata hidrazina u odnosu na monokarbonilno jedinjenje mogu se formirati monohidrazoni, dihidrazoni, trihidrazoni i tetrahidrazoni. Monohidrazoni nastaju kondenzacijom jednog molekula hidrazina ili derivata hidrazina sa jednim molekulom monokarbonilnog jedinjenja (Slika 2.3 a)). Jedinjenja dobijena kondenzacijom hidrazina i/ili njegovih derivata sa dva molekula monokarbonilnih jedinjenja (Slika 2.3 b)) ili jednim molekulom dikarbonilnog jedinjenja nazivaju se dihidrazoni. Za formiranje tri- i tetra- hidrazona postoji veliki broj različitih načina sinteze, a na Slici 2.3 c) i d) su prikazani trihidrazoni i tetrahidrazoni koji se formiraju kondenzacijom tri, odnosno četiri monokarbonilna jedinjenja sa hidrazinom ili njegovim derivatima³².

Poslednjih nekoliko godina veliku pažnju iz različitih oblasti biologije i različitih grana hemije privukli su *h*-(T)UK. Za to su jednim delom zaslužni njihovi prekursori dhO i dhS koji su našli primenu u biohemiji, farmakologiji, biologiji³³ i koriste se za proizvodnju različitih industrijski važnih polimera primenljivih u fotografiji³⁴.

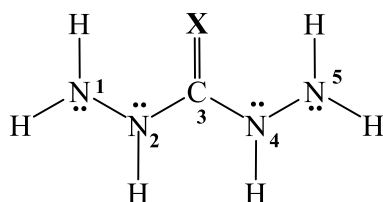


Slika 2. 3 Struktura a) mono- b) di-, c) tri- i d) tetra- hidrazona

2.1.3 Dihidrazidi ugljene i tiougljene kiseline (dhO(S))

dhO i dhS su simetrični homolozi uree i tiouree. Preduslov za otkrivanje ove vrste jedinjenja bio je pronalazak hidrazina 1863. godine. *Curtius* i *Heidenreich* su 1894. godine opisali, a 1895. godine detaljnije objasnili sintezu i karakterizaciju dhO, dejstvom hidratisanog hidrazina na dietilkarbonat. *Stolle* je 1908. godine otkrio dhS. Postoji veliki broj istraživanja koja opisuju kondenzaciju dhO(S) sa karbonilnim jedinjenjima. Jedno od izdanja koje sistematski obuhvata istorijske radove i korigovana dela ranijih studija o ovoj vrsti jedinjenja su publikovali *Frederick Kurzer* i *Michael Wilkinson*³⁴.

Sinteza hidrazinskih derivata ugljene i tiougljene kiseline³⁵ (dhO i dhS) predstavlja isključivo varijaciju jednostavne reakcije hidrazinolize ugljene i tiougljene kiseline ili njihovih derivata (Slika 2.4). Reakcije koje se najviše koriste za sintezu dhO(S) su prikazane u nastavku.



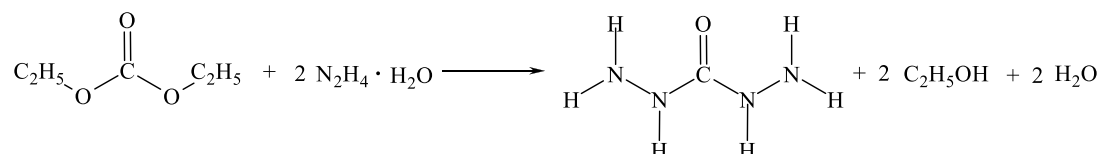
X = O; Dihidrazid ugljene kiseline
X = S; Dihidrazid tiougljene kiseline

Slika 2. 4 dhO i dhS

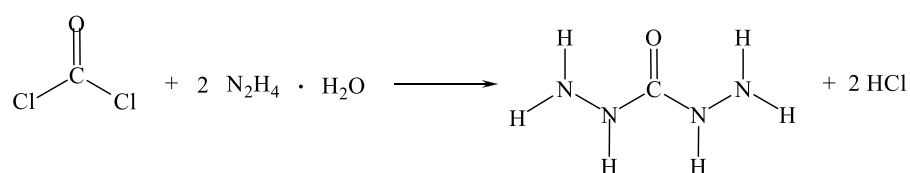
2.1.3.1 Sinteza dhO(S)

Sinteza dhO³⁴

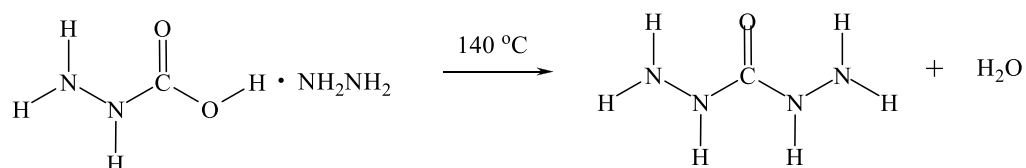
a) Jednu od prvih sinteza primenljivih u praksi koja se zasniva na hidrazinolizi dietilkarbonata opisao je *Curtius* i kasnije *Kesting* - hidrazinoliza estra ugljene kiseline.



b) dhO se može formirati i interakcijom fosgena i hidrazina uz refluks u prisustvu hlorbenzena - hidrazinoliza fosgena.

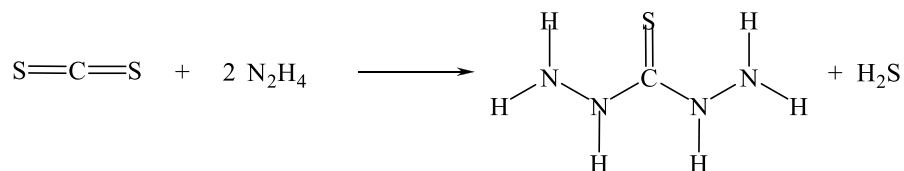


c) Karbazidna kiselina koja se dobija uvođenjem ugljenik(IV)-oksida u vodeni rastvor hidrazina formira so hidrazina koja se prevodi u dhO zagrevanjem na 140 °C. Reakcija predstavlja hidrazinolizu karbazidne kiseline uz eliminaciju molekula vode.

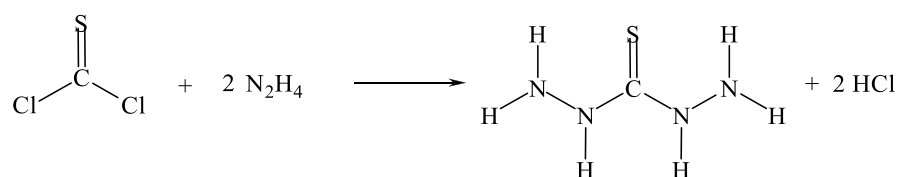


Sinteza dhS³⁴

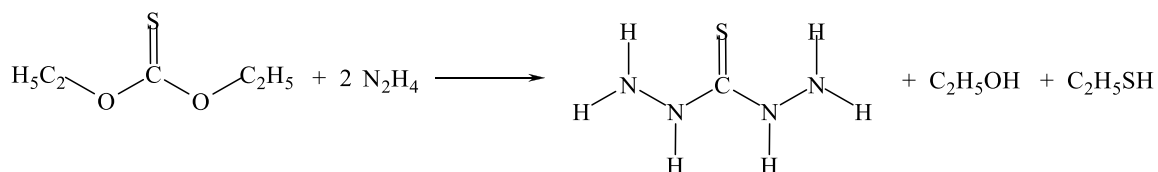
a) Komercijalnija metoda koja daje najbolje rezultate sinteze dhS predstavlja hidrazinoliza ugljenik(IV)-sulfida. Vremenom je izvršena njena modifikacija u cilju povećanja prinosa reakcije.



b) Kao i analog kiseonika, tiofosgen lako podleže reakcijama hidrazinolize u etru ili u vodenom medijumu pri čemu se dobija dhS.



c) Zagrevanjem dietilksanata dobija se visok prinos dhS uz oslobađanje etanola i etantiola u obliku gasova

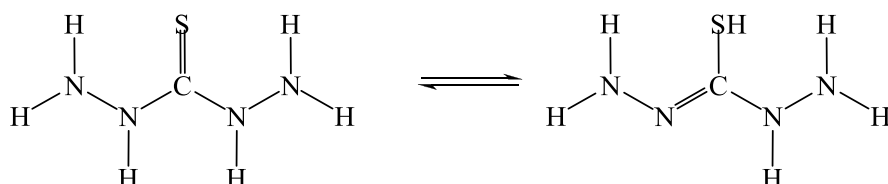


2.1.3.2 Fizička svojstva dhO(S)

dhO je bela kristalna supstanca sa tačkom topljenja od 153-154 °C, veoma rastvorna u vodi, u organskim rastvačima skoro nerastvorna i delimično rastvorna u dimetil-sulfoksidu (DMSO-u) i dimetil-formamidu (DMF-u). dhS je takođe bela kristalna supstanca sa tačkom topljenja oko 168 °C. Najbolji izbor rastavarača za prekriztalizaciju ovog jedinjenja je voda. Rastvoran je i u etanolu, hloroformu, ugljentetrahloridu, hidrazin hidratu itd. Skoro je u potpunosti nehigroskopan³⁴.

2.1.3.3 Hemijska svojstva dhO(S)

Iako dhO i dhS pokazuju slične hemijske osobine, mnoge reakcije su prisutne samo kod jedne vrste jedinjenja. Veća hemijska svestranost tionske (C=S) grupe u poređenju sa keto grupom odgovorna je za raznovrsnije ponašanje dhS. dhO kao i dhS se razlažu na svojim tačkama topljenja na amonijak i vodonik-sulfid, s'tim što se dhS razlaže čak i na temperaturi znatno nižoj od tačke topljenja (110 °C)³⁴. dhO je dvokisela baza koja može formirati mono- i di- hidrohlorid, sulfat i oksalat pri čemu su hidrohloridi rastvorni u vodi. Za razliku od njih dhS su amfoterna jedinjenja rastvorna u razblaženim bazama i kiselinama. Blago kisela vrednost vodenog rastvora dhS (pH = 6,95) se pripisuje vodonikovom atomu koji je susedan tionskoj grupi koji usled mobilnosti može da gradi tiolni oblik (Slika 2.5). dhS se takođe mogu ponašati kao dvokiselinske baze, formirajući dihidrohloride i monosulfate³⁴.

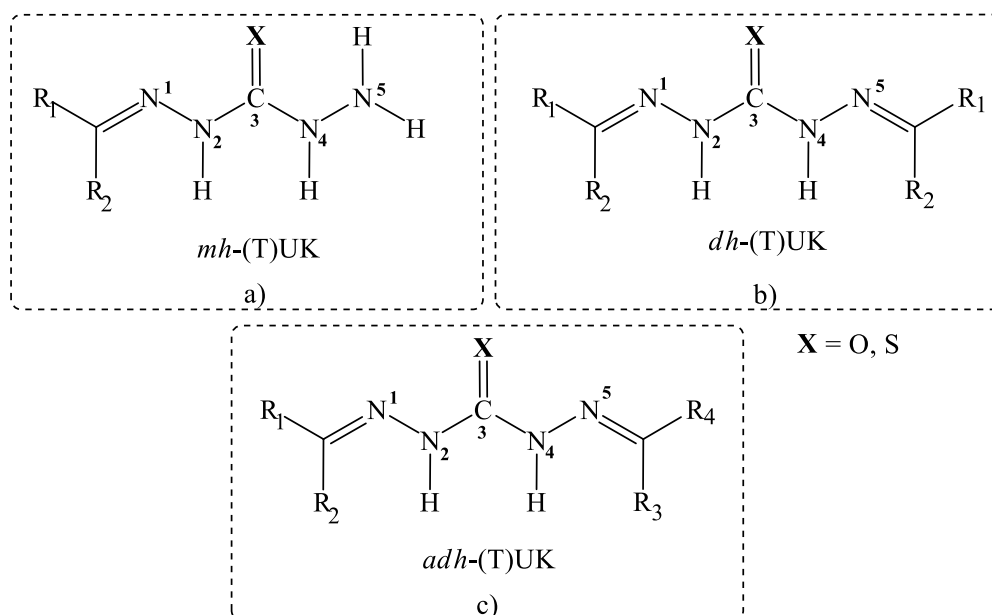


Slika 2. 5 Tautomerija dhS

Kondenzacija sa karbonilnim jedinjenjima

h-(T)UK predstavljaju proizvode kondenzacije *dhO* i *dhS* sa karbonilnim jedinjenjima. Obe hidrazidne grupe dihidrazida pokazuju reaktivnost prema karbonilnim jedinjenjima što omogućava veliku raznolikost ove vrste jedinjenja (Slika 2.6).

Reakcijom karbonilnog jedinjenja sa *dhO*(S) reakcijom adicije i eliminacije vode gradi se imino veza tj. dolazi do eliminacije oba vodonikova atoma sa jedne strane *dhO*(S) (N_1 ili N_5 , Slika 2.4), i nastaju *monohidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline (mh-(T)UK)*. Uspešno izvođenje reakcije se ostvaruje sprovođenjem kontrolisanih uslova kao što su ekvimolarni odnos amino grupa/karbonilno jedinjenje ili manji broj molova karbonilnog jedinjenja u odnosu na derivat hidrazina (Slika 2.6 a)). *Simetrični dihidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline* odnosno *bishidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline (dh-(T)UK*, (Slika 2.6 b)) nastaju reakcijom obe terminalne amino grupe tj. uklanjanjem oba vodonikova atoma sa oba azotova atoma *dhO* ili *dhS* (N_1 i N_5 , Slika 2.4) i njihova sinteza je jednostavnija. Da bi se obezbedila kondenzacija karbonilnog jedinjanja sa obe strane *dhO*(S) količina dodatog aldehida ili ketona mora biti najmanje dva puta veća od količine *dhO*(S). Sa sintezu *asimetričnih dihidrazona dihidrazida (tio)ugljene kiseline* odnosno *asimetričnih bishidrazona dihidrazida (tio)ugljene kiseline (adh-(T)UK*, Slika 2.6 c)) kao polazni materijal se koristi *mh-(T)UK*. Na slobodan hidrazidni kraj *mh-(T)UK* vrši se kondenzacija raznorodnih reaktivnih karbonilnih jedinjenja.

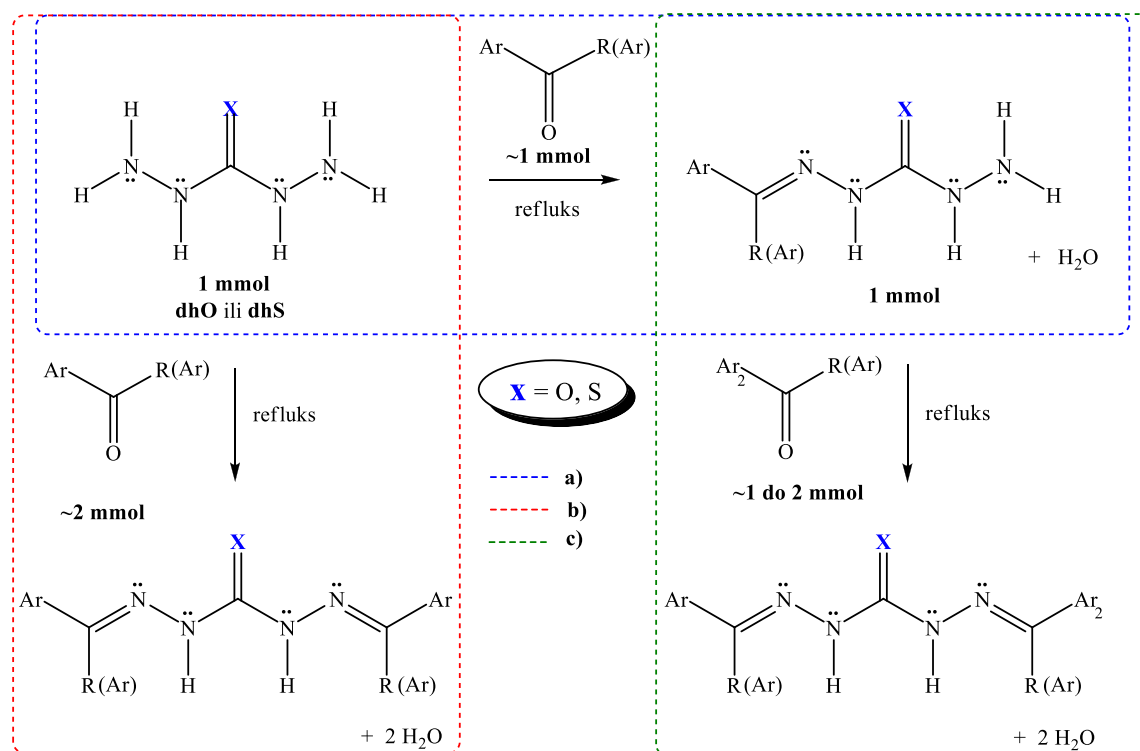


Slika 2. 6 Hidrazoni *dhO* i *dhS*

2.1.4 Sinteza *h*-(T)UK

h-(T)UK se dobijaju u jednostavnoj reakciji kondenzacije *dhO* i *dhS* sa aldehidima i ketonima. Kontrolisanjem molskih odnosa reaktanata, odnosno *dhO* i *dhS* u odnosu na karbonilna jedinjenja, može se uticati na sintezu *mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK.

Odnos broja molova *dhO*(S) u odnosu na karbonilna jedinjenja pri sintezi *mh*-(T)UK je u većini slučajeva 1:1. Sinteze se uobičajeno izvode u metanolu (MeOH) ili u smeši rastvarača etanol (EtOH)/voda zagrevanjem uz refluks⁴⁰ (Slika 2.7 a). Promena rastvarača u kom se vrši sinteza ne menja značajno tok reakcije³⁸, dok vreme trajanja sinteze^{38,39}, dodatak katalizatora⁴⁰ i naglo hlađenje rastvora nakon sinteze može uticati na prinos reakcije⁴¹. Dodatak glacijalne sirćetne kiseline povećava elektrofilnost karbonilne grupe aldehida ili ketona i na taj način ubrzava i pospešuje uspešnost sinteze⁴⁰. Upotreba mikrotalasnog reaktora od 300 W pri sintezi *mh*-TUK uz prisustvo katalizatora značajno poboljšava prinos proizvoda pri čemu je samo 15 min potrebno da celokupna količina reaktanata proreaguje³⁷.

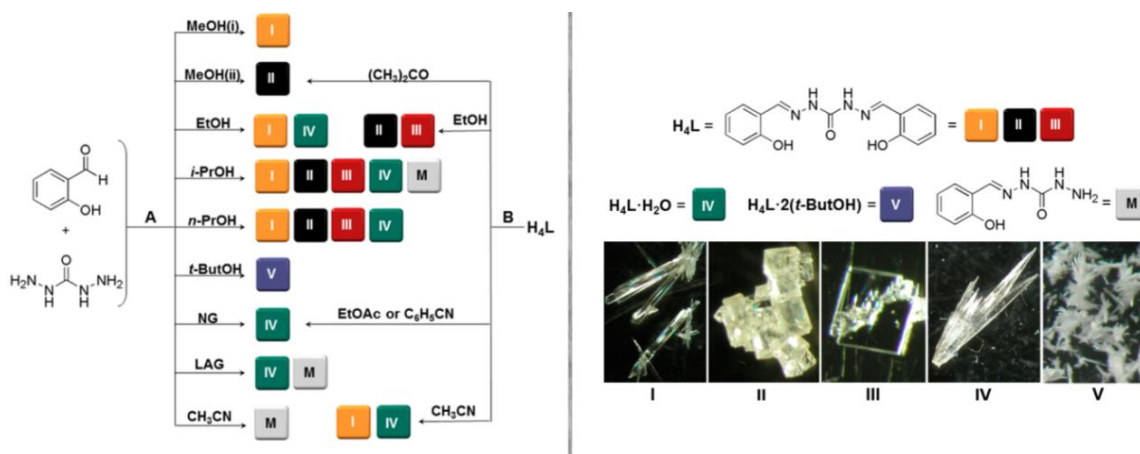


Slika 2. 7 Sinteza a) *mh*-(T)UK, b) *dh*-(T)UK, c) *adh*-(T)UK

Pri sintezi *dh*-(T)UK količina dodatog aldehida ili ketona je približno duplo veća u odnosu na molove *dhO*(S) uz promenljive reakcione uslove sinteze (Slika 2.7 b)).

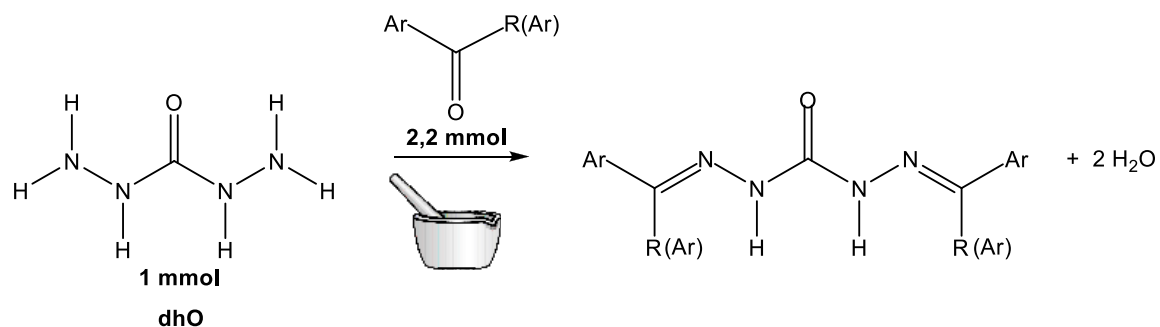
Reakcija se može odigravati u različitim rastvaračima i vremenima trajanja, pri čemu povećanje količine aldehida i ketona u odnosu na količinu dhO(S) i dodatak katalizatora ne utiču značajno na povećanje prinosa reakcije (70-80 %) ⁴². Za razliku od toga produženja trajanja reakcije do 24 h u smeši rastvarača etanol/voda bez upotrebe katalizatora povećava prinos proizvoda reakcije do 95 % ⁴³.

Zapaženo je da menjanje reakcionih uslova i rastvarača utiče i na način kristalizacije dihidazona dihidrazida ugljene kiseline (*dh*-UK). Dobijanje različitih vrsta kristala 1,5-bis[(2-hidroksifenil)metilen] dihidrazida ugljene kiseline (*dh*UK_(sal)) u zavisnosti od reakcionih uslova prikazani su na Slici 2.8. Prinos kristala **I** i **II**, koji u dobijeni klasičnom metodom (Slika 2.8 A) uz korišćenje metanola kao rastvarača u trajanju od 3 h je oko 80 % bez obzira na menjanje reakcionih uslova (temperatura i intezitet mešanja). Ukoliko se kao rastvarač koristi acetonitril favorizovano je formiranje [(2-hidroksifenil)metilen] dihidrazida ugljene kiseline (*mh*UK_(sal)). Već dugo je poznat i drugi način sinteze *dh*-UK ⁴⁴, takozvana "zelena metoda" odnosno sinteza bez upotrebe rastvarača. Umešavanjem reaktanata u avanu bez rastvarača (NG) u trajanju od 40 min dobiijeni su kristali **IV**. Pokazalo se da ova metoda predstavlja najefikasniji način sinteze uz prinos blizu 100 %. Ova procedura je moguća i uz upotrebu jedne kapi rastvarača (LAG) ali u ovom slučaju dolazi do sinteze i kristala **IV** i *mh*UK_(sal) ⁴⁵.



Slika 2. 8 Sintaza (A) i prekrizalizacija (B) *dh*UK_(sal). (aldehid : dhO = 2 mol : 1 mol; NG, formiranje kristala bez rastvarača; LAG, formiranje kristala uz pomoć male količine MeOH ili acetonitrila (CH₃CN); MeOH (i), sinteza iz metanola (mešanje uz reflux); MeOH(ii), sinteza iz metanola (bez mešanja blago zagrevanje); EtOAc, etil-acetat; *n*-PrOH, 1-propanol; *i*-PrOH, 2-propanol; *t*-ButOH, *terc*-butanol; (CH₃)₂CO, aceton; C₆H₅CN, benzonitril) ⁴⁵

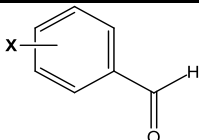
"Zelena metoda" sinteze *dh*-UK može se primeniti pri kondenzaciji *dh*O i sa drugim aromatičnim aldehydima i ketonima na sobnoj temperaturi. Dobro usitnjenom *dh*O (1 mmol) u avanu dodaje se aldehyd ili keton (2,2 mmol) i uz konstantno mešanje 2-8 minuta nastaju *dh*-UK u velikom prinosu (Slika 2.9).⁴⁴



Slika 2. 9 Sinteza *dh*-UK "zelenom metodom"

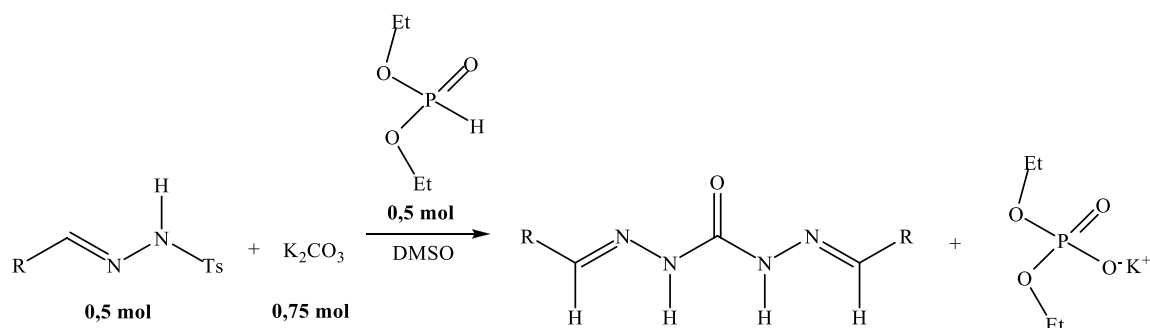
Ovaj tip sinteze se može primeniti kako na kondenzaciju sa tečnim tako i sa čvrstim aromatičnim aldehydima i ketonima, s'tim što je kondenzacija sa aldehydima u tečnom agregatnom stanju pokazala najbolje rezultate. Poređenjem "zelene metode" sa klasičnom metodom sinteze u alkoholnom rastvaraču uz refluks (Tabela 2.1) zaključeno je da je za "metodu rastvarača" potrebno mnogo više vremena uz mnogo manji prinos proizvoda u odnosu na "zelenu metodu"⁴⁴.

Tabela 2. 1 Poređenje "metode rastvarača" sa "zelenom metode" pri sintezi *dh*-UK

	"Metoda rastvarača"		"Zelena metoda"	
	Vreme (h)	Prinos (%)	Vreme (min)	Prinos (%)
2-OH	4	87	2	96
2-CH ₃ O	5	89	3	97
2-Cl	5	85	3	92
4-Br	7	81	7	92

Treći način sinteze *dh*-UK predstavlja karbonilovanje tosilhidrazona. Po prvi put se lako dostupni, jeftini i ekološki pogodan kalijum-karbonat koristi kao karbonil donor za prevođenje u derivat ugljene kieline. Reakcioni sistem je pogodan za različite funkcionalne grupe i daje željene proizvode uz dobre prinose (do 95 %)⁴⁶. Sintaza je

isprobana u različitim rastvaračima, različitom molskom odnosu reaktanata i sa dodatkom aditiva sa promenjenom dužinom niza alkil ostatka, ali prikazana procedura se pokazala kao najefikasnija (Slika 2.10).



Slika 2. 10 Sinteza *dh*-UK iz kalijum-karbonata

U reakcionom balonu, opremljenom magnetnom mešalicom i povratnim hladnjakom, dodaje se 0,5 mol tosilhidrazona, 0,75 mol kalijum-karbonata, 0,5 mol dietilfosfita i 2 ml DMSO. Reakcionom balonu se zagreva na temperaturu od 60 °C tokom 10 h, a nakon završene sinteze smeša se hladi do sobne temperature, razblaži etil acetatom, ispira slanom vodom i suši pomoću natrijum-sulfata. Nakon sušenja, prečišćavanje proizvoda se vrši hromatografijom na koloni⁴⁶. Dihidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline (*dh*-TUK) su do sada sintetisani samo klasičnom metodom uz refluks upotrebom različitih rastvarača^{42,47,48}.

Osim *dh*-(T)UK literaturno su poznati i *adh*-(T)UK koji se dobijaju dvostepenim postupkom: u prvom koraku se vrši sinteza *mh*-(T)UK a u drugom koraku se vrši adicija odabranih aldehida ili ketona na prečišćeni *mh*-(T)UK u alkoholnom rastvaraču uz refluks i hlorovodoničnu kiselinu kao katalizator^{37,49}. Nedostaci ove metode kao što su dugo vreme trajanja reakcije (7-9 h) i mali prinos (31-58 %) mogu se prevazići na dva načina:

- a) dodavanjem veće količine karbonilnog jedinjenja kako bi se povećala brzina reakcije sa amino grupama iz *mh*-(T)UK uz povećanje količine hlorovodonične kiseline (prinos 80 %). Vreme trajanja reakcije se skraćuje na 1 h, ali nedostatak predstavlja dobijanje proizvoda u obliku hidrohloridnih soli⁵⁰.

- b) sintezom uz pomoć mikrotalasa umešavanjem u avanu, bez korišćenja rastvarača, uz prisustvo neutralnog aluminijum-oksida i dve kapi hlorovodonične kiseline kao katalizatora. Ovaj način sinteze je brz (trajanje reakcije 5,5 min), ekološki prihvatljiv

(nema upotrebe rastvarača), efikasan (prinos 80-89 %) i prvi je izbor za sintezu asimetričnih dihidrazoni dihidrazida tiougljene kiseline (*adh*-TUK)³⁷.

2.2 Izomerija *h*-(T)UK

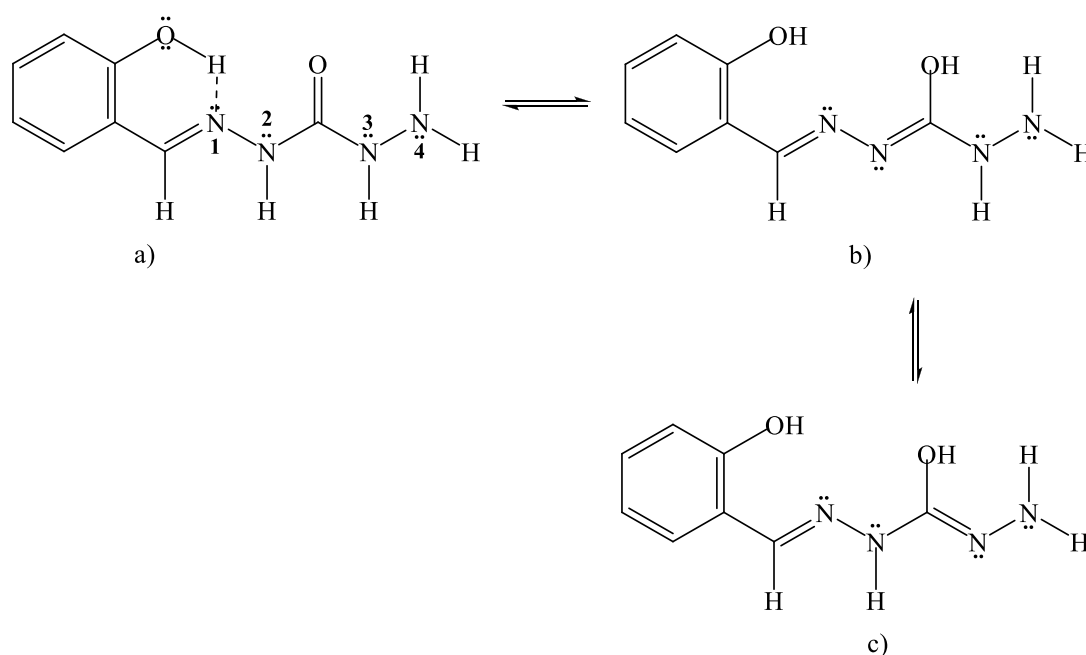
Za karbonilne derivate *dhO*(S) karakteristična su dva oblika izomerije: tautomerija i geometrijska izomerija. Poznato je da kod jednostavnijih struktura, usled ograničene rotacije oko azometinske veze može doći do pojave stereoisomerije. *Tautomerija* u najopštijem obliku predstavlja reverzibilno intramolekulsko premeštanje u organskih molekulima pri čemu se promena elektronske gustine na pojedinim atomima ili atomskim grupama vrši relativno velikom brzinom. Drugim rečima, pod tautomerijom se podrazumeva postojanje dva ili više različitih strukturnih izomera, koji se nalaze u ravnoteži i koji se među sobom razlikuju samo u rasporedu elektronske gustine i položaju relativno mobilne grupe ili atoma. Pomenuti strukturni izomeri se nazivaju tautomeri, a proces prelaska jednog tautomernog oblika u druge oblike, do uspostavljanja ravnotežnog stanja, označava se kao tautomerija. U većini slučajeva mobilni atom je vodonik, pa se u tom slučaju tautomerija definiše kao intramolekulska prototropija ili prototropna tautomerija⁵¹. Ponašanje tautomera i položaj ravnoteže mogu se ispitivati različitim spektroskopskim metodama (FT-IR, UV-Vis, NMR) dok se RSA može odrediti struktura jedinjenja u čvrstom stanju.

2.2.1 Primena NMR, FT-IR i UV-Vis spektroskopije u ispitivanju izomerije *h*-(T)UK

2.2.1.1 Monohidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline

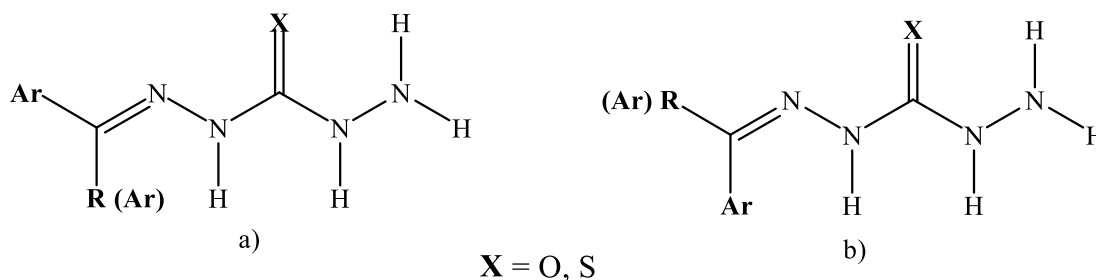
U rastvoru postoji više slobode ketanja molekula u odnosu na čvrsto stanje, a samim tim i rastvarači utiču na konformaciju molekula i stanje tautomerne ravnoteže. Vodonične veze u molekulu predstavljaju ključni faktor koji utiče na strukturu i funkcionalnost biološki aktivnih jedinjenja, odnosno omogućavaju lakše vezivanje liganda za receptor⁵². Proučavanje strukture molekula daje bolji uvid u ove interakcije što je veoma važno pri kreiranju molekula sa poboljšanim biološkim profilom. U slučaju hidrazona pokazano je da *E* i *Z* hidrazonski izomeri imaju različita svojstva i farmakodinamičku aktivnost¹⁴ što predstavlja još jedan od razloga za ispitivanje mogućnosti izomerizacije u rastvoru. *mh*-UK su literaturno poznati ali detaljnije

ispitivanje konformacije u rastvoru i mogućnost keto-enolne tautomerije ispitivano je samo u slučaju *mhUK*_(sal). Rezultati eksperimentalnog ispitivanja o postojanju intra- i inter-molekulskih veza ukazuju da se molekul navedenog jedinjenja nalazi u *E*- obliku u rastvoru DMSO-a jer je stabilisan usled građenja intramolekulske vodonične veze tipa OH---N (Slika 2.11 a)), dok mogućnost keto-enolne tautomerije nije primećena. *E*- oblik *mhUK*_(sal) potvrđen je korelacijom NMR signala atoma vodonika u COSY (korelaciona spektroskopija) spektru između N₄-H vodonikovog i susednog vodonikovog atoma N₃-H, kao i korelacijom azometinskog vodonikovog atoma sa N₂-H atomom u NOESY spektru. Prošireni signal (N₂-H i OH) u protonskom spektru ukazuje na prisustvo vodonične veze.



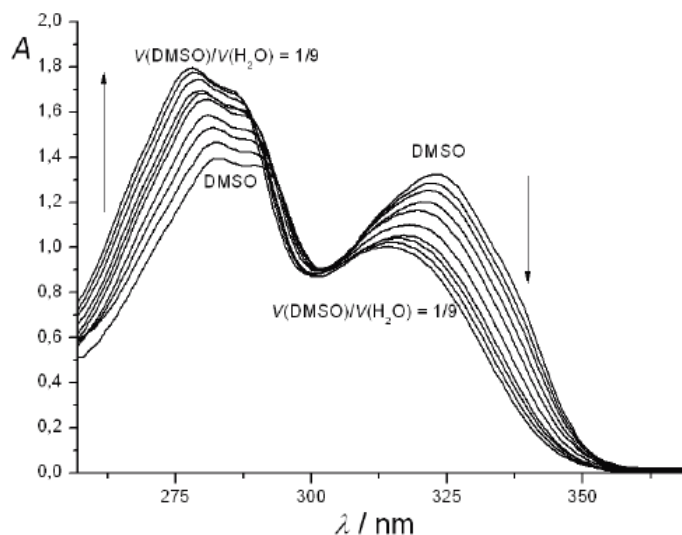
Slika 2. 11 Tautomerni oblici *mhUK*_(sal)⁵²

Zbog mogućnosti rotacije oko C=N dvostruke veze *mh*-UK mogu zauzimati *E*- (Slika 2.12 a)) i *Z*- konfiguraciju (Slika 2.12 b))⁵³.



Slika 2. 12 Izomerni oblici *mh*-(T)UK: a) *E*-izomer, b) *Z*-izomer

Mogućnost izomerizacije $mhUK_{(sal)}$ u rastvoru ispitivana je dodatkom vode u DMSO rastvor jedinjenja količinske koncentracije $1 \cdot 10^{-4}$ M (Slika 2.13). Primećeno je da dodatak vode u rastvor uzrokuje opadanje apsorbanca na većim talasnim dužinama i porast apsorbanca na manjim talasnim dužinama (Slika 2.13). U isto vreme pomeranje apsorbanca ka manjim talasnim dužinama (sa 323 na 314 nm i 283 na 273 nm) ukazuje na mogućnost *E/Z*- izomerizacije u rastvoru.⁵²

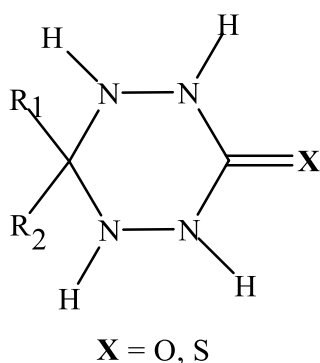


Slika 2. 13 Promena apsorbanca na UV-Vis spektru $mhUK_{(sal)}$ u DMSO-u i smeši rastvarača DMSO/voda⁵²

Lirong i saradnici objavili su rad u kojem je dokazano da dolazi do *E/Z*-izomerizacije *N*-heteroaromatičnih semikarbazona nakon izlaganja jedinjenja UV zračenju na talasnim dužinama od 302 nm i 365 nm u intervalu od 1 do 60 min. Semikarbazoni predstavljaju analoge *mh*-UK koji imaju jednu NH_2 reaktivnu grupu manje (N_1 ili N_5 Slika 2.4) i kod kojih je kondenzacija karbonilnih jedinjenja moguća samo na jednom kraju. U zavisnosti od strukturnih karakteristika i položaja atoma azota u piridinskom jezgru *N*-heteroaromatičnog semikarbazona procesi fotoizomerizaciju jedinjenja u dihlormetanu kao i u čvrstom stanju se odigravaju u različitim vremenskim periodima. *o*- položaj atoma azota, tj. "aza" grupe u heterocikličnom jezgru u najvećoj meri favorizuje proces fotoizomerizacije. Promena boje supstance u čvrstom stanju iz bele u žutu ukazuje da je fotoizomerizacija izvršena nakon izlaganja UV zračenju, što je i dokazano snimanjem NOESY spektra na kom se jasno vide promene na osnovu pomeraja u protonskim spektrima i nestajanja korelacija između azometinskog atoma vodonika i

atoma vodonika pored azota u piridinskom prstenu. Pomeranje maksimuma apsorpcije u UV-Vis spektru ka većim talasnim dužinama u rastvoru predstavlja još jedan dokaz fotoizomerizacije u rastvoru. U cilju proučavanja stabilnosti *Z*-izomera, rastvor sa novonastalom konformacijom jedinjenja ostavi se na tamno mestu tokom 150 h. Usled odsustva izvora pobude dolazi do sporog procesa vraćanja jedinjenja u prvobitni oblik, iz čega je zaključeno da je proces fotoizomerizacije povratan odnosno novoformirane konformacije jedinjenja su nestabilne. Takođe je uočeno da za ovaj vid izomerizacije nisu pogodni rastvarači koji pokazuju tendenciju ka stvaranju vodoničnih veze¹⁵.

Interesantno je napomenuti da *mh*-UK podležu i intramolekulskoj ciklizaciji (Slika 2.14) što je potvrđeno NMR spektroskopskim merenjima⁵⁴. Ispitivana je serija alifatičnih i aromatičnih monohidrazona ugljene kiseline i primećeno je da se alifatični *mh*-UK prilikom sinteze dobijaju u vidu smeše različitih izomera među kojima je i jedinjenje sa šestočlanim prstenom. Kod alifatičnih aldehidnih derivata *mh*-UK zamenu metil (R_1) grupe sa etil ili *izo*-propil grupom opada procenat cikličnog oblika, dok aromatični *mh*-UK ne pokazuju mogućnost ciklizacije čak i ako je prisutan jak elektron-akceptorski supstituent kao što je nitro grupa.

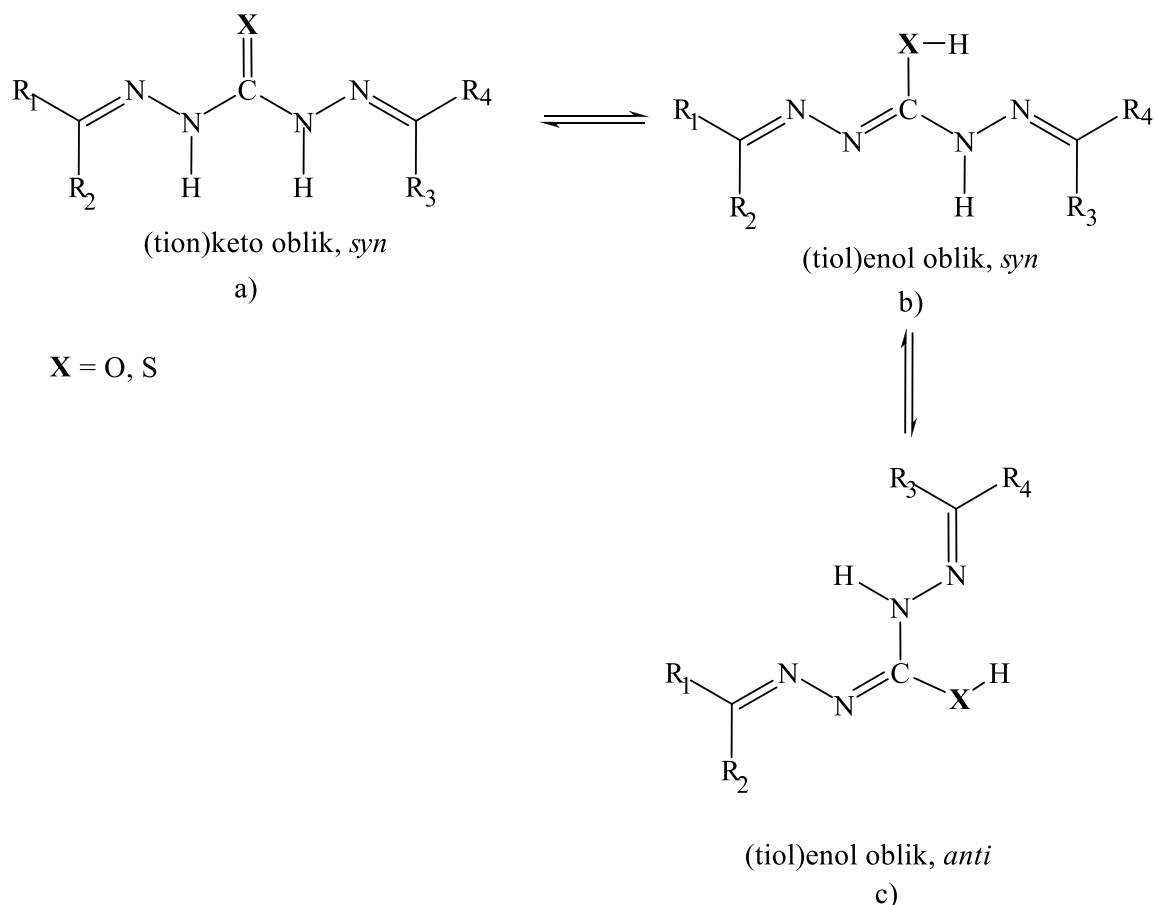


Slika 2. 14 Ciklična stuktura *mh*-(T)UK

U slučaju derivata *mh*-UK dibijenih iz dhO i ketona samo aceton i butanon podležu ciklizaciji dok aromatični i alifatični ketoni sa većim brojem ugljenikovih atoma ne podležu⁵⁴. *mh*-TUK lakše podležu ciklizaciji i kod ove grupe jedinjenja derivati dobijeni iz aromatičnih ketona grade šestočlane prstenove, dok su u slučaju derivata dobijenih iz alifatičnih ketona detektovani i šestočlani i petočlani prstenovi⁵⁵.

2.2.1.2 Dihidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline

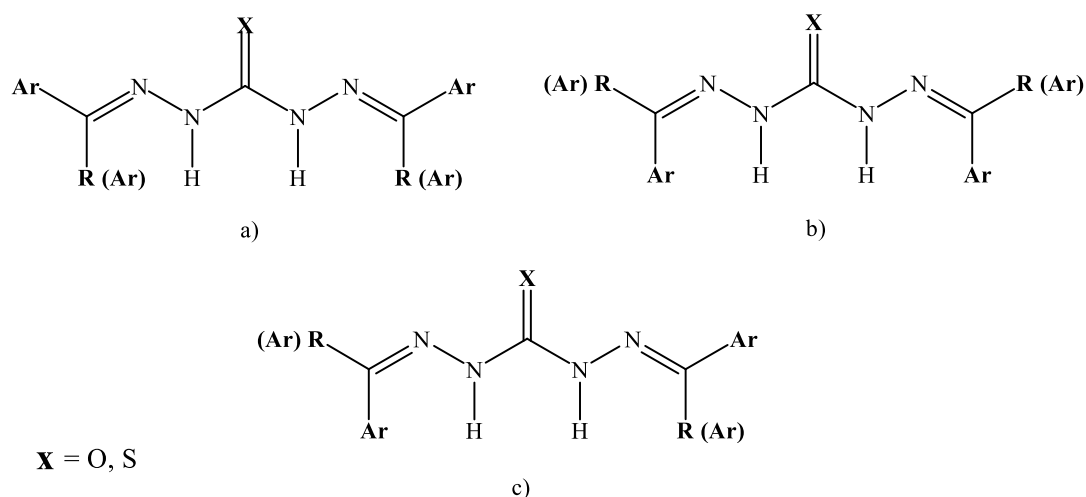
Postojanje *dh*-(T)UK u (tione)keto ili (tione)enol tautomernom obliku zapaženo je još odavno⁵⁶⁻⁵⁸. (Tione)enolni tautomeri mogu postojati kao *syn* i *anti* konformeri (Slika 2.15 b) i c)) što je rezultat fleksibilne prirode ovih jedinjenja i doprinosi većoj efikasnosti tokom koordinacije i građenja kompleksa sa metalima^{42,45,57,59}. Prisustvo *sin*- i *anti*-oblika 1,5-bis[1-(2-piridinil)etiliden] dihidrazida ugljene kiseline (***dh*UK_(2pya)**) dokazano je prisustvom dvostrukog NMR signala u protonskom spektru koji je pripisan atomu vodonika vezanom za atom azota. Pojava dve trake bliskih frekvenci u IR spektru (1698 i 1679 cm⁻¹) pripisuje se C=O vezi *sin*- i *anti*- oblika^{56,60}. Prisustvo vodonika iz enolnog oblika eksperimentalno je dokazano na osnovu asignacijom vodonika u protonskom spektru na hemijskim pomeranjima iznad 14 ppm⁵⁶.



Slika 2. 15 Keto-enolna tautomerija *dh*-(T)UK i *adh*-(T)UK

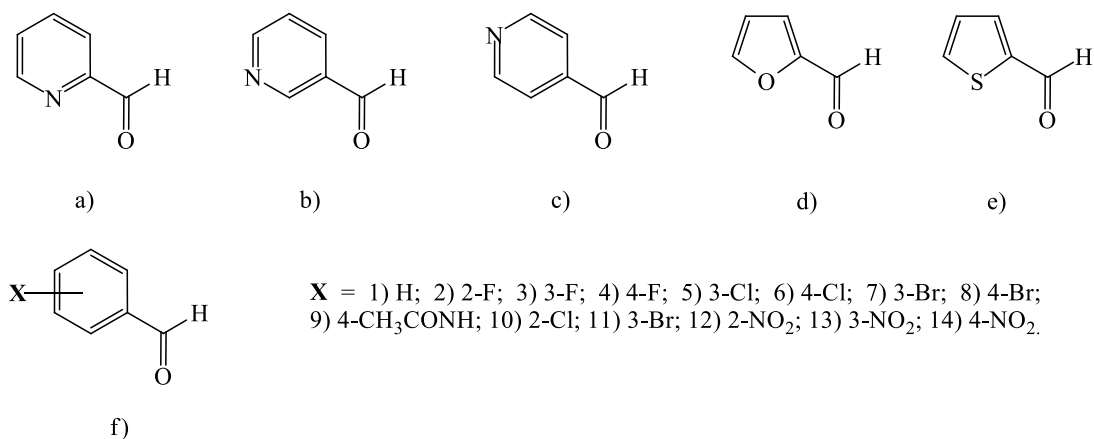
S`obzirom da *dh*-(T)UK i *adh*-(T)UK u svom sastavu imaju dve C=N veze pogodne za rotaciju mogućnost pojavnih izomernih oblika je veća: *E/E*- , *Z/Z*-, *E/Z*- (Slika 2.16 a-c). Na osnovu rezultata NMR merenja sintetisanih serija *dh*-(T)UK liganada

došlo se do zaključka da priroda karbonilnog jedinjenja, odnosno prisustvo elektron donorskih i akceptorskih grupa utiče na konformacione oblike ispitivanih jedinjenja. U slučaju 1,5-bis(2-piridinilmetilen) dihidrazida tiougljene kiseline (*dhTUK*_(2pyc)) eksperimentalno je utvrđeno prisustvo sva tri strukturna izomera (Slika 2.16 a), b) i c)).



Slika 2. 16 Opšte formule izomernih oblika *dh*-(T)UK: a) *E/E*-izomer b) *Z/Z*-izomer c) *E/Z*-izomer

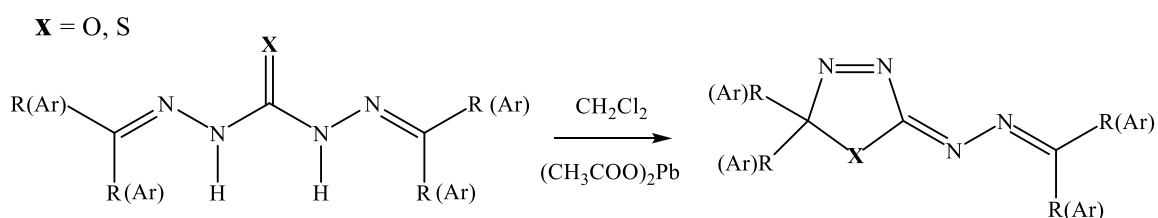
dh-TUK dobijeni kondenzacijom *dhS* sa drugim aldehydima (Slika 2.17 b), d) i f)1-8) pokazuju isključivo *E/Z*- geometrijsku izomeriju (Slika 2.16 c)) na šta ukazuje prisustvo udvojenog signala azometinskog atoma ugljenika u ¹³C-NMR spektru, kao i udvojenog signala vodonika na azometinskom ugljenikovom atomu. Takođe, primećeno je i udvajanje signala N-H protona u ¹H-NMR spektru. Pojava signala vodonikovih atoma u ¹H-NMR spektru na različitim pomeranjima objašnjena je postojanjem mogućnosti formiranja intramolekulskih veza u molekulu.



Slika 2. 17 Strukture jedinjenja koja utiču na stabilnost izomernih oblika *dh*-TUK

Kondenzacijom *dhS*-a sa aldehydima koji su na Slici 2.17 obeleženi sa c), e) i f) 9-14, nastaju *dh-TUK* koji pokazuju simetričnu *E/E*- strukturnu izomeriju koja je potvrđena izostankom duplih signala vodonika i ugljenika sa azometinske grupe u NMR spektrima. Kod *dh-TUK* dobijenih kondenzacijom sa aromatičnim ketonima koji imaju metil grupu vezanu za azometinski ugljenik, prisutna je simetrična *E/E*-konfiguracija gde C=S predstavlja mesto simetrije molekula (Slika 2.16 a)) što je najverovatnije prouzrokovano metil grupom koja ograničava fleksibilnost molekula da zauzme konformaciju neophodnu za formiranje intramolekulske veze⁴⁷.

Simetrični *dh-(T)UK* takođe podležu intramolekulskoj ciklizaciji ali uz prisustvo olovo(IV)-acetata kao oksidativnog agensa u dihlormetanu (Slika 2.18).



Slika 2. 18 Ciklizacija *dh-(T)UK* u prisustvu olovo(II)-acetata

Alkil dihidrazoni dihidrazida ugljene kiseline (*dh-UK*) veoma brzo ciklizuju čak i na temperaturi od 0 °C dok u slučaju aril analoga reakcija teče znatno sporije sa veoma malim prinosom što je najverovatnije izazvano sterim i polarnim smetnjama³⁴.

2.2.2 Primena rendgenske strukturne analize u ispitivanju konformacije

RSA je veoma korisna metoda za ispitivanje stanja tautomerne ravnoteže jer omogućava dobijanje detaljnih informacija o molekulskim konformacijama, dužinama veza i uglova, kao i o međumolekularnim interakcijama u čvrstom stanju. Kristalne strukture do sada poznatih *h-(T)UK* ukazuju da se ova jedinjenja prisutna isključivo u tionskom obliku^{42,45,57,59}. Na osnovu rasporeda atoma, uglova veza u kristalnoj strukturi potvrđeno je da je *Z/Z*-⁴⁸ ili *E/Z*-⁴² konfiguracija *dh-(T)UK* najčešće uzrokovana intramolekulskim vodoničnim vezama, dok je kod molekula kod kojih nije prisutan ovaj tip veze primećeno da se *dh-UK* nalaze u obliku *E/E*- izomera^{42,60}.

2.3 Korelaciona analiza u organskoj hemiji

Nedostaci kinetičkih rezultata koji pri hemijskoj reakciji ne govore o prirodni intermedijera, niti ukazuju koje veze se raskidaju ili stvaraju za vreme reakcije, u fizičkoj organskoj hemiji se nadoknađuju metodom koja daje informacije o strukturi aktivnog kompleksa, odnosno LFER. Dublja analiza strukture prelaznog stanja se dobija proučavanjem uticaja različitih supstituenata na reaktivnost molekula (*efekat supstituenta*).

2.3.1 Efekti supstituenata i linearna korelacija slobodnih energija

Pažljivom primenom efekata supstituenata može se odrediti mehanizam promene reakcione slobodne energije i slobodna energija aktivacije u funkciji hemijske strukture.⁶¹ Menjanjem funkcionalnih grupa prate se promene naelektrisanja duž reakcione koordinate. Proučavanje odnosa strukture i reaktivnosti često daje veoma bitne informacije o mehanizmu reakcije organskih molekula i zasniva se na promenama slobodne energije reakcije i parametara koji su prouzrokovani supstituentom, odnosno opisuju elektronske karakteristike supstituenta.

Efekti supstituenata. Uticaj strukture na raspodelu elektronske gustine u osnovnom stanju molekula i u toku reakcije povezuje molekulsku strukturu sa reaktivnošću⁶². Raspodela elektronske gustine u molekulu može biti posledica delovanja tri efekta: polarnog (induktivni efekat i efekat polja), rezonancionog i sternog.

Induktivni efekat (I) predstavlja sposobnost atoma ili grupe atoma da privlače ili odbijaju elektrone kroz σ veze. Može biti elektron-donorski (+I, povećava elektronsku gustinu) i elektron-akceptorski (-I, privlači elektrone jače od atoma vodonika) a udaljenje supstituenta od reakcionog centra smanjuje njegov uticaj. Klasični induktivni efekat predstavlja polarizaciju kroz sigma veze ugljenikovog niza i opada sa rastojanjem, dok efekat polja deluje kroz prostor, nezavisno od elektronskog sistema u molekulu.

Rezonancioni efekat (R) predstavlja sposobnost atoma ili grupe atoma da smanjuje ili povećava elektronsku gustinu kroz sistem π -veza. Mehanizam prenošenja ovog efekta zasniva se na konjugaciji i supstituent mora imati p - ili π -orbitale koje su na raspolaganju za konjugaciju sa π -molekulskim orbitalama aromatičnog sistema. Supstituent može da: povećava elektronsku gustinu na reakcionom centru (+R) i ima slobodni elektronski par ili π -elektrone na atomu koji je direktno vezan za prsten (-NH₂, -

NR₂, -OH, -OR, -SR, -Hal, -CH-CH₂) ili smanjuje elektronsku gustinu na reakcionom centru (-R) i obično ima π-akceptorski centar vezan za prsten i nema prazne vezivne p-orbitale.

Sterni efekti utiču na konformacije molekula i brzinu hemijske reakcije jer veliki atomi ili grupe često onemogućavajući efikasne sudare.

2.3.2 Hammett-ova jednačina

Osnov za sve kvantitativne veze između strukture i reaktivnosti molekula zasniva se na Hammett-ovoj jednačini⁶¹ koja služi sa korelisanje različitih termodinamičkih (2.1.) i kinetičkih (2.2.) ponašanja mnogih sistema:

$$\log \frac{K}{K_0} = \rho\sigma \quad (2.1)$$

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho\sigma \quad (2.2)$$

gde K i k predstavljaju konstantu ravnoteže i konstantu brzine reakcije ispitivanih jedinjenja sa supstituentima; K_0 i k_0 odgovaraju konstantu ravnoteže i konstantu brzine reakcije za nesupstituisani sistem; ρ je reakciona konstanta; σ predstavlja konstantu supstituenta. Hammett je 1937. godine pretpostavio da se efekti supstituenata mogu odrediti proučavanjem reakcije funkcionalnih grupa u m - i p - položaju u odnosu na reakcioni centar. Disocijacija benzojeve kiseline u vodi na 25 °C je uzeta kao model reakcija⁶³. Konstanta supstituenata σ_x definisana kao razlika između pK_a vrednosti benzojeve kiseline i pK_a vrednosti m - i p -supstituisanih benzojevih kiselina prikazana je uz pomoć jednačine 2.3 ($\sigma_x = 0$ za nesupstituisanu benzojevu kiselinu):

$$\sigma_x = \log K - \log K_0 = -pK_a + (pK_a)_0 \quad (2.3)$$

gde je K konstanta ravnoteže supstituisane benzojeve kiseline, a K_0 konstanta ravnoteže nesupstituisane kiseline.

Elektron-akceptorske grupe svojim elektronskim efektom stabilizuju karboksilatni anjon i povećavaju vrednost konstante ravnoteže K_a usled čega je numerička vrednost pK_a manja, a konstanta σ_x ima pozitivnu vrednost. Analogno pomenutom, elektron-donorski supstituenti imaju negativne vrednosti σ_x .

Parametar ρ se naziva reakciona konstanta i predstavlja osetljivost reakcije ili ravnoteže na elektronske efekte supstituenata u poređenju sa osetljivošću disocijacije

benzoeve kiseline u vodi na 25 °C ($\rho = 1$). Velike vrednosti ove konstante ukazuju na veliku promenu naboja na centralnom atomu funkcionalne grupe i ukoliko se naboj povećava na tom atomu, ρ će biti veće od nule i ovakve reakcije će biti ubrzane elektron-akceptorskim supstituentima, a usporene elektron-donorskim supstituentima. Ukoliko se u prelaznom stanju javlja pozitivno naelektrisanje, ρ će imati negativnu vrednost i reakcija će biti ubrzana elektron-donorskim supstituentima, a usporena elektron-akceptorskim supstituentima⁶⁴.

Osnovne konstante supstituenta (*Hammett-ove* σ konstante) izražavaju ukupan elektronski efekat supstituenata, koji se manifestuje kao doprinos rezonacionog i polarnog efekta supstituenata. Određuju se na osnovu reakcija disocijacije i na osnovu reakcije disocijacije *m*- i *p*- supstituisanih benzoevih kiselina u vodi na 25 °C pri $\rho = 1$. Za sisteme u kojima je moguća direktna rezonaciona interakcija između supstituenata i reakcionog centra *Hammett*-ova korelacija nije zadovoljavajuća ako se primene osnovne konstante supstituenata σ_m i σ_p . Tako se ukazala potreba za uvođenjem novih konstanti σ , nukleofilne (σ^-) i elektrofilne (σ^+) konstante supstituenata⁶⁵.

Pri interakciji supstituenta koji rezonantno privlači elektrone i funkcionalne grupe koje odaje e^- koristi se nukleofilna konstanta, a ukoliko je prisutna interakcija sa supstituentima koji rezonacionalno odaju elektrone kod kojih može doći do konjugacije sa reakcionim centrom koji prima elektrone (na samom jezgru ili na bočnom nizu) upotrebljava se elektrofilna konstanta supstituenata⁶⁶.

Nukleofilne konstante σ^- su izračunate na osnovu ρ vrednosti dobijenih za *m*- ili *p*-supstituisane derivate sa elektron-donorskim supstituentima i eksperimentalno određenim pK_a vrednostima za elektron-akceptorske supstituente u *p*-položaju korišćenjem modela reakcije disocijacije *m*- i *p*- supstituisanih anilinjum katjona⁷¹. Solvoliza 2-aril-2-hlorpropana S_N1 mehanizmom na temperaturi od 25 °C u 90 % acetonu kao rastvaraču⁶⁹ se koristi kao reakcija za definisanje σ^+ . Ukoliko se u *p*-položaju nalazi supstituent koji lako stupa u rezonacionu interakciju sa elektron-deficitarnim centrom, odnosno sa +R efektom ($-OCH_3$), razlika između konstanti σ i σ^+ su velike. U slučaju prisusustva grupe sa -R efektom koja privlači elektrone razlike između konstanti σ i σ^+ su neznatne ili jednake nuli⁶⁶.

Upotreba σ^+ i σ^- konstanti proširuje primenu *Hammett*-ove jednačine i na osnovu toga dobijamo informaciju o prirodi prelaznog stanja. Sama potreba za primenom σ^+ i σ^- ukazuje na znatnu delokalizaciju naelektrisanja.

2.3.2.1 Modifikovana i proširena Hammet-ova jednačina

Modifikacija jednostavne *Hammett*-ove jednačine (2.4) usledila je kao posledica specifičnosti izučavanih sistema jer se za svaki supstituent koji pokazuje izvestan rezonancioni efekat može se očekivati čitava skala konstanti supstituenata i to ne samo za parove izolovanih vrednosti σ^+ , σ za +R ili σ^- , σ za -R supstituente.

$$Q = \rho\sigma + h \quad (2.4)$$

Yukawa i *Tsuno*⁷⁰⁻⁷² predložili su jednačinu (2.5) koja u sebi sadrži višestruku linearnu korelaciju $\log k$ sa vrednostima σ i ($\sigma^+ - \sigma$):

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho[\sigma + r(\sigma^+ - \sigma)] \quad (2.5)$$

gde ρ predstavlja reakcionu konstantu, vrednosti σ su *Hammett*-ove konstante, vrednosti σ^+ su *Brown*-ove konstante. Nova konstanta r predstavlja kvantitativnu meru rezonantne interakcije supstituenata i reakcionog centra.

Yoshioka i saradnici⁷³ predložili su analognu jednačinu (2.6) za slučaj povećane uloge rezonancije u stabilizaciji negativnog naelektrisanja:

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho[\sigma + r(\sigma^- - \sigma)] \quad (2.6)$$

Taft i Lewis⁷⁴ predložili su jednačinu znatno šire primene, takozvanu proširenu *Hammett*-ovu jednačinu koju je moguće prilagoditi složenom efektu supstituenata (razdvojenom na lokalizovan i delokalizovan) uz adekvatan izbor konstanti supstituenata:

$$Q = \alpha\sigma_I + \beta\sigma_R + h \quad (2.7)$$

Q je korelisana veličina ($\log k$, $\log K$, itd.), h je odsečak, α i β definišu relativan udeo induktivnog, odnosno rezonancionog efekta kroz konstante σ_m i σ_p uz pomoć izraza 2.8. i 2.9⁸⁰.

$$\sigma_m = \sigma_I + \alpha\sigma_R \quad (2.8)$$

$$\sigma_p = \sigma_I + \sigma_R \quad (2.9)$$

2.3.3 Primena *Hammett*-ove jednačine

Objašnjenje intramolekulskih interakcija elektronskog ili sternog tipa, a posebno načina na koji supstituenti utiču na brzinu reakcije ili položaj ravnoteže, kao i proučavanje reakcionog mehanizma uz primenu drugih fizičko-hemijskih metoda, su neke metode primene *Hammett*-ove jednačine i njenih modifikovanih oblika. *Hammett*-ova jednačina se može koristiti za korelisanje različitih fizičkih svojstava, među kojima spektroskopski podaci (FT-IR, UV-Vis, NMR^{64,77}) i pK_a ⁷⁸ vrednosti predstavljaju najznačajnije i najdostupnije vrednosti.

Primenjena na apsorpcione frekvence *Hammett*-ova jednačina data je izrazom:

$$\nu_{max} = \nu_0 + \rho \cdot \sigma \quad (2.10)$$

gde je ρ konstanta proporcionalnosti koja reflektuje osetljivost ν_{max} na elektronske efekte supstituenata, ν_0 predstavlja frekvencu nesupstituisanog člana serije, a σ odgovarajuću konstantu supstituenta.

Da bi se proučavali elektronski efekti supstituenata u okviru određene serije molekula, korelišu se ¹H NMR, ¹³C NMR ili ¹⁵N NMR hemijska pomeranja sa različitim konstantama supstituenata^{84,85}. Za korelisanje se koriste jednoparametarske i dvoparametarske jednačine koje su prilagođene korelaciji hemijskih pomaka.⁷⁷

Kao jednoparametarskih jednačina koristi se jednostavna *Hammett*-ova jednačina⁶³:

$$SCS(N) = \rho\sigma + h \quad (2.11)$$

gde je $SCS(N)$ - korelisani hemijski pomak; h odsečak.

Kao dvoparametarska jednačina koristi se proširena *Hammett*-ova jednačina koju su predložili *Taft* i *Lewis*.

2.4 Linearna korelacija solvatacionih energija

2.4.1 Solvatohromizam organskih molekula

Na položaj, intezitet i oblik apsorpcionih traka u UV-Vis spektrima utiče izbor rastvarača, brzina hemijske reakcije i položaj hemijske ravnoteže⁸²⁻⁸⁹. Uticaj rastvarača na UV-Vis spektre odnosno na pomeranje i promenu inteziteta apsorpcionih traka naziva se solvatohromizam. Ove promene predstavljaju posledicu intermolekulskih interakcija između rastvarača i rastvorene supstance (jon-dipol, dipol-dipol, dipol-indukovani dipol, vodonične veze i dr). Ukoliko se sa povećanjem polarnosti rastvarača apsorpcioni

maksimum pomera ka manjim talasnim dužinama to predstavlja *hipsokromni* (negativni, plavi) solvatohromizam, dok je pomeranje ka većim talasnim dužinama *barokromni* (pozitivni, crveni) solvatohromizam.

Apsorpcioni spektri višeatomskih molekula proučavaju se sa stanovišta prelaza elektrona lokalizovanih u vezama ili određenim funkcionalnim grupama. Određeni tip prelaza se dešava u delu molekula koji određuje apsorpcionu energiju i naziva se hromoforna grupa ili hromofora i ima svoju karakterističnu vrednost talasne dužine. Mogući elektronski prelazi su:

- a) $n \rightarrow \pi^*$, kada elektroni slobodnog elektronskog para prelaze u manje stabilnu antivezivnu π^* orbitalu;
- b) $\pi \rightarrow \pi^*$, kada elektroni vezivne π orbitale prelaze u manje stabilnu antivezivnu π^* orbitalu;
- c) $\sigma \rightarrow \sigma^*$, kada elektroni vezivne σ orbitale prelaze u manje stabilnu antivezivnu σ^* orbitalu.

Molekuli sa π -elektronima, kod kojih se raspodela naelektrisanja značajno razlikuje u osnovnom i pobuđenom stanju, imaju izražena solvatohromna svojstva. Relativno mala zavisnost UV-Vis spektara od rastvarača zapaža se kod sledećih jedinjenja: aromatična jedinjenja (bez elektron-donorskih i/ili akceptorskih grupa, npr. benzen), polieni (npr. likopen, karotinoide), poliini (npr. poliacetileni) i simetrične polimetinske boje.

2.4.2 Efekat rastvarača-višeparametarski pristup

Nemogućnost kvantitativnog izražavanja uticaja rastvarača (preko fizičkih konstanti) na reaktivnost organskih jedinjenja i njihove apsorpcione spektre podstakla je uvođenje empirijske skale efekata rastvarača koje se zasnivaju na referentnim reakcijama. U model reakcijama koje su osetljive na rastvarače izražava se empirijska mera polarosti rastvarača (solvaciona moć). Empirijski parametri koji su određeni na osnovu jedne reakcije ne mogu se primeniti za druge sisteme jer se pokazalo da sposobnost rastvarača da solvatiše prisutne molekule i jone ne zavisi samo od polarosti rastvarača, već i od svih intermolekularnih interakcije.

Da bi se razmotrilo dva ili više aspekta solvatacije pribeglo se višeparametarskom pristupu kod kojih se svaki parametar odnosi na određenu interakciju u ukupnoj

solvataciji molekula. On omogućava predviđanje vrednosti zavisno promenljive na osnovu vrednosti nezavisno promenljivih i može da se primeni na set podataka dobijenih za veliki broj dobro odabranih rastvarača.

Iako je razdvajanje efekata rastvarača na različite tipove interakcija čisto formalne prirode jer njihovo delovanje ne može uvek da se razdvoji uopšteno se mogu podeliti na dve grupe doprinosa: specifične (donor-akceptor, kiselo-bazne uz uključene vodonične veze) i nespecifične (potiču od delovanja rastvarača kao dielektričnog kontinuuma) interakcije.

2.4.2.1 Kamlet-Taft-ova skala polarnosti

Kamlet i *Taft* su 1976. godine razvili prvu višeparametarsku korelaciju jednačinu⁹⁰ zasnovanu na LSER-u:

$$A = A_0 + s(\pi_1^* + d\delta) + a\alpha_1 + b\beta_1 \quad (2.12)$$

Veličina A predstavlja fizičko-hemijsko svojstvo rastvorene supstance čija se zavisnost od rastvarača ispituje; A_0 je ekstrapolisana vrednost svojstva u cikloheksanu kao referentnom rastvaraču. Parametar π_1^* je mera polarnosti/polarizabilnosti rastvarača i funkcija je njegovog dipolnog momenta $\mu = -0,1 + 4,3\pi_1^*$ (skala se kreće od 0 (cikloheksan) do 1,00 (DMSO)). Za korekciju polarizabilnosti uvodi se parametar $d\delta$ (alifatični ($\delta = 0$), halogenoveni ($\delta = 0,5$) i aromatični ($\delta = 1$) rastvarače)⁹¹. Parametar α_1 opisuje sposobnost rastvarača da bude donor protona (odnosno akceptor elektronskog para) u vodoničnoj vezi⁹² (0 za nepolarne aprotične rastvarače do 1 za metanol) dok parametar β_1 opisuje sposobnost rastvarača da primi proton (odnosno da preda elektronski par) u vodoničnoj vezi (0 za nepolarne aprotične rastvarače do 1 za triamid heksametilfosfornu kiselinu). Koeficijenti s , d , a i b predstavljaju kvantitativnu meru uticaja skale, odgovarajućih parametara rastvarača i odražavaju doprinose jednog određenog parametra u odnosu na drugi.

Primenjena na UV-Vis apsorpcione frekvence *Kamlet* i *Taft* jednačina ima oblik:

$$\nu_{max} = \nu_0 + a\alpha + b\beta + s\pi^* \quad (2.13)$$

Parametar π^* predstavlja polarnost/polarizabilnost i zasnovan je na pomeranjima apsorpcionih frekvenci $\pi \rightarrow \pi^*$ prelaza nekoliko referentnih jedinjenja,⁹¹ ν_0 predstavlja apsorpcionu frekvencu rastvorene supstance u referentnom sistemu, a ν_{max} je apsorpciona frekvencija jedinjenja u određenom rastvaraču.

Kamlet-Taft-ov pristup ima značajan uspeh u kvalitativnoj proceni efekata rastvarača na apsorpcione spektre ali postoje i određeni nedostaci ove metode. Pošto su dipolarnost i polarizabilnost rastvarača predstavljene samo jednim parametrom (π^*) solvatohromna svojstva nepolarnih supstanci (ne uspostavljaju vodonične veze sa rastvaračem) ne mogu da se adekvatno opišu korišćenjem *Kamlet-Taft*-ove skale. Parametar za korekciju polarizabilnosti ($d\delta$) nije pogodan jer ne omogućava razlikovanje efekata polarizabilnosti između dva srodna rastvarača (aromatični i halogenovani ugljovodonici). Određivanje *Kamlet-Taft*-ovih parametara izračunavanjem srednjih vrednosti svojstava različitih referentnih molekula predstavlja drugi nedostatak⁹³.

2.4.2.2 *Catalán*-ova skala polarnosti

Catalán i saradnici⁹⁴ su uveli tri alternativne skale polarnosti SA, SB i SPP, koje se formalno mogu dovesti u vezu sa *Kamlet-Taft*-ovim parametrima α_1 , β_1 i π_1^* . Određivanje svakog solvatohromnog parametra rastvarača zasniva se na paru dobro definisanih homomorfni referentnih jedinjenja. Potreba za uvođenjem četvrta skale polarnosti (SP) proizišla je iz zaključka *Catalán*-a i *Hopf*-a, koji su pokazali da je jedinjenje označeno kao ttbP9 (3,20-di-*terc*-butil-2,2,21,21-tetrametil-5,7,9,11,13,15,17,19-dokozanonaen) osetljivo na promene u polarizabilnosti medijuma i neosetljivo je na kiselost, baznost i dipolarnost rastvarača⁹⁵. Zavisnost skale SPP i SP opravdava korišćenje samo jednog od ovih parametara, što je prouzrokovalo potrebu za uvođenjem dopunske skale (SdP), koja opisuje dipolarnost rastvarača. SdP je izvedena iz skale SP i apsorpcionih frekvencija DMANF-a (2-N,N-dimetilamino-7-nitrofluoren)⁹⁴. Formulirana višeparameterska jednačina obuhvata po dva parametra za specifične (SA i SB) i nespecifične interakcije (SP i SdP) (2.14):

$$A = A_o + aSA + bSB + cSP + dSdP \quad (2.14)$$

koja ako se primenjeni na UV-Vis apsorpcione frekvence ima formu:

$$\nu_{max} = \nu_o + aSA + bSB + cSP + dSdP \quad (2.15)$$

Koeficijenti a , b , c i d su regresioni koeficijenti koji opisuju osetljivost svojstva A na različite tipove interakcija između molekula rastvorene supstance i rastvarača.

Korišćenjem *Catalán*-ove jednačie prvi put su specifične interakcije uspešno odvojene na dva nezavisna parametra: dipolarnost i polarizabilnost.

2.5 Teorija funkcionala gustine (DFT)

Značaj DFT pristupa konstantno raste i zauzima vodeće mesto po pitanju upotrebe u naučnim radovima. Veliki broj rezultata potvrđuje izuzetnost DFT metode koji nudi najbolji odnos tačnosti rezultata i kompjuterskih resursa⁹⁶⁻⁹⁸. Praktična primena DFT-a predstavljena je sredinom 60-tih godina u dve publikacije od strane *Hohenberg-a*, *Kohn-a* i *Sham-a*. Već tada je primećena kao nauspešniji pristup za izračunavanje elektronske strukture materije. DFT metoda je pronašla primenu u proučavanju atoma, molekula, materije, tečnosti, kompleksnih materijala, međumolekulskih interakcija, pobuđenih i prelaznih stanja, mehanizama hemijskih reakcija, određivanju NMR spektara i drugih fizičko-hemijskih parametara ispitivanih jedinjenja.

U originalnoj formulaciji DFT daje osnovno stanje sistema gde gustina elektrona igra ključnu ulogu i sa velikom preciznošću predviđa različite molekulske osobine kao što su molekulska struktura, električna i magnetna svojstva, put reakcije, energiju jonizacije, vibracionu frekvenciju i.t.d.

Cilj većine pristupa u kvantnoj hemiji je da reši vremenski nezavisnu nerealističnu Šredingerovu jednačinu (2.16):

$$\hat{H}\Psi(r_1, \dots, r_N) = E\Psi(r_1, \dots, r_N) \quad (2.16)$$

gde je elektronska talasna funkcija $\Psi(r_1, \dots, r_N)$ funkcija od tri N nepoznate (N-broj elektrona). Rešavanjem Šredingerove jednačina moglo bi se predvideti ponašanje bilo kog sistema elektrona ali je zbog postojanja previše stepena slobode to nemoguće. DFT pokušava da opiše jedan interaktivni sistem elektrona koji se zasniva na funkciji gustine elektrona, označava se sa $r(x, y, z)$ i ima više pogodnosti i prednosti:

- a) fundament DFT pristupa (gustina elektrona) je eksperimentalno merljiv (difrakcijom X-zraka⁹⁹);
- b) nije apstraktan;
- c) matematički tretman je funkcija samo tri koordinate (x, y i z ose).

Zaključujemo da je u DFT pristupu gustina elektrona funkcija svega tri promenljive, bez obzira na dimenzije i broj elektrona u molekulu.

DFT je baziran na dve teoreme koje su objavili *Hohenberg* i *Kohn*¹⁰⁰, i seta jednačina koje su dobijene iz ovih teorema od strane *Kohn-a* i *Sham-a*¹⁰¹. Prva teorema glasi:

"Sva svojstva molekula u osnovnom elektronskom stanju su određena osnovnim stanjem funkcije elektronske gustine $\rho_0(x, y, z)$."

Ova teorema stanja kaže da se može odrediti bilo koje svojstvo molekula u osnovnom stanju, ukoliko se na neki način dođe do $\rho_0(x, y, z)$. Gustina sistema određuje sva osnovna stanja sistem, odnosno rešenje Šredingerove jednačine znači pronalazak energije osnovnog stanja sistema. Nedostatak ove teoreme je što ne objašnjava prirodu funkcionala odnosno kako da se dođe do njega što predstavlja glavni problem u DFT pristupu.

Druga teorema *Hohenberg-a* i *Kohn-a* glasi:

"Bilo koja probna funkcija elektronske gustine će dati energiju sistema koja je viša ili jednaka energiji pravog osnovnog sistema."

Pokazano je da postoje različiti principi za funkcije gustine, ali ovaj princip je ograničen na osnovna stanja i ne može se lako primeniti na pobuđena stanja. Ove dve teoreme su osnova DFT-a ali one ne nude praktičan način za proračune. *Kohn* i *Sham* su pokazali da problem pronalaženja prave elektronske gustine može biti rešen korišćenjem seta jednačina gde je samo jedan elektron uključen.

Kohn i *Sham* (KS) jednačine dobijaju se diferenciranjem energije po KS molekulskim orbitalama, gde se diferenciranje vrši po talasnim funkcijama molekulskih orbitala. Gustina ima isti izraz kao da je dobijena iz *Slater* determinante i prikazane je jednačinom (2.17).

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum_i |\Psi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (2.17)$$

gde Ψ_i predstavlja KS prostorne orbitale. *Kohn* i *Sham* su predložili izračunavanje kinetičke energije neinteraktivnog sistema sa istom gustinom kao kod realnog, reagujućeg sistema, gde se nereagujući elektroni kreću u efektivnom potencijalu. Energija je podeljena na "poznate" i "nepoznate" uslove (2.18):

$$E[\mathbf{r}] = T_s[\mathbf{r}] + E_{ext}[\mathbf{r}] + E_{Coul}[\mathbf{r}] + E_{xc}[\mathbf{r}] \quad (2.18)$$

T_s –poznata kinetička energija, privlačenje elektron-jezgro E_{ext} , Kulonovo privlačenje E_{Coul} i nepoznata izmensko-korelaciona energija, E_{xc} .

Jedini termin za koji se ne može dati eksplicitna forma je E_{xc} . Minimalizacija energije funkcionala vodi ka jednačinama *Kohn-a* i *Sham-a* koje su date u nastavku (2.19-2.22):

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V_{eff}(\mathbf{r}) \right] \Psi_i(\mathbf{r}) = \varepsilon_i \Psi_i(\mathbf{r}) \quad (2.19)$$

$$V_{eff}(\mathbf{r}) = V_{ext}(\mathbf{r}) + V_H(\mathbf{r}) + V_{xc}(\mathbf{r}) \quad (2.20)$$

$$n(\mathbf{r}) = \sum_i |\Psi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (2.21)$$

$$V_{xc} = \frac{\delta E_{xc}}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (2.22)$$

Za rešavanje KS jednačina koristi se metod samousaglašenog polja (SCF, *eng.* Self-Consistent Field) jer efektivni potencijal V_{eff} zavisi od $n(\mathbf{r})$, stoga i od $\Psi(\mathbf{r})$, što predstavlja rešenje za jednačine. Od dobijenih ajgen-energija i ajgen-funkcija moguće je dobiti totalnu energiju osnovnog stanja, gustinu naelektrisanja, vibracione osobine i.t.d. Funkcionalni izmensko-korelacione energije opisuju efekat Paulivog principa i Kulonovog potencijala više od čistog elektostatičkog potencijala između elektrona. Ovaj termin je definisan kao funkcionalni izvod od E_{xc} uzimajući u obzir elektronsku gustinu. Pronalaženje ovog funkcionala je veoma izazovan zadatak pa su razvijeni aproksimativni funkcionali kao što su LDA aproksimacija (*eng.* Local Density Approximation), uopštena gradijentna aproksimacija (GGA, *eng.* Generalized-Gradient Approximation), ili hibridni funkcionali.

2.5.1 Aproksimacioni funkcionali

Prvi pokušaj aproksimacije funkcionala izmensko-korelacione energije je napravljen korišćenjem najjednostavnije aproksimacije koja se matematički gledano zasniva na *lokalnom svojstvu* funkcije (LDA). LDA aproksimacija se zasniva na pretpostavci da u svakoj tački u molekulu gustina energije odgovara onoj vrednosti koju bi u toj tački imao homogeni elektronski gas čija gustina elektrona odgovara elektronskoj gustini u toj tački. Treba primetiti da LDA ne pretpostavlja da je elektronska gustina u molekulu homogena. U LDA E_{xc} je izračunat sumiranjem sistemskog ponašanja homogenog elektronskog gasa na lokalnom nivou (2.23):

$$E_{xc} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}^{LDA}(\rho(\mathbf{r})) \quad (2.23)$$

$\varepsilon_{xc}^{LDA}(\rho)$ je gustina izmensko-korelacione energije elektrona homogenog gasa sa gustinom ρ .

Performanse LDA u proračunima su iznenađujuće dobre za takav metod ali krajnje precenjivanje energije veze i siromašna termohemija smanjuju njegovu korisnost u suočavanju sa većinom pitanja koja su u interesu hemije.

Najosnovnija klasa funkcionala koja poboljšana u odnosu na LDA bazirana je na uopštenoj gradijentnoj aproksimaciji i većina aktuelnih DFT pristupa koristi ove funkcionale koji koriste i elektronsku gustinu i njen gradijent, odnosno zavise od vrednosti nagiba elektronske gustine (2.24):

$$E_{xc} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}^{GGA}(\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.24)$$

Lokalna nehomogenost u elektronskoj gustini se može objasniti zavisnošću gustine energije i gradijenta gustine. Za razliku od LDA izraz ε_{xc}^{GGA} nije jedinstven tako da postoje brojni GGA funkcionali koji se koriste. Ovi funkcionali variraju korišćenjem graničnih uslova u broju podesivih parametara koje sadrže kao i u količini empirizma koji se uključuje za njihovo konstruisanje. Njemu najbliži funkcionali su PW91¹⁰², PBE¹⁰³ i BLYP¹⁰⁴.

Uopšteno GGA funkcionali daju mnogo bolje rezultate za izračunavanje od većine svojstava, međutim nisu dovoljno korisni u proračunima energija hemijskih reakcija. Veoma su popularni u čvrstom stanju jer daju tačne geometrije, elastična svojstva čvrstih supstanci i kvalitativno ispravne elektronske strukture veza. Meta-GGA funkcionali povećavaju fleksibilnost u funkcionalnoj definiciji pomoću KS gustine kinetičke energije (τ_{KS}) koja se dobija sumiranjem gradijenata KS orbitala (2.25, 2.26).

$$E_{xc} = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}^{GGA}(\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r}), \nabla^2\rho(\mathbf{r}), \tau_{KS}(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.25)$$

$$\tau_{KS}(\mathbf{r}) = -\frac{1}{2} \sum_i |\nabla_i(\mathbf{r})| \quad (2.26)$$

Imajući u vidu povećan stepen slobode meta-GGA funkcionali poboljšavaju tačnost u izračunavanju svojstava u odnosu na GGA i u isto vreme su preaktični za sve tipove struktura: atomi, molekuli, periodične strukture i površine. Najpoznatiji primeri meta-GGA funkcionala su: PW91, mPW, BLYP, PBE, mPBE, Tpps i M06-L.¹⁰⁵

Navedeni funkcionali LDA, GGA i meta-GGA su semilokalni funkcionali što znači da izmensko-korelacione energije gustine u jednoj tački zavisi samo od svojstava u toj tački. Becke¹⁰⁶ je pokazao da je moguće u velikoj meri poboljšati proračune molekularne termohemije mešanjem GGA sa tačnim izmenama frakcija koji se

obračunavaju kao izmena *Hartree-Fock* (HF) energije, ali su dobijeni iz KS orbitala. S obzirom da podrazumevaju prisustvo i DFT i HF pristupa, često se funkcionali zasnovani na ovom metodu nazivaju i *hibridnim*. Drugim rečima, ovi funkcionali sadrže energetski doprinos HF tipa elektronske izmene izračunat iz KS talasnih funkcija neinteragujućih elektrona. Ono što međusobno najviše razlikuje hibridne funkcionale jeste procenat u kome sadrže HF izmensku energiju. Upotreba tačne izmene funkcionala opravdana je Adijabatskom povezanošću formula^{107,108}:

$$E_{xc}[\rho] = \int_0^1 \left(\left\langle \sum_{i>j} r_{ij}^{-1} \right\rangle_{\lambda} - J[\rho^{\lambda}] \right) d\lambda = \int_0^1 U_{xc}^{\lambda} d\lambda \quad (2.27)$$

$\lambda = 0$ for neinteragujući *Kohn-Sham* sistem, $\lambda = 1$ za potpuno međusobno reagujući realni sistem, t.j. parametar λ pokreće korelacije elektrona. Potencijal izmenske-korelacije (U_{xc}) pri $\lambda = 0$ je tačna izmena energije dobijena korišćenjem KS orbitala. (2.28).

$$U_{xc}^0 = -\frac{1}{2} \sum_{ij}^{occ} \int \frac{\Psi_i^*(\mathbf{r}_1)\Psi_j^*(\mathbf{r}_2)\Psi_j^*(\mathbf{r}_1)\Psi_i^*(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \quad (2.28)$$

Izmensko-korelacioni funkcional može biti usaglašen interpolacijom između $\lambda = 0$ ograničenog (tačna izmena) i $\lambda = 1$, predstavljen semilokalnim funkcionalom (2.29).

$$E_{xc}[\rho] = a_x U_{xc}^0 + (1 - a_x) E_{xc}^{semilocal}[\rho] \quad (2.29)$$

Ovi hibridni funkcionali koji koriste frakcije tačne razmene nisu više semilokalni, zato što tačna izmena uključuje dvostruku integraciju nad realnim prostorom. Zbog toga oni zahtevaju znatno veći računski proračune od semilokalnih funkcionala što ograničava njihovu široku primenu. Hibridni funkcionali koji se najčešće koriste su B3LYP¹⁰⁹, TPSSH¹¹⁰, PBE1PBE¹¹¹ i M06¹¹².

2.5.2 Bazisni skupovi

Bazisni skupovi ili bazisi predstavljaju bitan element kada se radi o molekulskom modelovanju i utiču na tačnost i dužinu proračuna. Predstavljaju skupove vektora koji definišu prostor u kome se posmatra i rešava neki problem.

Sa stanovišta teorije molekularskih orbitala, bazisni skupovi su skupovi matematičkih funkcija (bazisne funkcije) čije linearne kombinacije konstituišu molekularske orbitale. Može se koristiti linearna kombinacija bilo kog skupa matematičkih

funkcija koje su pogodne za manipulisanje i čija linearna kombinacija daje dobro predstavljanje molekulskih orbitala.

Različiti tipovi funkcija (vodonične, polinomne) se mogu koristiti za opisivanje raspodele elektrona oko atoma ali *Slater*-ove (semi-empirijski proračuni) i *Gauss*-ove (*ab initio* i DFT pristup) funkcije su najjednostavnije i upravo se one koriste najviše.

I jedna i druga funkcija imaju nedostataka pa je zarad poboljšanja efikasnosti, jedno rešenje moglo biti da bude aproksimiranje *Slater*-ovih funkcija *Gauss*-ovim. Međutim, iako poboljšava efikasnost, ovo rešenje nije sasvim adekvatno jer *Gauss*-ovim funkcijama raspodela elektrona oko atoma se ne opisuje ni izbliza tako dobro kao što se to čini upotrebom *Slater*-ovih funkcija. Tako se došlo do ideje da se *Slater*-ove funkcije aproksimiraju sa više *Gauss*-ovih funkcija.

Za DFT pristup, u kombinaciji sa B3LYP funkcionalom, od posebnog je značaja 6-31G(d) bazis. Kod tog bazisa brojevi 6 i 3 označavaju aproksimacije *Slater*-ovih orbitala sa *Gauss*-ovim funkcijama i obrnuto. Broj 1 označava da su sa po jednom *Gauss*-ovom funkcijom zamenjene sve ostale *Slater*-ove orbitale. Slovo d označava da se orbitalama „dozvoljava“ da budu pomerenije u jednu stranu. Ovaj bazis se može poboljšati dodavanjem polarizacionih funkcija i na lake atome, tj. atome vodonika, kada se pomenuti bazis označava kao 6-31G(d,p).

2.5.3 Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori predstavljaju veličine čije numeričke vrednosti opisuju određeno fizičko-hemijsko svojstvo. S obzirom da kvantitativna analiza povezanosti između strukture jedinjenja i njegove aktivnosti podrazumeva predviđanje fizičko-hemijskih svojsta na osnovumolekulske strukture, pravilan izbor i primena molekulskih deskriptora je od ključnog značaja. Postoji veliki broj molekulskih deskriptora a ovde će biti navedeni samo oni korišćeni tokom izrade ove disertacije.

2.5.4 HOMO, LUMO, HOMO-LUMO energetska prelaz

HOMO i LUMO su energije najvišeg i najnižeg energetskog nivoa koji sadrži elektrone. Molekuli sa visokim vrednostima HOMO energija mogu donirati elektrone lakše, dok molekuli sa niskim LUMO vrednostima lakše primaju elektrone. Iz navedenog se zaključuje da se više vrednosti HOMO energije povezuju sa višim reaktivnostima.

Ukoliko je HOMO energija suprotnog znaka taj deskriptor se naziva jonizacionim potencijalom i služi kao mera nukleofilčnosti molekula, dok se suprotna vrednost LUMO deskriptora naziva elektrofiličnost.

HOMO-LUMO gap je važan kvantno molekularski deskriptor i indikator stabilnosti kada se radi o molekularskom modelovanju. Visoka vrednost ovog deskriptora ukazuje na visoku stabilnost, a niska na nižu stabilnost ispitivanog molekula.

$$GEP = E_{LUMO} - E_{HOMO}$$

2.5.5 Spektroskopija i spektroskopske veličine

Primenljivost nekog nivoa teorije molekularskog modelovanja može se proveriti izračunavanjem spektroskopskih veličina. Od posebnog značaja su predviđanje IR, NMR, Raman i UV-Vis spektara. U okvirima TD-DFT-a mogu se istraživati elektronski prelazi, što za posledicu ima dobijanje UV-Vis spektara. Moguće je i specificirati i broj i tip elektronskog prelaza što otvara mogućnosti kada se radi o dizajnu molekula kod kojih nam trebaju baš neki specifični prelazi.

2.5.6 Primena kvantnohemijjskih proračuna u ispitivanju izomerije *h*-(T)UK

Kvantnohemijjski proračuni predstavljaju moćnu tehniku u ispitivanju izomerije raznih vrsta jedinjenja. Njen značaj se ogleda u pružanju informacija o relativnoj stabilnosti različitih izomera i tautomera, transferu nalektrisanja kroz molekul kao i mogućnosti formiranja vodoničnih veza. Proračuni se obično odnose na gasnu fazu, a s`obzirom da se izomerizacija najčešće ispituje u rastvoru potrebno je proračune prilagoditi ispitivanom rastvaraču. Stoga dalja istraživanja bi trebala da podrazumevaju modelovanje interakcija uključivanjem molekula rastvarača i njihovih interakcija sa odgovarajućim izomerom. U Tabeli 2.2 dati su termodinamički podaci i relativne energije optimizovanih struktura *mhUK*_(sal) (Slika 2.12 a-c) izračunatih uz pomoć DFT B3LYP/6-3110+g(d,p) modela¹¹³. S`obzirom da su NMR podaci pokazali da se molekul u DMSO-u nalazi u *E*- obliku teorijski proračuni su upoređivani izračunavanjem enrgija stabilnosti za molekul u vakumu i u DMSO-u.

Tabela 2. 2 Termodinamička svojstva keto-enolnih tautomera $mhUK_{(sal)}$ u gasnoj fazi i DMSO-u

Molekul	$\Delta_r G / \text{kJ/ mol}$	
	Gasna faza	DMSO ($\epsilon_r = 46,826$)
$mhUK_{(sal)-a}$	0,00	0,00
$mhUK_{(sal)-b}$	36,45	36,45
$mhUK_{(sal)-c}$	62,38	62,38

Na rezultata može se zaključiti da je keto hidrazonski tautomer $mhUK_{(sal)-a}$ stabilniji od enolnih tautomera i u gasnoj fazi kao i u DMSO-u kao rastvaraču. Jačina vodoničnih veza u tautomeru $mhUK_{(sal)-a}$ kategorizovana je kao umereno jaka i iznosi 42,62 kJ/mol u vakumu i 28,99 kJ/mol u DMSO-u. Sa druge strane intermolekulska vodonična veza između N-H grupe i DMSO molekula računata u vakumu iznosi 11,21 kJ/mol iz čega se zaključuje da je ta veza znatno slabija od intramolekulske vodonične veze koja u stvari stabilizuje $mhUK_{(sal)-a}$ molekul⁵².

Molekulskim modelovanje $dhUK_{(2pya)}$ korišćenjem DMOL³ programa¹¹⁴ uočeno je da njegov *syn* i *anti* enolni oblik (Slika 2.11 b) i c) poseduje istu vezivnu energiju (4043,32 kcal/mol) što pokazuje da se on može naći u oba oblika što je u skladu sa NMR podacima⁵⁶.

Da bi se objasnile različite strukturalna svojstva liganda $dhUK_{(2pya)}$ optimizacijom geometrije TD-DFT metodom¹¹⁵ korišćenjem M06 funkcionala u gasnoj fazi analizirani su elektronski prelazi i nakon upoređivanjem sa UV-Vis eksperimentalnim podacima utvrđeno je da jedinjenje u rastvoru može postojati i u *E*- i u *Z*- obliku¹¹⁶.

2.6 Pručavanje kvantitativne veze između strukture i svojstava molekula

Opšte je poznato da struktura samih molekula utiče na fizička svojstva hemijskih jedinjenja, kao i da je u tesnoj vezi sa hemijskom i biološkom aktivnošću. Veliki broj istraživanja ima za cilj za definisanje veze između strukture i karakteristika molekula. Još početkom XIX veka objavljeni su prvi radovi koji su se bavili korelacijom strukture i biološke aktivnosti¹¹⁷. Pručavanje odnosa između strukture i aktivnosti, započeto je 60tih godina XX veka od strane *Hansch*-a i *Fujita*¹¹⁸ koji su dali veliki doprinos razvoju

QSAR-a. U klasičnoj QSAR analizi najviše se koriste sledeći fizičko-hemijski parametri koji:

- a) kvantifikuju elektronske efekte supstituenata (*Hammet*-ove σ vrednosti);
- b) kvantifikuju sterne uticaje supstituenata (*Taft*-ove E_s konstante);
- c) odražavaju lipofilnost molekula ili supstituenata ($\log P$ i π konstante).

Pri sintezi novih lekova medicinski hemičari se trude da prouče ADMET svojstva jedinjenja koji su kandidati za lek. Osnovno jezgro molekula leka se zadržava dok se modifikacijom (dodatkom, uklanjanjem ili varijacijom određenih supstituenata) hemičari trude da poboljšaju biološko svojstvo molekula.

Ispitivanjem biološke aktivnosti serije jedinjenja moguće je zaključiti koji supstituenti poboljšavaju biološko dejstvo molekula. Proučavanje odnosa strukture i aktivnosti slično je LFER-u, odnosno analizira se doprinos supstituenta nekoj fizičkoj veličini (pK_a , $\log P$, itd.), odnosno razlika u osobinama dva jedinjenja, najčešće jednog nesupstituisanog drugog supstituisanog. Formirane su baze podataka bioloških aktivnosti i ADMET karakteristika lekova koje je moguće pretraživati. Analiza preklopljenih parova molekula (MMPA, *eng.* Matched Molecular Pairs Analysis) se zasniva na zameni jedne grupe molekula drugom i danas se dosta koristi u cilju proučavanja uticaja supstituenata u *in vitro* i *in vivo* studijama¹¹⁹. Kompjuterski algoritmi mogu da obrađuju podatke na nepristrasan način, formiraju pravila po kojim treba dizajnirati molekule i predlažu bolje molekule sa boljim farmakološkim osobinama i samim tim smanjuju vreme dizajniranja lekova. Kombinovanje informacija iz više različitih izvora može unaprediti istraživanja medicinskih hemičara čak i za nekoliko godina. S obzirom da su upravo prediktivnost i domen primenljivosti najveće mane klasičnih QSAR modela, MMPA sve više nalazi upotrebu u farmaceutskoj praksi.

2.6.1 3D-QSAR analiza

U novije vreme, razvijen je metod poznat kao 3D-QSAR u kome se uzimaju u obzir ukupne osobine molekula a ne individualni doprinosi grupa ili delova molekula. Osamdesetih godina XX veka razvijene su brojne metode za 3D-QSAR analizu, a jedna od najviše upotrebljivanih metoda jeste komparativna analiza molekulskih polja (CoMFA, *eng.* Comparative Molecular Field Analysis)¹²⁰. CoMFA se primenjuje na seriju jedinjenja koja su na osnovu pogodno izabranog kriterijuma međusobno svrstana u

konfiguracionom prostoru i opisuju se različitim trodimenzionalnim poljima izračunatim u tačkama u prostoru oko molekula, upotrebom odgovarajuće probe.

Analiza delimičnih najmanjih kvadrata (PLS, *eng.* Partial Least Squares) se koristi za kvantitativnu korelaciju deskriptora izvedenih iz molekulskih polja i jačine biološkog dejstva ispitivanih jedinjenja. Fleksibilni molekuli mogu postojati u nekoliko stabilnih konformacija, i pretpostavka je da molekul u 3D-QSAR modelu treba da bude u konformaciji identičnoj onoj koju zauzima u aktivnom mestu biološke mete („*aktivna konformacija*“). Međusobno svrstavanje molekula u konfiguracionom prostoru je ključni problem za uspešnu CoMFA analizu, i predstavlja usko grlo i najveći izvor grešaka u CoMFA studijama. Ukoliko strukturni podaci o kompleksima između liganda i biološke mete (najčešće proteina) ne postoje, molekuli se međusobno svrstavaju na osnovu svih drugih dostupnih informacija: farmakofornih hipoteza ili na osnovu sličnosti između molekulskih fragmenata. Ukoliko je eksperimentalno određena struktura biološke mete (enzima, receptora) dostupna, tada se koriste tzv. metode međusobnog svrstavanja molekula zasnovane na strukturi (biološke mete). One obuhvataju doking molekula u vezivno mesto biološke mete ili svrstavanje molekula u odnosu na ligand koji je kokristalisan sa biološkom metom.

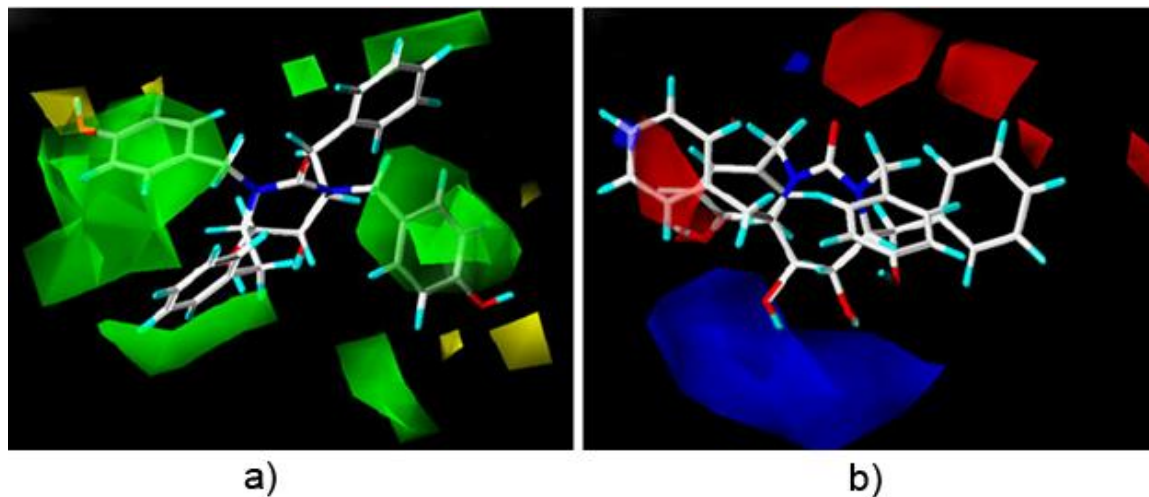
Drugi problem vezan za CoMFA i srodne metode za 3D-QSAR analizu jeste nizak odnos signala i šuma u PLS analizi. Šum u ovom kontekstu znači da se deskriptori (promenljive) koje nisu relevantne za jačinu dejstva jedinjenja razmatraju pri izvođenju modela. Prema tome, odabir najzačajnijih promenljivih i isključivanje pozadinskog šuma predstavlja opšti problem u 3D-QSAR analizi.

Radi prevazilaženja problema prostornog poravnavanja struktura, Pastor i saradnici razvili su GRIND metod zasnovan na MIF-ovima¹²¹. MIF-ovi daju informaciju gde su energetske povoljne, a gde energetske nepovoljne pozicije probe u prostoru oko molekula mete. Ovaj metod generiše promenljive nezavisne od položaja molekula u 3D rešetki.

2.6.2. Polje molekulskih interakcija – GRID metod

Polja molekulskih interakcija^{122,123} predstavljaju prostornu varijaciju energije interakcije između molekula mete i odgovarajuće probe. Uoliko je poznata molekulska struktura molekula može se izračunati MIF koji daje informaciju o energetski povoljnim i

nepovoljnim pozicijama probe u prostoru oko molekula mete (Slika 2.19). Trodimenzionalni grafik koji pokazuje konturnu površinu koja okružuje molekul predstavlja jednu izabranu vrednost elektrostatskog potencijala.



Slika 2. 19 Polja molekularnih interakcija: a) sterne konture, b) elektrostatske konture¹²⁴

Program GRID ima cilj da pruži hemijski specifične informacije o molekulu, odnosno računa MIF-ove za mnoštvo različitih hemijskih proba i ima tri specifične osobine:

a) GRID probe su anizotropne. Program funkcioniše tako što centralni atom probe smešta u odgovarajuću tačku rešetke, a zatim se proba rotira dok usmerenost hemijskih veza u prostoru odgovara energetski najpovoljnijoj interakciji atoma mete i atoma probe. Ovo je naročito značajno kod proba koje se koriste za opisivanje vodoničnog vezivanja.

b) Molekul meta „odgovara” kada se proba pomera oko nje iz mesta u mesto. Ovo znači da se na sličan način i atomi mete rotiraju oko odgovarajućih veza dok se ne ostvari energetski najpovoljnija interakcija atoma mete i atoma probe.

c) Pretpostavljeno je da su i meta i proba „potopljene u vodi” i da okolina koja okružuje metu ima dielektričnu konstantu koja odgovara vodenoj sredini ($\epsilon_r=80$), kao i da se ona smanjuje na vrednost koja je u šupljinama velikih globularnih makromolekula ($\epsilon_r=4$).

2.6.2.1 GRID polje sila, kalibracija

Program GRIN uvek analizira ulazne podatke pre svakog GRID izračunavanja. Najvažniji proces koji GRIN sprovodi jeste spajanje nepolarnih vodonikovih atoma sa njihovim susednim teškim atomima tako da daju „prošireni tip atoma”. Hemijske probe

interaguju sa proširenim tipovima atoma a ukupna energija predstavlja zbir sledećih pojedinačnih osnovnih energetske doprinosa:

- a) disperzionih sila opisanih *Lennard-Jones*-ovim 12,6-potencijalom;
- b) elektrostatičkog doprinosa opisanog klasičnim *Coulomb*-ovim zakonom;
- c) vodoničnog vezivanja;
- d) entropijskog faktora.

Kalibracija GRIN programa koji predstavlja osnovu programa GRID vrši se u odnosu na eksperimentalne podatke za razlikovanje entalpijskih i entropijskih doprinosa *Gibbs*-ovoj slobodnoj energiji vezivanja upotrebljena su kalorimetrijska merenja ili iz dobijenih vrednosti kristalografskih podataka za *Van der Wals*-ove poluprečnike različitih tipova atoma.

2.6.3. GRIND deskriptori izvedeni iz MIF-ova

Pri dizajniranju potencijalnih liganada koriste se MIF-ovi kao identifikacija vezivnih mesta za probe na makromolekulima kao metama. Da bi se mali molekuli okarakterisali prema njihovom potencijalu da deluju kao ligandi vezujući se za određenu vrstu makromolekula, moguće je izračunati MIF-ove koji u stvari predstavljaju svojstva molekula odnosno „molekulske deskriptore”. Molekulski deskriptori zasnovani na GRID MIF-ovima su korišćeni u različitim 3D-QSAR metodama: CoMFA, CoMSIA,¹²⁵ GRID/GOLPE¹²⁶.

MIF-ovi različitih molekula mogu se porediti ukoliko su molekuli precizno preklopljeni na način da se fragmenti strukturno različitih molekula koji interaguju sa istim delovima biološke mete nalaze na približno istim položajima što se može postići na nekoliko načina:

- a) preklapanjem ekvivalentnih atoma, odnosno onih koji interaguju sa istim delovima receptora ukoliko su poznate strukture ligand-receptor kompleksa;
- b) određivanjem dokinga 3D struktura ispitivanih molekula u vezivno mesto receptora ako je poznata struktura makromolekula i tako dobiti strukture kompleksa koje služe za dalje preklapanje;
- c) preklapanjem na osnovu svih relevantnih informacija, kao što su određene hipoteze, farmakofore, slični strukturi fragmenti uz određenu dozu subjektivnosti u proces preklapanja.

Osim problema sa međusobnim rasporedom molekula, jedan od problema u procesu 3D-QSAR analize, vezano je i za prirodu samih MIF-ova. Broj promenljivih je ogroman i često prevazilazi nekoliko stotina hiljada zbog čega je neophodna upotreba multivarijantnih i megavarijantnih metoda kao što su analiza delimičnih najmanjih kvadrata i/ili analiza glavnih komponenata (PCA, *eng.* Principal Component Analysis)¹²⁷.

Zbog svih ovi nedostataka razvijeni su novi tipovi molekulskih deskriptora koji mnogo manji broj informativnih promenljivih dobijaju kondenzovanjem informacija iz inicijalnog seta MIF-ova. Kao rezultati dobijeni su deskriptori za opisivanje farmakokinetičkih (Volsurf¹²⁸) i farmakodinamičkih (GRIND¹²¹) osobina molekula, odnosno sposobnosti vezivanja molekula za biološke mete.

2.6.3.1 Osnovna svojstva GRIND deskriptora

Ekstrakcija najrelevantnijih informacija iz MIF-a i njihovo kondenzovanje u korisne promenljive se odvija uz pomoć GRIND metode. Zahtevi koji GRIND deskriptori ispunjavaju su sledeći:

- a) rezultujuće promenljive su nezavisne od međusobne pozicije ili orijentacije molekula u prostoru;
- b) promenljive imaju hemijsko značenje i lako se mogu interpretirati;
- c) mali broj promenljivih treba da sadrže najvažnije informacije;
- d) dobijene promenljive su pogodne za analizu standardnim hemometrijskim metodama kao što su PCA i PLS;
- e) deskriptori se mogu izračunati brzo i automatski.

Dobijanje (izračunavanje) GRIND deskriptora podrazumeva tri koraka:

I Izračunavanje MIF-ova (polja molekulskih interakcija)

GRIND metod izračunava MIF-ove sa sledećim GRID probama:

- a) **DRY**, koja karakteriše hidrofobne interakcije;
- b) **O**, (sp^2 kiseonik) koji opisuje akceptore vodničnih veza;
- c) **N1**, (planarni, amidni azot) koji opisuje donore vodoničnih veza;
- d) **TIP**, određuje oblik na osnovu lokalne zakrivljenosti površine molekula¹²⁹.

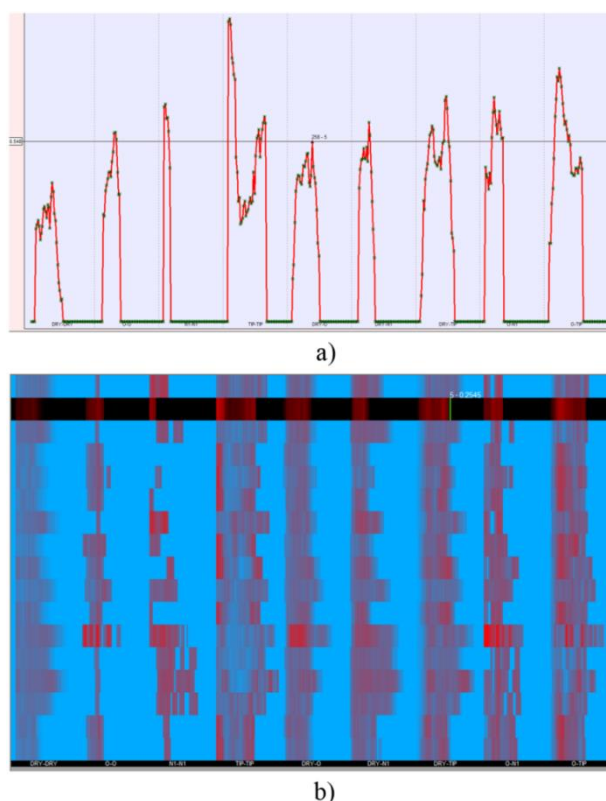
II Ekstrakcija najznačajnijih regiona MIF-ova (diskretizacija MIF-ova)

U ovoj fazi izračunavanja vrši se odabir najvažnijih regiona u kojima ligand može ostvariti povoljne interakcije sa grupama u vezivnom mestu molekula mete i veliki deo

informacija sadržanih u MIF-ovima se odbacuje. Odabrane vrednosti MIF-ova imaju energetski napovoljnije interakcije i određena međusobna rastojanja između regiona. Doprinos oba ova kriterijuma se može podešavati u programu ALMOND, a nedavno je opisan i novi način odabira MIF-ova iz pomoć AMANDA algoritma¹³⁰ koji daje drugu generaciju GRIND deskriptora (GRIND-2).

III Prevođenje informacije iz MIF u deskriptore („kodiranje”) upotrebom MACC2 kriterijuma¹³¹

Opisivanje prostornog rasporeda čvorova (rastojanje između čvorova i energija MIF-ova u njima) odabranih najznačajnijih regiona bez upotrebe njihovih apsolutnih koordinata ili spoljašnjeg referentnog sistema je sledeći korak u GRIND postupku. U programu Pentacle uvedena je metodologija kodiranja MIF-ova primenom MACC-2 kriterijuma (*eng.* Maximum Auto- and Cross Covariance). Dobijeni deskriptori mogu se prikazati na više načina:



Slika 2. 20 a) Korelogrami promenljivih proizvoljno izabranog jedinjenja izračunati u programu Pentacle, b) Hitmapa serije jedinjenja sortiranih prema rastućoj biološkoj aktivnosti (svaki red hitmape predstavlja jedno jedinjenja, dok svaka kolona predstavlja jednu promenljivu)

a) Različitim tipovima korelograma koji se upotrebljavaju za poređenje inteziteta različitih promenljivih koje opisuju jedno jedinjenje (Slika 2.20 a)) u kojima su rastojanja predstavljena horizontalnom osom a normalizovani proizvodi energija vetrikalnom osom. Jedinjenja koja poseduju osobine lekova obično sadrže 50- 80 promenljivih po korelogramu.

b) Za ukupan uvid promenljivih za sva jedinjenja u seriji, reprezentacija promenljivih „hitmapama“ je korisnija (Slika 2.20 b). „Hitmape“ predstavljaju matrice gde svaki red predstavlja jedno jedinjenje a svaka kolona odgovarajuću promenljivu, pri čemu različito obojenje određuje niske (crvena boja) ili visoke (plava boja) vrednosti promenljivih.

2.6.4 Trodimenzionalna analiza odnosa strukture i aktivnosti (3D-QSAR) zasnovana na poljima molekulskih interakcija

Za dobijanje QSAR modela koriste se izračunati GRIND-2 deskriptori koji imaju ulogu i za klasifikaciju molekula. PCA pokazuje sličnosti i/ili razlike u okviru ispitivane grupe jedinjenja i okviru njega originalna X-matrica promenljivih prevodi se pomoću nekoliko ortogonalnih projekcija u set novih, međusobno nezavisnih promenljivih odnosno glavnih komponenti (PC *eng.* Principal Components). Cilj pravljenih projekcija je da dobijena PC ima najveći mogući procenat informacija iz polaznog seta. Najveća korist u PCA tehnici je organizacija informacija koje sadrže X-matricu uz formiranje najjednostavnije forme za interpretaciju osobina objekata (molekula). PCA razlaže matricu promenljivih na proizvod dve matrice:

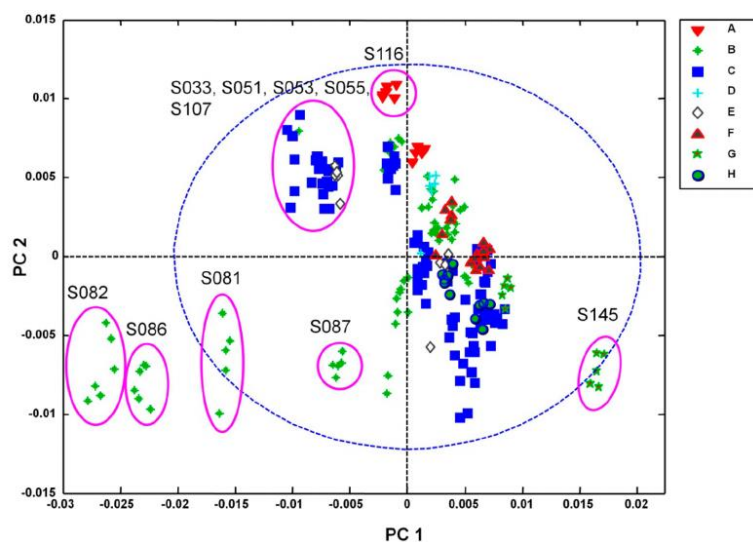
$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E}$$

gde su **P** – matrica doprinosa („loading matrix“), sadrži informaciju o promenljivim; **T** – matrica skorova („score matrix“), koja sadrži informacije o objektima i u njoj je svaki objekat opisan u prostoru glavnih komponenti, umesto u multidimenzionalnon prostoru originalnih promenljivih; **E** – matrica reziduala, koja predstavlja neobjašnjenu X varijansu.

Za interpretaciju PCA modela koriste se još dva tipa grafika:

a) Grafik PCA skorova (Slika 2.21) koji odlikava relativne pozicije objekata u (konfiguracionom) prostoru glavnih komponentata. Ovi grafici su korisni u identifikaciji grupe objekata, kao i u uočavanju objekata čije osobine odstupaju od ostatka seta

(„outliers“, spoljne vrednosti). Objekti unutar elipsoidne linije mogu se smatrati sličnim u intervalu pouzdanosti od 5 %.



Slika 2. 21 Grafik PCA rezultata za molekule iz nekoliko strukturno različitih grupa u prostoru PC modela¹³²

b) Grafik PCA doprinosa na osnovu koga je moguće utvrditi koji strukturni fragmenti jedinjenja najviše doprinose glavnim komponentama.

Obično prva PC razdvaja jedinjenja po veličini, druga na hidrofobna i hidrofilna itd. Ako je poznata kvantitativno izražena biološka aktivnost može se koristiti kao zavista Y-promenljiva i korelisati sa matricom deskriptora koristeći multivarijantne metode kao što je npr. PLS. Ova tehnika razlaže X-matricu na proizvod matrice skorova (**T**), matrice doprinosa (**P**) (vodeći računa o prisutnim eksperimentalnim greškama u Y-vrednostima) uz definisanje i matrica skorova Y- vrednosti (**U**).

PLS analiza je regresiona tehnika koja ima za cilj da objasni jednu ili više zavisnih promenljivih (**Y**) od prediktora, odnosno nezavisnih promenljivih (**X**), i ona je jedina pogodna regresiona tehnika koja može da da validan rezultat iz **X** matrica koje se koriste u 3D-QSAR. Ova tehnika razlaže X-matricu kao proizvod matrice doprinosa (**P**) i matrice skorova (**T**) i daje latentne promenljive (**LV**) tako da ispunjavaju dva bitna uslova: reprezentovanje strukture kako X- tako i Y- matrice i obezbeđivanje maksimalnog fitovanja između X i Y vrednosti. LV su ekstrahovane po opadajućem redosledu značaja i međusobno su ortogonalne.

Programi ALMOND i Pentacle daju informacije o dobijenom PLS modelu pri čemu se dobijaju određeni statistički parametri. Indeks fitovanja modela (R^2_{acc}) i indeks prediktivne sposobnosti modela (Q^2_{acc}) predstavljaju dva najvažnija statistička parametra koja su dobijena unakrsnom validacijom (vrednosti bliže R^2_{acc} su bolje). R^2_{acc} pokazuje deo Y varijanse objašnjen modelom (vrednosti bliže 1 su bolje). Kvadratne vrednosti R i Q određuju kvalitet i najbolju dimenzionalnost dobijenog modela. Prihvatljiv 3D-QSAR model treba da ima R^2 iznad 0.8 i Q^2 iznad 0.5. Što se tiče broja LV, bira se model sa višim Q^2 ali je razumno odbaciti LV ako je njen doprinos vrednostima R^2 i Q^2 mali.

Prediktivna sposobnost modela koje je važna zbog broja LV obično se procenjuje upotrebnom unakrsne validacije. (CV, *eng.* Cros-Validation). Formiraju se modeli sa pojedinim uklonjenim objektima koji treba da predvide Y vrednosti (Y') za objekte koji su izvršili redukciju modela. Nakon toga se Y' poredi sa eksperimentalnim Y i izračunavaju se: SDEP (standardna devijacija greške predviđanja) i Q^2 (prediktivni korelacioni koeficijent).

Postoji više načina unakrsne validacije koja se dobija CV tehnikom:

- a) LOO (*eng.* Leave One Out). Edukovani modeli se tako prave da se u svakom ciklusu izostavlja samo po jedan objekat u toku analize i procedura se ponavlja dok svi objekti nisu po jednom izostavljeni.
- b) LTO (*eng.* Leave Two Out). Modeli se grade tako što se izostavljaju po dva objekta i procedura se ponavlja sve dok svi objekti, u grupama po dva, nisu po jednom izostavljeni.
- c) Nasumične grupe (*eng.* Random Groups). Objekti se grupišu na nasumičan način u N grupa od kojih svaka sadrži jednak, ili približno jednak broj objekata, zatim se u svakom ciklusu po jedna grupa izostavlja iz analize. Što je grupa izostavljenih objekata veća to je metod CV statistički validniji.

Izbor najpogodnijeg CV metoda, uvek zavisi od osobina setova podataka koji se koriste u QSAR analizi i statistički je validnija ako se grupe formiraju tako da slični molekuli uvek budu u okviru iste grupe. Ako se koristi LOO i LTO većina informacija koje sadrže objekti ili parovi objekata koji su uklonjeni već se nalaze unutar modela. Korišćenjem nasumičnih grupa dobijene Q^2_{acc} vrednosti su numerički niže, ali je sama prediktivnost pouzdanija. Fiksiranjem određenog broja grupa postoji realna mogućnost da kompletne grupe sličnih molekula budu uklonjene iz analize u redukovanom modelu. Procedura se ponavlja mnogo puta da bi se dobili stabilni rezultati. Procena prediktivnosti

modela može se izvršiti i upotrebom seta jedinjenja koja se ne nalaze u setu i iz kojeg je model izveden.

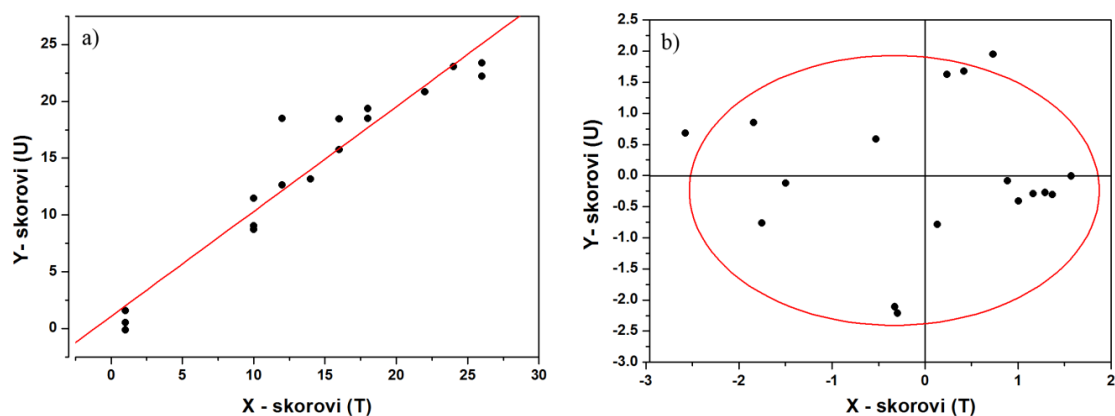
Opšti problem 3D-QSAR metode je pojava tzv. „šuma“ koji je prouzrokovan činjenicom da se veliki broj od ukupnog broja X promenljivih ne koreliše sa Y vrednostima i smanjuje osetljivost modela najinformativnijim promenljivim. Program Pentacle koristi proceduru frakcionog dizajna faktora (FFD *eng.* Fractional Factorial Design) za uklanjanje promenljivih koje stvaraju šum.

2.6.5 Interpretacija PLS modela

TU grafik (objekti u prostoru X-skorova (**T**) nasuprot Y-skorovima (**U**)) je koristan za identifikaciju objekta koji imaju uticaj na model kao i grupisani objekt (Slika 2.22 a)). Sa njega može videti korelacija između X i Y za svaku LV koju daje model.

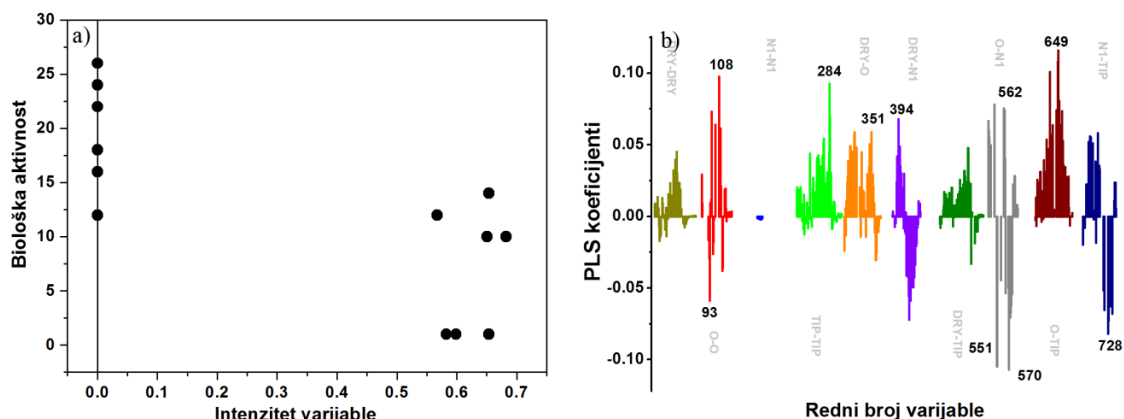
Na grafiku PLS skorova (Slika 2.22 b)) objekti su raspoređeni u prostoru dve LV gde distanca između dva objekta odražava njihovu sličnost. Objekti unutar elipse pokazuju objekte koji se mogu smatrati sličnim na 95 %-tnom intervalu pouzdanosti. Sa grafika PLS doprinosa u obliku histograma može se videti uticaj pojedinačnih promenljivih na konkretnu LV.

Grafik izabrane promenljive X u zavisnosti od Y („VarX selected - Y“, Slika 2.23 a)) prikazuje korelaciju određene promenljive sa biološkom aktivnošću jedinjenja. U modelu se uvek traže promenljive koje jasno diskriminišu aktivne od neaktivnih jedinjenja.



Slika 2. 22 a) TU (PLS) grafik, b) Grafik PLS skorova

Grafik PLS koeficijenata (Slika 23 b)) je najinformativniji u smislu interpretacije rezultata modela. Korisno je posmatrati istovremeno grafik „VarX selected - Y“ i grafik PLS koeficijenata.



Slika 2. 23 a) Grafik koji pokazuje intenzitet izabrane promenljive za svako jedinjenja u setu, za izabrani broj LV u PLS modelu, b) Grafik PLS koeficijenata

Promenljive sa pozitivnim PLS koeficijentima obično su izražene kod najaktivnijih jedinjenja, dok obrnuto važi za promenljive sa negativnim koeficijentima. Posmatranjem nekoliko promenljivih sa najvećim koeficijentima dobija se dovoljno informacija o tome koje funkcionalne grupe i u kom prostornom rasporedu imaju povoljan uticaj na biološku aktivnost jedinjenja. Ove informacije se dalje prevode u set hipoteza koji su korisni za racionalizaciju postojećih rezultata i dizajn novih, aktivnijih jedinjenja.

2.7. Biološka aktivnost

Jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže atome azota i sumpora su predmet stalnih istraživanja u medicinskoj hemiji³⁵. Veliki broj heterocikličnih jedinjenja azota predstavljaju zanimljive mete za dizajn različitih vrsta lekova⁷⁻¹¹. Značajna farmakološka aktivnosti *h*-TUK i njihovih derivata su uzrok porasta interesa za njihove transformacije u cilju povećanja aktivnosti. Raznovrsnije hemijsko ponašanje dhS u odnosu na dhO posledica je veće hemijske reaktivnosti tionske grupe u odnosu na keto grupu, i objašnjava se većom lipofilnošću sumporovih jedinjenja. Stoga kondenzovanje heterocikličnih jedinjenja i dhS predstavlja logičan sled u dizajnu molekula koji će se koristiti za različita biološka ispitivanja³⁵.

Poznato je da hidrazoni i njihovi derivati pokazuju širok spektar biološke aktivnosti i koriste se kao antioksidansi, analgetici, antikonvulzanti, antidepresivi, antiinflamatorni i antituberkularni agensi. Osim toga koriste se kao kardioprotektivi, a poznati su i po antihelmitičkom i antikancer dejstvu¹⁻⁶. Mnoge od ovih supstanci su patentirane zbog svog dobrog biološkog dejstva¹³³.

2.7.1 pK_a vrednost kao parametar biološke aktivnosti

Fizičko-hemijski parametri (čistoća i stabilnost, pK_a vrednost(i), lipofilnost, rastvorljivost i permeabilnost) su ključni za ADMET osobine potencijalno biološki aktivnog jedinjenja. Apsorpcija, distribucija, biotransformacija i eliminacija leka jednim delom se može predvideti ukoliko su poznate pK_a vrednosti molekula i pH vrednost sredine u kojoj se supstanca nalazi¹³⁴. Iako je moguće predvideti pK_a vrednost pomoću različitih softvera, eksperimentalno dobijeni rezultati se ipak mogu razlikovati do 2 pK_a jedinice. Pothranjivanjem baze podataka sa eksperimentalno dobijenim rezultatima omogućava preciznije predviđanje pK_a vrednosti strukturno sličnih molekula.

U današnje vreme razvijene su različite metode koje se mogu primeniti za određivanje pK_a vrednosti, a najčešće korišćene metode su potenciometrija i UV-Vis spektrofotometrija.

Potenciometrija je metoda izbora za određivanje pK_a vrednosti organskih molekula ukoliko je njihova rastvorljivost u vodi minimum $1 \cdot 10^{-4}$ M u pH oblasti od značaja. pK_a vrednost slabo rastvornih molekula određuje se u smešama organskih rastvarača (najčešće metanol) i vode¹³⁵. Rastvoru supstanci čija se pK_a vrednost određuje dodaje se poznata zapremina standardnog rastvora jake kiseline ili baze i nakon dodatka određene (fiksne ili promenljive) vrednosti meri se pH vrednost rastvora. Dodatak inertnog elektrolita (najčešće KCl u koncentraciji 0,15 M) održava jonsku jačinu konstantnom i simulira fiziološku koncentraciju soli.

Određivanje pK_a vrednosti primenom elektrohemijjskih metoda zasniva se na merenju elektromotorne sile (EMS) u galvanskim elementima u kojima potencijal elektrode (staklena odnosno kombinovana) zavisi od koncentracije hidronijum jona (u idealnom slučaju prema Nernstovoj jednačini). Korišćenjem softverskog paketa GLEE¹³⁶ vrši se kalibracija celokupnog sistema za određivanje kiselinskih konstanti koja se zasniva na modifikovanoj *Nernst*-ovoj jednačini u kojoj figuriše koncentracija hidronijum

jona¹³⁷. Koncentracija H_3O^+ jona se mogu dovesti u vezu sa merenom pH vrednošću korišćenjem *Avdeef-Bucher*-ove četvoroparametarske jednačine¹³⁸. U osnovi potencimetrijskog određivanja pK_a vrednosti nalazi se funkcija građenja, n_{H} ¹³⁹ koja predstavlja prosečan broj vezanih protona po molu kiseline i može se izračunava iz eksperimentalnih podataka pomoću jednačine 2.30:

$$n_{\text{H}} = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{tot}} - [\text{H}_3\text{O}^+] - [\text{NaOH}]}{c_{\text{HA}}} \quad (2.30)$$

gde je $[\text{H}_3\text{O}^+]_{\text{tot}}$ predstavlja ukupnu koncentraciju protona koji potiču od ispitivane kiseline (c_{HA}) i vode ($[\text{OH}^-]$); $[\text{NaOH}]$ predstavlja koncentraciju dodatog standardnog rastvora baze tokom titracije, dok $[\text{H}_3\text{O}^+]$ koncentraciju slobodnih hidronijum jona koja se dobija merenjem pH vrednosti.

Za obradu rezultata dobijenih potencimetrijskim kiselinsko-baznim titracijama proučavanog rastvora za izračunavanje konstanti kiselosti koriste se matematičke relacije. Ukoliko stanje ravnoteže nije potpuno poznato i ako supstanca ima više od tri stepena disocijacije ovakva obrada podataka nije moguća. U današnje vreme pK_a vrednosti iz potencimetrijskih titracija se izvode primenom različitih softverskih paketa za obradu podataka od kojih je napoznatiji HYPERQUAD 2008 (HQ)¹⁴⁰. Eksperimentalni podaci za dati sistem se fituju automatski (prema sistemskim parametrima) ili njihovim podešavanjem pri unošenju (početna koncentracija i zapremina ispitivane supstance, koncentracija titracionog sredstva i broj jonizacionih centara). Procenom dobrog fita i postavljanjem različitih modela donosi se zaključak o broju jonizacionih centara.

UV-Vis spektrofotometrijska metoda za određivanje pK_a vrednosti je osetljivija, primenljiva na manjim količinama uzorka i na slabo rastvornim jedinjenjima u vodi. Metoda zahteva visok stepena čistoće supstanci i moguća je samo kod jedinjenja koja u strukturi sadrže hromofore dovoljno blizu kiselinsko-baznog centra. Pri merenju spektralnih promena izazvanih jonizacijom supstance u rastvorima različite kiselosti, uslov za izračunavanje odnosa koncentracije čestica konjugovanog kiselinsko-baznog para je razlika između spektara molekulskog i jonizovanog oblika pri svakoj pH vrednosti.

Na osnovu vrednosti apsorbancije rastvora na apsorpcionom maksimumu (λ_{max}) ili na talasnoj dužina na kojoj je razlika apsorbancija protonovanog i deprotonovanog oblika veća nego na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma (λ_{opt}), i uz poznate pH vrednosti serije rastvora, može se odrediti vrednost pK_a . Za određivanje kiselinskih konstanti dovoljno je poznavanje apsorbancije samo jednog čistog oblika dok se apsorbancija

drugog oblika i vrednost kiselinske konstante, mogu odrediti primenom linearne regresione analize iz odsečka i nagiba odgovarajuće prave¹⁴¹. Metoda nije primenljiva na poliprotične sisteme sa bliskim pK_a vrednostima ($\Delta pK_a \leq 4$).

2.7.2 Antimikrobna aktivnost

Otpornost mikroorganizama na antibiotike koji se već dugo primenjuju za profilaksu i tretiranje infektivnih bolesti postaje sve veći problem u novije vreme. Strategija farmaceutske industrije ogleda se u izmenama molekulske strukture postojećih antibiotika u cilju poboljšanja njihove efikasnosti. Razlog tome i jeste sinteza i ispitivanje novih antimikrobnih supstanci koje će imati dovoljno širok spektar dejstva, neće izazivati rezistenciju i pokazivaće nizak potencijal za izazivanje neželjenih efekata. Zbog specifičnosti u građi bakterija postoji mnogo antibakterijskih meta, a najuspešniji agensi deluju na izgradnju bakterijskog ćelijskog zida, sintezu proteina ili replikaciju i transkripciju DNK-a¹⁴².

Za određivanje aktivnosti antimikrobnih agenasa primenjuju se različite kvalitativne i kvantitativne standardizovane metode: difuzione¹⁴³, dilucione¹⁴⁴ i kombinovane metode¹⁴⁵, kao i visokoosetljivi automatizovani sistemi (npr. VITEK 2 sistem) koji se baziraju na reakcijama mikroorganizama sa supstratima za biohemijsku detekciju njihovih karakteristika uz određivanje kinetike rasta mikroorganizama koja se vrši merenjem fluorescencije u kratkim intervalima tokom inkubacije sa specifičnim reagensima¹⁴⁶.

Parametri aktivnosti koji u ispitivanju određuju osetljivost bakterija i gljivica na postojeće antimikrobne lekove i antimikrobnu aktivnost novih antimikrobnih agenasa su:

- a) minimalna inhibitorna koncentracija (MIC, *eng.* Minimal Inhibitory Concentration);
- b) minimalna baktericidna koncentracija (MBC, *eng.* Minimal Bactericidal Concentration).

MIC predstavlja najmanju koncentraciju antimikrobnog agenasa koja inhibira vidljivi rast mikroorganizama, dok je MBC najmanja koncentracija koja sprečava rast $\geq 99,9\%$ mikroorganizama nakon subkultivacije inicijalne infektivne doze u medijumu bez ispitivanog agenasa. Antimikrobna aktivnost jedinjenja može biti procenjena i na osnovu prečnika zone inhibicije ukoliko se ispitivanje vrši difuzionim metodama. Ukoliko je

bujon nakon ispitivanja zamućen, dejstvo supstance je mikrobiostatsko, a ako je bujon bistar supstanca ima mikrobicidno dejstvo.

Antimikrobna aktivnost *h*-(T)UK nije u velikoj meri ispitivana iako zbog svojih analoga, (tio)semikarbazona i (tio)semikarbazida^{147,148} koji su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost, predstavljaju logičan sled za nastavak daljih bioloških ispitivanja.

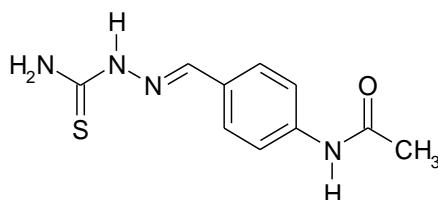
2.7.2.1 Antimikrobna aktivnost *h*-(T)UK

Ispitivanjem serije *h*-(T)UK *Bacchi* i saradnici su došli do zaključka da simetrični dihidrazoni *dhO*(S) imaju najveću antimikrobnu aktivnost na Gram- pozitivne bakterije⁵⁹. Veza između strukture i biološke aktivnosti ukazuje da su *h*-TUK mnogo aktivniji od *h*-UK. Izuzetak predstavlja jedinjenje koji u svom sastavu ima 5-nitrofuralaldehid, što je i za očekivati jer je ova grupa zastupljena u mnogim antimikrobnim agensima. Velika razlika u minimalnoj inhibitornoj aktivnosti sugeriše da je C=S komponenta esencijalna za antimikrobnu aktivnost. Predpostavlja se da jedinjenja koja sadrže sumpor inhibiraju sintezu enzima, tako što vrše deaktivaciju supstanci esencijalnih za enzimsku aktivnost. Prisustvo sumpora i azota u strukturi aktivnih jedinjenja olakšava njihov prolazak kroz lipidni sloj membrana mikroorganizama na mestu delovanja, i na kraju ih ubija povezivanjem sa esencijalnim grupama određenih ćelijskih enzima¹⁴⁹. Jedan od faktora koji utiče na antimikrobno dejstvo *mh*-TUK i *dh*-TUK u odnosu na nesupstituisane *dhS* jeste i lipofilnost koja takođe poboljšava sposobnost prolaska supstance kroz lipidnu membranu i vezivanje za receptore. Dokazano je da antimikrobna aktivnost zavisi i od vrste i broja supstituenta na azotovim atomima, pri čemu disupstituisani *dhO* pokazuju bolje antimikrobno dejstvo od monosupstituisanih *dhO*. 1,5-bis[1-(2-piridinil)propiliden] dihidrazid tiougljene kiseline i 1,5-bis[1-(2-piridinil)pentiliden] dihidrazid tiougljene kiseline pokazuju najbolju antimikrobnu aktivnost sa MIC vrednošću od 0,7 mg/ml na soj bakterija *Bacillus subtilis* i 3 mg/ml na *Staphylococcus aureus*. Promena položaja azota u heteroaromatičnom jezgru, odnosno pomeranje iz *o*- položaja ka *m*- i *p*- položajima utiče na smanjenje antibakterijske aktivnosti⁵⁹.

S druge strane, publikovani su rezultati koji ukazuju da kondenzacija određenih jedinjenja sa *dhO*-om ima pozitivno dejstvo na biološku aktivnost. Tako je npr. primećeno da 1,5-bis[2,3,4-trihidroksifenil)metilen] *dhO* ima mnogo veću aktivnost na

gram pozitivnu bakteriju *S. epidermidis* od polaznog aldehida¹⁵⁰. Prisustvo elektron-donorskih grupe u *o*-, *m*- ili *p*- položaju heteroaromatičnog jezgra pokazuje značajan uticaj na biološku aktivnost kao i prisustvo kiseonika, sumpora i azota u aromatičnom prstenu. Kod 1,5-bis(2-furanilmetilen) dihidrazida ugljene kiseline kiseonik se ponaša kao elektron-donorska grupa i vrši delokalizaciju elektrona kroz furanov prsten i tako smanjuje elektronsku gustinu na hidrazonskom delu molekula. Predpostavlja se da je to jedan od razloga za njegovu odličnu antibakterijsku aktivnost¹⁵¹.

Antituberkulozni efekat hidrazona zapažen je odavno u lečenju jedne od najčešćih infektivnih bolesti, tuberkuloze¹⁵². Skoro trećina svetske populacije je zaražena sa *Mycobacterium tuberculosis*-om a nove infekcije se javljaju jedna u sekundi. *h*-UK pokazali su aktivnost na *Mycobacterium bovis*-u čije dejstvo može da se poredi sa triacetazonom, komercijalnim lekom za tuberkulozu (Slika 2.24)^{153,47}.

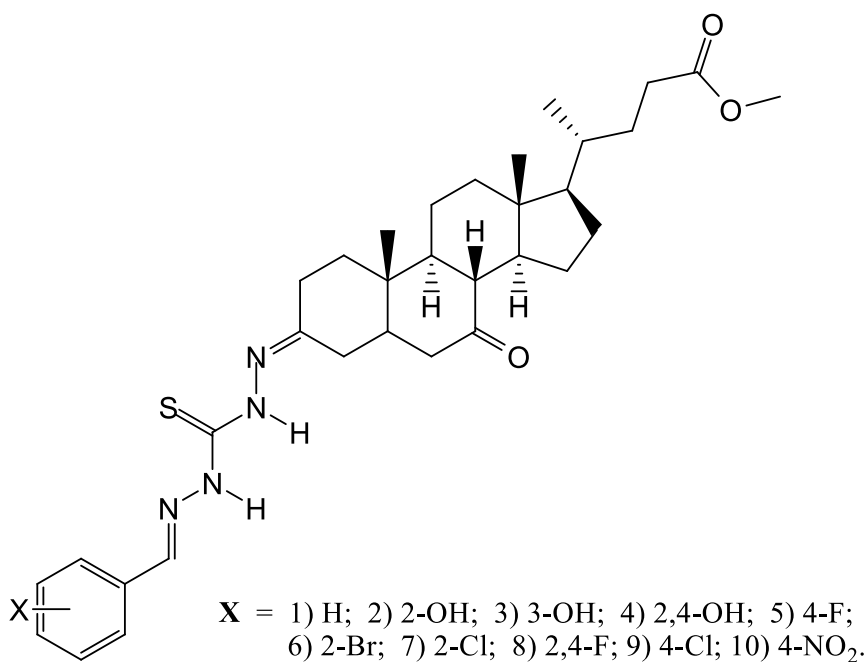


Slika 2. 24 Triacetazon

Strukturne studije aktivnosti triacetazona (SAR) su pokazale da je tiosemikarbazoni deo triacetazona esencijalan za antitubekularnu aktivnost, odnosno *b*-*h*-TUK predstavljaju dimerizovani oblik strukture triacetazona kod kojih se dva aromatična prstena nalaze na krajevima. Zamenom supstituenata vezanih za aromatični prsten vrši se promena lipofilnosti, elektronskih i prostornih karakteristika. Ispitivanjem aktivnosti dvadesetšest *dh*-TUK mikrodilucionom metodom na bakteriji *Mycobacterium bovis* i gljivici *Candida albicans*, 1,5-bis[1-(2-piridinil)propiliden] dihidrazid tiougljene kiseline se pokazao kao najaktivnija supstanca sa vrednošću MIC < 1,9 µg/mL (triacetazon i etambutol su pokazale MIC < 3,9 i 0,75 µg/mL) na *Mycobacterium bovis* i MIC < 3,25 µg/mL na *Candida albicans*. 1,5-Bis(2-thienilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline i 1,5-bis[(4-hlorfenil)metilen] dihidrazid tiougljene kiseline su takođe pokazali dobru aktivnost na *Mycobacterium bovis* sa vrednostima MIC od 15,6 µg/mL⁴⁷. Na osnovu teorijski proračunatih vrednosti za *ClogP*, dipolni moment i *logP* izvršena je analiza njihove antimikrobne aktivnosti. Barry i saradnici¹⁵⁴ su identifikovali da je kod

supstanci koje pokazuju antimikrobnu aktivnost optimalna vrednost $\log P$ između 1,3-4,1. Nakon upoređivanja sa eksperimentalnim podacima pokazano je da supstance koje pokazuju najbolju antimikobakterijsku aktivnost imaju vrednosti u okviru navedenog opsega $\log P$, odnosno da supstance koje imaju vrednost $\log P$ približno 4, pokazuju najbolju aktivnost. Manji dipolni moment je takođe uticao na povećanje biološke aktivnosti⁴⁷.

Osim *mh*- i *dh*- (T)UK literaturno je poznata i aktivnost jedanaest *adh*-TUK derivata henodezoksiholne kiseline (Slika 2.25). Nakon ispitivanja zaključeno je da supstance koje na fenolnom jezgru imaju određene supstituente (X): H, 4-OCH₃, 4-F, 2-Br pokazuju antimikrobnu aktivnost istu kao i amoksicilin na soju bakteriji *B. subtilis*, a na soj bakterije *S.aureus* bolju od amoksicilina. Većina testiranih jedinjenja nisu pokazale nikakvu aktivnost na Gram-negativne bakterije *E.coli* i *P.aeruginoza*. Ispostavilo se da je jedino aktivno jedinjenje sa fluorom kao supstituentom u *p*- položaju heteroaromatičnog jezgra. Na osnovu rezultata je zaključeno da elektron-donorske grupe imaju najveći uticaj na aktivnost pomenutih jedinjenja na Gram-pozitivne bakterije. Monosupstituisani halogeni derivati pokazuju dobru aktivnost na Gram-pozitivne kao i na Gram-negativne bakterije, a uvođenjem drugog halogenog supstituenta na heteroaromatičnom jezgru utiče na smanjenje antimikrobne aktivnosti³⁷.



Slika 2. 25 *adh*-TUK derivata henodezoksiholne kiseline

2.7.3 Antioksidativna aktivnost

Slobodni radikali predstavljaju izuzetno reaktivne hemijske vrste (molekuli, atomi ili joni) koji mogu nastati u ljudskom organizmu čak i pri normalnim fiziološkim procesima. Svaki organizam poseduje sposobnost da svojim prirodnim mehanizmima, koji se nalaze u ćelijama ili se unose putem hrane do određene mere neutrališe produkciju slobodnih radikala. Ukoliko organizam ne uspe da se odbrani od štetnog delovanja reaktivnih vrsta, dolazi do pojave tzv. oksidativnog stresa¹⁵⁵. Zbog toga je optimalna antioksidativna zaštita protiv potencijalno štetnih hemijskih vrsta esencijalna za život i zbog toga savremena medicina dosta pažnje posvećuje pronalaženju novih antioksidanasa, “hvatača” slobodnih radikala. Hemijska nestabilnost slobodnih radikala potiče usled težnje za sparivanjem nesparenih elektrona na poslednjem energetskom nivou atoma. U većini slučajeva ovaj proces je praćen narušavanjem stabilnosti drugih molekula a ponekad i pokretanjem lančanih reakcija koje se ne mogu kontrolisati¹⁵⁵. Najveća štetnost se ogleda u tome slobodni radikali pri napadu na ćelijske membrane oštećuju njihov genetski materijal što uzrokuje pojavu različitih bolesti¹⁵⁶. U zavisnosti od elementa koji ulazi u njihov sastav izvršena je osnovna podela radikala na:

- a) reaktivne kiseonične vrste, (ROS, *eng.* Reactive Oxygen Species);
- b) reaktivne azotne vrste (RNS, *eng.* Reactive Nitrogen Species);
- c) reaktivne sumporne vrste (RSS, *eng.* Reactive Sulfur Species).

ROS čine kiseonični radikali (superoksidni anjon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksid radikal (HO^{\cdot}), hidroperoksidni radikal (HOO^{\cdot}), peroksil (RO_2^{\cdot}), alkoksil (RO^{\cdot}), azot(II)-oksid (NO^{\cdot}), azot(IV)-oksid (NO_2^{\cdot})) ali i neradikalska jedinjenja (vodonik-peroksid (H_2O_2), hipohlorna kiselina ($HOCl$) kao i molekul ozona (O_3) i.t.d.) koja se mogu lako konvertovati u radikale pomoću oksidujućih agenasa. S obzirom da RNS obuhvata različite vrste jedinjenja sa različitim osobinama jedini kriterijum za pripadanje ovoj grupi radikala predstavlja to da su dobijeni od azot(II)-oksida. Najpoznatiji RNS radikal (peroksi-nitrit, $ONOO^-$) nastaje reakcijom $^{\cdot}NO$ radikala sa superoksidom $O_2^{\cdot-}$ i dovodi do oksidacije, nastanka nitrozo jedinjenja ili nitrovanja¹⁵⁷. RSS se vrlo lako formiraju u reakciji ROS sa tiolima¹⁵⁸.

Najzastupljenija vrsta ROS-a je superoksidni radikal koji nastaje u procesu disanja u mitohondrijima pri prenošenju elektrona sa supstrata na kiseonik. Drugi veoma važni, hidroksil radikal čiji je nastanak u biološkim sistemima prouzrokovan jonskim

zračenjem koje uzrokuje raspadanje molekula vode ili fotolitičkim razlaganjem alkilhidroperoksida¹⁵⁶.

Dejstvo slobodnih radikala odvija se preko dva mehanizma. Ili dolazi do interakcije dva slobodna radikala koji poseduju po jedan slobodni elektron¹⁵⁷ ili reakcijom slobodnog radikala sa nekom drugom neradikalnom vrstom¹⁵⁹ pri čemu se uvek formira novi slobodan radikal koji pokazuje toksičan efekat vršeći oksidativnu modifikaciju lipida, proteina i DNK.

Antioksidansi u biološkim sistemima služe za neutralizaciju slobodnih radikala tako što stabilizuju ravnotežu nesparenih elektrona i neutrališu potencijalno štetno delovanje slobodnih radikala pri čemu ostaju stabilni. Njihova osnovna antiradikalna aktivnost se ogleda u otpuštanju elektrona i njihovom prelasku na radikalsku vrstu¹⁶⁰. Deluju preko različitih mehanizmima:

- a) kao inhibitori oksidativnih reakcija u kojima učestvuju slobodni radikali;
- b) prekidanjem lančanih reakcija auto-oksidacije supstrata;
- c) preko sinergije sa drugim antioksidantima;
- d) kao helator metalnih jona i/ili prevodeći redoks aktivne pro-oksidante (derivati gvožđa i bakra) u stabilne produkte;
- e) kao inhibitori pro-oksidativnih enzima (npr. lipooksigenaze)¹⁵⁸.

Proizvod koji nastaje mora da bude stabilan i manje štetan od radikala. Ukoliko je u organizmu nizak nivo antioksidanata ili nizak nivo antioksidativnih enzima, stvara se oksidativni stres koji može oštetiti ćelije i dovodi se u vezu sa starenjem, kao i mnogim patološkim stanjima, poput arteroskleroze, dijabetesa i kancera¹⁶¹.

Na osnovu načina delovanja antioksidansi se primarno dele na enzimске i neenzimске. Najznačajniji enzimski antioksidansi su superoksid-dismutaza, glutathion-peroksidaza i katalaza. Ova grupa enzima, između ostalih, katalizuje reakcije prevođenja superoksidnog radikala preko vodonik-peroksida do vode. U neenzimске antioksidanse ubrajaju se vitamin C, vitamin E, glutathion, karotenoidi, polifenoli i drugi¹⁶². U okviru ove grupe antioksidanasa izvršena je podela po poreklu na prirodne i sintetske. Iako se stalno nameće pitanje sigurnosti sintetskih antioksidanasa po zdravlje čoveka u odnosu na prirodne, da bi se povećala njihova delotvornosti u manjim koncentracijama vrši se modifikacija strukture prirodnih antioksidanasa pri čemu se dobijaju aktivnija jedinjenja.

Najčešće se dodaju hrani da bi produžili njen vek trajanja, a njihov glavni fokus je sprečavanje oksidacije masnih kiselina u hrani¹⁵⁸.

Metode za određivanje antioksidativne aktivnosti koje se najčešće koriste zasnivaju se pretežno na kolorimetrijskim merenjima, dok se mehanizma delovanja zasniva na kapacitetima neutralisanja različitih vrsta slobodnih radikala. Vreme odigravanja reakcije i trajanja razlikuje se od metode do metode, pri čemu se po potrebi uvode modifikacije u zavisnosti od tipa i kompleksnosti uzorka za analizu antioksidativnog potencijala.¹⁵⁸

U ovoj disertaciji za merenje antioksidativne aktivnosti ispitivanih jedinjenja, korišćena je metoda sposobnosti hvatanja slobodnih radikala koja je praćena u sistemu sa DPPH radikalima. Proširena delokalizacija je uzrok pojave intenzivno ljubičastog obojenja rastvora usled prisustva DPPH radikala sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Reakcijom prenosa reaktivnosti i prihvatanjem protona od ispitivanog antioksidansa, DPPH radikal se redukuje do hidrazinskog derivata koji je žute boje. Ovaj derivat usled značajnog smanjenja rezonancione interakcije ne apsorbuje na talasnoj dužini od 517 nm i samim tim doprinosi smanjenju apsorpcije. Izmereno smanjenje apsorpcije na pomenutoj talasnoj dužini je proporcionalno antioksidativnoj aktivnosti ispitivane supstance. Kvantitativna mera antioksidativne aktivnosti kao rezultata koji proističe iz DPPH metode jeste "inhibitorna koncentracija" ili IC₅₀ vrednost. Definiše se kao koncentracija supstrata koja izaziva 50 % smanjenja DPPH aktivnosti, odnosno gubitak boje, tj. koncentracija jedinjenja koja dovodi do 50 % inhibicije^{163,164}.

2.7.3.1 Antioksidativna aktivnost h-(T)UK

Mnogi faktori utiču na antioksidativnu aktivnost različitih vrsta sintetskih jedinjenja. U prethodnom poglavlju pomenuto je da na antimikrobnu aktivnost utiču elektron-donorske grupe što je zabeleženo i kod antioksidativne aktivnosti. Nakon ispitivanja antioksidativne aktivnosti serije supstituisanih aromatičnih dhO pokazano se da sve supstance koje imaju elektron-donorske grupe (*p*-fluoro, *p*-metil, *p*-hidroksi, *o*-hidroksi i *p*-hloro) na heteroaromatičnom jezgru pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost¹⁶⁵. Poznato je da prisustvo amino grupe i hlora takođe povećava antioksidativnu aktivnost ali ne u tolikoj meri kao npr. hidroksilna i metoksi grupa¹⁶⁶.

Antioksidativna aktivnost aromatičnih *dh*-TUK povezana je sa delokalizacijom elektrona i sposobnošću odavanja vodonikovog atoma od DPPH radikala. Dokazano je da prisustvo jezgra furana kao elektron donorske grupe u strukturi *dh*-TUK značajno povećava antioksidativnu aktivnost. Nasuprot toga, prisustvo elektron-akceptorskih grupa na heteroaromatičnom jezgru (-Cl, -NO₂) utiče na smanjuje antioksidativne aktivnost¹⁵¹.

Prisustvo piridinskog prstena takođe utiče na antioksidativnu aktivnost, kao i položaj azota u piridinskom prstenu.⁵⁶ Zamenom 2-piridinilmetilenskog prstena kondenzovanog sa *dhS* sa 4-piridinilmetilenskim prstenom znatno se smanjuje antioksidativna aktivnost¹⁶⁷. Ispitivanjem antioksidativne aktivnosti kompleksa bakra, kobalta i nikla sa *h*-TUK ligandima, rezultati ukazuju da jedino kompleks kobalta pokazuje boju aktivnost od liganda koja je veoma blizu antioksidativne aktivnosti Vitamina C⁶⁰.

2.7.4 Antikancer aktivnost

Kancer predstavlja oboljenje somatske ćelije koja se razvija usled akumulacije genskih mutacija sa posledicom funkcionalne nestabilnosti obolele ćelije u odnosu na zdrave ćelije tkiva u čiji sastav ulazi. Postoji više od 100 različitih tipova malignih tumora, koji mogu da se jave u okviru određenih organa¹⁶⁸. Da bi se razvijali novi primenljivi antikancer lekovi neophodno je razumevanje složenih mehanizama procesa karcinogenoze i ćelijske smrti¹⁶⁸.

2.7.4.1 Određivanje tipova ćelijske smrti

Na osnovu preporuke Komiteta za nomenklaturu tipova ćelijske smrti (NCCD, *eng.* Nomenclature Committee on Cell Death), ćelijska smrt se u načelu može podeliti u dva osnovna uzajamno isključiva tipa: akcidentalna (ACD, *eng.* Accidental Cell Death,) i kontrolisana ćelijska smrt (RCD, *eng.* Regulated Cell Death). ACD nastaje usled teškog oštećenja integriteta ćelije prouzrokovanog fizičkim, hemijskim ili mehaničkim stimulansima, dok se RCD odvija pod kontrolom genetički kodiranih molekularnih mehanizama¹⁶⁹. Dok su početak i evolucija ACD potpuno nepredvidivi, RCD može do nekog stepena biti modulirana, i to ne samo inhibicijom prenošenja signala koji vode okončanju procesa, već i povećanjem kapaciteta ćelije za adaptivni odgovor na stres. Obzirom da je RCD neophodan događaj u cilju očuvanja zdravlja organizma, ona se u

kontekstu održavanja tkivne homeostaze i imunog odgovora definiše i kao programirana ćelijska smrt (PCD, *eng.* Programmed Cell Death).

Svaki od tipova ćelijske smrti (anoikis, autofagija, apoptoza, komifikacija, entozis, mitotična katastrofa, nekroptozis, netozis, partanozis i piroptozis) se karakteriše određenim morfološkim karakteristikama, te su svojevremeno specifične izmene u strukturi ćelijskih organela korišćene kao osnovni metod za utvrđivanje forme smrti¹⁶⁹. Ispostavilo se međutim, da se iza naizgled sličnih morfoloških promena kriju funkcionalne, biohemijske i imunološke heterogenosti visokog stepena. Iz tih razloga biohemijske metode za utvrđivanje tipova ćelijske smrti imaju brojne prednosti nad morfološkim, jer osim što pružaju mogućnost kvantitativne analize, nose i znatno manji rizik od nastanka greške usled subjektivne procene.

Na osnovu literaturnih podataka, antitumorski potencijal novosintetisanih terapeutika najčešće se procenjuje testirajući njihovu sposobnost da inhibiraju proliferaciju malignih ćelija u tretiranim uzorcima. Ovakva vrsta analiza vrši se kolorimetrijskim metodama koje su jeftine i jednostavne za izvođenje. Veliki nedostatak ovih metoda odnosi se na činjenicu da je dobijeni rezultat relativna procena broja viabilnih ćelija u tretiranim uzorcima u odnosu na netretiranu kontrolu čije se ćelije neometano dele geometrijskom progresijom. Stoga, parametri kao što su dužina trajanja mitostskog ciklusa koja je različita za svaku od ćelijskih kultura, kao i dužina inkubacije, mogu da imaju značajan uticaj na dobijeni rezultat. Istovremeno, ovakvi eseji ne daju informaciju šta je moglo da bude uzrok smanjenja veličine populacije živih ćelija: ćelijska smrt (apoptoza, nekroza, autofagija i dr.) ili zaustavljanje/usporevanje deobe ćelija (mitotski blok, „senescence“). Iz ovih razloga, biohemijske metode kojima se dobija jasan uvid u posledice tretiranja ćelija jesu bolji izbor za utvrđivanje aktivnosti testiranog jedinjenja.

Za ispitivanje uticaja ispitivanih jedinjenja na maligne ćelije koriste se biohemijske metode kao što je dvokolono bojenje Aneksin-om V (Annexin V) i propidijum jodidom (PI). Aneksin V je po strukturi fosfolipid koji se sa visokim afinitetom vezuje za fosfatidil-serin. Fosfatidil-serin se u vitalnim ćelijama nalazi na unutrašnjoj strani membrane, ali se sa ulaskom ćelije u apoptozu on relocira na njenu spoljašnju stranu i datu ćeliju čini „vidljivom“ za makrofage. Ovakav sled događaja omogućava da se ćelija koja je donela „samoubilačku“ odluku i ušla u proces apoptotzne

smrti u tkivu živog organizma eliminiše od strane imunog sistema bez izazivanja posledica po okolne ćelije. Sa druge strane, PI markira ćelije sa oštećenim funkcionalnim integritetom ćelijske membrane, odnosno ćelije koje su u procesu nekrotične smrti. Za razliku od apoptoze koja spada u RCD, nekroza je ACD i za posledicu ima oslobađanje sopstvenog intracelularnog sadržaja u neposrednu okolinu sa posledičnim aktiviranjem zapaljenskog imunog odgovora i dodatno oštećenje tkiva.

Pri ovakvim ispitivanjima osim ćelija koje su obojene samo Aneksinom V ili PI (*single-stained cells*), u analiziranim uzorcima mogu se naći i ćelije obojene sa obadva markera. Ove ćelije nalaze se u uznapredovalim fazama smrti, bilo apoptoze ili nekrotize, i nije ih moguće razlikovati u kojem su od ova dva procesa¹⁷⁰.

2.7.4.2 Određivanja faza ćelijskog ciklusa

Ćelijski ciklus u ćelijama sisara je visoko organizovan i kontrolisan proces kojim se omogućava dupliranje genetičkog materijala i potomja deoba majke ćelije na dve ćerke ćelije. Kontrola ovog procesa uključuje regulaciju signala rasta ćelije kao i očuvanje genetičkog integriteta radi sprečavanja nastanka oštećenja genetskog materijala u ćerkama ćelijama¹⁷¹. Ćelija tokom deobe prolazi kroz četiri faze ćelijskog ciklusa: G0/G1, S, G2 i M. Svaka od ovih faza je kontrolisana od strane kompleksa ciklinskih proteina i ciklin-zavisnih kinaza. Kulture malignih ćelija spadaju u takozvane imortalizovane modele, odnosno populacije sa gotovo neograničenom sposobnošću za deobu. Analizom netretiranog uzorka očitava se određeni procenat zastupljenosti ćelija u svakoj od navedenih faza mitotskog ciklusa, obzirom da se u svakom trenutku deo ćelija analizirane populacije nalazi u procesu deobe. Pri tome, najviše ćelija se po pravilu nalazi u fazi mirovanja ili neposredno pred ulazak u deobu (G0/G1 faza), manji procenat njih će se zateći u G2 i M fazama (G2/M faza), a najmanje njih će u zadatom trenutku biti u procesu duplikacije genetičkog materijala (S faza). Nakon izlaganja ćelija ispitivanom hemijskom jedinjenju odnos procentualne zastupljenosti ćelija po fazama ćelijske deobe u odnosu na netretiranu kontrolu se menja, u zavisnosti od njegovog mehanizma delovanja. Na osnovu toga može se dobiti informacija da li ispitivano jedinjenje usporava/prekida ćelijsku deobu na nivou nekog od „kontrolnih punktova“ (*mitotic checkpoint*) ćelijske deobe, sprečava ulazak ćelija u deobu, ometa dupliranje genetičkog materijala, ili pak sprečava razdvajanje dupliranih hromozoma i podelu citoplazme i

organela na dve ćerke ćelije. Ovako dobijeni podaci, iako nikada dovoljno precizni, daju prvi uvid u mehanizam delovanja ispitivanog jedinjenja, i jesu dobra polazna osnova za procenu u kojem pravcu bi trebalo organizovati dalja istraživanja. Metodološki, za određivanje zastupljenosti ćelija po fazama deobe koristi se jednokolono bojenje sa PI. Obzirom da je PI vitalna boja, tj. da ga žive ćelije sa funkcionalno neoštećenom ćelijskom membranom „izbacuju“, pre bojenja je neophodno fiksirati ih. Na taj način se omogućava da PI oboji celu ćelijsku populaciju, pri čemu se one procesom fiksacije zadržavaju u onoj fazi ciklusa u kojoj su zatečene u trenutku nanošenja fiksativa.

2.7.4.3 Utvrđivanje uloge kaspaza u apoptozi izazvanoj ispitivanim jedinjenjima

Kaspaze su familija endoproteaza čija je uloga da u ćeliji održavaju funkcionalnu usklađenost (homeostazu) regulacijom procesa RCD i inflamacije¹⁷². Kaspaze 2, 3, 6, 7, 8, i 9 su uključene u kontrolu procesa apoptozne smrti, i obzirom na ulogu koju imaju dele se na one koje učestvuju u njenoj inicijaciji (kaspaze 2, 8 i 9), i na one koje prenose signal od kaspaza inicijatora do ćelijskih struktura koje imaju presudnu ulogu u procesu ćelijske smrti (kaspaze 3, 6 i 7). U ćeliji se sintetišu kao neaktivni monomerni molekuli kojima je za aktivaciju neophodno povezivanje (dimerizacija) sa još jednim identičnim molekulom (homodimerizacija) i potonjim odstranjivanjem dela njihovog proteinskog lanca čime se oslobađa aktivno mesto za interakciju sa substratom. Zavisno od načina inicijacije apoptoznog procesa, razlikuju se dve osnovne putanje prenošenja apoptoznih signala: spoljašnja (EAP, *eng.* Extrinsic Apoptotic Pathway) i unutrašnja (IAP, *eng.* Intrinsic Apoptotic Pathway). EAP inicira se vezivanjem liganda za odgovarajuće receptore na spoljašnjoj strani ćelijske membrane, što ima za posledicu dimerizaciju i aktivaciju kaspaze 8. IAP, koja se još i naziva mitohondrijalna, pokreće se usled oslobađanja citohroma c iz mitohondrija posredstvom različitih ćelijskih signala stresa, pri čemu aktivacija kaspaze 9 ima inicijalnu ulogu u procesu apoptozne smrti. Ova dva puta nisu međusobno izolovana i često dolazi do njihove uzajamne aktivacije. Osim kaspaza-zavisne postoji i kaspaza-nezavisna apoptoza koja za okidače procesa može imati različite unutarćelijske molekule pri čemu izostaje aktivacija bilo kog od poznatih kaspaznih puteva¹⁷³. Kaspaza-nezavisna apoptoza je još uvek nedovoljno proučena i njena kontrola je u fokusu aktuelnih naučnih interesa.

Uloga kaspaza u apoptozi može biti ispitivana različitim metodama. Ovde su prikazane metode korišćene tokom izrade ove disertacije. Prvo je određivano da li je apoptoza nastala usled tretmana ćelija ispitivanim jedinjenjima bila zavisna od aktivacije kaspaza ili ne. U ovu svrhu ćelije su istovremeno inkubirane sa ispitivanim jedinjenjem i inhibitorom kaspaza širokog spektra, te je nakon završetka perioda inkubacije u ovim uzorcima metodom Aneksin V/PI dvokolornog bojenja definisani procenti ćelija u apoptozi i nekrozi. Kao pozitivna kontrola korišćeni su uzorci ćelija koji su istovremeno tretirani samo ispitivanim jedinjenjem dodatog u identičnoj koncentraciji kao u eksperimentalnom uzorku, sa identičnom dužinom inkubacije na tretiranim ćelijama, takođe analizirane Aneksin V/PI metodom. Razlika u procentima nekrotičnih i apoptotičnih ćelija između ova dva uzorka ukazuje do koje mere je aktivacija kaspaza bitna za neometano sprovođenje procesa apoptoze uslovljene ispitivanim jedinjenjem. Drugi primenjeni metod obezbedio je neposredan uvid u procenat ćelija koje su se odlikovale aktiviranim formama kaspaza 8 i 9, kao i procentom ćelija u kojima su bile pristune aktivne forme obe ove kaspaze. Na ovaj način bilo je moguće utvrditi koji je od dva kaspazna puta (unutrašnji ili spoljašnji) dominantno aktiviran ispitivanim jedinjenjem, kao i da li je postojala njihova uzajamna aktivacija.

2.7.4.4 Kvantitativno određivanje superoksidnih radikala u mitohondrijama

Mitohondrije su jedan od ključnih izvora inreacelularnih kiseoničnih radikala (ROS)¹⁷⁴. U fiziološkim uslovima, u mitohondrijama se tokom procesa oksidativne fosforilacije generišu superoksidni radikali ($O\bullet$) na nivou respiratornih kompleksa I i II, koji potom manjim delom završavaju u mitohondrijalnom matriksu a većim delom u mitohondrijalnom međumembranskom prostoru. Iz mitohondrijalnog međumembranskog prostora $O\bullet$ dalje mogu biti oslobođeni u citoplazmu ćelije¹⁸³. Zaštita ćelije od nastalih ROS zasniva se na aktivnosti antioksidativnih enzima koji su u različitim formama zastupljeni u različitim delovima ćelije. Najvažniju ulogu u konverziji $O\bullet$ imaju bakar/cink-zavisna superoksid dismutaza (Cu/Zn-SOD, SOD1) i mangan-zavisna superoksid dismutaza (Mn-SOD, SOD2)¹⁷⁷. SOD1 nalazi se u citoplazmi i mitohondrijalnom međumembranskom prostoru, dok je SOD2 zastupljena isključivo u mitohondrijalnom matriksu. Obe izoforme katališu konverziju $O\bullet$ u vodonik peroksid koji se, aktivnošću drugih enzima, dalje konvertuje do za ćeliju bezopasnih molekula.

Određivanje nastanka mitohondrijanih O• usled tretmana ćelija sa ispitivanim jedinjenjima može se vršiti MitoSOX fluorescentnom bojom, čija je osobina da specifično detektuje samo O• nastale u mitohondrijama. Analizom rezultata utvrđuje se procenat MitoSOX pozitivnih ćelija u tretiranim uzorcima.

2.7.4.5 Utvrđivanje sposobnosti ispitivanih jedinjenja da stimulišu diferencijaciju matičnih ćelija kancera

Matične ćelije kancera (CSCs, *eng.* Cancer Stem Cells), su mala subpopulacija unutar tumorskog tkiva koje se odlikuju osobinama znatno drugačijim od ostatka tumorske mase. U ove osobine ubrajaju se izrazito visok tumorogeni potencijal, povećan migratorni kapacitet, mogućnost opstanka i deobe i u odsustvu međućelijskih kontakata, visoka sposobnost za razvoj rezistencije na primenjene terapijske tretmana itd¹⁷⁸. Stoga je ova subpopulacija ćelija najodgovornija za ponovnu pojavu objektivnih manifestacija maligne bolesti (klinički relaps) i godinama nakon naizgled uspešno okončane terapije, a njihova eliminacija uslov za konačnu eradikaciju maligne bolesti.

Markiranje CSCs moguće je zahvaljujući tome što iste na svojoj površini poseduju receptore koji se ne mogu naći na preostalim ćelijama karcinoma¹⁷⁹. Matične ćelije adenokarcinoma pankreasa odlikuju se ekspresijom CD44 površinskog receptora. Po svojoj strukturi, CD44 je transmembranski glikoprotein sa ulogom receptora za različite komponente ekstracelularnog matriksa kao što su hialuronska kiselina, kolagen, osteoponin, integrin, fibronektin, laminin, matriks metaloproteinaze itd¹⁸⁰. Jedna od njegovih značajnih uloga podrazumeva posredovanje u interakcijama između ćelija i između ćelija sa međućelijskim matriksom, kao i stimulacija migracije karcinomskih ćelija sa formiranjem metastatskih ognjišta. Osim nabrojanog, aktivacija CD44 vezivanjem liganada podstiče preživljavanje kancer stem ćelija i razvoj rezistencije na hemio i radioterapiju¹⁹². U procesu diferencijacije matičnih ćelija kancera dolazi do smanjenja broja CD44 receptora¹⁸⁸, što je iskorišćeno kao osnovni parametar za procenu sposobnosti ispitivanih jedinjenja da pokrenu „reprogramiranje“ fenotipa AsPC-1 ćelija. Za razliku od eksperimenta gde je ispitivana sposobnost jedinjenja da izazovu ćelijsku smrt, njihova aktivnost u pravcu diferencijacije testirana je tokom dužeg perioda inkubacije (3 dana), dodatih na ćelije u dvema niskim koncentracijama za koje je predhodno potvrđeno da ne izazivaju ćelijsku smrt tokom prvih 24 sata. Analizirani su

procenti CD44 pozitivnih ćelija u tretiranim uzorcima u odnosu na netretiranu kontrolu, kao i srednji intenzitet CD44-FITC fluorescencije (MFI, *eng.* Median Fluorescence Intensity) pozitivne subpopulacije koja je proporcionalna srednjoj gustini CD44 receptora po ćeliji.

2.7.4.6 Ispitivanje aktivnosti jedinjenja na 3D modelu

Iako se dvodimenzionalne (2D, monolejer) ćelijske kulture i dalje koriste kao standardni model za proučavanje unutarćelijskih mehanizama uslovljenih tretmanom ćelija sa ispitivanim jedinjenjem, njihov veoma bitan nedostatak uslovljen je neprirodnom organizacijom ćelija koja po svemu odudara od organizacije unutar tumorskog tkiva. Postoji veliki broj dokaza da su ćelije organizovane u trodimenzione (3D) modele po morfološkim i fiziološkim parametrima znatno sličnije ćelijama matičnog tumora u poređenju sa istim ćelijama održanim u 2D kulturi¹⁸⁴. Stoga, 3D kulture predstavljaju odličnu *in vitro* zamenu za ispitivanje na životinjama u pogledu brzine ćelijske proliferacije, ćelijske diferencijacije, ekspresije gena i proteina i odgovora ćelija na ispitivani tretman. Tokom ispitivanja u okviru ove disertacije, 3D kulture su tretirane osam dana u kontinuitetu. Sposobnost ispitivanih jedinjenja da uspore ili zaustave rast 3D tumora testirana je u tri koncentracije. Promene u veličini tretiranih i netretiranih tumora praćene su na Celigo citometru (*eng.* Celigo imaging cytometer). Rezultati su predstavljeni kroz indeks rasta 3D kultura izračunat za određene dane tretmana u odnosu na njihovu veličinu izmerenu neposredno pre dodavanja ispitivanog jedinjenja.

2.7.4.7 Osnovni principi analize ćelija metodom protočnog citometra

Najveći broj analiza koje uključuju testiranje aktivnosti ispitivanih jedinjenja na biološkom modelu malignih ćelija rađen je na protočnom citometru¹⁸⁷. Princip rada protočnog citometra zasniva se na propuštanju snopa laserskog zraka kroz pojedinačnu ćeliju koja je prethodno obeležena fluorescentnim markerom. Fluorescentni marker omogućava detektovanje određenog događaja, bilo tako što je vezan za antitelo koje specifično reaguje sa proteinom od interesa, ili se pak fluorescenca markera „aktivira“ nakon što njegov „nosač“ pretrpi strukturne promene u interakciji sa molekulom čija se aktivnost detektuje. Kada ćelija dođe u kontakt sa ulaznim snopom laserskog zraka „udari“ o ćeliju dolazi do ekscitacije fluorescentnog markera koji će posledično emitovati

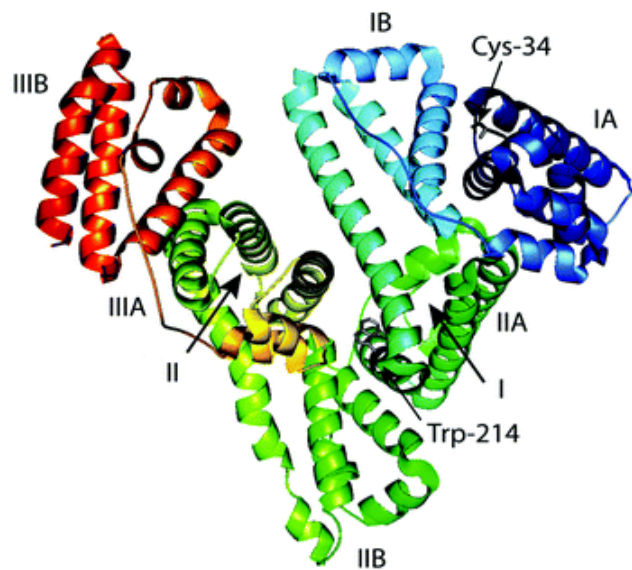
foton određene talasne dužine. Softverskom analizom emitovanih fotona dobija se puna informacija o parametru od interesa na nivou jedne ćelije, odnosno na nivou populacije ćelija.

2.7.4.8 Antikancer aktivnost *h*-(T)UK

Antikancer aktivnost *h*-(T)UK je isitivana samo u nekoliko radova, ali bez studije o potencijalnim mehanizmima aktivnosti.^{56,167,188-194} Nakon ispitivanja kompleksa Cd(II) i Zn(II) liganada 1,5-bis[1-(2-piridinil)etiliden] dihidrazida tiougljene kiseline i bis[1-(3-piridinil)etiliden] dihidrazida tiougljene kiseline na liniji tumora jajnika A2780cisR, koja je rezistentna na *cis*-DDP (*eng.* *cis*-diamminedichloroplatinum(II)), rezultati su pokazali da su oba kompleksa kadmijuma u stanju da prevaziđu otpor na koji nailazi *cis*-DDP pri delovanju na ovu ćelijsku liniju. Ovi kompleksi su predloženi kao polazna tačka za ispitivanja metal tiohidrazonskih kompleksa u terapiji kancer ćelijskih linija koje su rezistentne na *cis*-DDP¹⁹⁴.

2.7.5 Humani serum albumin

Humani serum albumin predstavlja jednolančani protein sastavljen od 585 aminokiselina, koji se se sintetiše u jetri i u svom sastavu ne sadrži lipide ni ugljenohidrate¹⁹⁵. Najveći deo HSA se razgrađuje u mišićima i bubrezima. Aktivne supstance i lekovi u krvi se vezuju za proteine plazme, a u stanju bolesti dolazi do promene vezivanja lekova za HSA. U cilju određivanja terapije neophodno je dobro poznavanje interakcija koje se javljaju između aktivnih komponenti i ovog proteina. Primenom RSA dokazano je da se HSA može podeliti u tri homologna domena (I, II i III) a svaki od njih ima i subdomene A i B, koji se sastoje od po šest i četiri α heliksa. Aminokiselinska sekvenca sadrži sedamnaest disulfidnih mostova, jedan slobodan tiol (Cys 34) i jedan triptofan (Trp 214). Glavna vezivna mesta za mnoge aromatične i heterociklične ligande su uglavnom locirana u okviru dva hidrofobna džepa u subdomenima IIA i IIIA¹⁹⁶ (Slika 2.26). Novije studije ukazuju da HSA ima i treće relevantno vezivno mjesto, a to je subdomen IB¹⁹⁷.



Slika 2. 26 Humani serum albumin¹⁹⁸

Zbog izraženog kapacitet za vezivanje različitih liganada, predstavlja važan regulator farmakokinetičkih osobina lekova. Masne kiseline su i primarni fiziološki ligandi albumina, pri čemu je identifikovano devet vezivnih mjesta za masne kiseline sa različitim afinitetima¹⁹⁹. Sposobnost akumulacije HSA u čvrstim tumorima podstiče povećanje broja ispitivanja vezivanja za ovaj protein u cilju razvoja novih lekova na bazi albumina koji bi obezbedili oslobađanje lekova na mapiranom tumoru²⁰⁰. Mehanizam vezivanja aktivnih komponente za HSA se ispituje UV-Vis spektrofotometrijski, dok se više detalja o vezivanju obezbeđuje korišćenjem spektrofluorimetrije. Ispitivanje vezivanja različitih liganada za HSA upotrebom fluorescente spektroskopije omogućeno je prisustvom Trp-214 ostatka u strukturi, koje daje ovom proteinu intezivnu fluorescenciju¹⁹⁸. Kada HSA interaguje sa određenim jedinjenjem²⁰¹, dolazi do konformacionih promena, asocijacije, ili vezivanja jedinjenja za protein što dovodi do promena intenziteta fluorescencije²⁰².

3. EKSPERIMENTALNI DEO

U cilju proučavanja strukture i svojstava *N*-heteroaromatičnih *mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK sintetisan je veći broj do sada nepoznatih jedinjenja koja su upotpunjena sintezom poznatih jedinjenja. Ispitivana jedinjenja se međusobno razlikuju prema:

- položaju iminske grupe u odnosu na piridinski i hinolinski atom azota;
- tipu supstituenata vezanih na iminskoj grupi;
- prisustvu atoma kiseonika, odnosno sumpora.

Na osnovu razlike u broju aromatičnih prstenova u svojoj strukturi i u zavisnosti od toga da li se oni nalaze sa jedne ili obe strane dhO odnosno dhS izvršena je podela sintetisanih jedinjenja u dve grupe:

- monohidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline, *mh*-(T)UK
- dihidrazoni dihidrazida (tio)ugljene kiseline, *dh*-(T)UK

3.1. Sinteza *mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK

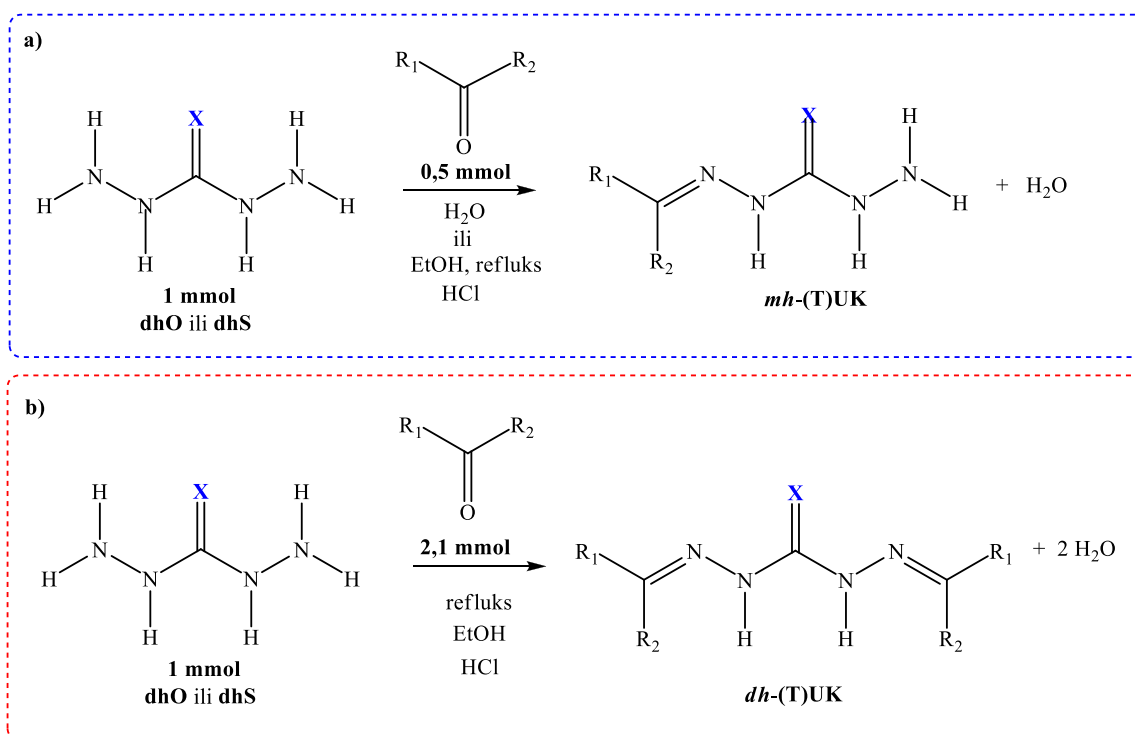
3.1.1. Opšta procedura dobijanja

mh-(T)UK se dobijaju reakcijom kondenzacije dhO ili dhS i odgovarajućeg aldehida ili ketona (Slika 3.1 a).

mh-UK koji u svom sastavu sadrže 2-hidroksifenil i piridinil supstituent na imino atomu ugljenika (*mhUK*_(sal), *mhUK*_(2pyc), *mhUK*_(3pyc), *mhUK*_(4pyc), *mhUK*_(2pya), *mhUK*_(3pya) i *mhUK*_(2pya)) sa izuzetkom *mhUK*_(2bp) dobijeni su reakcijom kondenzacije dhO (1 mmol) i odgovarajućeg karbonilnog jedinjenja (0,5 mmol) u vodi (10 ml) kao rastvaraču na sobnoj temperaturi uz dodatak jedne kapi hlorovodonične kiseline kao katalizatora. Nakon mešanja reakcione smeše u toku 2 h dobijeni talog je odvojen od rastvora filtriranjem, ispran etanolom i dietiletom. U cilju dobijanja čistog proizvoda izvršena je i višestruka rekristalizacija iz odgovarajućeg rastvarača do postizanja konstantne tačke topljenja.

*mhUK*_(8qc), *mhUK*_(2qc), *mhUK*_(8OH2qc), *mhUK*_(2bp) i svi *mh*-TUK su dobijeni sintezom pri istom količinskom odnosu, ali pri drugačijim reakcionim uslovima. U balon opremljen povratnim hladnjakom sipa se 40 ml etanola i u njemu rastvori dhO(S) (1 mmol) na povišenoj temperaturi, a zatim doda odgovarajući aldehyd ili keton (0,5 mmol). Smeša se zagreva 3 h uz refluks u vodenom kupatilu. Nakon zagrevanja, smeša se ohladi

do sobne temperature, a nastali talog filtrira i ispere sa nekoliko kapi etanola i dietil-etra. Prekristalizacija se vrši iz odgovarajućih rastvarača.



R_1	R_2	$X = O$	$X = S$	$X = O$	$X = S$
		<i>mh</i> -UK	<i>mh</i> -TUK	<i>dh</i> -UK	<i>dh</i> -TUK
2-Hidroksifenil	H	<i>mh</i> UK _(sal)	<i>mh</i> TUK _(sal)	<i>dh</i> UK _(sal)	<i>dh</i> TUK _(sal)
2-Piridinil	H	<i>mh</i> UK _(2pyc)	<i>mh</i> TUK _(2pyc)	<i>dh</i> UK _(2pyc)	<i>dh</i> TUK _(2pyc)
3-Piridinil	H	<i>mh</i> UK _(3pyc)	<i>mh</i> TUK _(3pyc)	<i>dh</i> UK _(3pyc)	<i>dh</i> TUK _(3pyc)
4-Piridinil	H	<i>mh</i> UK _(4pyc)	<i>mh</i> TUK _(4pyc)	<i>dh</i> UK _(4pyc)	<i>dh</i> TUK _(4pyc)
2-Piridinil	Me	<i>mh</i> UK _(2pya)	<i>mh</i> TUK _(2pya)	<i>dh</i> UK _(2pya)	<i>dh</i> TUK _(2pya)
3-Piridinil	Me	<i>mh</i> UK _(3pya)	<i>mh</i> TUK _(3pya)	<i>dh</i> UK _(3pya)	<i>dh</i> TUK _(3pya)
4-Piridinil	Me	<i>mh</i> UK _(4pya)	<i>mh</i> TUK _(4pya)	<i>dh</i> UK _(4pya)	<i>dh</i> TUK _(4pya)
2-Piridinil	Ph	<i>mh</i> UK _(2pyb)	<i>mh</i> TUK _(2pyb)	<i>dh</i> UK _(2pyb)	<i>dh</i> TUK _(2pyb)
8-Hinolil	H	<i>mh</i> UK _(8qc)	<i>mh</i> TUK _(8qc)	<i>dh</i> UK _(8qc)	<i>dh</i> TUK _(8qc)
2-Hinolil	H	<i>mh</i> UK _(2qc)	<i>mh</i> TUK _(2qc)	<i>dh</i> UK _(2qc)	<i>dh</i> TUK _(2qc)
8-hidrksi-2-Hinolil	H	<i>mh</i> UK _(8OH2qc)	<i>mh</i> TUK _(8OH2qc)	<i>dh</i> UK _(8OH2qc)	<i>dh</i> TUK _(8OH2qc)

dh-dihidrazon; *mh*-monohidrzon; *UK*-ugljena kiselina; *TUK*-tiougljena kiselina; *ba*-benzaldehyd; *af*-acetofenon; *py*-piridin; *a*-acetil; *c*-karboksaldehid; *b*-benzoil; *q*- hinolin; *Me*-metil; *Ph*-fenil.

Slika 3. 1 Opšta procedura dobijanja *mh*- i *dh*- (T)UK

dh-(T)UK se dobijaju kondenzacijom 1 mmol *dh*O ili *dh*S i odgovarajućeg aldehida ili ketona (2,1 mmol) u prisustvu hlorovodonične kiseline kao katalizatora (Slika 3.1 b). Nakon refluktovanja etanolne (40 ml) smeše polaznih supstanci u trajanju od 3 h,

nakon hlađenja dobijeni istaloženi proizvod se filtrira i prekrystalise do stalne tačke topljenja iz odgovarajućeg rastvarača.

3.2. Karakterizacija sintetisanih jedinjenja

Sva jedinjenja korišćena u sintezi jedinjenja (*mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK) bila su čistoće *p.a.* (Acros Organics, Sigma-Aldrich, Fluka). Struktura sintetisanih jedinjenja potvrđena je određivanjem temperature topljenja FT-IR, ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopijom i rendgenskom strukturnom analizom u slučaju supstanci kod koji je bilo moguće dobiti kvalitetne kristale za RSA. Sastav svih jedinjenja je određen elementalnom analizom. Temperature topljenja su određene na Stuart SMP30 aparatu. C, H, N analize rađene su klasičnim mikroanalitičkim metodama na Elemental Vario EL III mikroanalizeru. Infracrveni spektri jedinjenja snimani su na instrument Bomem MB 100 spektrofotometru u oblasti $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ u formi KBr tableta. Apsorpcioni spektri jedinjenja su snimljeni na spektrofotometru Shimadzu 1700 u rastvaračima spektroskopske čistoće (Fluka) pri fiksnoj koncentraciji od 10^{-5} M. ^1H NMR, ^{13}C NMR spektri kao i 2D spektri jedinjenja (COSY, NOESY, ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C HMBC i za neke supstance ^1H - ^{15}N HSQC, ^1H - ^{15}N HMBC) snimani su u DMSO-*d*₆ na aparatima Varian Gemini 200 ili Bruker AVANCE na 500/125 MHz. Vrednosti hemijskih pomeranja, δ , su izražene u *ppm* jedinicama u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutrašnji standard za ^1H i ^{13}C ili u odnosu na ureu (77,0 ppm) za snimanje ^{15}N NMR spektara. Konstante kuplovanja (*J*) određene u slučaju novosintetisanih supstanci izražene su u Hz. Pri pripisivanju multipliciteta signala korišćene su sledeće skraćenice: *s* - singlet; *d* - dublet; *t* - triplet; *dd* - dublet dubleta; *ddd* - dublet dubleta dubleta; *td* - triplet dubleta, *m* - multiplet, *ss* - široki singlet, *spm* - široki preklopljeni multiplet.

Od četrdesetčetiri sintetisanih jedinjenja, dvadesetpet jedinjenja je poznato u literaturi dok je sintetisano devetnaest novih jedinjenja. U slučaju supstanci čije su sinteze prethodno objavljene čistoća je potvrđena elementalnom analizom i određivanjem temperature topljenja. Za supstance čija je karakterizacija bila nepotpuna, a bila je neohodna za tumačenje rezultata karakterizacija je urađena u potpunosti, kao i za sva nova jedinjenja.

[(2-hidroksiifenil)metilen] dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK_(sal)**)⁵². Bela supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 66 %. t.t. 180-181 °C (lit. t.t. -). Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₉N₄O₂ (Mw = 245,24 g mol⁻¹): C, 49,74; H, 4,70; N, 29,00 %; Nađeno: C, 49,68; H, 4,66; N, 28,93 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3353 (OH), 3282 (NH₂), 3096 (NH), 1680 (C=O), 1640 (C=N). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 4,16 (s, 2H, H₂-N₄), 6,79-6,89 (m, 2H, H-C₅, H-C₃), 7,18 (td, 1H, H-C₄, ³J_{4,5} = 7,7 Hz, ⁴J_{4,6} = 1,4 Hz), 7,64 (s, 1H, H-C₆), 7,92 (s, 1H, H-N₃), 8,22 (s, 1H, H-C₇), 10,08-10,73 (spm, 2H, OH, H-N₂). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 116,09 (C₃), 119,22 (C₅), 120,06 (C₂), 127,86 (C₆), 130,23 (C₄), 140,22 (C₇), 156,24 (C₁), 157,92 (C₈),
Literaturni podaci: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 4,12 (2H, H₂-N₄), 6,81 (1H, H-C₅), 6,84 (1H, H-C₃), 7,18 (1H, H-C₄), 7,66 (1H, H-C₆), 7,90 (1H, H-N₃), 8,20 (1H, H-C₇), 10,40 (2H, OH, H-N₂). ¹³C NMR (90 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 116,48 (C₃), 119,62 (C₅), 120,49 (C₂), 128,12 (C₆), 130,61 (C₄), 140,05 (C₇), 156,60 (C₁), 157,30 (C₈).

(2-piridinilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK_(2pyc)**). Bela supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 67 %. t.t. 173-174 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₇H₉N₅O (Mw = 179,18 g mol⁻¹): C, 46,92; H, 5,06; N, 39,09 %; Nađeno: C, 46,88; H, 5,01; N, 39,11 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3313 (NH₂), 3208 (NH), 1678 (C=O), 1635 (C=N). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 4,11 (s, 2H, H₂-N₅), 7,31 (ddd, 1H, H-C₅, ³J_{5,4} = 7,5 Hz, ³J_{5,6} = 4,9 Hz, ⁴J_{5,3} = 1,1 Hz), 7,78 (td, 1H, H-C₄, ³J_{4,5} = 7,5 Hz, ⁴J_{4,6} = 1,5 Hz), 7,89 (s, 1H, H-C₇), 8,10-8,28 (spm, 2H, H-C₃, H-N₄), 8,51 (ddd, 1H, H-C₆, ³J_{6,5} = 4,9 Hz, ⁴J_{6,4} = 1,5 Hz, ⁵J_{6,3} = 0,9 Hz), 10,64 (s, 1H, H-N₃). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 119,85 (C₃), 123,54 (C₅), 136,53 (C₄), 140,59 (C₇), 149,09 (C₆), 153,77 (C₂), 156,85 (C₈), ¹⁵N NMR (2D HMBC, δ (ppm)): 51,10 (N₅), 99,70 (N₄), 153,60 (N₃), 312,20 (N₁), 326,00 (N₂).

(3-piridinilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK_(3pyc)**). Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 60 %. t.t. 166-167 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₇H₉N₅O (Mw = 179,18 g mol⁻¹): C, 46,92; H, 5,06; N, 39,09 %; Nađeno: C, 46,76; H, 5,11; N, 38,96 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3308s (NH₂), 3211s (NH), 1675vs (C=O), 1638m (C=N). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ (ppm)): 4,09 (s, 2H, H-N₅), 7,39 (dd, 1H, H-

C5, $^3J_{5,4} = 7,95$ Hz, $^3J_{5,6} = 4,75$ Hz), 7,87 (*s*, 1H, H-C7), 8,063-8,319 (*br,m,ovlp.*, 2H, H-C4,H-N4, $^3J_{4,5} = 7,95$ Hz), 8,51 (*dd*, 1H, H-C6, $^3J_{6,5} = 4,75$), 8,86 (*d*, 1H, H-C2), 10,56 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 123,67 (C5), 130,67 (C3), 133,25 (C4), 137,00 (C7), 148,28 (C2), 149,64 (C6), 156,95 (C8).

(4-piridinilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(4pyc))³⁹. Beli kristali dobijeni nakon prekrizalizacije iz etanola i okarakterisani RSA-om. Prinos: 57 %. t.t. 189-190 °C (lit.t.t. 207-209 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₇H₉N₅O (*M*_w = 179,18 g mol⁻¹): C, 46,92; H, 5,06; N, 39,09 %; Nađeno: C, 46,88; H, 5,04; N, 39,02 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3314s (NH₂), 3206s (NH), 1683vs (C=O), 1636m (C=N).

Literaturni podaci: ^1H NMR (nema podataka MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,19 (*s*, 2H, H-N5), 7,79 (*d*, 2H, H-C3 = H-C5), 7,86 (*s*, 1H, H-C7), 8,31 (*s*, 1H, H-N4), 8,60 (*d*, 2H, H-C2 = H-C6), 10,76 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (no data MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 120,68 (C3 = C5), 137,31 (C7), 141,94 (C4), 149,87 (C2 = C6), 156,67 (C8).

[1-(2-piridinil)etiliden] dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(2pya))⁴². Bela supstanca prekrizalisana iz apsolutnog metanola. Prinos: 72,0 %. t.t. 202-203 °C (lit. t.t. 202-203 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₁N₅O (*M*_w = 193,21 g mol⁻¹): C, 47,73; H, 5,74; N, 36,25 %; Nađeno: C, 47,61; H, 5,82; N, 36,18 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3308m (NH₂), 3197m (NH), 3037w (CH_{aryl}), 1674vs (C=O), 1631m (C=N). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 11,60 (C8), 120,58 (C3), 123,57 (C5), 136,27 (C4), 145,14 (C7), 148,10 (C6), 155,01 (C2), 157,40 (C9).

Literaturni podaci: ^1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,26 (*s*, 3H, H-C8), 4,14 (*s*, 2H, H-N5), 7,34 (*dd*, 1H, H-C5), 7,76 (*td*, 1H, H-C4), 8,18 (*s*, 1H, H-N4), 8,38 (*d*, 1H, H-C6), 8,52 (*d*, 1H, H-C3), 9,76 (*s*, 1H, H-N3).

[1-(3-piridinil)etiliden] dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(3pya)). Bela supstanca prekrizalisana iz metanola. Prinos: 90,1 %, t.t. 190-191 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₁N₅O (*M*_w = 193,21 g mol⁻¹): C, 47,73; H, 5,74; N, 36,25 %; Nađeno: C, 47,66; H, 5,82; N, 36,25 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3314m (NH₂), 3264m (NH), 3032w (CH_{aryl}), 1672vs (C=O), 1649m (C=N). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,20 (*s*, 3H, H-C8), 4,10 (*s*, 2H, H-N5), 7,37 (*ddd*, 1H, H-C5, $^3J_{5,4} = 8,1$ Hz, $^3J_{5,6} = 4,7$ Hz), 8,12

(*s*, 1H, H-N4), 8,27 (*d*, 1H, H-C4, $^3J_{4,5} = 8,1$ Hz), 8,51 (*dd*, 1H, H-C6, $^3J_{6,5} = 4, 7$ Hz), 9,03 (*d*, 1H, H-C2), 9,62 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 12,86 (C8), 123,19 (C5), 133,36 (C3), 133,65 (C4), 142,57 (C7), 147,37 (C2), 149,15 (C6), 157,46 (C9).

[1-(4-piridinil)etiliden] dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(4pya))⁴⁰. Beli kristali dobijeni nakon prekrizalizacije iz apsolutnog etanola i okarakterisani RSA-om. Prinos: 84,0 %. t.t. 208-209 °C (lit. t.t. -). Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₁N₅O (*M*_w = 193,21 g mol⁻¹): C, 47,73; H, 5,74; N, 36,25 %; Nađeno: C, 47,52; H, 5,74; N, 36,29 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3314m (NH₂), 3206m (NH), 3037w (CH_{aryl}), 1681vs (C=O), 1631m (C=N). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 12,42 (C8), 120,61 (C3 = C5), 142,22 (C7), 145,11 (C4), 150,16 (C2 = C6), 157,33 (C9).

Literaturni podaci: ^1H NMR (nema podataka MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,17 (*s*, 3H, H-C8), 4,13 (*s*, 2H, H-N5), 7,85 (*d*, 2H, H-C3, H-C5), 8,20 (*s*, 1H, H-N4), 8,54 (*d*, 2H, H-C2 = H-C6), 9,76 (*s*, 1H, H-N3).

[fenil-(2-piridinil)metilen] dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(2pyb)). Bela supstanca prekrizalisana iz metanola. Prinos: 84 %. t.t. 203-205 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₃N₅O (*M*_w = 255,11 g mol⁻¹): C, 61,17; H, 5,13; N, 27,43 %; Nađeno: C, 61,02; H, 4,98; N, 27,15 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3304 (NH₂), 3215 (NH), 1674 (C=O), 1623 (C=N). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,15 (*s*, 2H, H₂-N5), 7,36 (*d*, 1H, H-C3, $^3J_{3,4} = 7,8$ Hz), 7,40-7,60 (*m*, 5H, Ph), 7,68 (*dd*, 1H, H-C4, $^3J_{4,3} = 7,8$ Hz, $^3J_{4,5} = 7,5$ Hz), 8,01 (*dd*, 1H, H-C5, $^3J_{5,4} = 7,5$ Hz, $^3J_{5,6} = 4,5$ Hz), 8,26 (*s*, 1H, H-N4), 8,85 (*d*, 1H, H-C6, $^3J_{6,5} = 4,5$ Hz), 13,20 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 121,79 (C3), 123,87 (C5), 124,84 (Ph), 125,95 (Ph), 128,27 (Ph), 128,93 (Ph), 129,14 (Ph), 138,18 (C4), 143,23 (C7), 148,90 (C6), 151,40 (C2), 157,21 (C8). ^{15}N NMR (2D HMBC, δ (ppm)): 57,62 (N5), 100,07 (N4), 155,1 (N3), 306,33 (N1), 315,85 (N2).

(8-hinolilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(8qc)). Žuta supstanca prekrizalisana iz metanola. Prinos: 64 %. t.t. 185 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₁H₁₁N₅O (*M*_w = 229,24 g mol⁻¹): C, 57,63; H, 4,84; N, 30,55 %; Nađeno: C, 57,71; H, 4,78; N, 30,62 %, IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3316 (NH₂), 3200 (NH), 1681 (C=O), 1621 (C=N). ^1H

NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 4,12 (*s*, 2H, H-N5), 7,57 (*dd*, 1H, H-C3, $^3J_{3,4} = 8,3$ Hz, $^3J_{3,2} = 4,1$ Hz), 7,63 (*t*, 1H, H-C6, $^3J_{6,5} = 7,7$ Hz), 7,98 (*dd*, 1H, H-C5, $^3J_{5,6} = 7,7$ Hz, $^4J_{5,7} = 1$ Hz), 8,16 (*s*, 1H, H-N4), 8,39 (*dd*, 1H, H-C4, $^3J_{4,3} = 8,3$ Hz, $^4J_{4,2} = 2,0$ Hz), 8,58 (*d*, 1H, H-C7, $^3J_{7,6} = 7,4$ Hz), 8,94 (*dd*, 1H, H-C2, $^3J_{2,3} = 4,1$ Hz, $^3J_{2,4} = 2,0$ Hz), 9,14 (*s*, 1H, H-C9), 10,65 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 121,67 (C3), 125,61 (C7), 126,45 (C6), 127,94 (C4a), 128,90 (C5), 131,59 (C8), 136,55 (C4), 136,89 (C9), 145,01 (C8a), 150,08 (C2), 157,21 (C10).

(2-hinolilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(2qe)). Bela supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 56 %. t.t. 183 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₁H₁₁N₅O ($M_w = 229,24$ g mol⁻¹): C, 57,63; H, 4,84; N, 30,55 %; Nađeno: C, 57,58; H, 4,62; N, 30,69 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3297 (NH₂), 3188 (NH), 1679 (C=O), 1638 (C=N). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 4,15 (*s*, 2H, H-N5), 7,58 (*ddd*, 1H, H-C6, $^3J_{6,7} = 8,2$ Hz, $^3J_{6,5} = 7,0$ Hz, $^4J_{6,8} = 1,1$ Hz), 7,74 (*ddd*, 1H, H-C7, $^3J_{7,6} = 8,2$ Hz, $^3J_{7,8} = 6,9$ Hz, $^4J_{7,5} = 1,4$ Hz), 7,93-7,99 (*spm*, 2H, H-C5, H-C8), 8,03 (*s*, 1H, H-C9), 8,27 (*d*, 1H, H-C4, $^3J_{4,3} = 8,4$ Hz), 8,34-8,46 (*spm*, 2H, H-C3, H-N4, $^3J_{3,4} = 8,4$ Hz), 10,84 (*s*, 1H, H-N3), ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 118,03 (C3), 126,84 (C6), 127,66 (C4a), 127,92 (C5), 128,69 (C8), 129,82 (C7), 136,19 (C4), 140,64 (C9), 147,26 (C8a), 154,34 (C2), 156,76 (C10).

[(8-hidroksi-2-hinolil)metilen] dihidrazid ugljene kiseline (**mhUK**_(8OH2qe)). Žuta supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 72 %. t.t. 214-215 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₁H₁₁N₅O₂ ($M_w = 245,24$ g mol⁻¹): C, 53,83; H, 4,525; N, 28,56 %; Nađeno: C, 53,66; H, 4,68; N, 28,74 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3371 (OH), 3335 (NH₂), 3198 (NH), 1696 (C=O), 1600 (C=N). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 4,14 (*s*, 2H, H-N5), 7,08 (*dd*, 1H, H-C7, $^3J_{7,6} = 7,4$ Hz, $^4J_{7,5} = 1,4$ Hz), 7,36 (*dd*, 1H, H-C5, $^3J_{5,6} = 8,1$ Hz, $^4J_{5,7} = 1,4$ Hz), 7,41 (*m*, 1H, H-C6), 8,09 (*s*, 1H, H-C9), 8,24 (*d*, 1H, H-C4, $^3J_{4,3} = 8,6$ Hz), 8,30-8,50 (*spm*, 2H, H-C3, H-N4), 9,71 (*s*, 1H, OH), 10,88 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 111,59 (C7), 117,74 (C5), 118,35 (C3), 127,73 (C6), 128,52 (C4a), 136,06 (C4), 137,93 (C8a), 140,50 (C9), 152,25 (C2), 153,24 (C8), 156,83 (C10).

[(2-hidroksiifenil)metilen] dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK_(sal)**). Žuta supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 76 %. t.t. 186-187 °C (lit. t.t. 218 -219 °C)³⁷. Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₀N₄OS (*M_w* = 210,06 g mol⁻¹): C, 45,70; H, 4,79; N, 26,65; S, 15,25 %; Nađeno: C, 45,66; H, 4,77; N, 26,45; S, 15,18 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3452s (OH), 3196s (NH₂), 3069m (NH), 2999w (CH_{aril}), 1483s (amidna II), 1282vs (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,85 (*s*, 2H, H₂-N₅), 6,84 (*dd*, 2H, H-C₅, H-C₃); 7,20 (*s*, 1H, H-C₄), 7,95 (*d*, 1H, H-C₆), 8,33 (*s*, 1H, H-C₇), 9,365-9,98 (*spm*, 2H, H-N₃, H-C₁(OH)), 11,35 (*s*, 1H, H-N₂). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 116,06 (C₂), 119,28 (C₄), 120,36 (C₆), 127,20 (C₅), 130,96 (C₃), 139,81 (C₇), 156,29 (C₁), 175,91 (C₈).

(2-piridinilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK_(2pyc)**). Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 54 %. t.t. 160-161 °C (lit.t.t. 162 -164 °C)²⁰³. Elementalna analiza: Izračunato za C₇H₉N₅S (*M_w* = 195,27 g mol⁻¹): C, 43,06; H, 4,65; N, 35,87; S, 16,42 %; Nađeno: C, 43,02; H, 4,58; N, 35,75; S, 16,28%. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3255s (NH₂), 3142m (NH), 2958w (CH_{aril}), 1501vs (amidna II), 1266s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,91 (*s*, 2H, H₂-N₅), 7,34 (*dd*, 1H, H-C₅, ³*J*_{5,6} = 4,7 Hz); 7,80 (*t*, 1H, H-C₄, ³*J*_{4,3} = 7,8 Hz), 8,04 (*s*, 1H, H-C₇), 8,35 (*d*, 1H, H-C₃, ³*J*_{3,4} = 7,8 Hz), 8,54 (*d*, 1H, H-C₆, ³*J*_{6,5} = 4,7 Hz), 10,02 (*s*, 1H, H-N₄), 11,63 (*s*, 1H, H-N₃). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 120,35 (C₃), 123,95 (C₅), 136,45 (C₄), 142,32 (C₇), 149,20 (C₆), 153,43 (C₂), 175,84 (C₈).

(3-piridinilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK_(3pyc)**). Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 74 %. t.t. 200-201 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₇H₉N₅S (*M_w* = 195,27 g mol⁻¹): C, 43,06; H, 4,65; N, 35,87; S, 16,42 %; Nađeno: C, 42,98; H, 4,61; N, 35,72; S, 16,33%. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3263s (NH₂), 3164m (NH), 2961w (CH_{aril}), 1503vs (amidna II), 1272s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,90 (*s*, 2H, H-N₅), 7,41 (*dd*, 1H, H-C₅, ³*J*_{5,4} = 7,9 Hz, ³*J*_{5,6} = 4,75 Hz), 8,02 (*s*, 1H, H-C₇), 8,30 (*d*, 1H, H-C₄, ³*J*_{4,5} = 7,9 Hz), 8,54 (*dd*, 1H, H-C₆, ³*J*_{6,5} = 4,75), 8,93 (*d*, 1H, H-C₂), 9,97 (*s*, 1H, H-N₄), 11,57 (*s*, 1H, H-N₃). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 123,69 (C₅), 130,28 (C₃), 133,86 (C₄), 139,05 (C₇), 148,83 (C₂), 150,15 (C₆), 175,85 (C₈).

(4-piridinilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK**_(4pyc)). Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 74 %. t.t. 199 °C (lit. t.t. 211-215 °C)³⁹. Elementalna analiza: Izračunato za C₇H₉N₅S (*M_w* = 195,27 g mol⁻¹): C, 43,06; H, 4,65; N, 35,87; S, 16,42 %; Nađeno: C, 42,98; H, 4,51; N, 35,64; S, 16,32%. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3255s (NH₂), 3147m (NH), 2953w (CH_{aril}), 1501vs (amidna II), 1266s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,93 (*s*, 2H, H-N5), 7,80 (*d*, 2H, H-C3 = H-C5, ³*J*_{3,2} = ³*J*_{5,6} = 5,9 Hz), 7,96 (*s*, 1H, H-C7), 8,57 (*d*, 2H, H-C2 = H-C6, ³*J*_{2,3} = ³*J*_{6,5} = 5,9 Hz), 10,07 (*s*, 1H, H-N4), 11,69 (*s*, 1H, H-N3). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 121,17 (C3 = C5), 139,22 (C7), 141,68 (C4), 149,96 (C2 = C6), 175,81 (C8).

[1-(2-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK**_(2pya)). Źuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88 %. t.t. 179-181 °C (lit.t.t. 153 -154 °C⁴² 185 -186 °C²⁰³). Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₁N₅S (*M_w* = 209,27 g mol⁻¹): C, 45,91; H, 5,30; N, 33,47; S, 15,32 %; Nađeno: C, 45,82; H, 5,21; N, 33,32; S, 15,41 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3265s (NH₂), 3166m (NH), 3000w (CH_{aril}), 1500vs (amidna II), 1235s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,36 (*s*, 3H, H-C8), 4,98 (*s*, 2H, H-N5), 7,36 (*dd*, 1H, H-C5), 7,78 (*td*, 1H, H-C4, ³*J*_{4,3} = 8,1 Hz), 8,51 (*d*, 1H, H-C3, ³*J*_{3,4} = 8,1 Hz), 8,56 (*d*, 1H, H-C6), 9,95 (*s*, 1H, H-N4), 10,30 (*s*, 1H, H-N3). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 11,99 (C8), 121,08 (C3), 123,83 (C5), 136,26 (C4), 148,27 (C7), 148,35 (C6), 154,73 (C2), 176,21(C9).

[1-(3-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK**_(3pya)). Źuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88 %. t. t. 174-175 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₁N₅S (*M_w* = 209,27 g mol⁻¹): C, 45,91; H, 5,30; N, 33,47; S, 15,32 %; Nađeno: C, 45,88; H, 5,20; N, 33,35; S, 15,44 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3273s (NH₂), 3169m (NH), 3018w (CH_{aril}), 1507vs (amidna II), 1224s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,30 (*s*, 3H, H-C8), 4,96 (*s*, 2H, H-N5), 7,39 (*dd*, 1H, H-C5, ³*J*_{5,4} = 8,0 Hz, ³*J*_{5,6} = 4,8 Hz), 8,36 (*dd*, 1H, H-C4, ³*J*_{4,5} = 8,0 Hz), 8,55 (*dd*, 1H, H-C6, ³*J*_{6,5} = 4,8 Hz), 9,13 (*d*, 1H, H-C2), 9,90 (*s*, 1H, H-N4), 10,31 (*s*, 1H, H-N3). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 13,61 (C8), 123,15 (C5), 133,20 (C3), 133,90 (C4), 145,60 (C7), 147,89 (C2), 149,65 (C6), 176,20 (C9).

[1-(4-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK**_(4pya)). Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88 %. t.t, 201-202 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₈H₁₁N₅S (*M_w* = 209,27 g mol⁻¹): C, 45,91; H, 5,30; N, 33,47; S, 15,32 %; Nađeno: C, 45,95; H, 5,22; N, 33,28; S, 15,36 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3297s (NH₂), 3167m (NH), 3024w (CH_{aril}), 1501vs (amidna II), 1220s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,27 (s, 3H, H-C8), 4,98 (s, 2H, H-N5), 7,93 (dd, 2H, H-C3, H-C5, ³*J*_{3,2} = ³*J*_{5,6} = 4,7 Hz), 8,57 (dd, 2H, H-C2 = H-C6, ³*J*_{2,3} = ³*J*_{6,5} = 4,7 Hz), 9,97 (s, 1H, H-N4), 10,40 (s, 1H, H-N3). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 13,24 (C8), 120,72 (C3 = C5), 144,70 (C7), 145,09 (C4), 149,72 (C2=C6), 176,19 (C9).

[fenil-(2-piridinil)metilen] dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK**_(2pyb)). Bela supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 84 %. t.t. 203-205 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₃N₅S (*M_w* = 271,34 g mol⁻¹): C, 57,54; H, 4,83; N, 25,51; S, 11,82 %; Nađeno: C, 57,48; H, 4,77; N, 25,66; S, 11,92 %. IR (KBr, cm⁻¹): 3411s (NH), 3144m (NH), 3002m (CH_{aril}), 1500vs (amidna II), 1218s (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 5,03 (s, 2H, H₂-N5), 7,29 (d, 1H, H-C3, ³*J*_{3,4} = 8,0 Hz), 7,44-7,58 (m, 5H, Ph), 7,67 (dd, 1H, H-C4, ³*J*_{4,3} = 8,0 Hz, ³*J*_{4,5} = 6,2 Hz), 8,01 (dd, 1H, H-C5, ³*J*_{5,4} = 6,2 Hz, ³*J*_{5,6} = 4,3 Hz), 8,86 (d, 1H, H-C6, ³*J*_{6,5} = 4,3 Hz), 10,09 (s, 1H, H-N4), 12,55 (s, 1H, H-N3). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 121,83 (C3), 122,20 (C5), 124,80 (Ph), 125,91 (Ph), 128,25 (Ph), 128,65 (Ph), 128,93 (Ph), 136,81 (C4), 148,50 (C7), 151,30 (C6), 154,51 (C2), 175,19 (C8).

(8-hinolilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK**_(8qe)). Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (voda/etanol 1:4, v/v). Prinos: 75 %. t.t. 163-164 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₁H₁₁N₅S (*M_w* = 245,30 g mol⁻¹): C, 53,86; H, 4,52; N, 28,55; S, 13,07 %; Nađeno: C, 53,75; H, 4,64; N, 28,40; S, 13,22 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3438s (NH), 3249w (NH₂), 2921m (CH_{aril}), 1500vs (amidna II), 1237m (C=S). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 4,91 (s, 2H, H-N5), 7,59 (dd, 1H, H-C3, ³*J*_{3,2} = 4,15 Hz, ³*J*_{3,4} = 8,35 Hz), 7,65 (t, 1H, H-C6, ³*J*_{6,5} = 7,9 Hz, ³*J*_{6,7} = 7,25 Hz), 8,03 (dd, 1H, H-C5, ³*J*_{5,6} = 7,9 Hz), 8,41 (dd, 1H, H-C4, ³*J*_{4,3} = 8,35 Hz), 8,73 (d, 1H, H-C7, ³*J*_{7,6} = 7,25 Hz), 8,96 (dd, 1H, H-C2,

$^3J_{2,3} = 4,15$ Hz), 9,30 (*s*, 1H, H-C9), 9,95 (*s*, 1H, H-N4), 11,67 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126,0 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 121,75 (C3), 126,33 (C7), 126,40 (C6), 127,94 (C4a), 129,59 (C5), 131,21 (C8), 136,59 (C4), 138,97 (C9), 145,30 (C8a), 150,29 (C2), 175,96 (C10).

(2-hinolilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK_(2qc)**). Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 56 %. t.t. 183 °C. Elementalna analiza: Izračunato za $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{S}$ ($M_w = 245,30$ g mol $^{-1}$): C, 53,86; H, 4,52; N, 28,55; S, 13,07 %; Nađeno: C, 53,66; H, 4,48; N, 28,32; S, 13,17 %. IR (KBr, cm $^{-1}$) ν_{max} : 3425 m (NH), 3267s (NH $_2$), 2962w (CH $_{\text{aril}}$), 1500 vs (amidna II), 1230 s (C=S), ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 4,97 (*s*, 2H, H-N5), 7,59 (*ddd*, 1H, H-C6, $^3J_{6,7} = 8,2$ Hz), 7,75 (*ddd*, 1H, H-C7, $^3J_{7,6} = 8,2$ Hz), 7,97 (*dd*, 2H, H-C5, H-C8), 8,18 (*s*, 1H, H-C9), 8,34 (*d*, 1H, H-C4, $^3J_{4,3} = 8,7$ Hz), 8,52 (*d*, 1H, H-C3, $^3J_{3,4} = 8,7$ Hz), 10,18 (*s*, 1H, H-N4), 11,78 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126,0 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 118,00 (C3), 126,75 (C6), 127,46 (4a), 127,57 (C5), 128,40 (C8), 129,57 (C7), 135,89 (C4), 141,98 (C9), 146,97 (C8a), 153,68 (C2), 175,37 (C10).

[(8-hidroksi-2-hinolil)metilen] dihidrazid tiougljene kiseline (**mhTUK_(8OH2qc)**). Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/metanol 1:9, v/v). Prinos: 83 %. t.t. 208-209 °C. Elementalna analiza: Izračunato za $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{OS}$ ($M_w = 261,30$ g mol $^{-1}$): C, 50,56; H, 4,24; N, 26,80; S, 12,27 %; Nađeno: C, 50,42; H, 4,34; N, 28,77; S, 12,42 %. IR (KBr, cm $^{-1}$) ν_{max} : 3450s (OH), 3424s (NH), 3165m (NH), 3015m (CH $_{\text{aril}}$), 1503vs (amidna II), 1228s (C=S). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 4,96 (*s*, 2H, H-N5), 7,09 (*dd*, 1H, H-C7, $^3J_{7,6} = 7,65$ Hz, $^4J_{7,5} = 1,1$ Hz), 7,37 (*dd*, 1H, H-C5, $^3J_{5,6} = 7,9$ Hz, $^4J_{5,7} = 1,1$ Hz), 7,42 (*t*, 1H, H-C6, $^3J_{6,5} = 7,9$ Hz, $^3J_{6,7} = 7,6$ Hz,), 8,23 (*s*, 1H, H-C9), 8,27 (*d*, 1H, H-C4, $^3J_{4,3} = 8,7$ Hz), 8,52 (*d*, 1H, H-C3, $^3J_{3,4} = 8,7$ Hz), 9,80 (*s*, 1H, OH), 10,17 (*s*, 1H, H-N4), 11,84 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 112,00 (C7), 117,71 (C5), 118,65 (C3), 127,97 (C6), 128,71 (C4a), 136,03 (C4), 138,10 (C8a), 142,16 (C9), 151,95 (C2), 153,36 (C8), 175,72 (C10).

*1,5-bis[(2-hidroksifenil)metilen] dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(sal))*⁴³. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 78 %. t.t. 219 °C (lit. t.t. 216 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₅H₁₄N₄O₃ (*M*_w = 298,11 g mol⁻¹): C, 60,35; H, 4,74; N, 18,79 %; Nađeno: C, 60,22; H, 4,62; N, 18,93 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3344 (OH), 3284 (NH), 1704 (C=O), 1622 (C=N).

Literaturni podaci: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 6,86-6,90 (*m*, 4H), 7,22-7,26 (*m*, 2H), 7,68-7,71 (*m*, 2H), 8,43 (*s*, 2H), 10,84 (*ss*, 4H). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 116,10, 119,10, 119,60, 128,10, 130,60, 142,60, 151,90, 156,60.

*1,5-bis(2-piridinilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(2pyc))*²⁰⁴. Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88 %. t.t. 185 °C (lit. t.t. 190-191 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₂N₆O (*M*_w = 268,11 g mol⁻¹): C, 58,20; H, 4,51; N, 31,33 %; Nađeno: C, 58,12; H, 4,88; N, 30,98 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3201 (NH), 1696 (C=O), 1604 (C=N).

Literaturni podaci: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 11,08 (*s*, 1H, N-H_{urea}), 8,59 (*d*, 1H, *J* = 4,4 Hz, C-H_{aril}), 8,25 (*s*, 1H, C-H_{imin}), 8,15 (*s*, 1H, N-H_{urea}), 7,87 (*t*, 1H, *J* = 7,6, C-H_{aril}), 7,39 (*t*, 2H, *J* = 6,0, C-H_{aril}). ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 151,68, 148,56, 144,59, 143,83, 126,01, 123,88.

1,5-bis(3-piridinilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(3pyc)). Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 77 %. t.t. 182 °C (lit.t.t. 202-204 °C)²⁰⁵. Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₂N₆O (*M*_w = 268,11 g mol⁻¹): C, 58,20; H, 4,51; N, 31,33 %; Nađeno: C, 58,34; H, 4,66; N, 31,21 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3211 (NH), 1670 (C=O), 1598 (C=N). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,45 (*dd*, 2H, H-C5 = H-C14, ³*J*_{5,4} = 8,0 Hz, ³*J*_{5,6} = 4,60 Hz), 8,01 (*s*, 2H, H-C7 = C9), 8,20 (*dd*, 2H, H-C4 = H-C13, ³*J*_{4,5} = 8,0 Hz, ⁴*J*_{4,6} = 1,7 Hz), 8,55 (*dd*, 2H, H-C6 = H-C15, ³*J*_{6,5} = 4,60 Hz, ⁴*J*_{6,4} = 1,7 Hz), 8,90 (*d*, 2H, H-C2 = H-C16, ³*J*_{2,4} = 2,0 Hz), 10,48 (*s*, 2H, H-N3 = HN4). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 123,31 (C5 = C11), 131,28 (C4 = C13), 133,66 (C3 = C12), 145,46 (C7 = C10), 147,94 (C2 = C16), 149,58 (C6 = C15), 152,92 (C9).

*1,5-bis(4-piridinilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(4pyc))*³⁹. Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 68 %. t.t. 210 °C (lit.t.t. 218 °C). Elementalna analiza:

Izračunato za $C_{13}H_{12}N_6O$ ($M_w = 268,11 \text{ g mol}^{-1}$): C, 58,20; H, 4,51; N, 31,33 %; Nađeno: C, 58,32; H, 4,77; N, 31,12 %. IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3212 (NH), 1695 (C=O), 1603 (C=N).

Literaturni podaci: ^1H NMR (no data MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 7,76 (s, 4H, H-C), 7,82 (s, 2H, H-C), 8,67 (d, 4H, H-C, $J = 6,06 \text{ Hz}$), 11,68 (s, 1H, H-N3, H-N4). ^{13}C NMR (no data MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 121,19, 141,18, 151,0, 151,18, 175,61.

1,5-bis[1-(2-piridinil)etiliden] dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(2pya)). Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88,0 %. t.t.(dekompozicija) 187 °C (lit. t.t.(dekompozicija) 186 °C)²⁰⁶. Elementalna analiza: Izračunato za $C_{15}H_{16}N_6O$ ($M_w = 296,14 \text{ g mol}^{-1}$): C, 60,80; H, 5,44; N, 28,36 %; Nađeno: C, 60,61; H, 5,31; N, 28,62 %. IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3206 (NH), 1698 (C=O), 1611 (C=N). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 2,31 (s, 6H, H-C8 = H-C11), 7,42 (dd, 2H, H-C5 = H-C15, $^3J_{5,4} = ^3J_{15,16} = 8,1 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6} = ^3J_{15,14} = 4,6 \text{ Hz}$), 7,88 (ddd, 2H, H-C4 = H-C16, $^3J_{4,3} = ^3J_{16,17} = 7,9 \text{ Hz}$, $^3J_{4,5} = ^3J_{16,15} = 8,1 \text{ Hz}$, $^4J_{4,6} = ^4J_{12,14} = 1,7 \text{ Hz}$), 8,16 (d, 2H, H-C3 = H-C17, $^3J_{3,4} = ^3J_{17,16} = 7,9 \text{ Hz}$), 8,58 (dd, 2H, H-C6 = H-C14, $^3J_{6,5} = ^3J_{14,15} = 4,6 \text{ Hz}$, $^4J_{6,4} = ^4J_{14,16} = 1,7 \text{ Hz}$), 10,31 (s, 2H, H-N3 = H-N4). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 13,25 (C8 = C11), 123,58 (C3=C17), 133,70 (C5=C15), 145,81 (C4=C16), 147,14 (C7 = C10), 149,61 (C6=C14), 151,45 (C2=C12), 152,12 (C9).

1,5-bis[1-(3-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (dhUK_(3pya)). Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88,0 %. t.t. 204 °C. Elementalna analiza: Izračunato za $C_{15}H_{16}N_6O$ ($M_w = 296,14 \text{ g mol}^{-1}$): C, 60,80; H, 5,44; N, 28,36 %; Nađeno: C, 60,70; H, 5,34; N, 28,58 %. IR (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3222 (NH), 1696 (C=O), 1608 (C=N). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 2,31 (s, 6H, H-C8, H-11), 7,45 (ddd, 1H, H-C5 = H-C14, $^3J_{5,4} = 8,05 \text{ Hz}$, $^3J_{5,6} = 4,75 \text{ Hz}$), 8,17 (ddd, 1H, H-C4 = H-C13, $^3J_{4,5} = 8,05 \text{ Hz}$, $^4J_{4,2} = 2,3 \text{ Hz}$, $^4J_{4,6} = 1,65 \text{ Hz}$), 8,58 (dd, 1H, H-C6 = H-C15, $^3J_{6,5} = 4,75 \text{ Hz}$, $^4J_{6,4} = 1,65 \text{ Hz}$), 8,99 (dd, 1H, H-C2 = H-C16, $^3J_{2,4} = 2,3 \text{ Hz}$), 9,98 (s, 1H, H-N3 = HN4). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 13,25 (C8 = C11), 123,43 (C5 = C15), 133,35 (C4 = C16), 133,70 (C3 = C17), 145,81 (C7 = C10), 147,24 (C2 = C12), 149,61 (C6 = C14), 152,09 (C9).

*1,5-bis[1-(4-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (dhUK_(4pya))*⁶⁰. Bela supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/voda 1 : 9 v/v). Prinos: 88,0 %. t.t. 220-221 °C (lit. t.t. -). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₅H₁₆N₆O (*M*_w = 296,14 g mol⁻¹): C, 60,80; H, 5,44; N, 28,36 %; Nađeno: C, 60,59; H, 5,22; N, 28,31 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3147 (NH), 1695 (C=O), 1596 (C=N). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 12,92 (C8 = C11), 120,78 (C3 = C5 = C15 = C17), 144,67 (C7 = C10), 145,44 (C4 = C16), 150,64 (C2 = C6 = C13 = C17), 152,33 (C9).

Literaturni podaci: ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,29 (*s*, 6H, CH₃), 7,64 (*d*, 2H, piridin), 7,74 (*d*, 2H, piridin), 8,45 (*d*, 2H, piridin), 8,62 (*d*, 2H, piridin), 10,08 (*ss*, 2H, NH).

1,5-bis[fenil-(2-piridinil)metilen] dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(2pyb))^{206,207}. Bela supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 91,0 %. t.t. 223 °C (lit. t.t. 225-226 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₂₅H₂₀N₆O (*M*_w = 420,17 g mol⁻¹): C, 71,41; H, 4,79; N, 19,99 %; Nađeno: C, 71,16; H, 4,82; N, 20,04 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3177 (NH), 1702 (C=O), 1612 (C=N).

Literaturni podaci: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,20–8,79 (*m*, 18H, C–H_{ar}), 9,90 (*s*, 1H, N–H), 12,74 (*s*, 1H, N–H). ¹³C NMR (62,90 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 123,70, 124,60, 127,20, 128,70, 129,00, 129,50, 131,00, 133,40, 136,80, 138,10, 148,80, 149,00, 162,40.

1,5-bis(8-hinolimtilen) dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(8qc)). Źuta supstanca prekrystalisana iz metanola. Prinos: 54 %. t.t. 219-220 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₁H₁₆N₆O (*M*_w = 368,14 g mol⁻¹): C, 68,47; H, 4,38; N, 22,81 %; Nađeno: C, 68,32; H, 4,91; N, 22,73 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{\max} : 3331 (NH), 1707 (C=O), 1614 (C=N). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,61 (*dd*, 2H, H–C3 = H–C17, ³*J*_{3,2} = ³*J*_{17,18} = 4,1 Hz, ³*J*_{3,4} = ³*J*_{17,16} = 8,3 Hz), 7,72 (*t*, 2H, H–C6 = H–C14, ³*J*_{6,5} = ³*J*_{14,15} = 7,9 Hz), 8,04 (*dd*, 2H, H–C5 = H–C15, ³*J*_{5,6} = ³*J*_{15,14} = 7,9 Hz), 8,43 (*dd*, 2H, H–C4 = H–C16, ³*J*_{4,3} = ³*J*_{16,17} = 8,3 Hz, ⁴*J*_{4,2} = ⁴*J*_{16,18} = 1,75 Hz), 8,60 (*d*, 2H, H–C7 = H–C13, ³*J*_{7,6} = ³*J*_{13,14} = 0,4 Hz), 8,99 (*dd*, 2H, H–C2 = H–C18, ³*J*_{2,3} = ³*J*_{18,17} = 4,1 Hz, ⁴*J*_{2,4} = ⁴*J*_{18,16} = 1,75 Hz), 9,50 (*s*, 2H, H–C9 = H–C11), 11,09 (*s*, 2H, H–N3, H–N4). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 121,77 (C3 = C17), 125,72 (C7 = C13), 126,49 (C6 = C14), 128,02 (C4a =

C15a), 129,28 (C5 = C15), 131,65 (C8 = C12), 136,62 (C4 = C16), 139,89 (C9 = C11), 145,19 (C8a = C12a), 150,16 (C2 = C18), 152,28 (C10).

1,5-bis(2-hinolilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(2qc)). Bela supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/metanol 1 : 9 v/v). Prinos: 78 %. t.t. 162-164 °C (lit.t.t.-)⁴⁸. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₁H₁₆N₆O (*M_w* = 368,14 g mol⁻¹): C, 68,47; H, 4,38; N, 22,81 %; Nađeno: C, 68,81; H, 4,80; N, 22,56 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3392 (NH), 1708 (C=O), 1630 (C=N), ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,63 (ddd, 2H, H-C6 = H-C16, ³*J*_{6,5} = ³*J*_{16,15} = 8,2 Hz, ³*J*_{6,7} = ³*J*_{16,17} = 6,8 Hz, ⁴*J*_{6,8} = ⁴*J*_{16,18} = 1,2 Hz), 7,79 (ddd, 2H, H-C7 = H-C17, ³*J*_{7,8} = ³*J*_{17,18} = 7,9 Hz, ³*J*_{7,6} = ³*J*_{17,16} = 6,8 Hz, ⁴*J*_{7,5} = ³*J*_{17,15} = 1,7 Hz), 8,02-8,20 (*m*, 4H, H-C5 = H-C15, H-C8 = H-C18), 8,31 (*s*, 2H, H-C9 = H-C11), 8,38-8,60 (*spm*, 4H, H-C3 = H-C13, H-C4 = H-C14), 11,31 (*s*, 2H, H-N3 = H-N4). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 117,78 (C3 = C13), 127,11 (C7 = C17), 127,79 (C6 = C16), 127,99 (C4a = C14a), 128,84 (C5 = C15), 130,00 (C8 = C18), 136,47 (C4 = C14), 144,06 (C9 = C11), 147,35 (C8a = C18a), 151,67 (C2 = C12), 153,99 (C10).

1,5-bis [(8-hidroksi-2-hinolil)metilen] dihidrazid ugljene kiseline (dhUK_(8OH2qc)). Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/metanol 1 : 9 v/v). Prinos: 66 %. t.t. 248-249 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₁H₁₆N₆O₃ (*M_w* = 400,39 g mol⁻¹): C, 62,99; H, 4,03; N, 20,99, %; Nađeno: C, 62,84; H, 4,11; N, 21,22 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3408 (OH), 3116 (NH), 1684 (C=O), 1601 (C=N), ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,12 (*dd*, 2H, H-C7 = H-C17, ³*J*_{7,6} = ³*J*_{17,16} = 7,4 Hz, ⁴*J*_{7,5} = ⁴*J*_{17,15} = 1,5 Hz), 7,41 (*dd*, 2H, H-C5 = H-C15, ⁴*J*_{5,7} = ⁴*J*_{15,17} = 1,5 Hz), 7,45 (*t*, 2H, H-C6 = H-C16, ³*J*_{6,7} = ³*J*_{16,17} = 7,4 Hz), 8,17-8,39 (*spm*, 4H, H-C3 = H-C13, H-C4 = H-C14), 8,48 (*s*, 2H, H-C9 = H-C11), 9,80 (*s*, 2H, H-O1 = H-O2), 11,34 (*s*, 2H, H-N3 = H-N4). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 112,13 (C7 = C17), 117,90 (C5 = C15), 118,12 (C3 = C13), 128,13 (C6 = C16), 128,75 (C4a = C14a), 136,40 (C4 = C14), 138,13 (C8a = C18a), 144,02 (C9 = C11), 151,92 (C2 = C12), 153,37 (C8 = C18), 162,45 (C10).

1,5-bis[(2-hidroksifenil)metilen] dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(sal))^{43,47}. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 77 %. t.t. 191 °C (lit. t.t. 216 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₅H₁₄N₄O₂S (*M_w* = 314,08 g mol⁻¹): C, 57,31; H, 4,49; N, 17,82; S, 10,20 %, Nađeno: C, 57,22; H, 4,56; N, 17,74; S, 10,11%. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3408m (NH), 3077w (CH_{aril}), 1505vs (amidna II); 1209s (C=S).
Literaturni podaci: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 6,91-6,93 (*m*, 4H), 7,28-7,43 (*m*, 3H), 8,07 (*s*, 1H), 8,52-8,76 (*ss*, 2H), 10,02 (*s*, 1H), 11,62 (*s*, 1H), 11,89-12,04 (*ss*, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 116,3, 118,1, 119,2, 120,0, 126,9, 130,4, 131,3, 141,1, 149,3, 156,9, 174,4.

*1,5-bis(2-piridinilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(2pyc))*⁴⁷. Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača(DMF/etanol, 5:1, v/v). Prinos: 77 %. t.t. 202-203 °C (lit.t.t. 204-207 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₂N₆S (*M_w* = 284,34): C, 54,91; H, 4,25; N, 29,56; S 11,28%; Nađeno: C, 54,82; H, 4,13; N, 29,39; S, 11,24 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3390m (NH), 3138w (CH_{aril}), 1530vs (amidna II); 1249s (C=S).
Literaturni podaci: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,42 (*ddd*, 2H, *J* = 7,6, *J* = 4,5, *J* = 1,0, 2H, C_{piridin}-H-4,4'), 7,90 (*dt*, 2H, C_{piridin} - H-5,5', *J* = 7,6, *J* = 1,4), 7,99 (*ss.*, 1H, C_{piridin} - H-6), 8,22 (*s s.*, 1H, C_{piridin}-H-6'), 8,37 (*s s.*, 1H, C_{imin}-H), 8,61 (*d*, 2H, C_{aril} - H-3,3, *J* = 4,5,), 8,64 (*ss.*, 1H, C_{imin} -H), 11,90 (*ss.*, 1H, N-H), 12,22 (*ss.*, 1H, N-H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 119,65, 120,22, 124,44, 124,57, 125,05, 126,71, 136,75, 137,07, 138,56, 139,44, 143,88, 148,29, 149,55, 149,88, 151,37, 152,82, 175,49, 176,75.

*1,5-bis(3-piridinilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(3pyc))*⁴⁷. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 88 %. t.t. 220 °C (lit. t.t. 215 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₂N₆S (*M_w* = 284,34): C, 54,91; H, 4,25; N, 29,56; S 11,28%; Nađeno: C, 54,78; H, 4,18; N, 29,49; S, 11,20 %. IR (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3311m (NH), 3145w (CH_{aril}), 1539vs (amidna II); 1270s (C=S).
Literaturni podaci: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,50 (*dd*, 2H, *J* = 7,64, C_{piridin}-H-5,5', *J* = 4,75), 8,17 (*ss.*, 2H, C_{piridin}-H-6,6'), 8,30 (*ss.*, 1H, C_{piridin}-H-2), 8,62 (*dd*, 2H, C_{piridin}-H-4,4', *J* = 4,75, *J* = 1,46), 8,66 (*ss.*, 1H, C_{piridin}-H-2'), 8,66 (*ss.*, 1H,

C_{imin-H}) 9,04 (ss., 1H, C_{imin-H}), 11,78 (ss., 1H, N-H), 12,14 (ss., 1H, N-H). ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 123,78, 129,97, 133,77, 140,63, 146,05, 148,75, 150,53.

*1,5-bis(4-piridinilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(4pyc))*⁴⁷. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 78 %, t.t. 216 °C (lit.t.t. 218-219 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₃H₁₂N₆S (*M*_w = 284,34): C, 54,91; H, 4,25; N, 29,56; S 11,28%; Nađeno: C, 54,72; H, 4,16; N, 29,63; S, 11,22 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3366m (NH), 3214w (CH_{aril}), 1511vs (amidna II); 1261s (C=S).

Literaturni podaci: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,71 (ss., 2H, C_{piridin-H-2,6}), 7,82 (ss., 2H, C_{piridin-H-2',6'}), 8,14 (ss., 1H, C_{imin-H}), 8,62 (ss., 1H, C_{imin-H}), 8,67 (*d*, 4H, C_{piridin-H-3,5,3',5'}, *J* = 5,85), 11,94 (ss., 1H, N-H), 12,31 (ss., 1H, N-H). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 121,24, 141,27, 146,84, 150,12, 175,65.

*1,5-bis[1-(2-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(2pya))*⁴⁷. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 64 %. t.t. 163-164 °C (t.t, lit, 163-165 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₅H₁₆N₆O (*M*_w = 312,39 g mol⁻¹): C, 57,67; H, 5,16; N, 26,90; S, 10,26 %; Nađeno: C, 57,84; H, 5,05; N, 26,75; S, 10,28 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3195m (NH), 3001w (CH_{aril}), 1508vs (amidna II); 1227s (C=S). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 12,13 (C8 = C11), 123,44 (C3=C17), 133,52 (C5=C15), 145,85 (C4= C16), 147,05 (C7 = C10), 149,88 (C6=C14), 151,32 (C2=C12), 172,44 (C9).

Literaturni podaci: ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 2,47, (*s*, 3H, CH₃) 2,49 (*s*, 3H, CH₃), 7,44 (*dd*, 2H, C_{piridin-H-5,5'}, *J* = 7,4, *J* = 4,8), 7,90 (*t*, 2H, C_{piridin-H-4,4'}, *J* = 7,8), 8,19 (*d*, 2H, C_{piridin-H-3,3'}, *J*=7,8), 8,63 (*d*, 2H, C_{piridin-H-6,6'}, *J* = 4,8), 11,00 (ss., 2H, NH).

*1,5-bis[1-(3-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(3pya))*⁵⁹. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 81 %. t.t. 201-202 °C (lit.t.t. 201-206 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₅H₁₆N₆O (*M*_w = 312,39 g mol⁻¹): C, 57,67; H, 5,16; N, 26,90; S, 10,26 %; Nađeno: C, 57,67; H, 5,16; N, 26,90; S, 10,26 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3185m (NH), 2963w (CH_{aril}), 1504vs (amidna II); 1222s (C=S). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 13,66 (C8 = C11), 123,72 (C5 = C15), 133,71 (C4 = C16),

133,82 (C3 = C17), 148,90 (C7 = C10), 149,02 (C2 = C12), 150,21 (C6 = C14), 172,12 (C9).

Literaturni podaci: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 2,41 (*s*, 6H, CH₃), 7,46–7,50 (*m*, 2H, C_{piridin}-H), 8,24 (*d*, 2H, C_{piridin}-H), 8,61 (*d*, 2H, C_{piridin}-H), 9,07 (*ss*, 2H, C_{piridin}-H), 11,01 (*s*, 2H, N-H).

*1,5-bis[1-(4-piridinil)etiliden] dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(4pya))*⁴⁷. Bela supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/etanol 1 : 9, v/v). Prinos: 77 %. t.t. 229-230 °C (lit. t.t. 233-236 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₁₅H₁₆N₆O ($M_w = 312,39 \text{ g mol}^{-1}$): C, 57,67; H, 5,16; N, 26,90; S, 10,26 %; Nađeno: C, 57,50; H, 5,18; N, 26,88; S, 10,24 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3422m (NH), 3098w (CH_{aril}), 1508vs (amidna II); 1220s (C=S), ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 13,25 (C8 = C11), 120,82 (C3 = C5 = C15 = C17), 145,55 (C4 = C16), 146,78 (C7 = C10), 150,88 (C2 = C6 = C13 = C17), 172,36 (C9).

Literaturni podaci: ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 2,39 (*s*, 6H, CH₃), 7,82 (*d*, 4H, C_{piridin}-H₂, 2', 6, 6', $J = 4,60 \text{ Hz}$), 8,65 (*d*, 4H, C_{piridin}-3, 5, 3', 5', $J = 4,60 \text{ Hz}$), 11,10 (*s*, 2H, H-N₃ = H-N₄).

*1,5-bis[fenil-(2-piridinil)metilen] dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(2pyb))*⁵⁹. Žuta supstanca prekrystalisana iz etanola. Prinos: 95 %. t.t. 193-194 °C (lit. t.t. 167-168 °C). Elementalna analiza: Izračunato za C₂₅H₂₀N₆S ($M_w = 436,54 \text{ g mol}^{-1}$): C, 68,79; H, 4,62; N, 19,27; S, 7,35 %; Nađeno: C, 68,66; H, 4,88; N, 18,98; S, 7,15 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3202m (NH), 2966m (CH_{aril}), 1504vs (amidna II), 1214s (C=S).

Literaturni podaci: ^1H NMR (300 MHz, CDCl₃, δ (ppm)): 7,32–8,86 (*m*, 18H, C-H_{aril}), 10,90 (*s*, 1H, N-H), 13,98 (*s*, 1H, N-H).

1,5-bis(8-hinolilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(8qc)). Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/etanol 1 : 4, v/v). Prinos: 75 %. t.t. (dekompozicija) 192-193 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₁H₁₆N₆S ($M_w = 384,12 \text{ g mol}^{-1}$): C, 65,61; H, 4,19; N, 21,86; S, 8,34 %; Nađeno: C, 65,44; H, 4,03; N, 21,77; S, 8,21 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3441m (NH), 3119w (CH_{aril}), 1519vs (amidna II); 1231s (C=S). ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm)): 7,62 (*dd*, 2H,

H-C3 = H-C17, $^3J_{3,4} = ^3J_{17,18} = 4,1$ Hz), 7,75 (*t*, 2H, H-C6 = H-C14, $^3J_{6,5} = ^3J_{14,15} = 7,95$ Hz), 8,09 (*dd*, 2H, H-C5 = H-C15, $^3J_{5,6} = ^3J_{15,14} = 7,95$ Hz), 8,35-8,64 (*spm*, 3H, H-C4 = H-16, H-C13), 8,88 (*s*, H-C7), 9,00 (*dd*, 2H, H-C2 = H-C18, $^3J_{2,3} = ^3J_{18,17} = 4,1$ Hz), 9,48 (*s*, 1H, H-C11), 9,91 (*s*, 1H, H-C9), 12,14 (*d*, 2H, H-N3 = H-N4). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 121,85 (C3 = C17), 125,98 (C13), 126,48 (C6 = C14), 126,70 (C7), 128,01 (C4a = C15a), 129,99 (C5 = C15), 130,97 (C12), 131,46 (C8), 136,65 (C4 = C16), 140,36 (C8a = C12a), 140,48 (C11), 145,40 (C9), 150,34 (C2 = C18), 175,21 (C10).

1,5-bis(2-hinolilmetilen) dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(2qc)). Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMSO/metanol 9 : 1, v/v). Prinos: 68 %. t.t. 184 °C (lit. t.t. 182 °C)⁴⁸. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₁H₁₆N₆S (*M_w* = 384,12 g mol⁻¹): C, 65,61; H, 4,19; N, 21,86; S, 8,34 %; Nađeno: C, 65,78; H, 4,01; N, 21,56; S, 8,12 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3424s (NH), 2923m (CH_{aril}), 1488 vs (amidna II); 1229 s (C=S). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,67 (*ddd*, 2H, H-C6 = H-C16, $^3J_{6,7} = ^3J_{16,17} = 7,05$ Hz, $^3J_{6,5} = ^3J_{16,15} = 7,95$ Hz), 7,82 (*ddd*, 2H, H-C7 = H-C17, $^3J_{7,6} = ^3J_{17,16} = 7,05$ Hz), 8,06 (*ddd*, 4H, H-C5 = H-C15, H-C8 = H-C18, $^3J_{5,6} = ^3J_{15,16} = 7,95$ Hz), 8,20 (*s*, 1H, H-C11), 8,40 (*s*, 1H, H-C9), 8,46-8,63 (*spm*, 4H, H-C3 = H-C13, H-C4 = H-C14), 12,16 (*s*, 1H, H-N4), 12,51 (*s*, 1H, H-N3). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 118,41 (C13), 118,72 (C3), 127,75 (C6 = C16), 128,23 (C4a = C14a), 127,37 (C5 = C15), 130,47 (C7 = C17), 130,47 (C8 = C18), 136,98 (C4 = C14), 144,46 (C11), 149,59 (C9), 147,70 (C8a = C18a), 152,03 (C12), 153,96 (C2), 175,97 (C10).

1,5-bis[(8-hidroksi-2-hinolil) metilen] dihidrazid tiougljene kiseline (dhTUK_(8OH2qc)). Žuta supstanca prekrystalisana iz smeše rastvarača (DMF/metanol 1 : 9, v/v). Prinos: 74 %. t.t. 240-241 °C. Elementalna analiza: Izračunato za C₂₁H₁₆N₆O₂S (*M_w* = 416,46 g mol⁻¹): C, 60,56; H, 3,87; N, 20,18; S, 7,70 %; Nađeno: C, 60,68; H, 4,03; N, 20,07; S, 7,52 %. IR (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3479s (OH), 3428m (NH), 2923m (CH_{aril}), 1500vs (amidna II); 1231s (C=S). ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 7,14 (*d*, 2H, H-C7 = H-C17, $^3J_{7,6} = ^3J_{17,16} = 7,4$ Hz), 7,43 (*m*, 4H, H-C5 = H-C15, H-6 = H-16), 8,05-8,41 (*spm*, 4H, H-C3 = H-C13, H-C4 = H-C14), 8,53 (*s*, 1H, H-

C11), 8,89 (*s*, 1H, H–C9), 9,89 (*s*, 2H, O1H = O2H), 12,18 (*s*, 1H, H–N4), 12,52 (*s*, 1H, H–N3). ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆, δ (ppm)): 112,24 (C7 = C17), 117,87 (C5 = C15), 118,62 (C3 = C13), 128,38 (C6 = C16), 128,90 (C4a = C14a), 136,48 (C4 = C14), 138,20 (C8a = C18a), 143,85 (C11), 149,17(C9), 151,60 (C2 = C12), 153,44 (C8 = C18), 175,61(C10).

3.3 Rendgenska strukturna analiza

Monokristali *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(4pya) su dobijeni iz rastvora za prekristalizaciju sporim uparavanjem i snimani su na Oxford Gemini S difraktometru sa Sapphire 3 CCD detektorom na sobnoj temperaturi korišćenjem monohromatskog Cu *K* α zračenja ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) za supstancu *mhUK*_(4pya) i MoK α ($\lambda = 0,71071 \text{ \AA}$) zračenja sa supstancu *mhUK*_(4pyc). Podaci su sakupljani korišćenjem programskog paketa CrysAlis CCD²⁰⁸, a redukcija podataka je izvršena programskim paketom CrysAlis RED²⁰⁸. Određivanje prostornog rasporeda grupa zasnovano je na analizi Laue klase i sistemski odsutne refleksije. Prikupljeni podaci su korigovani multi-sken korekcijom apsorpcije pomoću sfernih sekundarnih frekvencija primenjenih u SCALE3 ABSPACK mernom algoritmu²⁰⁸. Strukture su rešene direktnim metodama (SHELXT²⁰⁹) i utanačavane metodom najmanjih kvadrata korišćenjem programa SHELXL-2014/6.²⁰⁹ Za obe komponente parametri pomeranja svih atoma, osim atoma vodonika, utačnjeni su anizotropno. Položaji atoma vodonika vezanih za atome ugljenika su smešteni u geometrijski izračunate položaje i utačnjeni korišćenjem fiksnih distanci 0,93 Å (CH) i 0,96 Å (CH₃). Atomi vodonika vezani za atom azota su nađeni u mapi razlike elektronske gustine i utačnjen je izotropnim parametrima pomeranja. Svi proračuni su urađeni korišćenjem programa PARST²¹⁰ i PLATON²¹¹, primenjenih u WINGX²¹² programskom sistemu.

3.4 Korelaciona analiza

Korelaciona analiza izvršena je pomoću softverskog paketa Microsoft office Excel 2007. U svrhu ispitivanja uticaja rastvarača na sintetisane molekule određeni su UV apsorpcioni maksimumi za jedinjenja u izabranom setu rastvarača različite polarnosti. Efekat rastvarača, kao i uticaj supstienata na solvatohromne karakteristike je proučavan

Kamlet-Taftovom solvatohromnom jednačinom (jednačina 2.13) i modelom koji je predložio Catalán (jednačina 2.15).

Osim LSER metodologije, elektronska struktura ispitivanih jedinjenja je proučavana primenom principa korelacije slobodnih energija (LFER). Ovaj princip je prmenjen da bi se stekao uvid u faktore koji utiču na ^{13}C i ^1H NMR hemijska pomeranja, pK_a ili v_{\max} vrednosti. Prenos elektronskih efekata supstituenata je analizirana korišćenjem monoparametarskog modela Hammetove jednačine (SSP, Single Substituent Parameter) (2.4, 2.10-2.11). Validnost korelacionih analiza je procenjena na osnovu koeficijenata korelacije (R), standardne devijacije (sd), Fišerovog testa (F) i broja rastvarača uključenih u korelaciju (n).

3.5 Masena spektrometrija, MS/MSⁿ

Korišćeni maseni spektrofotomeetar je LTQ XL linerani jonski trap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) sa elektrosprej jonizacijom (ESI). Rezultati su obrađivani korišćenjem Xcalibur® 2.3 (Thermo Fisher) softverskog paketa. Podešavanje masenog spektrofotometra je izvršena automatski. MS i MSⁿ eksperimenti su urađeni u metanolu kao rastvaraču u koncentracijama $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Standardi isporučeni u špric pumpama sa brzinom protoka $10\ \mu\text{L min}^{-1}$ mešani su putem T-račve sa LC eluentom koji sadrži 99 % metanola i 1 % 10% sirćetne kiseline. Protok mobilne faze je $0,3\ \text{mL min}^{-1}$. Maseni spektri *mh*-UK su snimani u pozitivnom i negativnom ESI modu. Za sve eksperimente u pozitivnom ESI modu izvor napona je 5 kV. Azot je korišćen kao omotač i kao pomoćni gas i vrednosti njegovog protoka (skala u relativnim jedinicama u opsegu od 0-100 definisanog u LTK KSL sistemu) su bile 32 i 8 respektivno. Temperatura u kapilarima je postavljena na $350\ ^\circ\text{C}$, sa naponom u kapilarama u iznosu od 6 i 75 V, respektivno. U negativnom ESI modu postavljeni parametri su: izvor napona 4 kV, protok azota u omotaču 32 a kao kao pomoćni gas 8, napon u kapilarama -19 V i napon cevi objektiva -142 V. Helijum je korišćen kao kolizioni gas u jonskom trapu. Energija kolizije je ručno optimizovana za svaku supstancu. Maksimalno vreme injektiranja za MS je 50 ms, a broj mikroskeniranja je 2, a za MSⁿ eksperimente maksimalno vreme injektiranja je 100 ms uz 3 mikroskena. Kompletan režim skeniranja je korišćen za dobijanje masenih spektara i odabir jona prekursora za dobijanje jonskog spektra.

3.6 Potenciometrijsko određivanje konstanti kiselosti

Potenciometrijske titracije su izvedene na automatskom titratoru CRISON PH - Burette 24 2S, Version 3.0, sa kombinovanom mikro-elektrodom CRISON 50 29. Sistem je kalibrisan biftalatnim ($\text{pH} = 4,01$) i fosfatnim ($\text{pH} = 7,00$) puferima. Osnovni rastvori *mh*-UK ($c = 0,5 \cdot 10^{-3}$ M) za potenciometrijsko određivanje konstanti kiselosti pripremani su u vodi, u slučaju tri *mh*-UK na bazi hinolina (***mh*UK_(8qc)**, ***mh*UK_(2qc)**, ***mh*UK_(8OH2qc)**) koji su pripremani u smeši vode i metanola (1:1, v/v) na $t = 25 \pm 1$ °C pri konstantnoj jonskoj jačini ($I = 0,1$ M (NaCl)) rastvaranjem tačno odmerene mase suve supstance. Rastvori HCl i NaOH su standardizovani potenciometrijskim titracijama. Za izračunavanje konstanti kiselosti korišćeni su podaci dobijeni kalibracijom sistema *Grann*-ovom metodom korišćenjem softverskog paketa GLEE.¹³⁶ Program je napravljen za kalibraciju elektrode titracijom standardnog rastvora jake kiseline jakim bazom. Na osnovu eksperimentalnih podataka (E (mV) i V_{NaOH} (ml)) dobija se k , nagib i 'slope factor' (korekciju Nernstovskog nagiba, jednačina (β)), koji se potom koriste u softverskom paketu HYPERQUAD2008¹³⁶ za obradu eksperimentalnih podataka dobijenih titracijama za održavanje $\text{p}K_a$ vrednosti ispitivanih *mh*-UK. Program takođe može proceniti udeo rastvorenog CO_2 u rastvoru NaOH. Korišćeni su i standardni rastvori NaOH ($c = 0,0933$ M) i HCl ($c = 0,1123$ M).

Standardizacija rastvora NaOH izvedena je korišćenjem natrijum-hidrogenftalata, a standardizacija HCl korišćenjem prethodno standardizovanog rastvora NaOH. Potenciometrijske titracije su izvedene u vodenoj sredini i u smeši metanola i vode (1:1, v/v). Obzirom da su *mh*-UK slabo rastvorni u vodi i smeši rastvarača, rastvaranje je bilo potpomognuto ultrazvukom, mešanjem i blagim zagrevanjem ($t < 50$ °C) na magnetnoj mešalici. Pri potenciometrijskom određivanju $\text{p}K_{a1}$ i $\text{p}K_{a2}$, rastvorima *mh*-UK od 4,00 ml tačno poznate koncentracije dodato je proračunata zapremina 0,16 ml standardnog rastvora HCl i titrovano standardnim rastvorom NaOH. Zapremina inkremenata titracionog sredstva iznosila je 5 μl . Iz dobijenih eksperimentalnih podataka, $\text{p}K_{a1}$ i $\text{p}K_{a2}$ vrednost je određena korišćenjem softverskog paketa HQ2008¹³⁶.

3.7 Molekulske modelovanje

3.7.1 Kvantnomehanički proračuni, predikcija NMR-a i lipofilnost

Početna konformacije *mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK koji u svom sastavu sadrže hinolinsko jezgro su generisane na OMEGA 2.4.3,²¹³ korišćenjem MMFF94s polja sila.²¹⁴ Strukture su dodatno optimizovane korišćenjem ω B97X-D funkcionala,²¹⁵ i bazisnog seta 6-311G (d,p). Efekat solvatacije je simuliran polarizovanim Uticaj rastvarača je simuliran je primenom modela polarizovanog kontinuuma u acetonitrilu (PCM)²¹⁶. Da bi se potvrdilo da dobijena geometrija predstavlja globalni minimum izvršena je vibraciona analiza frekvencije (Opt + Freq keywords). Imaginarna frekvencija nije pronađena, stoga je stacionarna tačka predstavljala minimum. Modelovani su različiti tautomerni oblici i geometrijski izomeri oko azometinske grupe (C=N), i maksimanja energija svake komponente je bila (tio)keto, sa *E* konfiguracijom na svim azometinskim vezama. Polazeći od globalnog minimuma, NMR hemijska pomeranja su proračunata na ω B97X-D/6-311G(d,p) nivou korišćenjem GIAO aproksimacija²¹⁷ primenom PCM modela u DMSO. Hemijska pomeranja na skali ¹H i ¹³C određena su u odnosu na TMS. Lipofilnost komponenti je predviđena polazeći od DFT optimizovanih geometrija, izračunavanjem virtuelnog $\log P$ dobijenog iz molekuskog lipofilnog potencijala.²¹⁸

3.7.2 Teorijski proračuni *mh*-UK

Geometrija svih komponenti je optimizovana MP2 metodom korišćenjem bazisnog seta 6-311G(d,p) basis set. U cilju nalaženja globalnog minimum na potencijalnu energiju površine (PES, *eng.* Potential Energy Surface), izvršena je višestruka optimizacija za svaku komponentu sa različitim torzionim uglom i inkrementom od 15° i minimalizovanje energije uz poštovanje svih geometrijskih parametara. Priroda najnižeg energetskog minimuma je dodatno potvrđena proračunima frekvencije. Negativna frekvencija nije pronađena. UV-Vis apsorpcione energije jedinjenja, kao i karakteristike osnovnog i pobuđenog stanja dobijene su pomoću vremenski zavisne DFT metode (TD-DFT) proračunate na MP2/6-31G(d,p) optimizovanim geometrijama. Simulacija TD-DFT proračuna u DMSO je izvedena pomoću modela CAM-B3LYP²¹⁹ i 6-311G(d,p) bazisnog seta. Kvalitativni indeks

transfera naelektrisanja: D_{CT} , Q_{CT} i vrednosti variranja dipolnog momenta između osnovnog i ekscitovanog stanja (μ_{CT}) su izračunate primenom metode predložene od strane Le Bahers i saradnika²²⁰. Svi hemijski proračuni su izračunati korišćenje Gaussian09 programa²²¹. Analiza raspodele elektronske gustine na atomima u molekulu (AIM, *eng.* Atoms-in-Molecules) analize talasne funkcije osnovnog stanja su određene programom Multifwfn²²².

3.7.3 3D-QSAR modelovanje zasnovano na deskriptorima izvedenim iz MIF-ova primenjeno na antimikrobnu aktivnost *h*-TUK

3D-QSAR modeli su napravljeni u programu Pentacle 1.06¹²¹, koji izračunava deskriptore GRIND-2 iz polja molekulskih interakcija²²³. MIF-ovi su izračunati pomoću DRY, O, N1 i TIP probe. Važne pozicije oko molekula (hot spots) ekstrahovane su iz ϵ IF-ova koristeći AMANDA diskretizacioni algoritam²²⁴. Kodiranje profiliranih MIF-ova u GRIND promenljive urađeno je pomoću MACC2 algoritma. Svi parametri korišćeni za računanje MIF-ova bili su identični predefinisanim. S obzirom da je broj izračunatih deskriptora u velikoj meri prevazilazi broj komponenti PCA je korišćena kao metoda za grupisanje jedinjenja i proučavanje njihove sličnosti, dok je PLS regresija upotrebljena za dobijanje kvantitativne veze između biološke aktivnosti i GRIND.¹²⁰ 3D strukture *h*-TUK generisane su iz SMILES (*eng.* Simplified Molecular-Input Line System) zapisa u programu OMEGA 2.4.3,²¹³ koristeći MMFF94s polje sila i predefinisana podešavanja,²¹⁴ birajući samo najstabilniju konformaciju. Strukture su dodatno optimizovane koristeći semiempirijski PM6 metod u programu MOPAC 2016²²⁵ i koristeći VEGA ZZ ZZ 3.1.0 program kao grafički korisnički *interfejs* (GUI, *eng.* Graphical User *Interface*)²²⁶.

3.7.4 Doking vezivanja $dhTUK_{(8qc)}$ za HSA

Za ispitivanje vezivanja jedinjenja $dhTUK_{(8qc)}$ za mesto IB HSA, korišćena je kristalna struktura HSA sa dimerom idarubicina (PDB, *eng.* Protein Data Bank) kod 4LB2)²²⁷. Za mesti IIA korišćena je PDB struktura amidnih derivate indola (PDB kod 3LU7).²²⁸ Za mesto IIIA korišćena je struktura kompleksa HSA-diflunizal (PDB kod 2BXE)²²⁹. Za definisanje položaja receptora korišćena je rezidualna sfera od 12 Å oko kokristalnog liganda. Ligand i molekuli vode su

uklonjeni pre primene receptora u program AutoDock Tools 1.5.6²³⁰. Početna konformacija *dhTUK*_(8qc) generisana je u program OMEGA 2.4.3,²¹³ korišćenjem MMFF94s polja sila²¹⁴. Geometrija konformera sa najnižom energijom optimizovana je korišćenjem PM6 metode implementirane u MOPAC 2016²²⁵. Doking studija je sprovedena u softveru Autodock Vina 1.1.2²³¹. VEGAZZ 3.0.3 je korišćen kao GUI²²⁶.

3.8 Metode ispitivanja biološke kativnost

3.8.1 Ispitivanje anticancer aktivnosti

Ćelijske kulture

Testiranje antikancerske aktivnosti ispitivanih jedinjenja rađeno je na dve ćelijske linije: humani adenokarcinom pankreasa, AsPC-1(ATCC®, Kat. br. CRL-1682) i humana akutna monocitna leukemija, THP-1(ATCC®, Kat. br. TIB-202). Ćelijske kulture održavane su u medijumima po preporukama ATCC (*eng.* American Type Culture Collection) organizacije, AsPC-1 ćelije u medijumu DMEM (*eng.* Dominique Dutscher), a THP-1 ćelije u medijumu RPMI-1640 (Life Technologies). Oba medijuma obogaćena su sa 10 % (v/v) goveđeg seruma (Life Technologies) prethodno inaktivisanog na temperaturi od 56 °C tokom 30 minuta, i sa 1 % (v/v) antibiotika (penicilin 10 000 IU/ml, streptomycin 10 000 µg/ml, Life Technologies). Ćelijske kulture su održavane u vlažnom inkubatoru na 37 °C, sa 5 % (v/v) CO₂ u atmosferi.

Priprema ispitivanih jedinjenja

Sva ispitivana jedinjenja rastvorena su u dimetilsulfoksidu (DMSO, Sigma-Aldrich) u koncentraciji 20 mM. Razblaženja su pripremana sa odgovarajućim medijumima (DMEM ili RPMI-1640) neposredno pre stavljanja ispitivanih jedinjenja na ćelije. Najveća finalna koncentracija DMSO na ćelijama postignuta je u uzorcima tretiranim koncentracijom od 100 µM i iznosila je 0,5 % (v/v).

Tripsinizacija AsPC-1 ćelija

Pošto se AsPC-1 ćelije lepe za podlogu suda, pre svake pripreme ove ćelijske kulture za analizu na protočnom citometru neophodno je da se iste procesom tripsinizacije odlepe od podloge i dovedu u formu ćelijske suspenzije. Ista priprema nije neophodna za THP-1 ćelije obzirom da se one ne lepe za podlogu.

Po isteku trajanja vremena inkubacije određenog eksperimenta, sva količina medijuma iz bunarčića (mikrotitar ploče (korišćene su ploče sa 96 bunarčića, Corning®) sa tretiranim i netretiranim ćelijama prebacuje se u novu mikrotitar ploču. Na ovaj način sprečava se gubitak ćelija koje su se u procesu ćelijske smrti (apoptoze ili nekroze) odvojile od podloge. U bunarčiće sa zalepljenim ćelijama najpre se dodaje fosfatni pufer (PBS, Sigma-Aldrich) u zapremini od 0,2 ml, i mikrotitar ploča se centrifugira (centrifuga, Fisher Scientific) na 450 x g tokom 10 minuta. Ovaj korak je neophodan da bi se odstranio sav goveđi serum kojim je obogaćena DMEM podloga jer isti inhibira enzimsku aktivnost tripsina. Nakon završenog centrifugiranja, PBS se odtrazuje iz bunarčića izvrtanjem ploče na papirni ubrus, i potom se u svaki bunarčić dodaje 0,2 ml tripsina. Ploča se potom ostavlja u inkubatoru narednih 20 minuta da bi tripsin odvojio ćelije od podloge. Tripsin (BioWest) se poput PBS-a odstranjuje iz bunarčića nakon centrifugiranja ploče. U bunarčiće sa ćelijama odvojenim od podloge pomoću tripsina vraća se na početku odvojena podloga odstranjena na početku ovog procesa, i pristupa se bojenju uzorka za analizu na protočnom citometru.

Bojenje ćelija Aneksinom V i PI

Ćelije su sadene u mikrotitar ploče sa 96 bunarčića u koncentraciji 10 000 ćelija u 0,1 ml. Zasadene ćelije su ostavljene preko noći u inkubatoru, a sutradan su u bunarčiće dodata ispitivana jedinjenja u rasponu od 6 koncentracija (po jedna koncentracija u svakom bunarčiću). Kao negativna kontrola korišćene su ćelije u bunarčićima kojima su umesto ispitivanih jedinjenja dodat odgovarajući medijum (DMEM ili RPMI-1640). Pripremljene koncentracije jedinjenja dodate su u zapremini od 0,1 ml, tako da je ukupna zapremina po bunarčiću bila 0,2 ml. Dužina inkubacije je bila 24 h u inkubatoru sa gore opisanim atmosferskim i temperaturnim uslovima.

Po isteku trajanja inkubacije od 24 h, AsPC-1 ćelije se najpre tripsiniziraju kao što je gore opisano, dok se THP-1 ćelije boje bez ikakve prethodne pripreme. Bojenje ćelija se vrši tako što se u svaki od bunarčića doda po 3 μ l Aneksina V (Immuno Tools) i PI (Miltenyl Biotec Inc). Ploče sa bojenim ćelijama ostavljaju se u inkubatoru tokom 20 minuta pre analize. Do stavljanja mikrotitar ploče u protočni citometar (Guava® easyCyte 12HT Benchtop, Millipore) uzorke je potrebno zaštititi od svetlosti. Ćelije prikupljene na citometru automatski su analizirane GuavaSoft softverskim paketom (Millipore) i sortirane na osnovu njihove markiranosti Aneksinom V i/ili PI.

Određivanje ED₅₀ koncentracije

Procenat ćelija markiranih samo Aneksinom V ili Aneksinom V i PI dobijenih očitavanjem na protočnom citometru sabirane su za svaki od analiziranih tretiranih uzoraka pojedinačno. Grafikon odnosa koncentracije i efekta dobijen je tako što su na X osu unešene logaritmovane vrednosti koncentracija ispitivanog jedinjenja korišćenih u eksperimentu, dok su na Y osu unešene vrednosti zbira Aneksin V markiranih ćelija za svaku od koncentracija. Odnos koncentracije i dobijenih procenata je povezan asimetričnom petoparametarskom sigmoidnom logističkom jednačinom koristeći GrafPad Prizma softver (GraphPad Software 6 Prism). ED₅₀ koncentracija je definisana kao ona koja odgovara sredini eksponencijalne faze dobijene sigmoidne krive.

Određivanje zastupljenosti ćelija po fazama ćelijske deobe

Procenatualni raspored ćelija po fazama deobe određivan je na preostalim ćelijama nakon analize Aneksin V/PI-om. Mikrotitar ploča je neposredno nakon što je izvađena iz protočnog citometra stavljena u centrifugu (450 g tokom 10 minuta), a supernatant je potom odstranjen izvrtanjem ploče na papirni ubrus. U svaki bunarčić je potom dodato 0,2 ml 70 % etanola i ploča je ostavljena 24 h u frižideru na temperaturi 4-8 °C da bi se ćelije fiksirale. Nakon isteka procesa fiksacije ploča je ponovo centrifugirana (450 x g tokom 10 minuta), supernatant odstranjen polaganjem ploče na papirni ubrus, i u svaki bunarčić je dodat PBS u zapremini od 0,1 ml. Bojenje ćelija rađeno je dodavanjem 0,05 ml FxCycle rastvora (FxCycle™ PI/RNase rastvor, Molecular Probes) u svaki od bunarčića, nakon čega je ploča ostavljena 30 minuta u inkubatoru. Neposredno pred analizu u bunarčiće je dodato po 0,1 ml PBS-a. Ploča je do očitavanja u protočnom citometru bila zaštićena od svetlosti.

Određivanje zavisnosti apoptoze od aktivnosti kaspaza

Ćelije su sađene u mikrotitar ploču sa 96 bunarčića u gustini od 10 000 ćelija u 0,1 ml i ostavljene do 24 h u inkubatoru pre eksperimenta. U eksperimentalnim bunarčićima ćelije su tokom 6 sati tretirane sa ispitivanim jedinjenjem dodatim u ED₅₀ koncentraciji i inhibitorom aktivnosti kaspaza širokog spektra (Z-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, Z-VAD-fmk, Promega). U bunarčićima koji su služili kao pozitivna kontrola ćelije su tretirane samo sa ispitivanim jedinjenjem dodatim u ED₅₀ koncentraciji. Nakon završetka tretmana, AsPC-1 ćelije u eksperimentalnim i kontrolnim bunarčićima

su tripsinizirane a potom obojene Aneksinom V i PI. THP-1 ćelije su bez prethodne pripreme bojene Aneksinom V i PI. Bojenje je urađeno po gore opisanoj metodi. Uzorci su očitani na protočnom citometru. Procenat inhibicije apoptoze i nekroze izračunat je po sledećoj formuli:

$$\text{Inhibicija(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\% \text{ apoptoze ili nekroze u A}}{\% \text{ apoptoze ili nekroze u B}} \right) \right] \times 100 \quad (3.1)$$

gde je A – eksperimentalni uzorak tretiran sa Z-VAD-fmk i ispitivanim jedinjenjem, a B – kontrolni uzorak tretiran samo sa ispitivanim jedinjenjem.

Određivanje aktivacije kaspaza 8 i 9

Ćelije su sadene u mikrotitar ploču sa 96 bunarčića u gustini od 10 000 ćelija u 0,1 ml i ostavljene do 24 h u inkubatoru pre eksperimenta. Tokom perioda od 6 h ćelija su tretirane ispitivanim jedinjenjem dodatim u ED₅₀ koncentraciji, nakon čega su AsPC-1 ćelije tripsinizirane. Tripsinizirane AsPC-1 i tretirane THP-1 ćelije bojene su prema preporukama proizvođača specifičnim reagensima koji detektuju aktiviranu formu kaspaze 8 (Guava Caspase 8 FAM kit, EMD Millipore), odnosno kaspaze 9 (Guava Caspase 9 SR kit, EMD Millipore). Ćelije su nakon bojenja analizirane na protočnom citometru. Bunarčići sa netretiranim ćelijama su takođe bojani istim reagensima i korišćeni kao negativna kontrola.

Određivanje prisustva superoksidnih radikala u mitohondrijama

Ćelije su sadene u mikrotitar ploču sa 96 bunarčića u gustini od 10 000 ćelija u 0,1 ml i ostavljene do 24 h u inkubatoru pre eksperimenta. Tokom 6 h ćelje su tretirane ispitivanim jedinjenjem dodatim u koncentraciji od 50 μM, nakon čega su AsPC-1 ćelije tripsinizirane. Tripsinizirane AsPC-1 ćelije i tretirane THP-1 ćelije bojene su MitoSOX markerom (MitoSOX™ Red, Molecular Probes) po preporukama proizvođača. Ćelije su nakon bojenja analizirane na protočnom citometru. Bunarčići sa netretiranim ćelijama obojenim MitoSOX markerom su korišćeni kao negativna kontrola.

Određivanje prisustva CD44 receptora na površini AsPC-1 ćelija

AsPC-1 ćelije su sadene u mikrotitar ploču sa 96 bunarčića u gustini od 5 000 ćelija u 0,1 ml i ostavljene do 24 h u inkubatoru pre početka eksperimenta. Ispitivana jedinjenja su dodata u koncentracijama od 1 i 10 μM, nakon čega su mikrotitar ploče držane u inkubatoru tokom narednih 72 sata. Po isteku perioda tretmana, ćelije su

tripsinizirane i bojene anti-CD44-FITC antitelima (Miltenyl Biotec). Kao negativna kontrola korišćeni su bunarčići sa netretiranim ćelijama bojene anti-CD44-FITC antitelima, i bunarčići sa netretiranim ćelijama bojene anti-IgG-FITC antitelima (Miltenyl Biotec). Nakon dodavanja antitela ploče su držane u inkubatoru tokom 30 minuta. Višak nevezanih antitela odstranjen je nakon centrifugiranja ploče i odlivanja supernatanta okretanjem ploče na papirni ubrus. U svaki od bunarčića dodat je PBS u zapremini od 0,2 ml. Ćelije su analizirane na protočnom citometru.

Određivanje aktivnosti ispitivanih jedinjenja na 3D modelu

AsPC-1 ćelije su sadene u mikrotitar ploču sa U-profilisanim dnom (Corning). Ploča je držana u inkubatoru narednih 4 dana do formiranja sferoida. Ispitivana jedinjenja su dodata u koncentracijama od 1, 10 i 100 μM . Dužina tretmana sferoida iznosila je 8 dana, pri čemu je četvrtog dana polovina podloge zamenjena svežom sa odgovarajućom koncentracijom ispitivanog jedinjenja. Kao negativna kontrola korišćeni su netretirani sferoidi kojima je četvrtog dana takođe osvežena podloga. Promene u veličini tretiranih i netretiranih sferoida registrovane su snimanjem na Celigo citometru (Nexcelom Bioscience), korišćenjem Celigo softvera (Nexcelom Bioscience). Rezultati su predstavljeni kroz indeks rasta sferoida izračunatog za svaki od dana analize u odnosu na veličinu istih sferoida neposredno pre dodavanja ispitivanih jedinjenja.

3.8.2 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti, DPPH inhibicija

Sposobnost doniranja protona je testirana protokolom za određivanje aktivnosti neutralizacije radikala²³². Supstance su rastvore u DMSO-u a zatim razblažene u deset različitih koncentracija. Komercijalno dostupan DPPH radikal (Fluka Chemie AG Buchs) je rastvoren u metanolu u koncentraciji od $6,58 \cdot 10^{-5}$ M. U mikrotitar ploču sa 96 bunarčića 140 μL DPPH rastvora je uliveno 10 μL DMSO rastvora testiranih supstanci, kao i čist DMSO (10 μL) kao kontrola. Mikrotitar je ostavljen u mraku 30 min na sobnoj temperature. Nakon toga je merena apsorbanca na 517 nm korišćenjem Thermo Scientific Appliskan (TS Labor) spektrofotometra. Sva merenja su urađena tri puta. Inhibicija je izračunata na osnovu formule:

$$\text{Inhibicija(\%)} = \left(\frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorak}}}{A_{\text{kontrola}}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

gde su A_{uzorak} i A_{kontrola} apsorbanca rastvora uzorka i kontrolnog rastvora DPPH na 517 nm, respektivno. IC_{50} je izračunata za sve supstance na osnovu procenata neutralisanog DPPH radikala. Askorbinska kiselina je korišćena kao referentna supstanca (pozitivna kontrola) u koncentracijama od 50 do 500 mgmL^{-1} .

3.8.3 Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Za ispitivanje antimikrobnih svojstava ekstrakata gljiva korišćeno je četiri Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), četiri Gram-negativne bakterije: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), i tri gljivice: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) and *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Mikroorganizmi su gajeni na odgovarajućim podlogama, bakterije; agar HiMedia, Mumbai, India, gljivice: Sabouraud dextrose agar, Torlak. Svi korišćeni mikroorganizmi poreklom su iz američke kolekcije tipskih kultura, ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland). Kao kontrola su korišćeni amoksicilin, amikacin, flukonazol i nistatin.

Afar difuziona metoda

Antimikrobna aktivnost svi jedinjenja je određena agar difuzionom metodom²³³. U Petrijevu šolju (dijametar 90 mm) dodato je 22 ml hranljivog agara i 100 μL kulture mikroorganizama (10^6 ćelija po posudi za bakterije i 10^5 spora za gljivice). Na površinu svakog agara postavljeno je po tri filter diska prečnika 8 mm, koji su zatim natopljeni sa po 100 μL testirane supstance (1 mg/100 μL DMSO). Amikacin je korišćen kao kao pozitivna kontrola za antibakterijska ispitivanja a nistatin na antifungalna ispitivanja (30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L H}_2\text{O}$), dok je 100 μL vode i DMSO korišćeno kao negativna kontrola. Ista procedura je ponovljena na sve testirane mikroorganizme. Nakon inokulacije mikroorganizama, supstanci i kontrole Petri šolje su inkubirane 24 h na 37 °C za bakterije i 48 h na 24 °C za gljivice, nakon čega su izmereni prečnici zona inhibicije (zajedno sa filter diskovima). Svi testovi su urađeni u tri ponavljanja, za svako jedinjenje i svaki mikroorganizam.

Mikrodiluciona metoda

Da bi se preciznije odredila antibakterijska aktivnost ispitivanih jedinjenja primenjena je mikrodiluciona metoda²³⁴. Ispitivana je antimikrobna aktivnost ***h-TUK*** samo na dve bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) i jedan kvasac (*C. albicans*). Antimikrobno ispitivanje je izvedeno u 96-ćelijskim mikrotitar pločama (Sarstedt, Germany). Supstance su rastvorene u 5% vodenom rastvoru DMSO, i serijski razblaživane do koncentracija u rangu od 0,0097 to 20 mg/mL. Tetrazolijum hlorid (TTC, 0.0075%) je dodat mikrobiolškoj suspenziji kao indikator rasta. Za pozitivnu kontrolu rasta je korišćen 5% DMSO u odgovarajućem medijumu. Obe bakterijske vrste su inkubirane 24 h na 37 °C, dok je kvasac inkubiran 48 h na 32 °C. Nakon inkubacije minimalna baktericidna-fungicidna koncentracija supstance procenjavana je kao ona gde je došlo do izostanka rasta 99,9% ćelija početnog inokuluma. Najniža koncentracija koja inhibiše vidljivi rast testiranih sojeva mikroorganizama uočava se izostajanjem crvene boje. MBC predstavlja koncentraciju koja ubija više od 99,9% ćelija početnog inokuluma (dobija se na osnovu broja poraslih kolonija nakon subkultivacije na pločastom agaru) (NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards).

Najniža koncentracija svake supstance bez vidljivog rasta nakon ponovljene inkubacije predstavlja MBC/MFC (minimalna baktericidna/fungicidna koncentracija). Svi testovi su ponovljeni tri puta, a kao kontrola su korišćeni amoksicilin trihidrat i flukonazol, respektivno.

3.8.4 Vezivanje *dhTUK*_(8qc) za HSA

HSA iz koga su uklonjene masne kiseline (<0,007 % masih kiselina, $M_w = 66478$ Da) je dobavljen od kompanije Sigma, kao i kalijum-dihidrogenfosfat, dinatrijum-hidrogenfosfat, natrijum-hlorid i kalijum-hlorid korišćeni za pripremanje PBS. Rastvor HSA ($c = 1,91 \times 10^{-4}$ M) je pripremljen rastvaranjem precizno odmerene mase komercijalno dostupnog liofilizovanog HSA u sveže pripremljen pufer (1×PBS, pH 7.36), i čuvan je u frižideru u odmerenim zapreminama od 100 μ L. Rastvor 8_{bs} ($c = 6,87 \times 10^{-4}$ M) je pripremljen rastvaranjem potrebne količine supstance u DMSO-u, zbog svoje niske rastvorljivosti u puferu. Rastvor HSA je sveže pripremljen razblaživanjem osnovnog rastvora sa puferom (HSA konstantna koncentracija, $c = 7 \times 10^{-7}$ M) i titrisan sa rastvorom ***dhTUK***_{(8qc) da bi se izbeglo}

razblaživanje rastvora. Supstanca je dodavana u molarnim ekvivalentima: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 7 i 9. Posle svakog dodatka bez ostatka sistem je mešan i ostavljen 15 min da se uravnoteži pre merenja UV-Vis apsorpcije i snimanja emisionog spektra fluorescencije. Nakon dodatka svih 9 ekvivalenta supstance, krajnja zapremina DMSO nije prešla koncentraciju 2 % (v/v). Pokazano je da je dodatak 15 % DMSO nije doveo do strukturnih promena u goveđem serumu albuminu (BSA, *eng.* Bovine Serum Albumin), proteina strukturno sličnog HSA. Stoga je malo verovatno da će se konformacija HSA menjati sa nivoom dodatog DMSO u ovom eksperimentu.²³⁵ Milipore voda je korišćena za pripremanje pufera.

Merenje fluorescencije je vršeno na spektrofotometru Fluoromax-4 Jobin Yvon (Horiba Scientific, Japan), opremljenom sa Peltier elementima za kontrolu temperature i magnetnim mešanjem za kivetu, korišćenjem kvarcne ćelije dužine 1 cm i zapremine 4 mL. Pre snimanja fluorescentnog spektra razblaženi rastvor HSA je profiltriran kroz filtere sa veličinom pora od 0,23 μ m. Talasna dužina ekcitanije je na 280 nm, sa 5 nm prorezima. Emisioni spektar je snimljen u oblasti talasnih dužina od 300–450 nm, sa prorezima od 5 nm, u vremenu integracije od 0,1 s. Bazna linija PBS signala je oduzimana od svakog spektra.

Koncentracija HSA je bila konstanta, koncentracija **dhTUK**_(8qc) u opsegu od 0,35 do 6,3 μ M kod gašenja fluorescencije HSA. Odgovarajuće slepe probe, koje su podrazumevale odgovarajuće koncentracije **dhTUK**_(8qc) u puferu, su oduzete u cilju korekcije pozadinske fluorescencije. Uzevši u obzir da **dhTUK**_(8qc) apsorbuje svetlost koja odgovara ekscitacionim i emisionim talasnim dužinama, odnosno prisutan je fenomen unutrašnjeg filtera, urađena je korekcija fluorescentnih intenziteta za apsorpciju ekcitanione i reapsorpciju emitovane svetlosti, prema jednačini 3.3.:

$$F_{corr} = F_{obs} \times 10^{\left(\frac{A_{ex}-A_{em}}{2}\right)} \quad (3.3)$$

gde su F_{corr} u F_{obs} su ispravljeni i posmatrani intezitet fluorescencije, a A_{ex} i A_{em} su apsorbanca pobuđene i emisione talasne dužine²⁰². Korigovani inteziteti fluorescencije korišćeni su za sve proračune.

Određivanje konstante vezivanja je urađeno korišćenjem jednačine 3.4:

$$\log \frac{F_o - F}{F} = \log K_b + n \log [Q] \quad (3.4)$$

gde F_0 i F imaju isto značenje kao u prethodnoj jednačini; K_b je konstanta vezivanja, a n je broj nezavisnih vezujućih mesta molekula.

Termodinamički parametri vezivanja $\Delta h_{TUK(8qc)}$ za HSA, su određeni pomoću jednačine 3.5:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3.5)$$

gde je R - univerzalna gasna konstanta; T apsolutna temperatura; K_b - konstanta vezivanja na određenoj temperaturi.

UV-Vis spektar je snimljen na GBC Cintra6 UV/Vis spektrofotometru, korišćenjem kvarcnih ćelija učine 1 cm i zapremine 4 mL. Svi spektri su snimljeni u intervalu talasne dužine 250–450 nm na sobnoj temperaturi uz oduzimanje bazne linije čistog PBS.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ove disertacije sintetisane su dve grupe jedinjenja, *mh*-(T)UK i *dh*-(T)UK, kojima je testirana biološka i antioksidativna aktivnost, određena struktura u rastvoru, a za supstance koje su dobijene u obliku kristala pogodnih za RSA i u čvrstom stanju. Osim toga izvršena su teorijska izračunavanja elemenata geometrije, fizičko-hemijskih svojstava kao i korelacija svojstava i aktivnosti sa strukturom sintetisanih jedinjenja.

4.1. Strukturna i spektralna analiza *mh*-UK

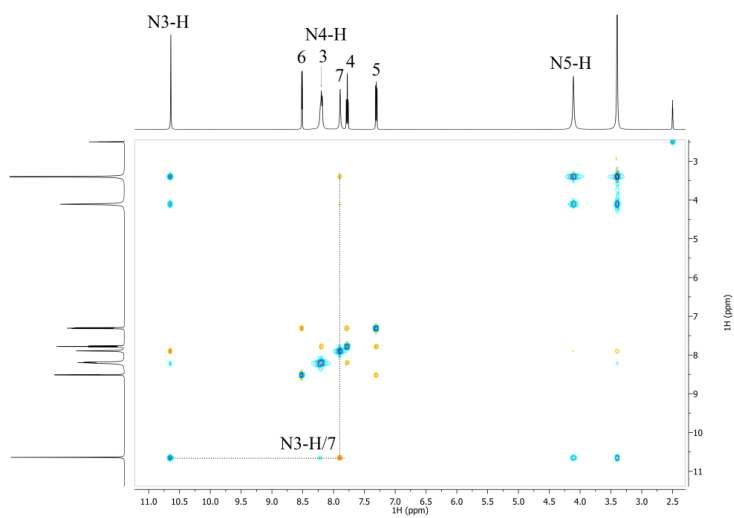
U cilju sistematičnog ispitivanja strukturnih karakteristika *mh*-UK u rastvoru, sintetisana serija od jedanaest monosupstituisanih dhO upotpunjena je sintezom dva literaturno poznata jedinjenja, 2-(fenilmetilen) dihidrazid ugljene kiseline (*mhUK*_(ba))⁵⁴ i 2-(1-feniletilden) dihidrazid ugljene kiseline (*mhUK*_(af))⁵⁴. Na osnovu teorijskih i eksperimentalnih podataka u nastavku teksta diskutovano je o uticaju supstituenta na azometiskom atomu ugljenika na ponašanje *mh*-UK u rastvoru.

Na osnovu podataka dobijenih iz IR spektara *mh*-UK zaključeno je da intezivne trake u oblasti 1679-1696 cm⁻¹, koje su pripisane vibracijama istezanja ν (C=O) grupe, i δ (N-H) i ν (C-N) vibracijama, potiču od doprinosa amidnih traka, amid (I) i amid (II). Apsorpcije između 1604-1640 cm⁻¹ su rezultat vibracija rastezanja, ν (C=N), imino grupe, dok široke trake u oblasti 3198-3316 cm⁻¹ potiču od ν (NH₂) vibracija²³⁶.

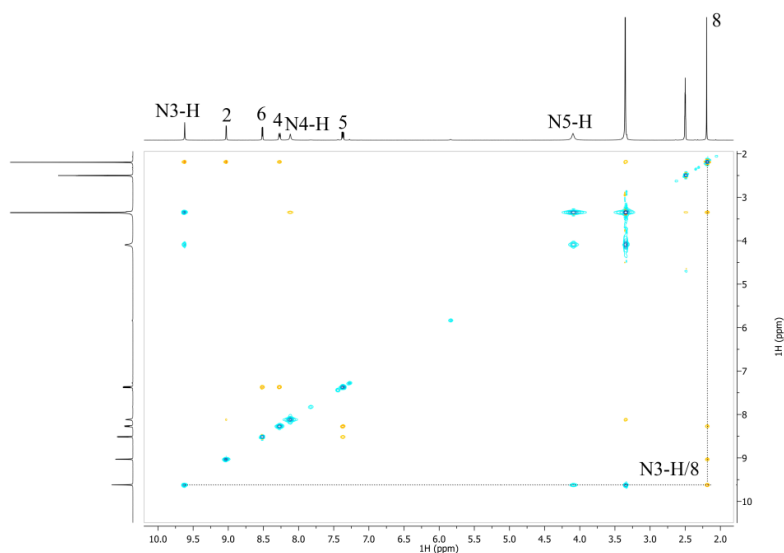
Poznato je da hidrazoni zbog mogućnosti rotacije oko C=N veze mogu zauzimati *E*- i *Z*- konfiguraciju,¹⁵ a tadode da jedinjenje *mhUK*_(sal), usled građenja intramolekulske vodonične veze u DMSO, zauzima stabilniju konformaciju *E* oblika⁵². U ovoj disertaciji analiza NMR hemijskih pomeranja izvršena je u cilju konformacione analize i određivanja postojanja intramolekulskih vodoničnih mostova, kao i njihovog uticaja na solvatohromizam i fotohromizam ispitivanih *mh*-UK.

Hemijska okolina protona na atomu azota **N3** (tj. **N2** za jedinjenja *mhUK*_(sal), *mhUK*_(ba) i *mhUK*_(af), Tabela P7.A1) je različita u slučaju *E* i *Z* izomera. Hemijski pomeraji protona na **N3** atomu azota kod *mh*-UK nalaze se u oblastima 10,64-10,76 (*mhUK*_(2pyc), *mhUK*_(3pyc), *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(8qc), 9,62-9,76 (*mhUK*_(2pya), *mhUK*_(3pya), *mhUK*_(4pya)) i 10,84-10,88 (*mhUK*_(2qc) i *mhUK*_(8OH2qc), *mhUK*_(4pyc)), dok se za **N2** atom

vodonika ($mhUK_{(ba)}$, $mhUK_{(sal)}$) nalaze u oblastima 10,30-10,40 i na pomeraju 9,50 ppm za jedinjenje $mhUK_{(af)}$. Najveće odstupanje uočeno je kod jedinjenja $mhUK_{(2pyb)}$ kod koga se proton na **N3** atomu azota nalazi na hemijskom pomeraju od 13,20 ppm. U cilju ispitivanja konformacije mh -UK u rastvoru snimljeni su 2-D NOESY spektri, a rezultati su potvrdili da sva jedinjenja, osim $mhUK_{(2pyb)}$ zauzimaju stabilnu konformaciju *E*-oblika u rastvoru DMSO-a. U nastavku teksta prikazana je detaljna strukturna karakterizacija izabranih jedinjenja $mhUK_{(2pyc)}$, $mhUK_{(3pya)}$ i $mhUK_{(2pyb)}$.



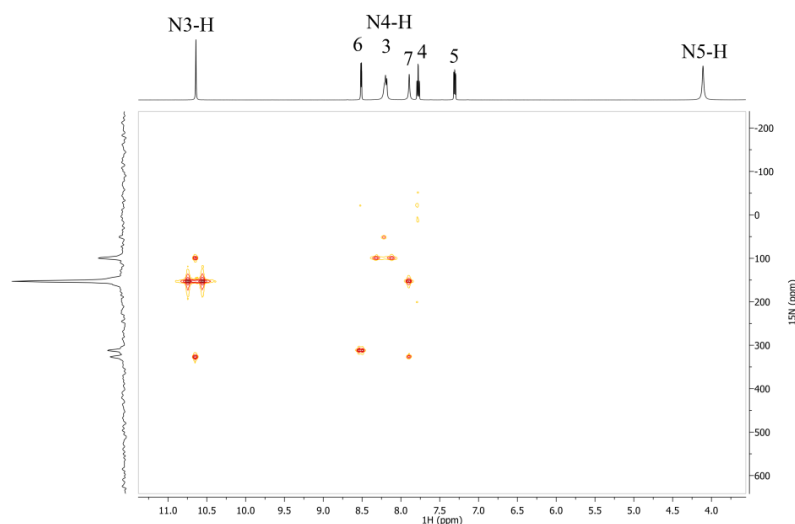
Slika 4. 1 NOESY spektar $mhUK_{(2pyc)}$ snimljen u DMSO- d_6



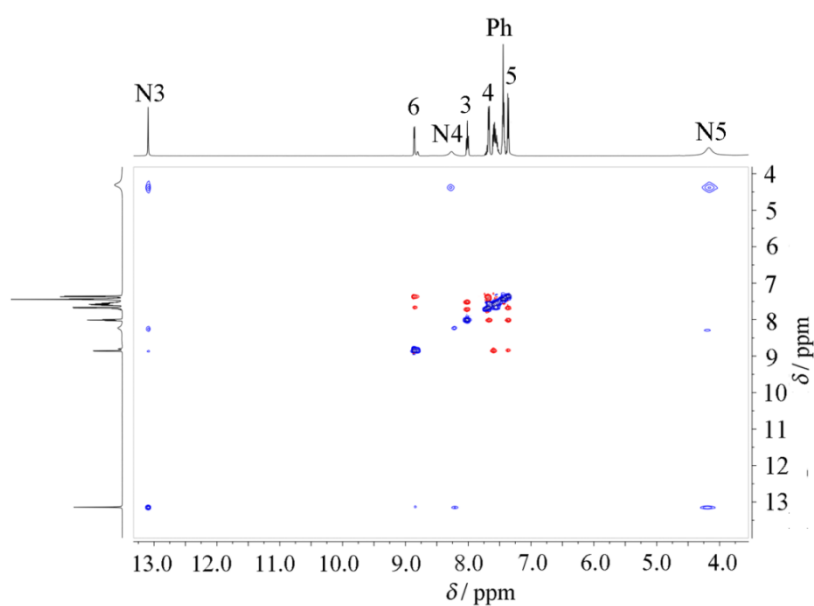
Slika 4. 2 NOESY spektar $mhUK_{(3pya)}$ snimljen u DMSO- d_6

Na osnovu unakrsnih korelacija protona na **C7** i **N3** atomu za $mhUK_{(2pyc)}$, i **C8** i **N3** za $mhUK_{(3pya)}$, uočenih u 2-D NOESY spektrima (Slika. 4.1 i 4.2), potvrđeno je da

ova jedinjenja zauzimaju *E* konfiguraciju. Dodatni dokazi su dobijeni iz 2D ^{15}N -HMBC spektra (Slika 4.3) za supstancu ***mhUK***_(2pyc) gde nije uočena povezanost između protona na **C7** i **N1** azota.



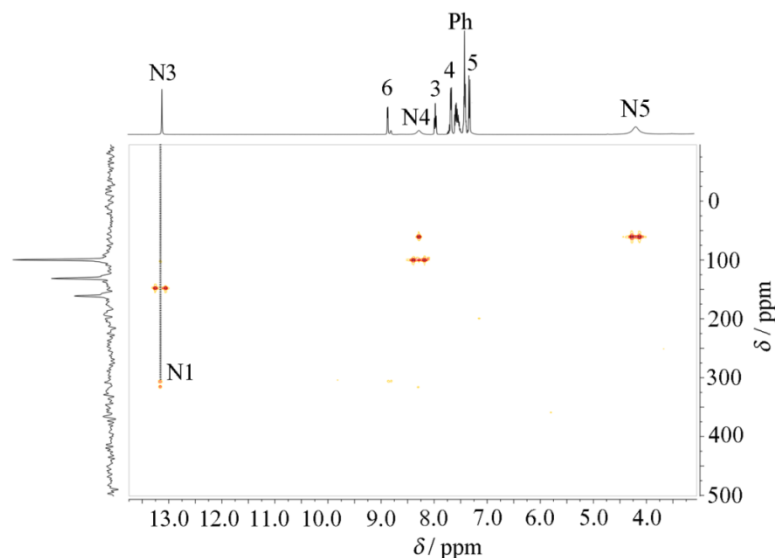
Slika 4.3 ^1H - ^{15}N HMBC spektar ***mhUK***_(2pyc) snimljen u $\text{DMSO-}d_6$



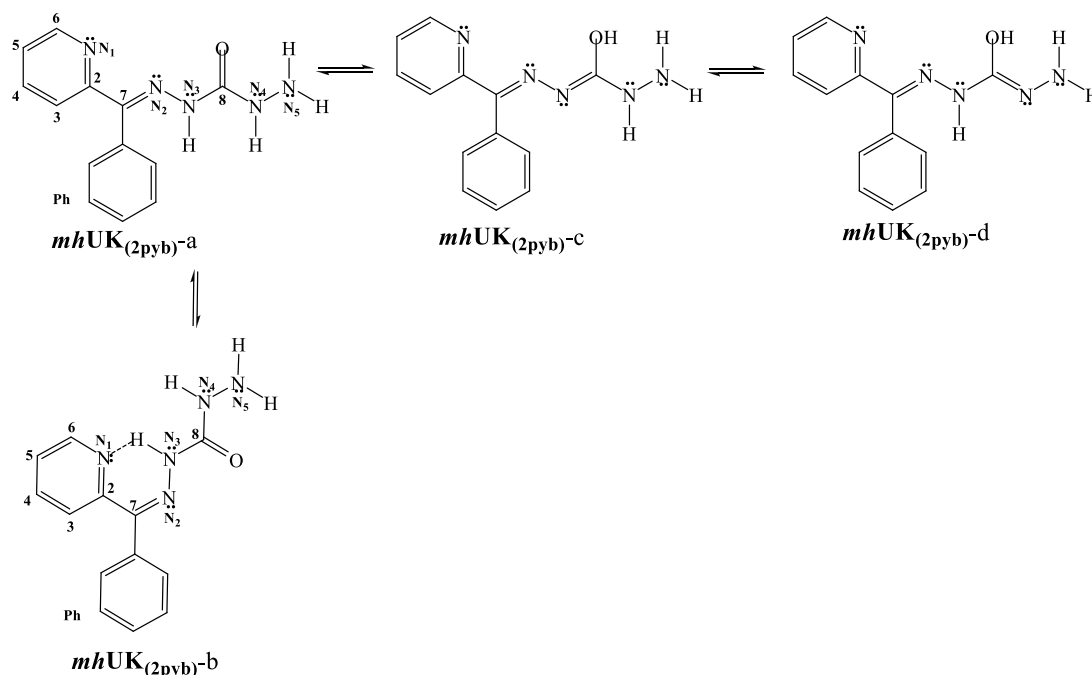
Slika 4.4 NOESY spektar ***mhUK***_(2pyb) snimljen u $\text{DMSO-}d_6$

Prethodno je opisano da 2-benzoilpiridin semikarbazon, analog jedinjenja ***mhUK***_(2pyb), može zauzimati (*E*)-²³⁷ i (*Z*)-²³⁸ konformaciju u DMSO-u. Slično ponašanje je uočeno i kod jedinjenja ***mhUK***_(2pyb). Korelacija između **N3** protona i fenilnog jezgra u

ovom jedinjenju ukazuje da se *mhUK*_(2pyb) javlja kao Z-izomer (Slika 4.4) u rastvoru DMSO-a, što je takođe potvrđeno korelacijom signala azotovog atoma (N1) i N3 protona u 2D ¹⁵N HMBC spektru (Slika 4.5).



Slika 4.5 ¹H-¹⁵N HMBC spektar *mhUK*_(2pyb) snimljen u DMSO-*d*₆



Slika 4.6 Ravnoteža tautomernih oblika *mhUK*_(2pyb) u rastvoru DMSO-a

Pretpostavlja se da je formiranje vodonične veze između N3 protona i aromatičnog azota u 2-piridinil grupi kod Z-izomera jedinjenja *mhUK*_(2pyb) jedan od razloga pomeraja N3 protona na 13,20 ppm (Slika 4.6, *mhUK*_{(2pyb)-b})²³⁹.

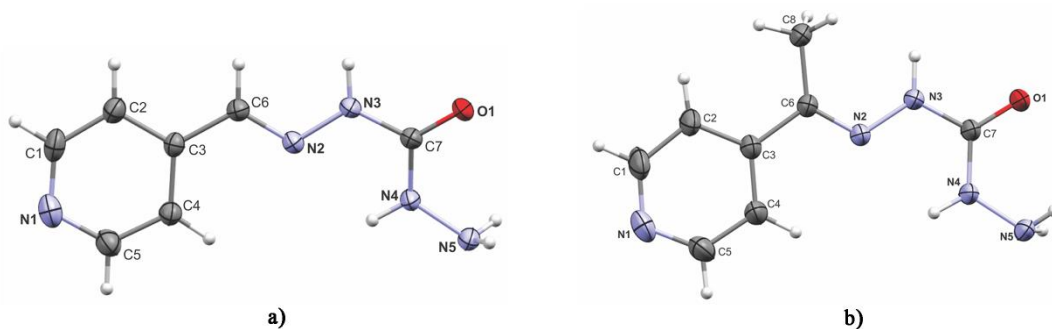
4.1.1. Rendgenska strukturna analiza

Kristalografski podaci i rezultati utajčnjavanja za jedinjenja *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(4pya) dati su u Tabeli.4.1. Molekulske strukture sa odgovarajućim oznakama atoma date su na Slici 4.7. Oba jedinjenja kristališu u monokličnim centrosimetričnim $P2_1/c$ prostornim grupama sa četiri molekula u jediničnoj ćeliji.

Tabela 4. 1 Kristalografski podaci za jedinjenja *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(4pya)

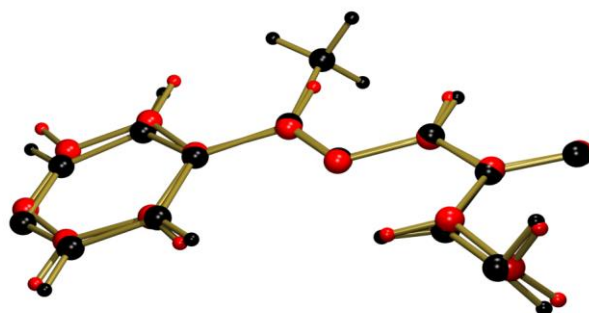
	<i>mhUK</i> _(4pyc)	<i>mhUK</i> _(4pya)
Hemijska formula	C ₇ H ₉ N ₅ O	C ₈ H ₁₁ N ₅ O
M_r	179,19	193,22
Kristalni sistem, prostorna grupa	Monociklični, $P2_1/c$	Monociklični, $P2_1/c$
a, b, c (Å)	8,5421 (7), 9,7341 (5), 10,4508 (7)	8,3793 (6), 9,9529 (4), 11,1145 (6)
β (°)	97,759 (7)	91,626 (6)
V (Å ³)	861,02 (10)	926,56 (9)
Z	4	4
μ (mm ⁻¹)	0,10	0,82
Veličina kristala (mm)	0,49 × 0,40 × 0,19	0,46 × 0,33 × 0,28
Korekcija apsorpcije	Multi-scan CrysAlis PRO ²⁰⁸	
T_{min}, T_{max}	0,985, 1,000	0,988, 1,000
Broj merenja, nezavisne i izmerene [$I > 2\sigma(I)$] refleksije	3555, 1938, 1312	5963, 1806, 1478
R_{int}	0,020	0,024
θ values (°)	$\theta_{max} = 29,0, \theta_{min} = 2,9$	$\theta_{max} = 72,5, \theta_{min} = 5,3$
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)], wR(F^2), S$	0,048, 0,109, 1,06	0,042, 0,122, 1,08
Broj parametara	134	144
Broj ograničenja	0	0
Težinska šema	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0424P)^2 + 0,0087P]$	$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0569P)^2 + 0,1592P]$
	gde je $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$	gde je $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
Tretman H-atoma	H atomi su tretirani mešavinom nezavisnog i ograničenog utanačavanja	
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0,11, - 0,18	0,14 - 0,15

Izabrane dužine veza, kao i uglova između pojedinih veza za ispitivana jedinjenja dati su u Tabeli 4.2. Detaljnim poređenjem strukturnih karakteristika jedinjenja $mhUK_{(4pyc)}$ i $mhUK_{(4pya)}$ nisu uočene značajne razlike u njihovoj geometriji što je potvrđeno preklapanjem molekulskih struktura ispitivanih jedinjenja (Slika 4.8).



Slika 4. 7 ORTEP²¹¹ prikaz struktura dobijenih na osnovu RSA analize: a) $mhUK_{(4pyc)}$ i b) $mhUK_{(4pya)}$ sa oznakama atoma (elipsoidi su prikazani sa verovatnoćom od 50 % i H atomi su prikazani kao sfere proizvoljnog prečnika)

Elementi geometrije prikazani u Tabeli 4.2 ukazuju da su strukture oba jedinjenja ($mhUK_{(4pyc)}$ i $mhUK_{(4pya)}$) neznatno odstupaju od planarnosti što je potvrđeno na osnovu vrednosti torzionog ugla N5-N4-C7-N3 (Slika 4.7) koji nije veći od 8,53 (17)°. Odsustvo metil supstituenta na položaju **C6** u jedinjenju $mhUK_{(4pyc)}$ doprinosi promenama u dužini veza i uglova uglavnom u delu C3-C6-N2 strukture (Tabela 4.2), ali ovi efekti su mali i nalaze u granicama statističke značajnosti. Kao ilustracija, maksimalna razlika može se uočiti poređenjem C3-C6 dužina veza (1,458 (2) Å u $mhUK_{(4pyc)}$ i 1,483 (2) Å u $mhUK_{(4pya)}$) i C2-C3-C6 uglova veze (120,41 (14)° i 115,42 (14)°, respektivno).



Slika 4. 8 Strukturno preklapanje $mhUK_{(4pyc)}$ (crvena) sa $mhUK_{(4pya)}$ (crna)

Tabela 4. 2 Izabrane dužine veza (Å) i uglova(°) *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(4pyc)

<i>mhUK</i> _(4pyc)					
<i>veza</i>		<i>ugao</i>		<i>torzioni ugao</i>	
O1—C7	1,2308 (17)	C6—N2—N3	116,87	C6—N2—N3—C7	-177,00
N2—C6	1,274 (2)	N2—N3—C7	119,85	N5—N4—C7—O1	5,5 (3)
N2—N3	1,3646 (17)	C7—N4—N5	121,43	N5—N4—C7—N3	-175,30
N3—C7	1,367 (2)	O1—C7—N4	123,89	N2—N3—C7—O1	-174,15
N4—C7	1,3425 (19)	O1—C7—N3	120,41	N2—N3—C7—N4	6,7 (2)
N4—N5	1,4098 (19)	N4—C7—N3	115,69	N3—N2—C6—C3	-174,73
C6—C3	1,458 (2)	N2—C6—C3	120,41	C2—C3—C6—N2	177,24(16)
C3—C2	1,383 (2)	C2—C3—C4	117,12	C4—C3—C6—N2	0,2 (3)
C3—C4	1,390 (2)	C2—C3—C6	120,51	C2—C3—C4—C5	-1,3 (2)
N1—C1	1,323 (2)	C4—C3—C6	122,31	C6—C3—C4—C5	175,76 (17)
N1—C5	1,335 (2)	C1—N1—C5	115,66	C4—C3—C2—C1	2,1 (2)
C4—C5	1,368 (2)	C5—C4—C3	118,67	C6—C3—C2—C1	-175,07
C2—C1	1,378 (2)	C1—C2—C3	119,35	C1—N1—C5—C4	2,8 (3)
		N1—C5—C4	124,94	C3—C4—C5—N1	-1,2 (3)
		N1—C1—C2	124,19	C5—N1—C1—C2	-1,9 (3)
				C3—C2—C1—N1	-0,5 (3)
<i>mhUK</i> _(4pya)					
<i>veza</i>		<i>ugao</i>		<i>torzioni ugao</i>	
O1—C7	1,2285 (18)	C6—N2—N3	118,44	C6—N2—N3—C7	177,51 (15)
N2—C6	1,284 (2)	N2—N3—C7	118,72	N5—N4—C7—O1	8,3 (3)
N2—N3	1,3678 (18)	C7—N4—N5	121,22	N5—N4—C7—N3	-171,47
N3—C7	1,3702 (19)	O1—C7—N4	123,24	N2—N3—C7—O1	177,27 (15)
N4—C7	1,345 (2)	O1—C7—N3	120,75	N2—N3—C7—N4	-2,9 (2)
N4—N5	1,406 (2)	N4—C7—N3	116,01	N3—N2—C6—C3	176,53 (14)
C6—C3	1,483 (2)	N2—C6—C3	115,42	N3—N2—C6—C8	-2,5 (3)
C6—C8	1,497 (2)	N2—C6—C8	124,48	N2—C6—C3—C2	-173,38
C3—C2	1,383 (2)	C3—C6—C8	120,10	C8—C6—C3—C2	5,7 (3)
C3—C4	1,392 (2)	C2—C3—C4	116,84	N2—C6—C3—C4	3,9 (2)
N1—C1	1,325 (3)	C2—C3—C6	122,01	C8—C6—C3—C4	-177,02
N1—C5	1,330 (3)	C4—C3—C6	121,09	C2—C3—C4—C5	0,2 (3)
C4—C5	1,374 (3)	C1—N1—C5	114,98	C6—C3—C4—C5	-177,19
C2—C1	1,384 (3)	C5—C4—C3	118,91	C4—C3—C2—C1	-1,4 (3)
		C1—C2—C3	119,0	C6—C3—C2—C1	176,04 (18)
		N1—C5—C4	125,2	C1—N1—C5—C4	-1,6 (4)
		N1—C1—C2	125,0	C3—C4—C5—N1	1,3 (4)
				C5—N1—C1—C2	0,3 (4)
				C3—C2—C1—N1	1,1 (4)

4.1.2 Optimizovane geometrije *mh*-UK

h-UK mogu postojati u keto ili enol tautomernom obliku, a takođe mogu zauzimati *E* ili *Z* konfiguraciju usled mogućnosti rotacije oko C = N dvostruke veze. Oba izomera mogu biti prisutna u rastvoru i njihov odnos zavisi od jačine vodoničnih veza i primenjenih spoljašnjih uicaja, kao i od svojstva okruženja. Pokazano je da stanje geometrijske ravnoteže može biti značajno određeno učešćem hidroksilne grupe kada se nalazi u *o*- položaju u odnosu na azometinsku grupu⁵³. S'obzirom da *E*- i *Z*-izomeri mogu pokazivati različite hemijska svojstva i biološku aktivnost¹⁴, a prisustvo hidroksilnih grupa doprinosi povećanju antioksidativne aktivnosti²³⁶, u skladu sa tim, *E/Z* izomerizacija i keto-enol tautomerija jedinjenja predstavljaju bitne parametre koji je potrebno ispitati radi potpunijeg sagledavanja korelacije njihovih svojstava/aktivnosti i strukture.

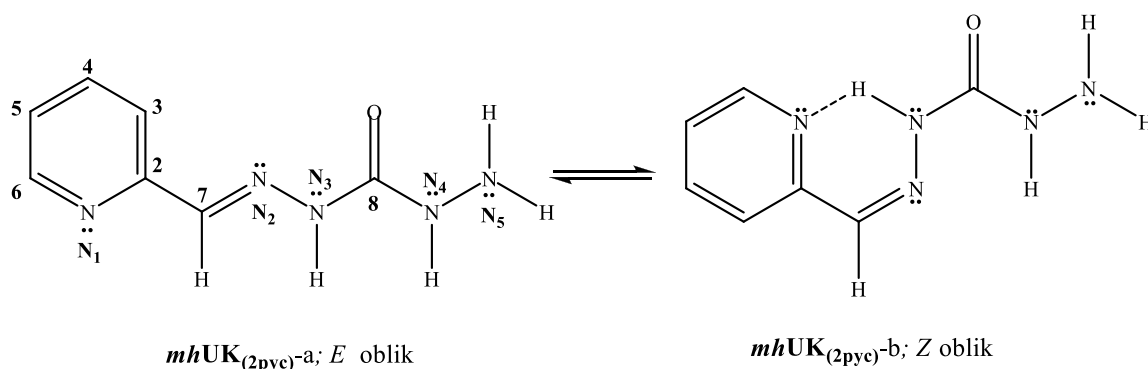
U nastavku rada bilo je od interesa izvršiti strukturnu optimizacija ispitivanih *mh*-UK, kao i upoređivanje sa kristalografskim podacima dobijenim za jedinjenja *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(4pya) kako bi se potvrdila validnost teorijskih izračunavanja. Rezultati teorijskih proračuna na MP2/6-311G(d,p) nivou prikazani su u Tabelama 4.3 i 4.4.

Tabela 4. 3 Energije optimizovanih struktura *mh*-UK

Jedinjenje / izomer	Energija	ΔE (kcal)
<i>mhUK</i> _(ba) / <i>E</i>	-603,2831718	-2,31
<i>mhUK</i> _(ba) / <i>Z</i>	-603,279484	0,00
<i>mhUK</i> _(sal) / <i>E</i>	-680,2559807	-9,69
<i>mhUK</i> _(sal) / <i>Z</i>	-680,2405457	0,00
<i>mhUK</i> _(2pyc) / <i>E</i>	-621,0584152	0,00
<i>mhUK</i> _(2pyc) / <i>Z</i>	-621,0618412	-2,15
<i>mhUK</i> _(3pyc) / <i>E</i>	-621,0562028	
<i>mhUK</i> _(4pyc) / <i>E</i>	-621,0563581	
<i>mhUK</i> _(af) / <i>E</i>	-642,4700374	0,00
<i>mhUK</i> _(af) / <i>Z</i>	-642,4706955	-0,41
<i>mhUK</i> _(2pya) / <i>E</i>	-660,3772243	0,00
<i>mhUK</i> _(2pya) / <i>Z</i>	-660,3780726	-0,53
<i>mhUK</i> _(3pyc) / <i>E</i>	-660,3725635	-1,82
<i>mhUK</i> _(3pyc) / <i>Z</i>	-660,3696592	0,00
<i>mhUK</i> _(4pyc) / <i>E</i>	-660,3731491	-2,17
<i>mhUK</i> _(4pyc) / <i>Z</i>	-660,3696854	0,00
<i>mhUK</i> _(8qc) / <i>E</i>	-774,6807102	
<i>mhUK</i> _(2qc) / <i>E</i>	-774,6834456	
<i>mhUK</i> _(8OH2qc) / <i>E</i>	-849,9142461	

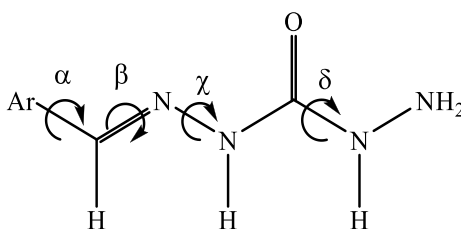
Energije struktura optimizovanih u DMSO-u su date u Tabeli 4.3 a odabrani geometrijski parametri, uključujući dužine veza, uglove veza i torzioni uglovi su prikazani u Tabeli 4.4. Slični rezultati su dobijeni za izračunavanja u gasnoj fazi.

Prema rezultatima iz Tabele 4.3 indikativno je da je *E*- izomer stabilniji za veći broj *mh*-UK sa izuzetkom tri jedinjenja, tj. *mhUK*_(2pyc), *mhUK*_(af) i *mhUK*_(2pya) koji po teorijskim proračunima zauzimaju *Z* konformacije. Jedinjenja *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) kod kojih je prisutan 2-piridinil prsten na azometinskom ugljeniku pokazala su nešto veću stabilnost u *Z* obliku (Slika 4.9). Ovi rezultati ukazuju da većoj stabilnosti *Z* oblika doprinose dva efekta: intramolekulska vodonična veza, kao glavni efekat zapažen u slučaju *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) i sterni uticaj metil grupe u manjem obimu koji koji je primećen kod *mhUK*_(af) i *mhUK*_(2pya).



Slika 4. 9 *E/Z* izomerizacija *mhUK*_(2pyc) u rastvoru DMSO-a

Kako bi se kompletirala potpuna slika o geometrijama ispitivanih *mh*-UK takođe su vršene sistematske analize energija u odnosu na strukturne varijacije elemenata geometrije, promenu vrednosti torzionih uglova definisanih rotacijom izvan ravnih supstituenta u pogledu imino veze (Šema 4.1), kao i rotacije oko jednostrukih veza. Na Šemi 4.1 su dati izmereni uglovi od interesa potrebni za analizu geometrijskih karakteristika ispitivanih jedinjenja.



Šema 4. 1 Torzioni uglovi *mh*-UK korišćeni u konformacionoj analizi

Elementi optimizovanih geometrija ispitivanih jedinjenja, dobijeni korišćenjem MP2/6-311G (d, p) metode za *E* i *Z* izomere su dati u Tabelama 4.4 i P7.A2. Na osnovu prikazanih vrednosti može se uvideti da geometrijske karakteristike ispitivanih *E/Z* izomera prate odgovarajući trend promene elemenata geometrije u odnosu na elektronske efekte supstituenta prisutnih na imino delu molekula. Razmatranje promena torzionih uglova α , β , χ i δ (Tabela 4.4 i P7.A2) ukazuje da uvođenje supstituenta na azometinskom ugljeniku izaziva male promene analiziranih vrednosti.

Značajna promena dužine za C2-C7 vezu (C3-C7; C4-C7; C7-C9 ili C2-C9) ukazuje da dva suprotna elektron-akceptorska efekta arilidenske strukture i karbonilne grupa uzrokuju odgovarajuće geometrijsko prilagođavanje strukture kao odgovor na elektron deficitarno okruženje. U skladu sa tim normalna polarizacija karbonilne grupe je umanjena što je praćeno smanjenje dužine te veze, a kao posledica proširene π, π -delokalizacija dolazi do smanjenje dužine veze C2-C7, koji predstavlja deo ariliden imino konjugovanog sistema. Analizirajući elemente geometrije jedinjenja $mhUK_{(sal)}$ i $mhUK_{(8OH2qc)}$ i uzimajući u obzir jedinjenja $mhUK_{(ba)}$ i $mhUK_{(2qc)}$ može se zaključiti da uvođenje elektron-donorskog supstituenta dovodi do smanjenje kako dužine C2-C7 veze tako i karbonilne grupe. Prisustvo hidroksilne grupe koja ima jak elektron-donorski efekat kompenzuje jak elektron-akceptorski efekat "aza" grupe i mali imino azota, što ima za posledicu povećanje π -rezonantne interakcije i minimalno smanjenje dužine C2-C7 veze.

Suprotan trend je primećen u slučaju jedinjenja koja u svom sastavu sadrže piridinsko jezgro sa azotom kao elektron-akceptorskim supstituentom u odnosu na nesupstituisane $mhUK_{(ba)}$ i $mhUK_{(af)}$. Rezultati ukazuju da promena dužina veze isključivo zavisi od induktivnog efekta "aza" grupe, koji je najveći u slučaju 2-piridinil grupe ($mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$) što utiče značajnije na povećanje dužine C2-C7 veze u poređenju sa 3- i 4-piridinil susptitisanim jedinjenjima.

Izuzetak je primećen kod jedinjenja $mhUK_{(4pyc)}$ gde se uočava da efekat usmerenog elektron-privlačnog efekta "aza" grupe i sternog efekta metil grupe na azometinskom ugljeniku dovodi do manjeg povećanja veze u odnosu na $mhUK_{(3pyc)}$. Osim toga primećeno je da sterna efekat prisutne metil grupe na azometinskom ugljeniku uzrokuje poremećaj π -elektron delokalizacije što ima za posledicu povećanje dužine C2-C7 veze. Kod *Z* oblika dobjeni rezultati su suprotni sa zanemarljivo malom promenom

Tabela 4. 4 Geometrijski podaci za stabilniji oblik *E* izomera *mh*-UK dobijen MP2/6-311G(d,p) metodom

Jedinjenja/parametri	<i>mhUK</i> (ba)	<i>mhUK</i> (sal)	<i>mUK</i> (2pvc)	<i>mhUK</i> (3pvc)	<i>mhUK</i> (4pvc)	<i>mhUK</i> *** (4pvc)	<i>mhUK</i> (af)	<i>mhUK</i> (2pva)	<i>mhUK</i> (3pva)	<i>mhUK</i> (4pva)	<i>mhUK</i> *** (4pva)	<i>mhUK</i> (8qc)	<i>mhUK</i> (2qc)	<i>mhUK</i> (8OH2qc)
Dužine veza (Å°)														
H-C7(C9*)	1,096	1,093	1,093	1,094	1,094	0,930						1,091	1,093	1,093
H-N3(N2**)	1,016	1,012	1,014	1,013	1,014	0,884	1,014	1,012	1,013	1,012	0,910	1,014	1,014	1,014
H-N4(N3**)	1,011	1,007	1,007	1,007	1,007	0,871	1,011	1,007	1,015	1,007	0,861	1,007	1,007	1,007
C2-C7(C9*)	1,462	1,459	1,471				1,477	1,491					1,471	1,469
C3-C7				1,466					1,489					
C4-C7					1,468	1,458				1,485	1,483			
C7-C9												1,468		
C7-C8							1,506	1,501	1,516	1,504	1,497			
C7(9*)-N2(N1**)	1,293	1,278	1,274	1,274	1,275	1,274	1,301	1,281	1,300	1,281	1,284	1,276	1,274	1,275
N2(N1**)-N3(N2**)	1,366	1,350	1,347	1,349	1,344	1,365	1,372	1,349	1,350	1,349	1,368	1,351	1,344	1,343
N3(N2**)-C(=O)	1,394	1,384	1,387	1,385	1,389	1,367	1,398	1,387	1,390	1,389	1,370	1,383	1,388	1,389
N4(N3**)-C(=O)	1,398	1,369	1,370	1,371	1,368	1,343	1,399	1,371	1,390	1,370	1,345	1,373	1,369	1,369
C=O	1,221	1,215	1,214	1,214	1,214	1,231	1,220	1,214	1,231	1,213	1,228	1,215	1,214	1,213
Uglovi veza(θ)														
C2(C3,C4,C7)- C7(C9*)-N2(N1**)	120,8	120,3	120,9	120,8	120,3	120,41	115,6	115,8	117,9	115,3	115,42	120,6	120,6	120,3
C7(C9*)-N2(N1**)- N3(N2**)	116,1	119,7	117,7	117,6	117,9	116,87	116,6	118,4	118,0	118,7	118,44	117,2	117,8	118,0
N2(N1**)-N3(N2**)- C(=O)	118,4	118,4	119,7	119,7	119,6	119,85	117,2	119,2	118,8	118,9	118,72	119,8	119,6	119,4
C(=O)-N4(N3**)- N5(N4**)	116,5	120,6	120,6	120,4	120,80	121,22	116,5	120,5	119,3	120,6	121,43	120,2	120,5	120,5
Torzioni uglovi (θ)														
α	178,3	179,7	179,8	179,7	179,8	-174,73	179,1	179,8	-178,4	-179,0	176,53	179,7	179,7	179,7
β	165,3	175,3	177,7	177,5	177,8	-177,00	171,6	177,4	178,7	178,6	177,51	176,4	177,9	178,2
χ	2,6	1,8	-0,5	-0,7	-0,5	-174,15	7,2	0,7	0	4,1	177,27	-0,2	-1,5	-1,5
δ	8,9	7,8	7,7	7,9	7,2	5,5	9,7	8,0	0	8,3	8,3	8,4	7,4	7,4

* za *mhUK*_(8qc), *mhUK*_(2qc) i *mhUK*_(8OH2qc); ** za *mhUK*_(ba), *mhUK*_(sal) i *mhUK*_(af); *** kristalografski podaci korišćeni za poređenje sa teorijskim proračunima

svih elemenata geometrije, umerenim razlikama u dužini **C7(9*)-N2(N1**)** veze kao i malim odstupanjima od planarnosti. Odstupanje od planarnosti se povećava sa porastom elektron-akceptorskih sposobnosti ariliden supstituenta. Poređenje teorijski predviđenih geometrija i eksperimentalno dobijenih rezultata iz kristalografske studije, ukazuje na dobro slaganje dobijenih rezultata i potvrđuje validnost primenjene metodologije.

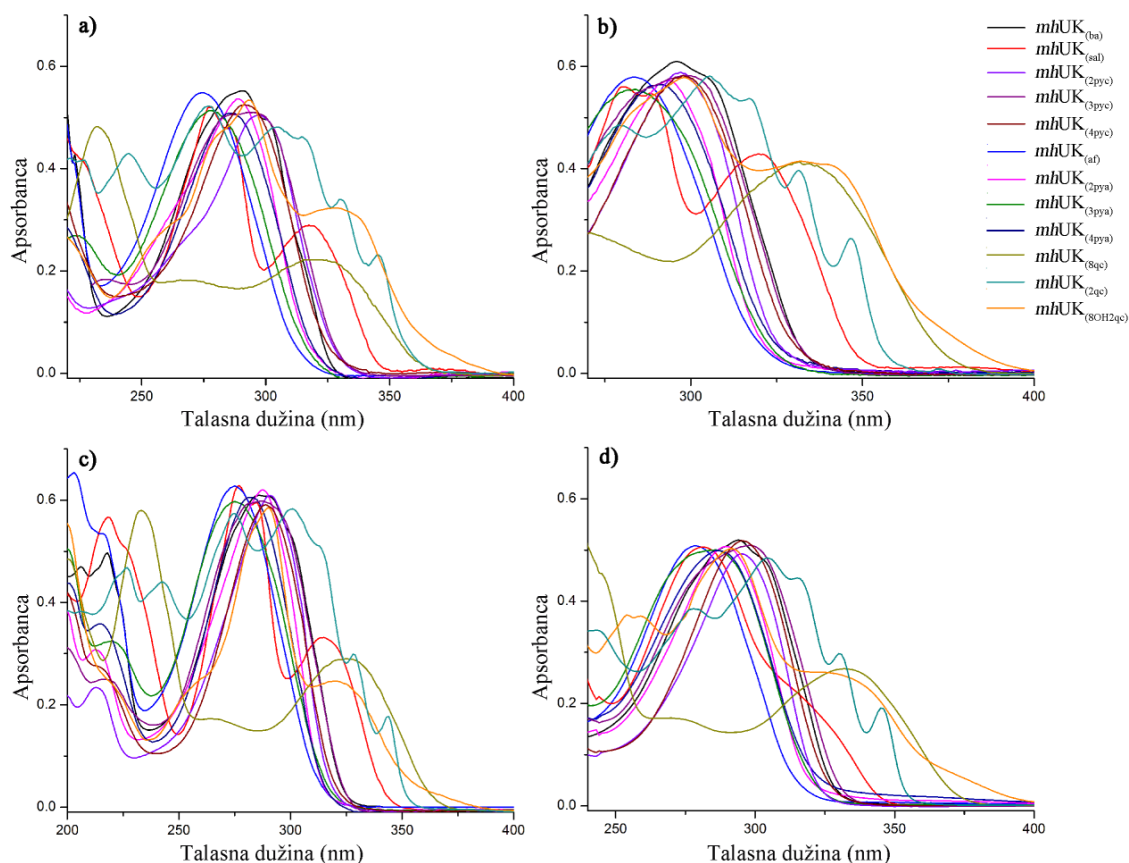
4.2 UV-Vis spektralna analiza

4.2.1 Solvatohromizam *mh*-UK

Strukturno proučavanje jedinjenja usko je povezano sa konformacionom studijom, uključujući geometriju i fenomen izomerizacije/tautomerizacije, a generalno brojna fundamentalna molekulska svojstva su osnov za uspostavljanje kvantitativnog odnosa svojstava i strukture ispitivanih jedinjenja (QSPR, *eng.* Quantitative Structure–Activity Relationship). UV-Vis je jednostavna i vredna spektroskopska metoda koja se često koristi za analizu stanja elektronske strukture tokom prelaza, izomerizacije i tautomerne ravnoteže, tj. koristi se za proučavanje mehanizama procesa tautomerizacije i izomerizacije. Primenjivost UV-Vis spektroskopije za ispitivanje navedenih fenomena se zasniva na različitosti spektralnih svojstava odgovarajućih izomernih/tautomernih oblika, osetljivost tautomerne ravnoteža na efekte rastvarača, dipolarnosti/polarizabilnosti i baznosti/kiselosti medijuma, efekte supstituenata, kao i temperature²⁴⁰.

Apsorpcioni spektri ispitivanih *mh*-UK (sa izuzetkom *mhUK*_(2pyb)) ispitivani su u dvadeset dva rastvarača različitih svojstava, a karakteristični spektri su prikazani na Slici 4.10. Svi UV-Vis spektri su snimani pri koncentraciji od $1 \cdot 10^{-5}$ M i predstavljene su srednje vrednosti iz tri merenja. Apsorpcioni trake na 235-280 nm za *E* izomer odgovaraju π - π^* i n - π^* ²⁴¹ prelazima za piridinske derivate, a 224-348 nm za hinolinske derivata⁴⁸. Osim toga poznato je da su kod piridinskih jedinjenja π - π^* prelazi na nižim talasnim dužinama u odnosu na n - π^* prelaze²⁴¹. U slučaju 2-, 3- i 4-piridin derivate uključivanje delokalizacija u piridinskom prstenu i favorizacija hidrazonskog ostatka dhO najverovatnije utiče na smanjenje energije π - π^* i azometin n - π^* prelaza da se preklapaju sa karbonil n - π^* prelazima u istu apsorpcionu traku. Takođe je poznato da se kod *mh*-UK koji na azometinskom atomu ugljenika imaju i piridinil i metil grupu, prelazi odigravaju na višim energijama nego kod njegovih monohidrazonskih analoga koji na iminskom atomu ugljenika imaju samo piridinski prsten²⁴¹. Generalno, planarna

struktura molekula izaziva veći barohromni pomak zbog povećanja doprinosa π -konjugacije. Usled toga proširena konjugacija operativna u arilidenskom delu molekula, može izazvati pomeranje gustine elektrona ka karbonilnoj grupi utičući na proton donorska/akceptorska svojstva i na promenu jačine veze.



Slika 4. 10 Apsorpcioni spektar *mh*-UK: a) etanol, b) DMSO, c) acetonitril i d) THF

Na osnovu rezultata iz literature i teoretskih proračuna izabrani su najznačajniji π - π^* prelazi u UV-Vis spektrima, a rezultati su prikazani u Tabeli 4.5. Na osnovu prikazanih spektara u oblasti između 250-350 nm (Slika 4.10) može se primetiti da su apsorpcione trake vrlo jednostavne za većinu jedinjenja, sa izuzetkom u slučaju *mhUK*_(sal), *mhUK*_(8qc), *mhUK*_(2qc) i *mhUK*_(8OH2qc). Na položaj i intenzitet glavnih apsorpcionih traka (Tabela 4.5), utiču elektronska struktura jedinjenja kao i svojstva rastvarača.

Spektralno ponašanje ispitivanih jedinjenja je povezano sa elektronskom strukturom u osnovnom i pobuđenom stanju, a promena rastvarača uzrokuje promene

Tabela 4. 5 ApSORPCIONI maksimumi *E* oblika proučAVANIH jedinjenja u odgovarajućim rastvaračima

Rastvarač ^a /supstance	$V_{\max} \times 10^{-3} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$											
	<i>mhUK</i> (ba)	<i>mhUK</i> (sal)	<i>mUK</i> (2pvc)	<i>mhUK</i> (3pvc)	<i>mhUK</i> (4pvc)	<i>mhUK</i> (af)	<i>mhUK</i> (2pva)	<i>mhUK</i> (3pva)	<i>mhUK</i> (4pva)	<i>mhUK</i> (8qc)	<i>mhUK</i> (2qc)	<i>mhUK</i> (8OH2qc)
Etanol (EtOH)	34,36	31,25	33,87	33,57	33,78	36,49	34,32	35,29	34,60	30,43	32,56	30,57
Metanol (MeOH)	34,60	31,49	34,05	33,66	33,95	36,49	34,52	35,41	34,73	30,81	32,88	30,85
1-Propanol (1-PrOH)	34,34	31,34	33,93	33,69	33,75	36,48	34,34	35,03	34,54	30,57	32,56	30,60
1-Butanol (1-BuOH)	34,35	31,34	34,05	33,67	33,83	36,46	34,35	35,22	34,52	30,56	32,67	30,58
<i>izo</i> -Butanol (<i>i</i> -BuOH)	34,55	31,30	34,01	33,71	33,74	36,46	34,45	35,02	34,56	30,45	32,75	30,57
1-Pentanol (1-PeOH)	34,22	31,28	33,87	33,62	33,65	36,50	34,20	34,97	34,66	30,58	32,65	30,58
<i>izo</i> -Pentanol (<i>i</i> -PeOH)	34,28	31,29	34,04	33,74	33,81	36,47	34,28	35,20	34,43	30,55	32,52	30,57
2-Metoksietanol (2ME)	33,65	31,44	34,06	33,63	33,68	36,25	33,71	35,08	34,64	30,35	32,44	30,23
2-Hloretanol (2CE)	34,21	31,59	34,08	33,97	34,12	36,55	34,01	35,18	34,69	30,54	32,55	30,44
Voda	35,59	32,04	34,39	33,59	34,30	36,90	35,98	35,86	35,84	31,47	32,57	31,41
Acetonitril (AcN)	34,96	31,74	33,95	33,98	34,41	36,49	34,23	35,58	34,95	30,61	33,30	30,82
Hloroform (Chl)	34,72	31,20	33,97	33,96	34,69	36,49	34,39	35,60	34,36	31,03	32,71	30,95
Dietiletar (Et ₂ O)	34,35	31,48	33,82	33,51	34,02	36,44	34,39	35,60	35,70	30,18	33,10	30,22
Tetrahidrofuran THF	34,01	30,99	33,66	33,47	33,80	35,84	34,69	35,44	34,82	29,96	32,79	30,47
Dioksan	34,62	31,27	33,73	33,59	34,25	34,52	34,61	35,31	34,50	30,16	32,85	30,09
2-Pirolidon (2-Py)	33,92	31,41	33,59	33,02	33,35	35,85	33,89	34,57	34,75	29,82	32,48	29,84
Etilacetat (EtAc)	34,22	31,68	33,69	33,85	33,64	36,29	34,12	35,28	34,53	30,34	32,82	30,41
Dihlormetan (DCM)	35,09	31,29	34,13	33,94	35,52	36,49	34,24	35,33	35,29	30,51	32,67	30,64
1-Metil-2-pirolidon (NMP)	33,79	31,00	33,54	32,68	33,43	35,80	33,77	34,73	34,38	29,52	32,47	30,30
<i>N,N</i> -Dimetilformamid (DMF)	33,82	31,15	33,59	33,26	33,55	35,35	33,73	34,75	34,34	29,91	32,44	30,30
Dimetil sulfoksid (DMSO)	33,78	31,05	33,51	33,05	33,53	35,33	33,67	34,77	33,90	29,93	32,37	29,84
<i>N,N</i> -Dimetilacetamid (DMA)	33,68	31,25	33,31	33,57	33,78	35,38	33,47	34,62	34,17	29,97	32,62	30,21

^askraćenice uzete sa www.chemnetbase.com

polarnosti, dielektrične konstante ili polarizabilnosti okolnog medijuma. Značajna razlika u raspodeli naelektrisanja između osnovnog i pobuđenog stanja uzrokuje batohromno pomeranje, koje je u korelaciji sa povećanjem polarnosti rastvarača, odnosno jača interakcija sa polarnim rastvaračima u pobuđenom stanju doprinosi značajnijem batohromnom pomeranju ν_{\max} vrednosti. Uopšteno razumevanje uticaja efekta rastvarača na pomeranje apsorpcionih maksimuma, sa eksperimentalnog i teorijskog aspekta, od posebnog su značaja za dublji uvid u QSPR analizama.

Podaci iz Tabele 4.5 pokazuju da apsorpcioni maksimumi zavise i od efekta supstituenta i efekta rastvarača, iako se ν_{\max} i elektron-donor i elektron-akceptor supstituisanih *mh*-UK nalaze na malim razlikama u talasnim dužinama (manje od 50 nm), sa izuzetkom kod jedinjenja koja sadrže hinolinsku strukturu. Za očekivati je da će uvođenje supstituenta sa većom elektron-donorskom sposobnošću izazvati veći batohromni pomeraj, čija je posledica izraženiji ICT proces. U skladu sa tim primećen je crveni pomeraj maksimuma apsorpcije jedinjenja koja na azometinskom ugljeniku nemaju alkil (metil) grupu (*mhUK*_(ba), *mhUK*_(sal), *mhUK*_(2pyc), *mhUK*_(3pyc), *mhUK*_(4pyc), *mhUK*_(8qc), *mhUK*_(2qc) i *mhUK*_(8OH2qc)). Nasuprot tome, hipsokromno pomeranje UV maksimuma *mh*-UK jedinjenja koja sadrže metil supstituent na azometinskom ugljeniku, tj. u slučaju *mhUK*_(af), *mhUK*_(2pya), *mhUK*_(3pya) i *mhUK*_(4pya), ukazuju na značaj elektron-donorskog i sternog efekta metil grupe na povećanje energije elektronskih prelaza. Prisustvo metil grupe takođe dovodi do prilagođavanja konformacije molekula usled čega dolazi do malog odstupanja geometrije molekula od planarnosti koji na taj način manje doprinosi stabilizaciji orbitala u toku elektronskih prelaza.

4.2.2 LSER analiza

Efekat različitih tipova interakcija između rastvarača i supstanci na pomeranje maksimuma apsorpcije je interpretiran pomoću LSER modela Kamlet-Taft-a i Catalana, pri čemu su parametri korišćenih rastvarača prikazani u Tabelama P7.A3^{242,243} i P7.A4⁹⁴. Korelaciona analiza je sprovedena pomoću Microsoft Excel softvera a vrednosti regresionih koeficijenata korelacije, koje su dbijene sa nivoom pouzdanosti od 95 %, su prikazane u Tabelama 4.6 i 4.7.

Tabela 4. 6 Rezultati korelacione za *E* izomere isitivani jedinjenja dobijenih primenom *Kamlet-Taft*-ove jednačine

Br.	$h \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	$s \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	$b \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	$a \times 10^{-3}$ (cm^{-1})	R^a	Sd^b	F^c	Rastvarači isključeni iz korelacije
<i>mhUK</i> _(ba)	34,80 ±0,11	-0,50 ±0,14	-0,78 ±0,12	+0,53 ±0,08	0,96	0,1	50,60	2CE, DCM, H ₂ O, AcN, 2ME, Dioksan
<i>mhUK</i> _(sal)	31,46 ±0,11	-0,11 ±0,14	-0,41 ±0,07	+0,29 ±0,07	0,93	0,06	23,36	H ₂ O, Chl, AcN, EtOAc, DMA, 2-Py, THF, Et ₂ O
<i>mhUK</i> _(2pyc)	34,03 ±0,09	-0,44 ±0,12	-0,19 ±0,33	+0,34 ±0,05	0,94	0,09	34,42	H ₂ O, DCM, 2ME, AcN, DMA, 1- BuOH
<i>mhUK</i> _(3pyc)	34,59 ±0,19	-1,26 ±0,25	-0,59 ±0,14	+0,19 ±0,11	0,93	0,15	27,13	H ₂ O, DMA, AcN, Et ₂ O, DCM
<i>mhUK</i> _(4pyc)	35,09 ±0,22	-0,73 ±0,26	-1,18 ±0,14	- ^d	0,95	0,12	31,27	H ₂ O, 2ME, DCM, EtOAc, AcN, Et ₂ O, THF
<i>mhUK</i> _(af)	37,02 ±0,17	-1,25 ±0,23	-0,46 ±0,16	+0,46 ±0,11	0,94	0,17	36,97	Dioxan, H ₂ O, AcN, DCM
<i>mhUK</i> _(2pya)	34,76 ±0,15	-0,70 ±0,17	-0,55 ±0,12	+0,44 ±0,10	0,94	0,12	30,77	H ₂ O, 2CE, 2ME, THF, Dioksan
<i>mhUK</i> _(3pyc)	36,08 ±0,10	-1,11 ±0,22	-0,51 ±0,16	+0,023 ±0,14	0,92	0,15	20,00	H ₂ O, MeOH, AcN, DCM, THF, 2CE, 1- PeOH
<i>mhUK</i> _(4pyc)	36,67 ±0,20	-1,51 ±0,21	-1,43 ±0,19	-0,27 ±0,11	0,95	0,14	36,45	H ₂ O, DCM, Dioksan, 2ME, EtOAc, 2-Py
<i>mhUK</i> _(8qc)	30,68 ±0,14	-0,18 ±0,18	-0,92 ±0,12	+0,86 ±0,10	0,95	0,13	41,13	H ₂ O, 2CE, 2-Py, AcN
<i>mhUK</i> _(2qc)	33,38 ±0,07	-0,87 ±0,09	-0,11 ±0,07	-0,34 ±0,10	0,95	0,07	40,19	AcN, H ₂ O, MeOH, 2ME, EtOH
<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	31,018 ±0,18	-0,43 ±0,22	-0,69 ±0,11	+0,44 ±0,11	0,94	0,11	23,89	H ₂ O, 2CE, AcN, Dioksan, NMP, Et ₂ O, 2-Py, 2ME

^a Korelacioni koeficijent; ^b Standardna devijacija; ^c Fisher-ov test; ^d zanemarljive vrednosti sa visokim standardnim greškama

Korelacioni rezultati prema Kamlet-Taft-u (jednačina 2.13) prikazani u Tabeli 4.6 pokazuju složeni uticaj i rastvarača i efekta supstituenata na promenu apsorpcionih maksimuma i ogledaju se u velikim varijacijama doprinosa nespecifičnih i specifičnih efekata rastvarača na UV-Vis spektralne promene. Negativni znak koeficijenta *s* i *b* za sve *mh*-UK ukazuje da dolazi do batohromnog pomeranja ν_{\max} sa porastom dipolarnosti i polarizabilnosti rastvarača i HBA (atom ili atomska grupa koja prima proton pri

uspostavljanju vodonične veze *eng.* Hydrogen-Bonding Acceptor) svojstava. Ovi rezultati ukazuju na bolju stabilizaciju ekscitovanog elektronskog stanja u odnosu na osnovno stanje. Najveće vrednost koeficijenata s i b uočene su kod jedinjenja $mhUK_{(4pya)}$. Nešto niža vrednost koeficijenta s uočeno je za jedinjenja $mhUK_{(af)}$, $mhUK_{(4pya)}$ i $mhUK_{(3pya)}$. Ovi rezultati ukazuju na to da oba efekta, i elektron-akceptorska svojstva 3- i 4-piridinil grupe i sternih interakcijs metil grupe doprinose značajnijem intenzitetu nespecifičnih interakcija.

Pozitivan znak koeficijenta a za sva jedinjenja (Tabela 4.6), osim za jedinjenja $mhUK_{(4pya)}$ i $mhUK_{(2qc)}$, označava hipohromni pomeraj u odnosu na HBD (atom ili atomska grupa koja daje proton pri uspostavljanju vodonične veze *eng.* Hydrogen-Bonding Donor) efekat rastvarača. Dobijeni rezultat ukazuje na bolju stabilizaciju osnovnog stanja u odnosu na ekcitovano stanje. Najveća vrednost za koeficijent a je dobijena za jedinjenje $mhUK_{(8qc)}$.

Kvantitativno razdvajanje nespecifičnog efekta rastvarača, određenog vrednošću koeficijenta s u Kamlet-Taftovoj jednačini, na efekte dipolarnosti i polarizabilnosti rastvarača izraženih vrednostima koeficijenata c i d definisanih u *Catalán*-ovoj jednačini (Jednačina 2.15), doprinose kvalitetnijoj analizi o veličini/tipu uticaja rastvarača na pomeranje ν_{max} ispitivanih jedinjenja.

Negativne vrednosti koeficijenata c , d i b , osim za koeficijent d za $mhUK_{(2qc)}$, ukazuju na veći doprinos dipolarnosti, polarizabilnosti i baznosti rastvarača na stabilizaciju pobuđenog stanja. Korelacioni rezultati (Tabela 4.7), ukazuju da je polarizabilnost rastvarača glavni faktor koji utiče na pomeranje apsorpcionog maksimuma ν_{max} , osim u slučaju $mhUK_{(ba)}$, $mhUK_{(af)}$, $mhUK_{(4pya)}$ i $mhUK_{(8qc)}$, s'tim što dipolarnost ima najveći uticaj na solvatohromna svojstva ova četiri jedinjenja.

Najveće vrednosti koeficijenta b , koji se odnosi na doprinos baznosti rastvarača, nađene su kod $mhUK_{(4pyc)}$ i $mhUK_{(4pya)}$, dok su kod drugih *mh*-UK primećeni umereni doprinosi. Efekat kiselosti rastvarača (označen koeficijentom a) je nižeg značaja i ukazuje na kompleksnije ponašanje jedinjenja, a najveće vrednosti uočene su kod $mhUK_{(ba)}$, $mhUK_{(af)}$, i $mhUK_{(8qc)}$. Pozitivna vrednost koeficijenta a za skoro sva jedinjenja (izuzetak su jedinjenja $mhUK_{(4pya)}$ i $mhUK_{(2qc)}$), ukazuju na umeren do slab doprinos kiselosti rastvarača na stabilizaciju osnovnog stanja.

Tabela 4. 7 Rezultati korelacije za *E* izomere isitivani jedinjenja dobijenih primenom *Catalán*-ove jednačine

Br.	h	c	d	b	a	R ^a	sd ^b	F ^c	Rastvarači isključeni iz korelacije
<i>mhUK</i> _(ba)	35,73 ±0,73	-0,69 ±1,05	-1,03 ±0,31	-0,74 ±0,22	+1,12 ±0,15	0,93	0,19	21,29	2ME, DCM, AcN
<i>mhUK</i> _(sal)	32,29 ±0,41	-1,19 ±0,59	-0,07 ±0,15	-0,33 ±0,11	+0,52 ±0,13	0,94	0,09	22,29	AcN, EtAc, EtOH, THF
<i>mhUK</i> _(2pyc)	34,68 ±0,30	-1,17 ±0,47	-0,07 ±0,14	-0,19 ±0,13	+0,59 ±0,10	0,94	0,10	19,00	MeOH, DCM, Chl, DMA, 2ME, iPeOH, iBuOH
<i>mhUK</i> _(3pyc)	36,92 ±0,40	-3,14 ±0,53	-0,72 ±0,19	-0,84 ±0,13	+0,15 ±0,18	0,97	0,09	23,95	H ₂ O, Et ₂ O, 2CE, DMA, Dioxan, THF, MeOH, EtOH, NMP
<i>mhUK</i> _(4pyc)	36,87 ±0,53	-2,33 ±0,69	-0,62 ±0,18	-1,28 ±0,14	-0,34 ±0,16	0,94	0,13	23,15	DCM, EtAc, Et ₂ O, 2CE, THF
<i>mhUK</i> _(af)	37,57 ±0,80	-0,33 ±1,25	-1,83 ±0,39	-0,13 ±0,48	+1,37 ±0,48	0,94	0,18	22,79	Dioxan, 2CE, AcN, DCM
<i>mhUK</i> _(2pya)	36,90 ±0,40	-2,49 ±0,52	-0,99 ±0,14	-0,40 ±0,11	+0,28 ±0,16	0,95	0,10	25,60	H ₂ O, EtAcO, THF, NMP, 2ME, Et ₂ O
<i>mhUK</i> _(3pyc)	37,87 ±0,37	-2,54 ±0,53	-0,52 ±0,17	-0,98 ±0,14	+0,19 ±0,17	0,94	0,12	24,63	H ₂ O, 1-BuOH, iPeOH, THF, 2ME
<i>mhUK</i> _(4pyc)	38,12 ±0,35	-1,58 ±0,55	-1,70 ±0,21	-1,61 ±0,14	-0,02 ±0,15	0,97	0,10	54,05	H ₂ O, Chl, EtAc, Dioxan
<i>mhUK</i> _(8qc)	32,06 ±0,87	-0,27 ±1,25	-1,59 ±0,39	-0,76 ±0,23	+1,15 ±0,29	0,95	0,18	23,07	AcN, DCM, Dioxan, 2CE, Et ₂ O, THF
<i>mhUK</i> _(2qc)	35,54 ±0,28	-3,55 ±0,34	+0,08 ±0,12	-0,43 ±0,08	-0,59 ±0,09	0,95	0,08	27,49	EtOH, EtAc, DMF, iPeOH
<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	31,78 ±0,46	-1,20 ±0,63	-0,20 ±0,24	-0,56 ±0,13	+0,59 ±0,14	0,95	0,11	22,46	MeCl, 2CE, Et ₂ O, DMSO, Dioxan, 2ME

^a Korelacioni koeficijent; ^b Standardna devijacija; ^c Fisher-ov test

4.2.3 LFER analiza primenjena na vrednosti UV-Vis spektralnih podataka *mh*-UK

Nastavak korelacije analize se odnosio na ispitivanja uticaja efekata supstituenta na intramolekulski prelaz naelektrisanja ispitivanih *mh*-UK, primenom principa LFER analize na UV-Vis spektralne podatke korišćenjem *Hammett*-ove

jednačine (Jednačina 2.10) i σ_p konstanti supstituenata (Tabela P7.A5^{244,245}). Rezultati korelacije su dati u Tabeli 4.8 i na Slici P7.A1 za *E* izomer.

Tabela 4.8 Rezultati LFER korelacija *E* izomera *mh*-UK dobijenih pomoću *Hammett*-ove jednačine

Supstance.	<i>mhUK</i> _(sal) , <i>mhUK</i> _(2pyc) , <i>mhUK</i> _(3pyc) , <i>mhUK</i> _(4pyc) , <i>mhUK</i> _(2pya) , <i>mhUK</i> _(4pya) i <i>mhUK</i> _(8gc)				
Rastvarač ^c	$\nu_0 \times 10^{-3}, \text{cm}^{-1}$	$\rho \times 10^{-3}, \text{cm}^{-1}$	R ^a	Sd ^b	F ^c
EtOH	31,00 ± 0,37	4,02 ± 0,59	0,95	0,54	46,81
MeOH	31,28 ± 0,33	3,85 ± 0,53	0,96	0,48	54,08
2CE	31,26 ± 0,42	3,83 ± 0,66	0,93	0,62	33,24
H ₂ O	31,77 ± 0,55	4,14 ± 0,84	0,91	0,78	24,31
AcN	31,35 ± 0,42	3,91 ± 0,67	0,93	0,63	33,48
Chl	31,27 ± 0,26	3,99 ± 0,42	0,97	0,39	89,18
DMSO	30,66 ± 0,34	3,80 ± 0,61	0,94	0,57	37,95

^a Korelacioni koeficijent; ^b Standardna devijacija; ^c Fisher-ov test

Generalno, rezultati korelacije su pokazali sličnu osetljivost ν_{max} pomeranja na elektronske efekte supstituenata, a najveći uticaj je uočen u vodi i etanolu kao rastvaraču. Veličina efekta koji se odnosi na građenje vodonične veze kod protičnih rastvarača je primarni faktor koji doprinosi boljoj stabilizaciji osnovnog stanja. Dipolarni aprotični rastvarači doprinose nešto nižoj osetljivosti apsorpcionih frekvencija na efekte rastvarača. Aprotični rastvarači se uglavnom ponašaju kao proton akceptori i sa lošim vezivnim svojstvima anjona, i učestvuju u efektivnoj stabilizaciji velikih i dispergovanih pozitivnih lokalnih/ukupnih naelektrisanja prisutnih u ispitivanom molekulu.

Manja vrednost korelacionih koeficijenata za apolarne rastvarače sa visokom relativnom dielektričnom konstantom može se objasniti činjenicom da jaki dipolarni efekat okolnog medijuma koja stvara sovatacioni sloj oko rastvorka doprinosi smanjenju razmene elektronske gustine tokom ekscitacije, time indukujući nižu osetljivost apsorpcionih maksimuma na elektronske efekte supstituenata. Prikazani rezultati su pokazali da se prenos elektronskih efekata supstituenata putem π -rezonantnih jedinica odvija na osnovu balansirano doprinosa dva efekta: kroz lokalizovane π -elektronske jedinice i kroz ukupan π -konjugovani sistem ispitivanih *mh*-UK²⁴⁰.

4.2.4 LFER analiza primenjena na vrednosti ^1H i ^{13}C NMR pomeranja *mh*-UK

U ovoj disertaciji LFER analiza je izvršena da bi se dobio i bolji uvid u uticaj strukturnih i efekta supstituenata na ^{13}C i ^1H -NMR hemijska pomeranja. Među važnim faktorima koji utiču na NMR hemijska pomeranja su geometrija, odnosno vrednost torzionih uglova α , β , χ i δ . Principi LFER su primenjeni u okviru analize uticaja efekata supstituenta, primenom σ konstanti (Tabela P7.A4), na NMR pomeranja atoma ugljenika i vodonika od interesa. Dobijeni korelacioni rezultati su prikazani u Tabeli 4.9 i na Slici P7.A2.

Opšti zaključak izveden iz analize ^1H i ^{13}C NMR hemijskih pomeranja je da su efekti supstituenti na hemijska pomeranja ugljenika atoma od interesa elektronske prirode. Analizom ρ vrednosti odabranih atoma ugljenika uočava se različita osetljivost NMR hemijskih pomeranja na efekte supstituenata. Uočeno je da su hemijska pomeranja azometinskog ugljenika i oba atoma vodonika pokazali normalni efekat supstituenta, a reversni efekat supstituenta je primećena na karbonilnom atomu ugljenika. Negativan znak reakcione konstante, ρ , za karbonilni ugljenikov atom znači obrnuto ponašanje, tj vrednost NMR pomeranja se smanjuje, iako se veličina elektron-akceptorskog dejstva supstituenta iskazane pomoću σ veličine povećava. Obrnuti efekat supstituenata prisutan kod karbonilnog ugljenika može se pripisati lokalizovanoj π -polarizaciji, koja dominira u odnosu na proširenu π -polarizaciju. Koncept π -polarizacije uveo je *Reynolds*^{246,247} da bi objasnio polje uticaja supstituenta operativnih u bočnom lancu *p*- i *m*-supstituisanih benzena.

Karbonilna grupa usled elektron-akceptorskog efekta utiče na smanjenje elektronske gustine na azometinskoj grupi što vodi do povećane rezonantne interakcije sa *p*-elektron-donorskim supstituentima. Elektron-donorski supstituenti dovode povećanja elektronske gustine u arilidenskom delu molekula, odnosno doprinose povećanju π -donorskog potencijala tog dela molekula što ima za posledicu značajnije pomeranje elektronske gustine ka karbonilnoj grupi ispitivanih jedinjenja. Nasuprot tome, elektron-akceptorski supstituenti dovode do uravnotežavanja uticaja sa suprotnim efektom iz ostatka molekula.

Tabela 4. 9 Rezultati korelacije NMR podataka *mh*-UK sa σ konstantama dobijenih primenom *Hammett*-ove jednačine 2.12

	ρ	h	R ^a	F ^c	Sd ^b	n ^d	Jedinjenja uključena u korelacije
$\underline{\text{H}}(\text{N})$	0,35 ±0,04	10,39 ±0,03	0,94	50,71	0,07	9	<i>mhUK</i> _(ba) , <i>mhUK</i> _(sal) , <i>mhUK</i> _(2pyc) , <i>mhUK</i> _(3pyc) , <i>mhUK</i> _(4pyc) , <i>mhUK</i> _(2qc) , * <i>mhUK</i> _(2Ti) , * <i>mhUK</i> _(4OMPh) , * <i>mhUK</i> _(4COOHPH)
$\underline{\text{H}}(\text{C}=\text{N})$	0,15 ±0,02	7,79 ±0,02	0,93	33,53	0,04	7	<i>mhUK</i> _(2pyc) , <i>mhUK</i> _(3pyc) , <i>mhUK</i> _(4pyc) , <i>mhUK</i> _(2qc) , * <i>mhUK</i> _(4OMPh) , * <i>mhUK</i> _(4COOHPH) , * <i>mhUK</i> _(4OHPH)
$\underline{\text{C}}=\text{N}$	0,45 ±0,06	140,2 ±0,04	0,96	52,09	0,09	6	<i>mhUK</i> _(sal) , <i>mhUK</i> _(2pyc) , <i>mhUK</i> _(2qc) , <i>mhUK</i> _(8OH2qc) , * <i>mhUK</i> _(4OMPh) , * <i>mhUK</i> _(4OHPH)
$\underline{\text{C}}=\text{O}$	-0,93 ±0,12	157,4 ±0,07	0,95	50,18	0,15	8	<i>mhUK</i> _(ba) , <i>mhUK</i> _(2pyc) , <i>mhUK</i> _(3pyc) , <i>mhUK</i> _(4pyc) , <i>mhUK</i> _(8qc) , <i>mhUK</i> _(8OH2qc) , * <i>mhUK</i> _(2Ti) , * <i>mhUK</i> _(4OHPH)

*literaturni podaci²⁴⁸; ^a Korelacioni koeficijent; ^b Standardna devijacija; ^c Fisher-ov test; ^d broj supstanci uključenih u korelacije

Prenos rezonacionog efekta supstituenata kroz π -konjugovani sistem ispitivanih jedinjenja sa prisutnim elektron-akceptorskim supstituentima dovodi do pomeranje elektronske gustine ka azometinskoj grupi i ukupan rezultat se ogleda u povećanju elektronske gustine na karbonilnom atomu ugljenika. Reversni efekat supstituenta je posledica visokog doprinosa lokalizovane π -polarizacije na C = O atomu ugljenika.

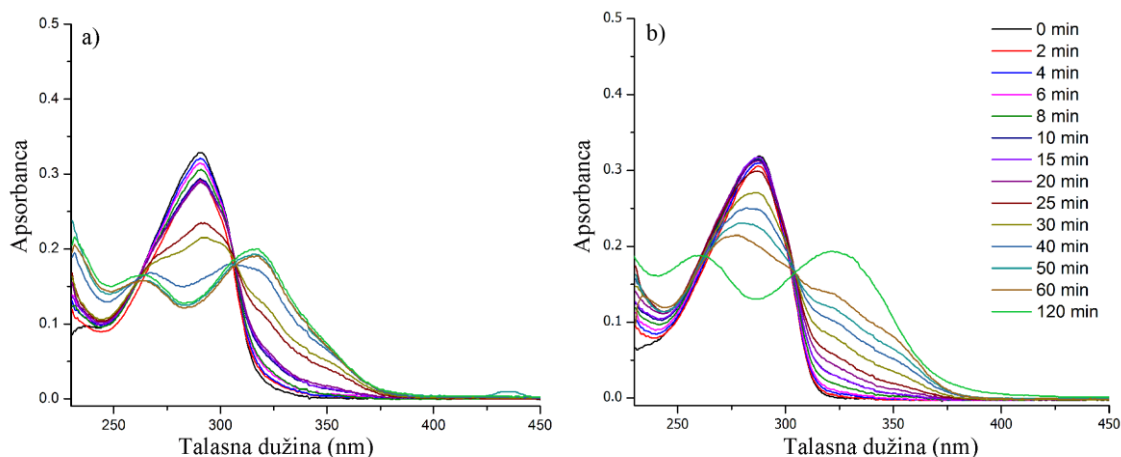
4.2.5. Izomerizacija *mh*-UK

U cilju ispitivanja mogućnosti izomerizacije sintetisanih jedinjenja izvršena su dva odvojena eksperimenta koja su prikazana u nastavku, fotoizomerizacija i ispitivanje mogućnosti izomerizacije u smeši DMSO/voda.

4.2.5.1 Fotoizomerizacija *mh*-UK

Poznato je da se piridin supstituisani semikarbazoni pokazuju zanimljiv fenomen povezan sa *E/Z* fotoizomerizacijom koja nastaje usled rotacije oko C = N dvostruke veze. Ova činjenica je potvrđena kod (*E*)-4-fenil-1-(piridin-2-il-metilen)-semicarbazona u rastvoru DMSO-a. Proces fotoizomerizacije je praćen pomoću ¹H NMR spektroskopije na osnovu hemijskih pomeraja **N3-H** atoma koji se javljaju na višim vrednostima hemijskih pomeraja za 0,22 ppm nakon UV ozračivanja. Ovakvo ponašanje predstavlja posledicu *cis-trans* fotoizomerizacije, a mehanizam izomerizacije je

potvrđen primenom UV-Vis i 2D NOESY NMR analize, kao i rendgenskom strukturnom analizom. Osim toga, pokazalo se da stepen izomerizacije zavisi od temperature, rastvarača koji se koriste i položaja bočnog lanca u odnosu na atom azota u piridinskom prstenu¹⁵.

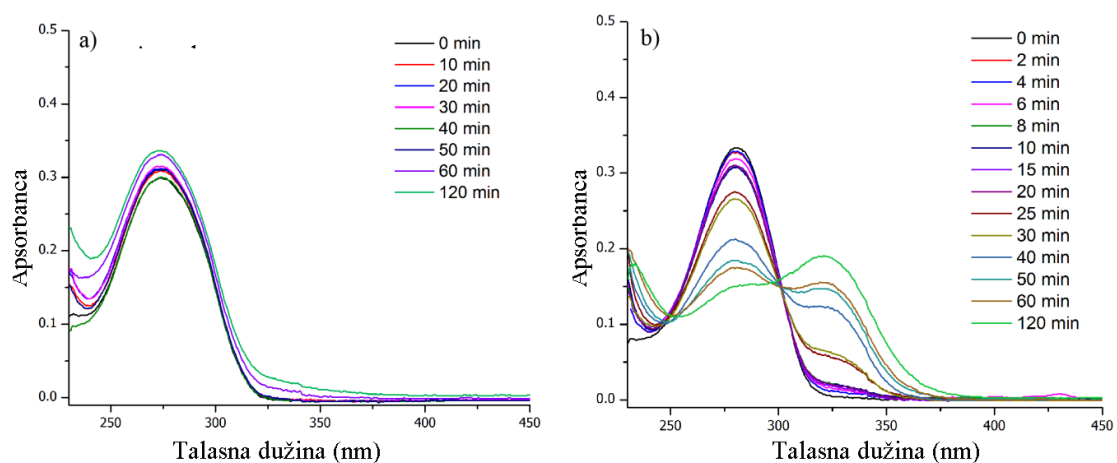


Slika 4. 11 Promena UV apsorpcionog spektra tokom ozračivanja rastvora a) *mhUK*_(2pyc) i b) *mhUK*_(2pya) ($1,0 \cdot 10^{-5}$ M) u DCM

U skladu sa literaturnim podacima i rezultatima NMR-a koja ukazuju na veću stabilnost *E* oblika *mh*-UK u DMSO, u ovoj disertaciji bilo je od interesa ispitati faktore i veličinu njihovog uticaja na proces *E/Z* izomerizaciju jedinjenja koja po teorijskim proračunima pokazuju mogućnost postojanja oba oblika u rastvoru DMSO-a. ¹H i ¹³C NMR analiza je pokazala da jedinjenja *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) postoje u *E* obliku u rastvoru DMSO, a suprotno tome rezultati teorijskih proračuna ukazuju na nešto veću stabilnost *Z* obliku kao rezultat stabilizacije usled građenja intramolekulske vodonične veze (Tabela 4.3). Kao što je napomenuto, *E/Z* izomerizaciju je moguće indukovati spoljašnjim stimulansima poput UV ozračivanja¹⁵. U skladu sa tim nakon UV zračenja DCM rastvora *E* oblika ovih jedinjenja, zbog male razlike u energijama i slabog efekta stabilizacije jedinjenja *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) u *Z* obliku usled građenje intramolekulske vodonične veze, vrši se fotoizomerizacija u *Z* izomer (Slika 4.11).

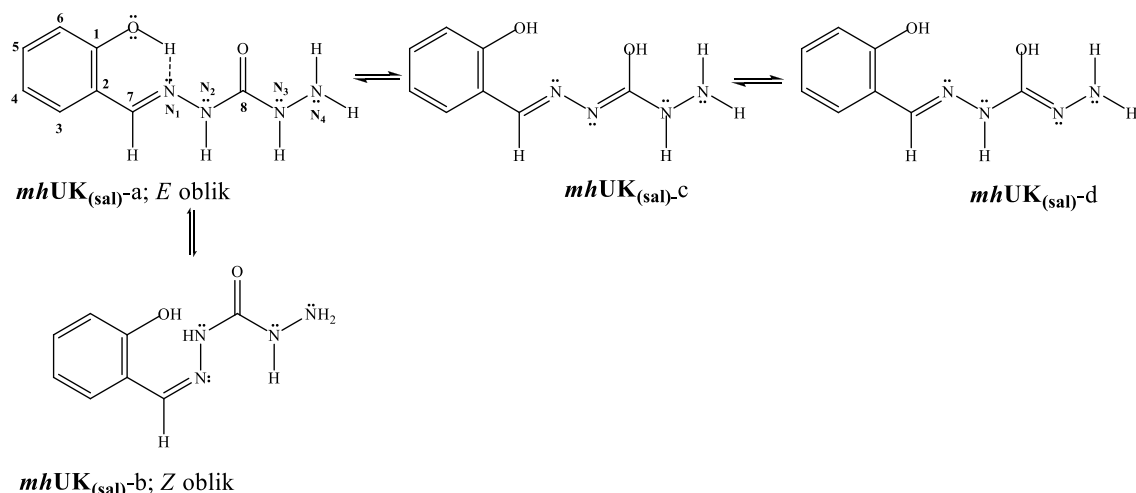
U cilju proučavanja kinetike *E/Z* fotoizomerizacije, odabrana jedinjenja koja prema teorijskim proračunima mogu zauzimati oba konformaciona oblika izlagana su UV zračenju u vremenskom intervalu od 0 do 120 min. Vremenski zavisne promene

apsorpcionih spektara ovih jedinjenja u DCM i MeOH, nakon ozračivanja UV zracima talasnih dužina od 254,0 nm (ili 364,0 nm), su prikazani na Slikama 4.11, 4.12 i 4.15.



Slika 4. 12 Promena UV apsorpcionog spektra tokom zračenja rastvora a) *mhUK*_(3pya) i b) *mhUK*_(4pya) ($1,0 \cdot 10^{-5}$ M) u DCM

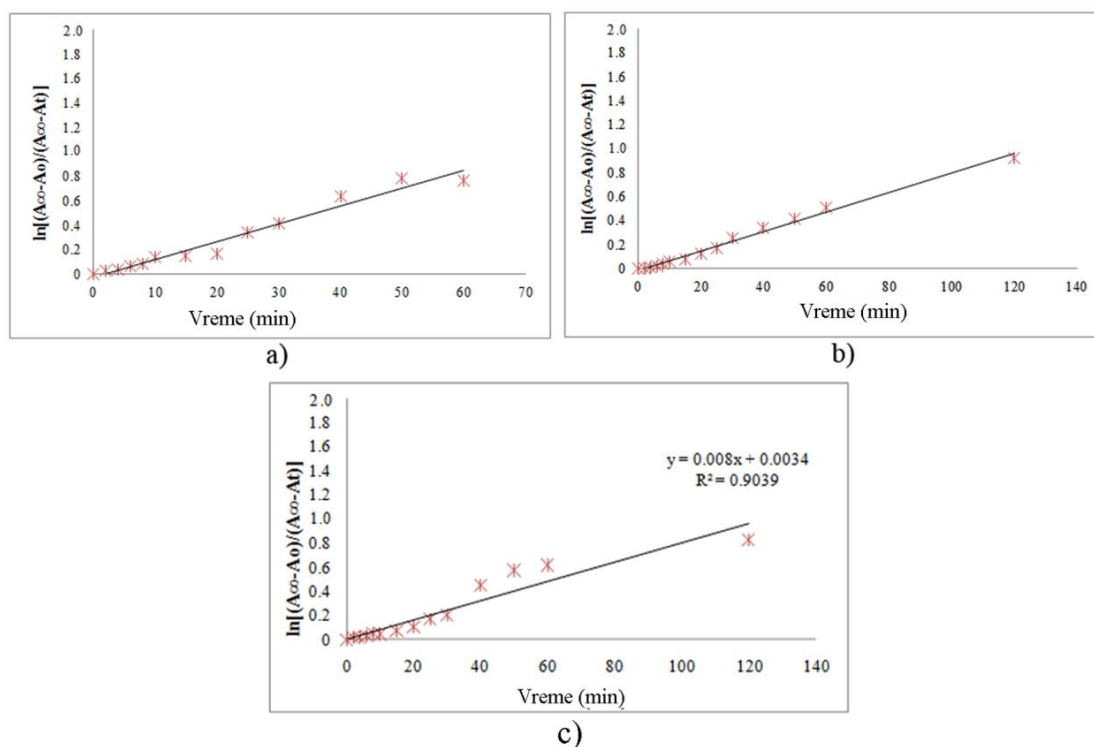
Apsorpcioni maksimumi *mhUK*_(2pyc), *mhUK*_(2pya) i *mhUK*_(4pya) se nalaze na 292,3, 292,0 i 283,0 nm u DCM, respektivno. Nakon UV ozračivanja novi apsorpcioni maksimum se pojavljuje u intervalu od 320-400 nm i 250-280 nm u DCM sa tačkom preseka (IP, *eng.* Isobestic Point) na 318,0 i 260,0 nm za jedinjenje *mhUK*_(2pyc), 323,0 i 260,0 nm za jedinjenje *mhUK*_(2pya) i 320,0 nm za jedinjenje *mhUK*_(4pya). Navedeni rezultati predstavljaju spektralne dokaze o procesima fotoizomerizacije koji se dešavaju u rastvoru. Fotoizomerizacija u slučaju jedinjenja *mhUK*_(ba), *mhUK*_(af) i *mhUK*_(3pya) nije detektovana u DCM, dok je kod *mhUK*_(4pya) primećen delimičan proces izomerizacije nakon ozračivanja u trajanju od 120 min. (Slika. 4.12 a) i b)). Zanimljivo je napomenuti da *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) zauzimaju Z konformacije nakon 60 i 120 minuta zračenja, respektivno. Ovi rezultati ukazuju na značaj sternog efekta azometinske metil grupe u interakciji/ometanju izomerizacije i na stabilizaciju ispitivanih jedinjenja u pobuđenom stanju. Jedinjenje *mhUK*_(sal) ne podleže procesu izomerizacije nakon ozračivanja UV svetlošću u DCM usled efekta stabilizacije jakim intramolekulskim vodoničnim vezama u *E* obliku početnog stanja (Slika. 4.13 a)).



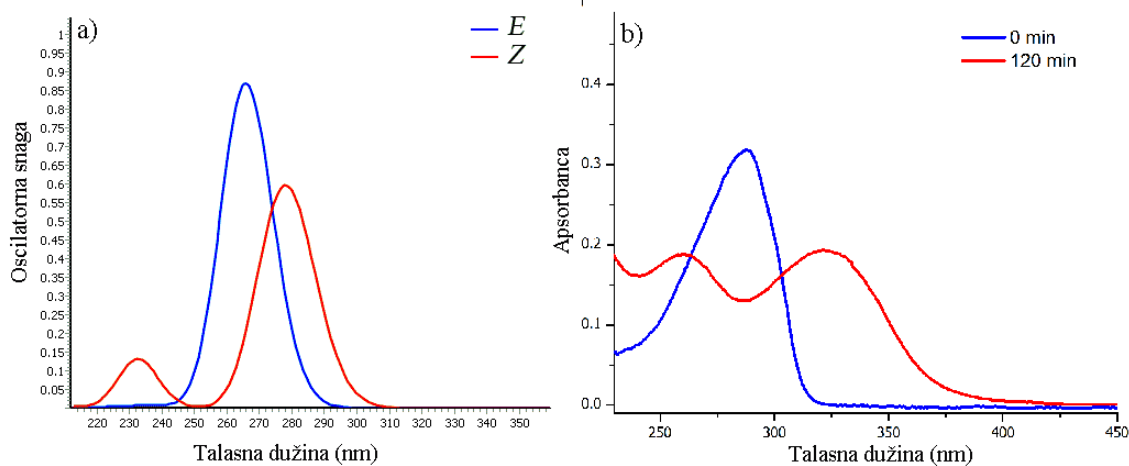
Slika 4. 13 Ravnoteža tautomernih oblika i geometrijskih izomera *mhUK*_(sal)

Potvrđeno je da se fotoizomerizacija jedinjenja *mhUK*_(2pyc), *mhUK*_(2pya) i *mhUK*_(4pya) u rastvoru zračenjem na talasnoj dužini od 364,0 nm prati kinetički zakon prvog reda u DCM (Slike 4.14). Nakon prestanka UV zračenja rastvora *mhUK*_(4pya), jedinjenje se spontano vraća u početno stanje, tj. pokazuje reversni proces izomerizacije ka *E* obliku koji se dešava nakon desetak dana stajanjem na tamnom mestu zaštićenom od svetlosti na sobnoj temperaturi. Nasuprot tome, čak i nakon deset dana *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) i dalje zauzimaju *Z* konformaciju u DCM.

Rezultati kinetike ispitivanje procesa fotoizomerizacije jedinjenja *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) ozračivanjem na 364 nm obrađeni su korišćenjem kinetičke jednačine prvog reda korelisanjem vrednosti $\ln [(A_{\infty}-A_0) / (A_{\infty}-A_t)]$ u odnosu na vreme trajanja procesa. Merene veličine A_0 , A_{∞} i A_t su podaci koji se odnose na vrednosti apsorpcija na talasnoj dužini 323,0 i 318,0 nm nakon ozračivanja DCM rastvora jedinjenja u trenutku nula, vremena nakon završetka procesa i vremena t tokom procesa izomerizacije, respektivno. Fotoizomerizacija *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya) je završena za 60 i 120 min, i prikazan je na Slici 4.14 a) i b). Svi dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim TD-DFT-om. Na slici 4.15 prikazan je teoretski i eksperimentalni spektar *E*- i *Z*- izomera *mhUK*_(2pya) u rastvoru pre i posle UV ozračivanja.



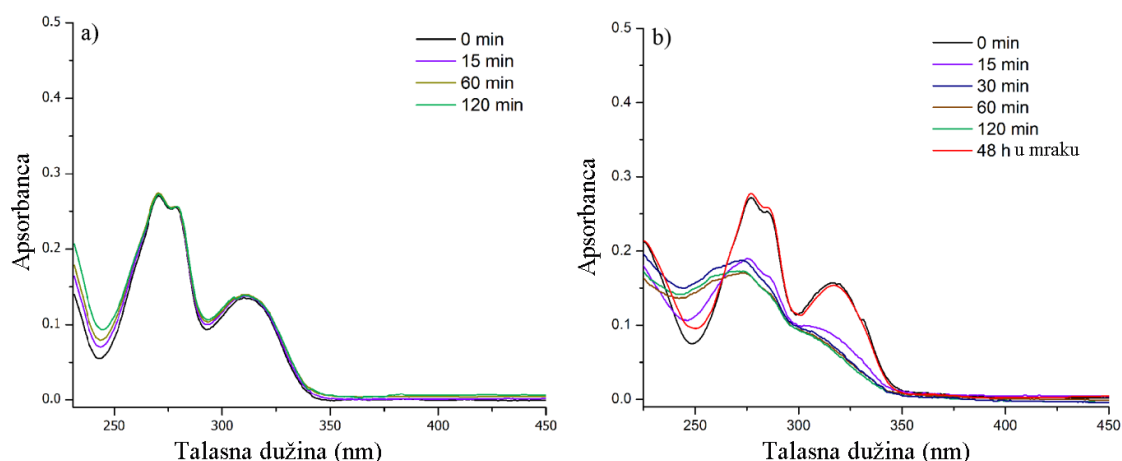
Slika 4. 14 Zavisnost $\ln[(A_{\infty} - A_0)/(A_{\infty} - A_t)]$ sa vremenom potrebnim za izomerizaciju a) $mhUK_{(2pyc)}$, b) $mhUK_{(2pya)}$ i c) $mhUK_{(4pya)}$ primenom UV zraka talasne dužine od 364,0 nm



Slika 4. 15 a) Teoretski UV-Vis spektar E - i Z - izomera $mhUK_{(2pya)}$, b) Eksperimentalni UV-Vis spektar pre i posle UV zračenja $mhUK_{(2pya)}$

Uticaj protičnog rastvarača MeOH na destabilizaciju intramolekulske vodonične veze pseudociklične strukture usled građenja međumolekularnih vodoničnih veza (Slika

4.9) je ispitivana u odnosu aprotični rastvarač DCM koji sa druge strane doprinosi stabilizaciji intramolekulske vodonične veze (Slika 4.13; $mhUK_{(sal)}$ *E* oblik). To znači da sposobnost MeOH da formira vodonične veze koje doprinose raskidanju intramolekulske vodonične veze u početnom stanju jedinjenja $mhUK_{(sal)}$ (Slika 4.13 a)), što doprinosi da se proces izomerizacije odigrava za 15 min. Posle stajanja rastvora jedinjenja $mhUK_{(sal)}$ u mraku tokom 48 h, jedinjenje se vraća u *E* oblik (Slika 4.16 b)).



Slika 4. 16 Promena UV apsorpcionog spektra tokom zračenja rastvora $mhUK_{(sal)}$: a) DCM, b) MeOH ($1,0 \cdot 10^{-5}$ M)

U skladu sa tim, ozračivanjem $mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$ u MeOH nije dovelo ni do kakvih uočljivih promena u UV spektru. Takvo ponašanje snažno potvrđuje značaj vodonične veze uspostavljene interakcijom između rastvarača i supstanci koje imaju suprotan efekat koji potiče od građenja intramolekulske vodonične veze, i koje formiranjem stvaraju pseudociklične strukture kod *Z*- izomera (Slika 4.9 b)).

$mhUK_{(ba)}$ i $mhUK_{(af)}$ ni u MeOH ni u DCM nakon ozračivanja ne pokazuju uočljivu izomerizaciju, na osnovu čega se može zaključiti da prisustvo piridinskog prstena doprinosi procesu izomerizacije.

Da bi se procenio uticaj intramolekularne vodonične veze u stabilizaciji *Z* oblika za $mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$ i *E* oblika za $mhUK_{(sal)}$ izvršena je reoptimizacija geometrija ovih izomera u DCM i MeOH korišćenjem ω B97Ks-D/6-311G (d,p) metode. Ova vrsta funkcionala je korišćena jer obuhvata empirijske disperzije i veliki opseg korekcija.

Skorašnje studije su pokazale veoma dobro ponašanje ovih funkcionala za opisivanje geometrije sa postojanjem jakih vodoničnih veza²⁴⁹.

Rezultati proračuna su pokazali da intramolekulsk vodonična veza doprinosi stabilizaciji *Z* izomera jedinjenja **mhUK**_(2pyc) i **mhUK**_(2pya). Energije *E* oblika su za 1,85 i 0,68 kcal veće nego kod *Z* oblika (Tabela 4.10). Male energetske razlike između izomera ukazuju da intramolekularna vodonična veza formirana u *Z* obliku doprinosi stabilizaciji takve strukture. Ovo je dalje potvrđeno strukturalnom i topološkom analizom. Rastojanja između azota i vodonika uključenih u stvaranju vodonične veze kod *Z* izomera jedinjenja **mhUK**_(2pyc) i **mhUK**_(2pya) u DCM su 1,908 i 1,849 Å dok u MeOH iznose 1,906 i 1,846 Å (Tabela 4.11), respektivno. Kraće dužine vodoničnih veza dobijene su za *E* oblik jedinjenja **mhUK**_(sal), 1,772 (DCM) i 1,764 Å (MeOH).

Tabela 4. 10 Rezultati ωB97X-D/6-311G(d,p) reoptimizacije i AIM proračuni za **mhUK**_(sal), **mhUK**_(2pyc) i **mhUK**_(2pya) u DCM i MeOH

Supst.	Rastvarač	Tautomer	Energija (kcal)	N--H(Å)	ρ	$\nabla^2\rho$	μ (D)
mhUK _(sal)	DCM	<i>E</i>	0,0	1,772	0,0445	0,119	6,5526
		<i>Z</i>	11,55				4,6091
	MeOH	<i>E</i>	0,0	1,764	0,0454	0,117	6,9343
		<i>Z</i>	11,56				4,8235
mhUK _(2pyc)	DCM	<i>E</i>	1,85				2,4733
		<i>Z</i>	0,0	1,908	0,0346	0,107	7,9018
	MeOH	<i>E</i>	1,73				2,6263
		<i>Z</i>	0,0	1,906	0,0348	0,108	8,2079
mhUK _(2pya)	DCM	<i>E</i>	0,68				2,9123
		<i>Z</i>	0,0	1,849	0,0396	0,118	8,0533
	MeOH	<i>E</i>	0,62				3,1011
		<i>Z</i>	0,0	1,846	0,0399	0,119	8,3915

Ove vrednosti su značajno niže od zbira odgovarajućih *Van der Waals*-ovih radijusa (2.6 Å). AIM topološkom analizom pronađena je kritičnu tačka veze (BCP, eng. Bond Critical Point) između azota i atoma vodonika u *Z* obliku jedinjenja **mhUK**_(2pyc) i **mhUK**_(2pya). Podaci o pronađenoj BCP sumirani su u Tabeli 4.10. Vrednosti ukupne elektronske gustine (ρ) na BCP od 0,0346 do 0,0445 u DCM i od 0,0348 do 0,0454 u MeOH, respektivno, spadaju u oblast koja odgovara visokim gustinama za vodoničnu vezu (0,002 – 0,035)²⁴⁹. Pošto je ukupna gustina elektrona na BCP u korelaciji sa jačinom vodonične veze^{250,251} veće vrednosti elektronske gustine *E*

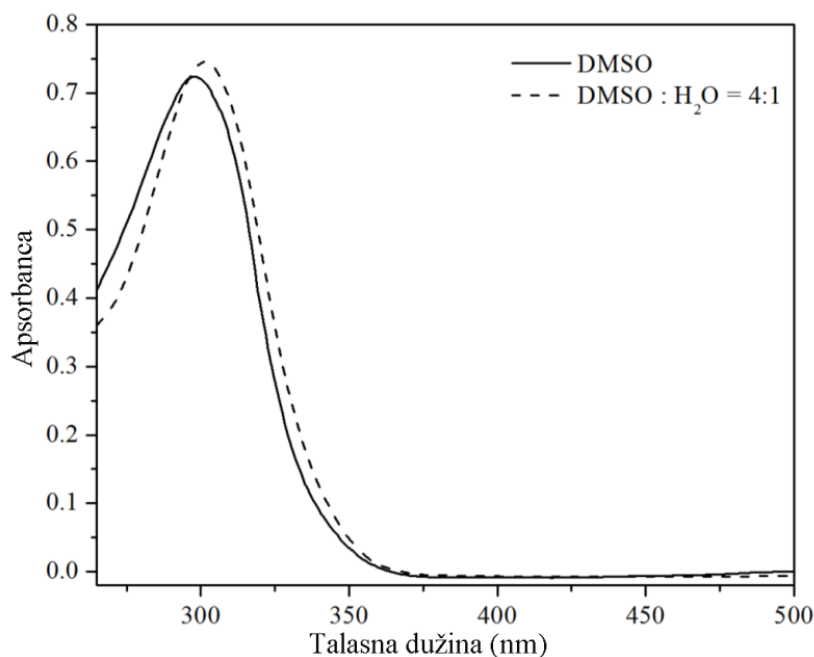
izomera jedinjenja **mhUK**_(sal) dodatno potvrđuju prisustvo jačeg vodoničnog vezivanja u ovom jedinjenju, nego u *Z* izomerima jedinjenja **mhUK**_(2pyc) i **mhUK**_(2pya), što je u skladu sa podacima o fotoizomerizaciji.

4.2.5.2 Ispitivanje mogućnosti izomerizacije jedinjenja **mhUK**_(2pyb) u smeši DMSO/voda

Za strukturno povezane arilhidrazone, objavljeno je da je *E*- izomeri preovlađuju u nevodenom medijumu, dok voda dovodi do promene u konformaciji i formiranja *Z* izomera,²⁵² ili do formiranja hidratizanih molekula.²⁵³ *E/Z* izomerizacija hidrazona može se uočiti na UV spektrima jer kao što je već napomenuto *E*- i *Z*- izomeri imaju različiti maksimume apsorpcije. Talasne dužine na kojima su uočen apsorpcioni maksimumi *Z*- izomera hidrazona se javljaju na 5-8 nm nižim pomeranjima nego kod *E*- izomera. U isto vreme, batohromni pomeraj sa 297 na 302 nm ukazuju na moguću *E/Z* izomerizaciju monosupstituisanog hidrazona u sistemu sa promenom svojstava rastvarača.²⁵⁴ Studija o mogućoj izomerizaciji (Slika 4.17) izvedena je za jedinjenje **mhUK**_(2pyb) kao jedini derivat *mh*-UK koji se u rastvoru nalazi u *Z* obliku.

Apsorpcioni spektri **mhUK**_(2pyb) snimljeni su u čistom DMSO-u i smeši DMSO/voda. Trake u spektralnom regionu 289-303 nm dodeljene su azometinskoj dvoguboj vezi i aromatičnom prstenu.²⁵⁵ Isprekidana linija pokazuje promenu apsorbanace, t.j. indukovani proces *E/Z* izomerizacije koji dovodi do pomeranja ravnoteže nakon dodatka vode. Dodavanje vode u sistem DMSO izazvalo je povećanje apsorpcionog maksimuma na talasnoj dužini od 297 nm za 0,08 a.u. (Slika 4.17), i pomeraj apsorpcionog maksimuma ka većoj talasnoj dužini za 5 nm, što odgovara prelasku u *E*-izomeru. Doprinos *E*- izomera se povećava sa udelom frakcije vode u smeši rastvarača, sudeći po tome da imino proton učestvuje u stvaranju intramolekulskih vodoničnih veza. Ove spektralne promene prati i pojava IP pripisane formiranju vodonične veze između -NH protona i molekula rastvarača.²⁵³ Signali pripisani -NH i -NH₂ protonima koji se pojavljuju kao singlet na pomeranjima od 4,15, 8,26 i 13,20 ppm, nestaju nakon dodatka D₂O, što je dokaz da je moguće raskinuti intramolekulske vodonične veze koje stabilišu *Z* isomer u ovom jedinjenju (Slika 4.6, **mhUK**_{(2pyb)-a}), čije mesto zauzimaju međumolekulske vodonične veze koje izazivaju konformacionu adaptaciju molekula, i prelazak u *E* izomer.

Na kraju se može zaključiti da sterni i rezonancioni efekat fenilnog jezgra prisutnog na azometisnom ugljenikovom atomu dodatno stabilizuje *Z* oblik ispitivanih jedinjenja. Usled neslaganja u pomerajima apsorpcionih maksimuma nakon *E*- i *Z*-izomerizacije u smeši rastvarača i fotoizomerizacije pretpostavljeno da stabilniji oblik jedinjenja u rastvoru apsorbuje na manjim talasnim dužinama, dok se nakon izomerizacije maksimum apsorpcije pomera ka većim talasnim dužinama.



Slika 4. 17 UV–Vis spektar *mhUK*_(2pyb) u DMSO i smeši rastvarača DMSO/voda

4.3 Određivanje konstanti kiselosti

Hemijske osobine organskih molekula u rastvoru u velikoj meri zavise od stepena jonizacije, tj njihove sposobnosti da oslobode ili prime proton u vodenim rastvorima. Transfer protona se najčešće javlja između proton-donorskih/akceptorskih mesta na molekulu ili bilo kom atomu ispitivanog molekulu koji sadrži vodonik koji podleže jonizaciji. Procesi protonovanja i deprotonovanja značajno zavise od jonizacionog potencijala mesta koje učestvuje u razmeni protona. Protonovanje i deprotonovanje kiselih odnosno baznih mesta, tj. lakoća primanja i odavanja protona, u određenoj meri utiču na promene ukupnog i lokalnog prenosa naelektrisanja.

Hidrazinski azot je reaktivniji nego iminski azot i oba atoma se ponašaju kao nukleofili, dok karbonilna grupa ima i elektrofilni i nukleofilni karakter. Iminski atom azota, usled konjugacije sa aromatičnim ostatkom, doprinosi povećanju elektrofilnog

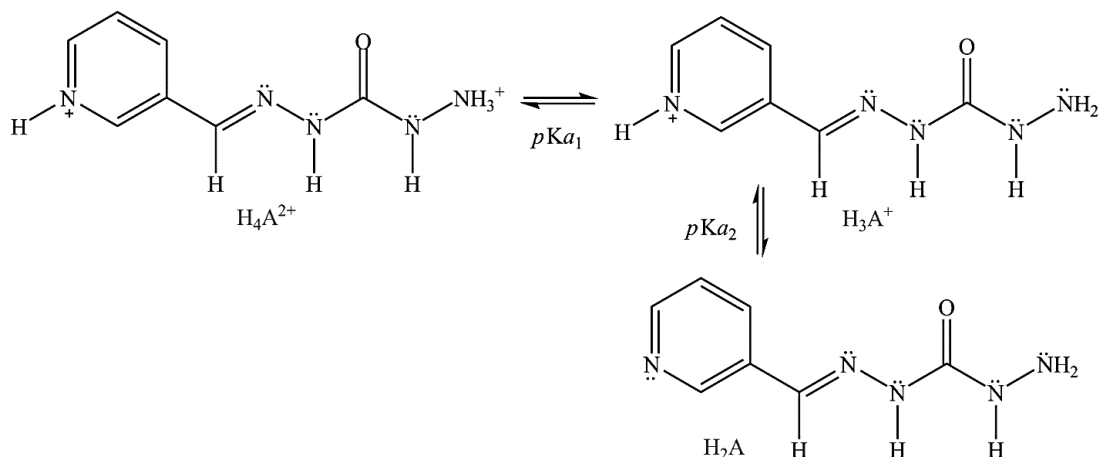
karaktera azometinskog ugljenika i snižava sposobnost prihvatanja vodonika. Na taj način merenje procesa protonovanja-deprotonovanja daje sliku o promeni distribucije naelektrisanja (i lokalne i na većoj udaljenosti od aktivnog mesta) i može se oceniti određivanjem pK_a vrednosti. Radi potvrđivanja uspešnosti primenjene eksperimentalne metodologije, određene vrednosti pK_a su upoređene sa teoretski izračunatim vrednostima²⁵⁶.

Tabela 4. 11 Eksperimentalno određene (pK_{aexp}) i izračunate (pK_{acalc}) pK_a vrednosti *E* izomera *mh*-UK

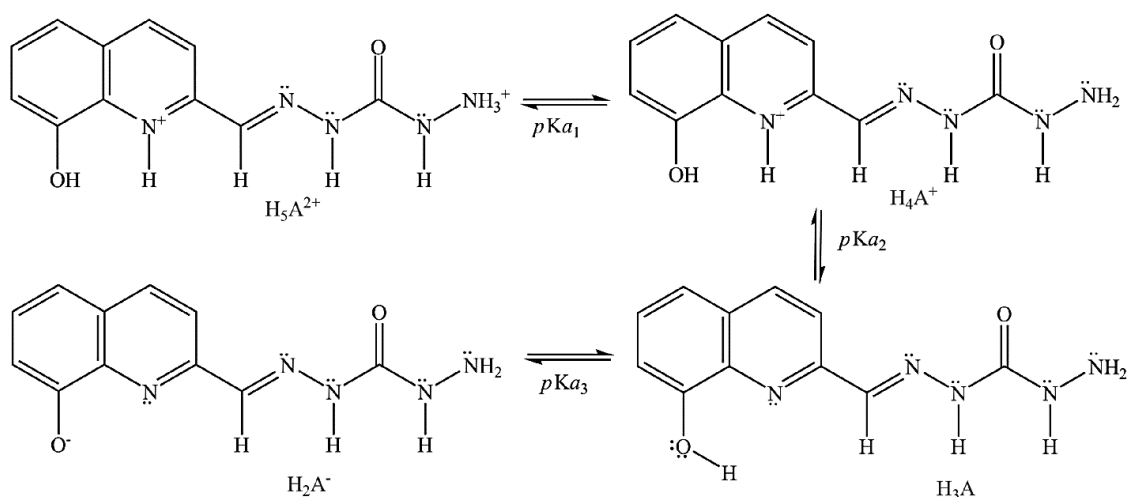
	pK_{a1exp}	pK_{a1calc}^*	pK_{a2exp}	pK_{a2calc}^*	pK_{a3exp}	pK_{a3calc}^*
<i>mhUK</i> _(ba)	3,27±0,05	2,79 ^x				
<i>mhUK</i> _(sal)	3,44±0,02	3,51			9,38±0,05	8,94
<i>mhUK</i> _(2pyc)	2,77±0,01	2,72	4,32±0,01	4,16		
<i>mhUK</i> _(3pyc)	3,17±0,06	2,94	4,48±0,06	4,08		
<i>mhUK</i> _(4pyc)	3,29±0,07	2,98	5,07±0,07	4,41		
<i>mhUK</i> _(af)	3,22±0,06	2,76 ^x				
<i>mhUK</i> _(2pya)	2,93±0,06	2,73	4,71±0,05	3,93		
<i>mhUK</i> _(3pyc)	3,19±0,11	2,99	4,83±0,09	4,13		
<i>mhUK</i> _(4pyc)	3,28±0,04	3,01	5,13±0,02	4,20		
<i>mhUK</i> _(8qc)	2,41±0,21	2,82	4,08±0,03	3,72		
<i>mhUK</i> _(2qc)	2,83±0,05	3,08	4,21±0,11	4,33		
<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	2,53±0,08	2,68	4,68±0,06	3,72	9,54±0,11	9,03

*ADMET Predictor, 2015 (<http://www.simulations-plus.com>). Sve predikcije su računate za *E* izomere jedinjenja *mh*-UK.²⁵⁶, ^x<http://www.chemaxon.com>

Rezultati potenciometrijski određenih pK_a vrednosti su prikazani u Tabeli 4.11, dok su moguće protolitičke ravnoteže u rastvoru u opsegu pH vrednosti od 1,8 do 12,2 za jedinjenja *mhUK*_(3pyc) i *mhUK*_(8OH2qc) prikazane na Šemama 4.2 i 4.3. Analiziranjem *mh*-UK ustanovljeno je da ispitivana jedinjenja sadrže značajan broj potencijalnih proton-akceptorskih i proton-donorskih mesta sa različitim mogućnostima za otpuštanje ili prihvatanje protona. Mogući procesi disocijacije koji su izvan ispitivanog pH opsega (1,8-12,2) nisu prikazani.



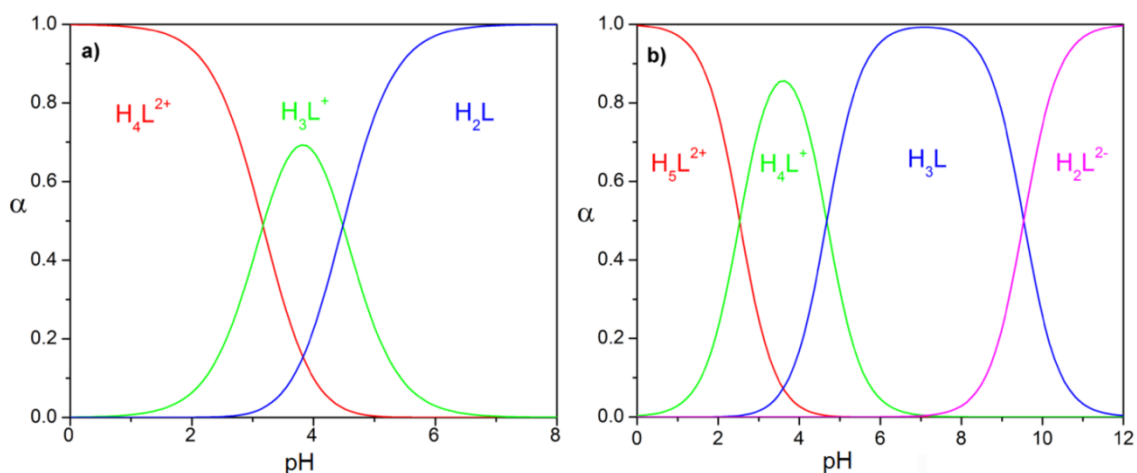
Šema 4. 2 Protolitička ravnoteža *mhUK*_(3pyc) u rastvoru vode



Šema 4. 3 Protolitička ravnoteža *mhUK*_(8OH2qc) u smeši rastvarača MeOH/voda

Na osnovu potenciometrijski određenih pK_a vrednosti formirani su dijagrami raspodele za jedinjenja *mhUK*_(3pyc) i *mhUK*_(8OH2qc) (Slika 4.18). Eksperimentalni podaci ukazuju da protonovana hidrazinil amino grupa pokazuje kiselost svojstva, uz malu zavisnost od položaja bočnog lanca u odnosu na položaj azota u piridinskom prstenu. Osim toga primećen je i mali uticaj sternih smetnji metil grupe na azometisnom atomu ugljeniku na pK_{a1} vrednosti. Slične eksperimentalne vrednosti logaritamskih vrednosti konstanti jonizacija (pK_{a1exp}) u *mhUK*_(8qc), *mhUK*_(2qc) i *mhUK*_(8OH2qc) u odnosu na *mhUK*_(2pyc) i *mhUK*_(2pya), ukazuju da na promenu pK_{a1} vrednosti najveći uticaj imaju elektron-akceptorski supstituenti prisutni na iminskom atomu ugljenika. Male promene

u pK_{a1} vrednostima **mh-UK** su uglavnom uzrokovane slabljenjem prenošenja efekta supstituenta do ostatka molekula tj. strukturnih elemenata hidrazida ugljene kiseline.



Slika 4. 18 Dijagrami raspodele: a) **mhUK**_(3pyc), b) **mhUK**_(8OH2qc) (α = molarna frakcija) dobijeni iz eksperimentalno izračunatih pK_a vrednosti

S druge strane, logaritamske vrednosti konstanti jonizacija protonovanih piridinskih/hinolinskih prstenova (pK_{a2}) koje se menjaju na sličan način kao i pK_{a1} vrednosti ukazujući da su efekti koji doprinose promeni obe pK_a vrednosti slični i nisu značajno zavisni od udaljenosti i položaja azota u aromatičnom jezgru u odnosu na bočni lanac. Elektron-donorske osobine hidroksilne grupe u jedinjenju **mhUK**_(8OH2qc) doprinose blagom povećanju pK_{a1} vrednosti. Posmatrajući trendove zavisnosti u slučaju **mhUK**_(2pyc) - **mhUK**_(4pyc) i **mhUK**_(2pya) - **mhUK**_(4pya), obe, pK_{a1} i pK_{a2} vrednosti se povećavaju usled pomeranja azota u heteroaromatičnom jezgru iz položaja 2 ka položaju 4 u odnosu na bočni lanac. To dokazuje odgovarajući uticaj elektron-akceptorskih efekata protonovanog piridinil supstituenta na kiselost terminalne hidrazinil amino grupe.

Štaviše, elektronska struktura i mogućnost formiranja vodoničnih veza ne utiču u velikoj meri na kiselost kiseonika iz hidroksilne grupe u **mhUK**_(sal) i **mhUK**_(8OH2qc). Ovakvo ponašanje je objašnjeno jakim uticajem HBD/HBA efekta rastvarača koji doprinose velikom umanjenju efekta intermolekulskih vodoničnih vezivanja.

4.3.1 LFER analiza primenjena na pK_a vrednosti molekula *mh*-UK

Produžena konjugacija kroz azometinsku grupu ispitivanih *mh*-UK može dovesti do pomeranja elektronske gustine ka hidrazidnom ostatku dhO utičući na proton-donorska i akceptorska svojstva odgovarajućih mesta sposobnih za disocijaciju. Da bi se razumeli i kvantifikovali uticaji strukturnih efekata na jonizacione konstante, tj. elektronski efekat supstituenata prisutnih na azometinskom ugljeniku, izvršena je LFER analiza korišćenjem SSP jednačine (jednačina 2.4). Rezultati korelacije pK_{aexp} vrednosti (Tabela 4.11) sa odgovarajućim konstantama supstituenata (Tabela P7.A4) su dati u Tabeli 4.12 i na Slici. P7.A2.

Na osnovu dobijenih rezultata jasno se uviđa da zavisnost između pK_a i σ_{pH^+} pokazuje značaj uticaja sposobnosti otpuštanja protona, što ukazuje da povećanje elektron-akceptorske sposobnosti supstituenta na azometinskom ugljeniku uzrokuje smanjenje kiselosti protovane amino grupe i piridinskog atoma azota.

Tabela 4. 12 Rezultati LFER korelacija pK_a vrednosti *E* izomera *mh*-UK sa σ_{pH^+} konstantama korišćenjem *Hammett*-ove jednačine

	ρ	h	R^a	F^b	Sd^c	n^d	Jedinjenja uključena u korelacije
$(pK_{a1})NH_3^+$	2,61 $\pm 0,08$	0,29 $\pm 0,04$	0,96	49,09	0,06	6	<i>mhUK</i> _(2pyc) - <i>mhUK</i> _(4pyc) <i>mhUK</i> _(2pya) - <i>mhUK</i> _(4pya)
$(pK_{a2})NH^+(OH)$	3,80 $\pm 0,25$	0,51 $\pm 0,13$	0,92	16,28	0,01	6	<i>mhUK</i> _(2pyc) - <i>mhUK</i> _(4pyc) <i>mhUK</i> _(2pya) - <i>mhUK</i> _(4pya)

^a Korelacioni koeficijent; ^b Standardna devijacija; ^c Fisher-ov test; ^d broj supstanci uključenih u korelacije

4.4 Masena spektrometrija

Maseni spektri snimljeni su u opsegu $m/z =$ od 50 do 600 u pozitivnom i negativnom elektrosprej jonizacionom modu. Masena spektrometrija je i u ovom slučaju omogućila razdvajanje i identifikaciju fragmenata koje se razlikuju po molekulskim masama. Detekcija analita je zasnovana na izolaciju protonovanog, $[M+H]^+$ ili deprotonovanog molekula $[M-H]^-$ za sve *mh*-UK, a fragmentacione šeme su prikazani na Slikama P7.A3-A8. Snimanje spektara u pozitivnom i negativnom modu izvršeno je radi razmatranja jonizacionih sposobnosti u ispitivanim molekulima koja su odgovorna za kiselost svojstva *mh*-UK u cilju poređenja sa određenim pK_a vrednosti.

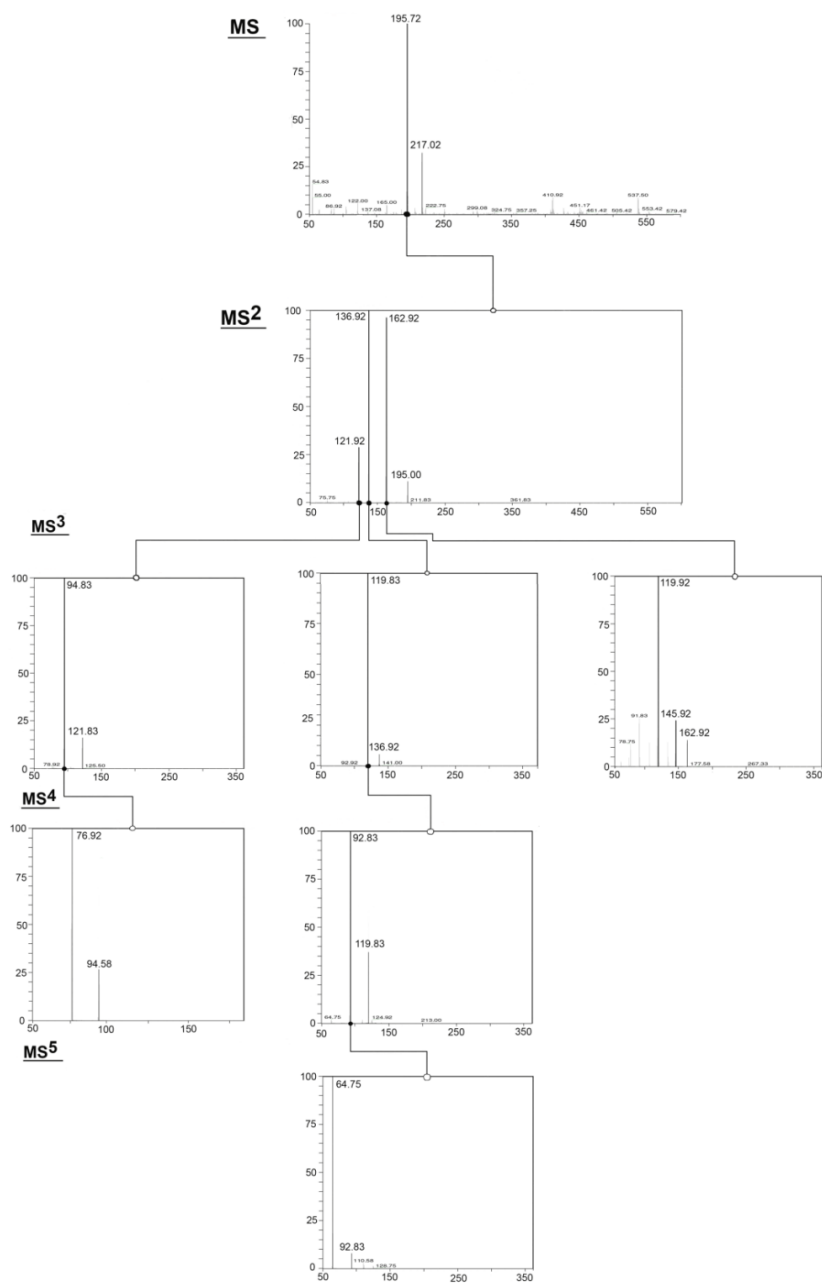
U MS spektru $mhUK_{(sal)}$ ($C_8H_{10}N_4O_2$, tačna masa 194,08) osnovni signal na $m/z = 195,17$ dodeljen je protonovanom molekularnom jonu, $[M + H]^+$. Osim toga uočen je adukt sa natrijumom $[M+Na]^+$ koji se pojavljuje na $m/z = 217,1$ (Slika 4.19). MS^2 spektar $mhUK_{(sal)}$ (Slika P7.A3) daje tri jaka signala koja odgovaraju fragmentima na m/z vrednostima 162,92, 136,92 i 121,92, respektivno. Fragment na m/z 162,92 dobijen je eliminacijom hidrazina (**I_a**) i dodatno se fragmentira gubitkom hidroksi radikala i CONH fragmenta gradeći 2-(2-hidroksibenziliden)-1-metildenhidrazinium jon, na m/z 145,92 (**Ib'**) i jon na m/z 119,83 (**Ib'**), respektivno. Odvajanjem semikarbazida, odnosno $H_2NNHCONH_2$ od $[M+H]^+$ jona, dobija se jon na m/z 121,92, od kog se dodatnom fragmentacijom i gubitkom cijanovodonika i vode formira protonovani fenol, m/z 94,73 (**IIIb**), i fenilni katjon na m/z 76,75 (**IIIc**), respektivno. Gubitak aminoizocijanatne grupe (H_2NNCO), iz protonovanog molekularnog jona $mhUK_{(sal)}$ dovodi do treće fragmentacije u MS^2 spektru uz formiranje jona na m/z 136,92, koji se dodatno fragmentiše gubitkom amonijum jona i daje ion na m/z 119,83 u MS^3 spektru. Daljim procesom uzastopne fragmentacije gubitkom cijanovodonika i ugljenik(II)-oksida formiraju se joni na m/z 93,03 (**II_c**) i 65,04 (**II_d**).

Za $mhUK_{(ba)}$ i $mhUK_{(2pyc)} - mhUK_{(4pyc)}$ (Slika P7.A4) prvi fragmentacioni korak je sličan fragmentaciji jedinjenja $mhUK_{(sal)}$. Glavni put fragmentacije, koji je zajednički za sva četiri jedinjenja predstavlja eliminaciju hidrazina u prvom koraku (**I_a**), nakon čega se u drugom koraku dešava eliminacija ugljenik(II)-oksida (**I_b**), a u trećem eliminaciju azota (**I_c**). Poslednji korak fragmentacija, koji je praćen odvajanjem cijanovodonika, moguć je samo za $mhUK_{(2pyc)} - mhUK_{(4pyc)}$ (**I_c** - **I_d**), uz dobijanje ciklopentadienil katjona. Sva četiri jedinjenja gubitkom aminoizocijanatne grupe formiraju drugi jon u MS^2 spektrima (**II_a**) koji je samo u slučaju jedinjenja $mhUK_{(4pyc)}$ dovoljno stabilan da se dalje fragmentiše (**X_a**).

Zajednička šema fragmentacije za $mhUK_{(af)}$ i $mhUK_{(2pya)} - mhUK_{(4pya)}$ čije je ponašanje u toku fragmentacija je slično dobijenim za $mhUK_{(ba)}$ i $mhUK_{(2pyc)} - mhUK_{(4pyc)}$, prikazano je na Slici P7.A5. Za sva četiri jedinjenja u zajedničkom putu fragmentacije u prvom koraku vrši se odvajanje hidrazina (**I_a**), u drugom koraku eliminacija ugljenik(II)-oksida (**I_b**), dok u trećem koraku uklanjanje azota dovodi do stvaranja $ArCH^+(CH_3)$ jona (**I_c**). Za jedinjenja $mhUK_{(af)}$, $mhUK_{(2pya)}$ i $mhUK_{(3pya)}$

fragmentacija $[M+H]^+$ jona dovodi i do formiranja novog jona gubitkom aminoizocijanatne grupe (**IIa**).

Naknadna fragmentacija u slučaju $mhUK_{(3pya)}$ vodi do stvaranja $ArC_2H_3N^+$ jona gubitkom amonijaka (X_a). Za $mhUK_{(af)}$ i $mhUK_{(2pya)}$ isti jon je generisana u MS^3



Slika 4. 19 Višestruko fazni fragmentacioni spektri (MS-MS⁵) dobijeni za $mhUK_{(sal)}$

spektu ali je nastao sledeći drugi put fragmentacije, tj odvajanjem -CONH grupe od **Ia** jona. Naknadna fragmentacija jona $\text{ArC}_2\text{H}_3\text{N}^+$ daje dva finalna fragmenta gubitkom cijanovodonika (**X_a'**) i odvajanjem NCCH_2 fragmenta (**X_b'**). Za jedinjenja **mhUK_(af)** i **mhUK_(3pya)** treći fragment uočen u MS^2 spektru dobijen je eliminacijom $-\text{H}_2\text{NNHCON}$ grupe.

Šema fragmentacije za **mhUK_(8qc)** prikazana je na Slici P7.A6. MS^2 spektar ukazuje na formiranje fragmenta uočnog na m/z 198,0 koji se nakon toga deli na tri fragmenata m/z 141,92, 154,92 i 181,00. Najzastupljeniji fragment je na m/z 141,92 i njegovim daljim fragmentisanjem dobija se 7H-ciklopenta[b]piridin-7-ilium jon (**Ib'**). Fragment na m/z 154,92 gubitkom cijanovodonika daje hinolinium katjon detektovan na m/z 127,83 (**Ic**), a najmanje zastupljen fragment na m/z 181,00 se dobija gubitkom H_3CN grupe proizvodeći hinolin-7-karbonitril jon detektovan na m/z 152,92 (**Ib'**).

Jedinjenja **mhUK_(2qc)** i **mhUK_(8OH2qc)** (Slika P7.A7) pokazuju vrlo slično ponašanje u fragmentacije kao jedinjenja **mhUK_(2pyc)** - **mhUK_(4pyc)**. Oba jedinjenja u prvom koraku fragmentacija pokazuju gubitak hidrazina (**Ia**), nakon čega sledi gubitak ugljenik(II)-oksida (**Ib**) i azota (**Ic**). Finalni korak fragmentacije uočen je kod jona Ar-CH_2^+ (**Ic**) koji daje jone detektovane na m/z 114,83 i m/z 130,17 za **mhUK_(2qc)** i **mhUK_(8OH2qc)**, respektivno. Za jedinjenje **mhUK_(2qc)** drugi fragment uočen na m/z 172,17, dobijen je u prvom koraku fragmentacije odvajanjem NH_2NCO grupe.

Za sva ispitivana jedinjenja uobičajan put fragmentacije u prvom koraku je bio gubitak hidrazina. Za jedinjenja **mhUK_(2pyc)** - **mhUK_(4pyc)**, **mhUK_(2pya)** - **mhUK_(4pya)** i **mhUK_(2qc)** i **mhUK_(8OH2qc)** glavni put fragmentacije bio je sličan, gubitak hidrazina u prvom koraku fragmentacije, zatim gubitak ugljenik(II)-oksida, a potom izdvajanje azota. Jedinjenja **mhUK_(sal)**, **mhUK_(2pyc)** - **mhUK_(4pyc)**, i **mhUK_(2pya)** - **mhUK_(4pya)** pored gubitka hidrazina u prvom koraku fragmentacije takođe generišu i fragment dobijen gubitkom H_2NNCO grupe.

Masena fragmentacija deprotonovanog molekularnog jona je sasvim jednostavna i praćena je eliminacijom najkiselijeg vodonika. Zajednička šema fragmentacije za sva jedinjenja predstavljena je na Slici P7.A8. Sva jedinjenja u prvom koraku fragmentacije generišu fragment $-\text{NHNHCO}$ (**Ia**) dok u drugom koraku fragmentacije vrši se izdvajanje azota (**Ib**). Jedinjenja **mhUK_(2pyc)**, **mhUK_(3pya)** i **mhUK_(4pya)** daljom fragmentacijom grade anjone predstavljene strukturom **Ic** za 2- i 3- piridnil i **Id** za 4-

piridinil supstituisana jedinjenja. U prvom koraku fragmentacije **mhUK**_(sal) i **mhUK**_(8OH2qc), pored gubitka NHNHCO grupe, generišu fragment i gubitkom hidrazina (**IIa**). Treći fragment u prvom koraku fragmentacije je dobijen i za **mhUK**_(2pyc) i **mhUK**_(8qc) gubitkom NHNHCON₂ grupe.

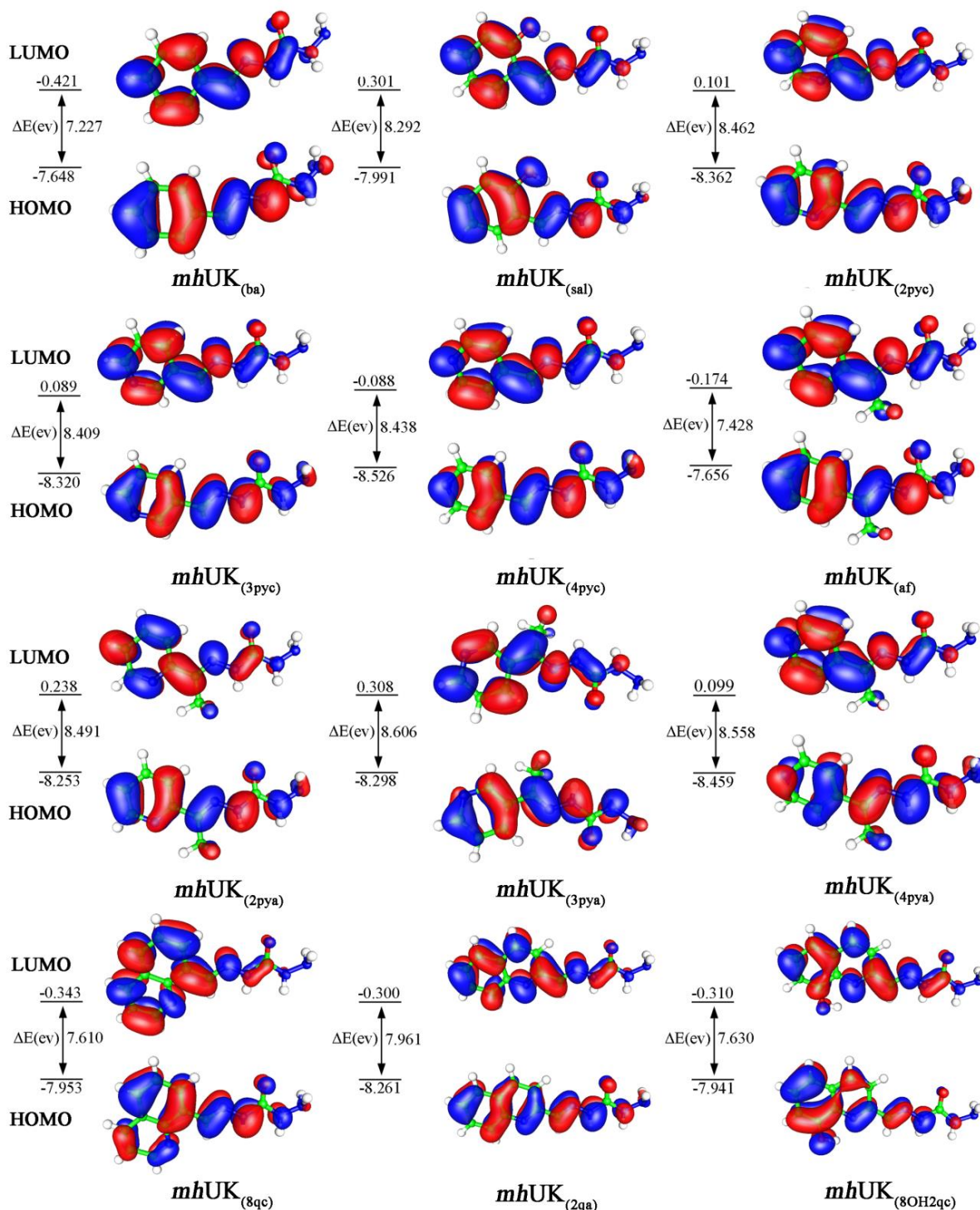
Uopšteno, na fragmentaciju ispitivanih jedinjenja utiču proton-donorske i akceptorske sposobnosti određenih kiselih i baznih mesta u molekulu, što dokazuje da lokalna raspodela elektronske gustine predstavlja važan faktor koji određuje režim fragmentacije ispitivanih jedinjenja.

4.5. TD-DFT proračuni: priroda graničnih molekulskih orbitala i kvantifikacija ICT

U nastavku ispitivanja u ovoj disertaciji proučavane su promene u raspodeli ukupnog naelektrisanja u osnovnom i ekcitanom stanju na osnovu proračuna HOMO/LUMO energija ($E_{\text{HOMO}}/E_{\text{LUMO}}$) i E_{gap} vrednosti u gasnoj fazi i u DMSO-u. Dobijeni rezultati su predstavljeni na Slikama 4.20 i P7.A9 i u Tabeli 4.13. Neznačajan intramolekulski prelaz naelektrisanja može se uočiti iz struktura HOMO-LUMO orbitala, kao i to da su E_{gap} vrednosti sveobuhvatno posmatrajući niže za hinolinske **mhUK**. Najveće energetske razlike od 9,282 i 9,168 eV pronađene su za **mhUK**_(3pya) i **mhUK**_(4pya) u Z obliku, dok su najniže razlike u energiji primećene u slučaju **mhUK**_(8qc), **mhUK**_(2qc) i **mhUK**_(8OH2qc) sa vrednostima od 7,610, 7,961 i 7,630 eV, respektivno. Ovi podaci su u skladu sa najvećim batohromnim pomerajima maksimuma apsorpcije u odnosu na nesupstituisano jedinjenje. Može se primetiti da su elektronske gustine HOMO i LUMO orbitala za sva jedinjenja više ili manje ravnomerno raspoređene u celom molekulu, što ukazuje na nizak stepen ICT u toku ekscitacije. Osim toga gustina HOMO/LUMO orbitala je najveća na heterocikličnom prstenu, zbog jakog elektron-akceptorskog karaktera atoma azota koji uzrokuje pomeranje π -elektronske gustine od ostatka molekula na suprotnu orijentaciju i slabiji elektron-akceptorski karakter ostatka dhO.

Očigledno je da je ICT proces lakše izvodljiv u jedinjenjima sa većom π -elektronskom gustinom, odnosno kod monohidrazona koji u svom sastavu sadrže hinolinsko jezgro. Razlog tome je veća polarizabilnost pobuđenog stanja koje je prvenstveno stabilizovano pod uticajem rastvarača u odnosu na osnovno stanje (Tabela

4.13). Usled toga su pobuđeno i osnovno stanje bliži što omogućava efikasnije prelaze. Varijacija strukturnih elemenata ili supstituenta jasno ukazuju da su doprinosi oba faktora i strukture i donor-akceptor karakteristike supstituenta uključeni u ICT mehanizam ispitivanih jedinjenja.



Slika 4. 20 Prikaz HOMO/LUMO orbitala i E_{gap} mh -UK (E oblik) u DMSO-u

Tabela 4. 13 Rezultati TD-DFT proračuna za prelaze iz osnovnog u prvo vertikalno pobuđeno stanje u DMSO

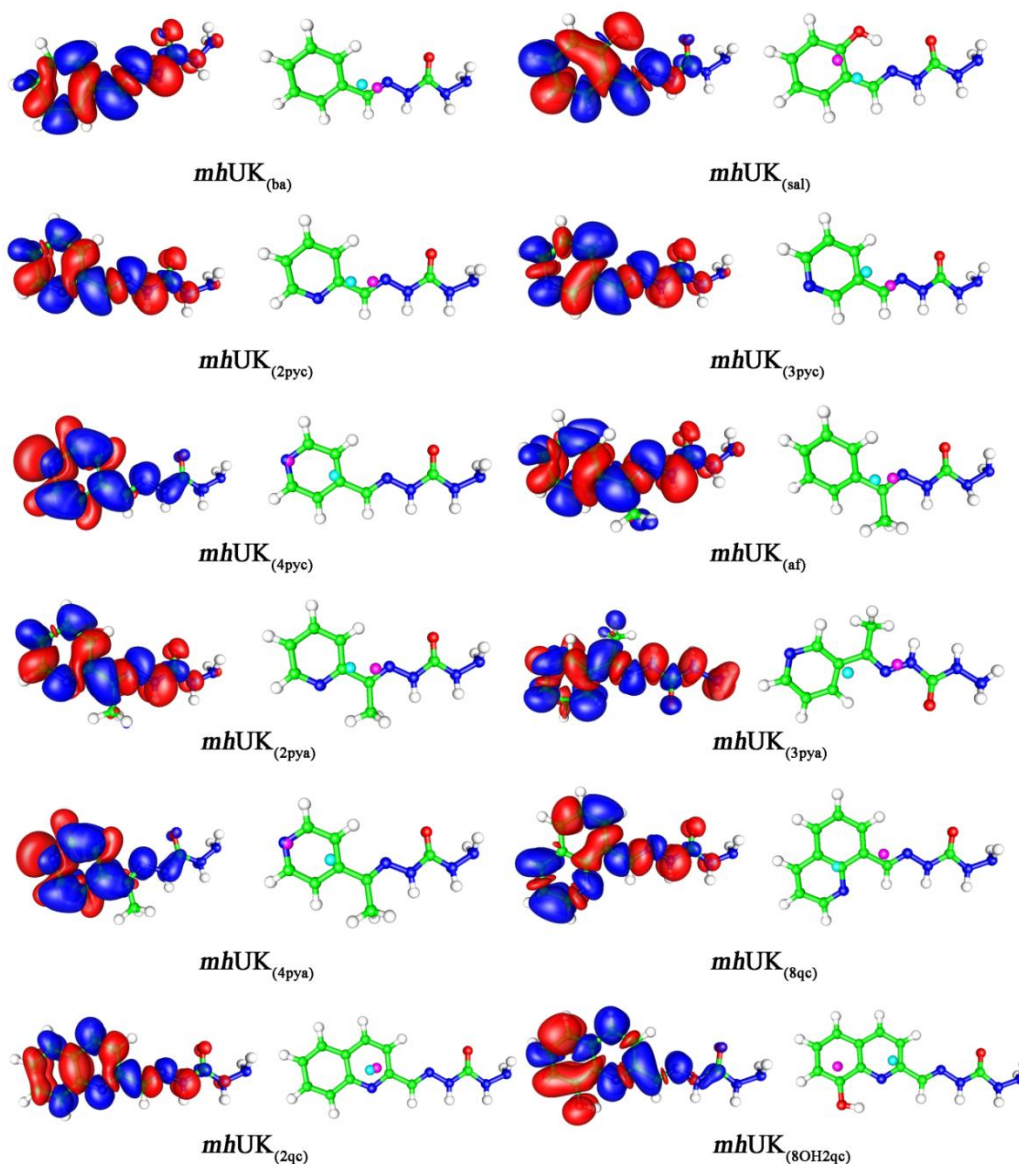
Supstance / izomeri	Energija (eV)	Oscilatorna snaga	Pobuđivanje	CI keficient ekspanzije	% doprinosa jednoelektro nskih prelaza
<i>mhUK</i> _(ba) / E	4,5721	0,8329	HOMO → LUMO	0,69413	96,36
<i>mhUK</i> _(ba) / Z	4,9323	0,4692	HOMO → LUMO	0,68389	93,54
<i>mhUK</i> _(sal) / E	4,3751	0,4378	HOMO → LUMO	0,68013	92,52
<i>mhUK</i> _(sal) / Z	4,8737	0,2377	HOMO-1 → LUMO	0,12199	2,98
			HOMO → LUMO	0,65268	85,20
			HOMO-1 → LUMO	0,10068	2,03
			HOMO → LUMO+1	0,14749	4,35
<i>mhUK</i> _(2pyc) / E	4,6647	0,8708	HOMO-1 → LUMO+2	0,13082	3,42
			HOMO → LUMO	0,69183	95,73
			HOMO → LUMO	0,68932	95,03
			HOMO → LUMO	0,6889	94,92
<i>mhUK</i> _(3pya) / E	4,6117	0,7878	HOMO → LUMO	0,69372	96,25
<i>mhUK</i> _(4pyc) / E	4,6815	0,8384	HOMO → LUMO	0,69115	95,64
<i>mhUK</i> _(af) / E	4,7889	0,7242	HOMO → LUMO	0,68398	93,56
<i>mhUK</i> _(af) / Z	5,2377	0,3730	HOMO → LUMO	0,69092	95,47
<i>mhUK</i> _(2pya) / E	4,6999	0,7626	HOMO → LUMO	0,69117	95,54
<i>mhUK</i> _(2pya) / Z	4,458	0,5501	HOMO → LUMO	0,68091	92,73
<i>mhUK</i> _(3pya) / E	4,7798	0,6454	HOMO → LUMO	0,33081	21,89
<i>mhUK</i> _(3pya) / Z	5,1039	0,0184	HOMO → LUMO	-0,1172	2,75
			HOMO-1 → LUMO	0,30703	18,85
			HOMO-2 → LUMO	0,47447	45,02
			HOMO-3 → LUMO	0,11188	2,50
			HOMO-5 → LUMO	-0,11158	2,49
			HOMO-7 → LUMO	0,68797	94,66
			HOMO → LUMO	-0,13373	3,58
<i>mhUK</i> _(4pya) / E	4,7902	0,6856	HOMO-1 → LUMO	0,19789	7,83
			HOMO-2 → LUMO	0,54799	60,06
			HOMO-3 → LUMO	-0,3013	18,16
			HOMO-2 → LUMO	0,10459	2,19
			HOMO-2 → LUMO+2		
<i>mhUK</i> _(8qc) / E	4,045	0,588	HOMO → LUMO	0,68888	94,91
<i>mhUK</i> _(2qc) / E	4,3282	0,7059	HOMO → LUMO	0,57551	66,24
			HOMO → LUMO+1	-0,13347	3,56
			HOMO-1 → LUMO	0,29287	17,15
			HOMO-2 → LUMO	0,1049	2,20
<i>mhUK</i> _(8OH2qc) / E	4,0394	0,3024	HOMO → LUMO	0,6808	92,70
			HOMO-1 → LUMO	0,14272	4,07
			HOMO-1 → LUMO+1		

Dodatni rezultati iz TD-DFT proračuna, oscilatorna snaga, vertikalna energija ekscitacije i elektronski prelazi dati su u Tabeli 4.13. Rezultati TD-DFT ukazuju na veliki doprinos HOMO → LUMO prelaza iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje (više od 90 % za *E* izomer; Tabela 4.13). Samo u slučaju 2-hinolil jedinjenja **mhUK**_(2qc), uočava se učešće HOMO-1 → LUMO ekscitacije (17.15%), HOMO-2 → LUMO (2.20%) i HOMO → LUMO+1 (3.56%) prelaza. Na osnovu proračuna E_{gap} vrednosti zaključeno je da su proračuni u skladu sa eksperimentalnim rezultatima dobijenim iz UV-Vis spektrofotometrijskih merenja.

ICT nastaje kada apsorpcija fotona podstiče značajnu deformaciju elektronskog oblaka usled odgovarajućeg (delimičnog odnosno ukupnog) elektronskog pomaka od jednog dela molekula u drugi. U cilju merenja ovih pojava, jednostavan i efikasan model je korišćen za definiciju i procenu ICT na osnovu izračunate ukupne distribucije naelektrisanja i promena kako u osnovnom tako i u pobuđenom stanju^{220,257,258}. U ovoj disertaciji proračunavanje rastojanja prenosa naelektrisanja i količine prenetog naelektrisanja vršeno je TD-DFT metodom u cilju kvantifikacije ICT-a.

Tabela 4. 14 Izračunate D_{CT} i Q_{CT} vrednosti *mh*-UK u toku ekscitacije elektrona

jedinjenje/ izomer	Q_{CT} (e ⁻)	D_{CT} (Å)
mhUK _(ba) / <i>E</i>	0,448	0,835
mhUK _(ba) / <i>Z</i>	0,543	2,130
mhUK _(sal) / <i>E</i>	0,583	1,320
mhUK _(sal) / <i>Z</i>	0,487	0,858
mhUK _(2pyc) / <i>E</i>	0,484	1,134
mhUK _(2pyc) / <i>Z</i>	0,577	2,180
mhUK _(3pyc) / <i>E</i>	0,497	1,465
mhUK _(4pyc) / <i>E</i>	0,743	2,378
mhUK _(af) / <i>E</i>	0,443	0,907
mhUK _(af) / <i>Z</i>	0,622	2,782
mhUK _(2pya) / <i>E</i>	0,471	1,284
mhUK _(2pya) / <i>Z</i>	0,614	2,482
mhUK _(3pyc) / <i>E</i>	0,558	2,516
mhUK _(3pyc) / <i>Z</i>	0,725	1,254
mhUK _(4pyc) / <i>E</i>	0,732	2,208
mhUK _(4pyc) / <i>Z</i>	0,706	1,377
mhUK _(8qc) / <i>E</i>	0,421	2,629
mhUK _(2qc) / <i>E</i>	0,374	0,401
mhUK _(8OH2qc) / <i>E</i>	0,614	3,183



Slika 4. 21 ICT procesi u supstancama *mh*-UK (*E* oblik) (Sa leve strane prikazana je razlika u gustini ekcitovanog i pobuđenog stanja (crveno-gustina raste i plavo – gustina opada); Sa desne strane prikazane su pozicije bari centara za gubitak naelektrisanja (plavi krug) i porast naelektrisanja (ljubičasti krug) pri prelazima)

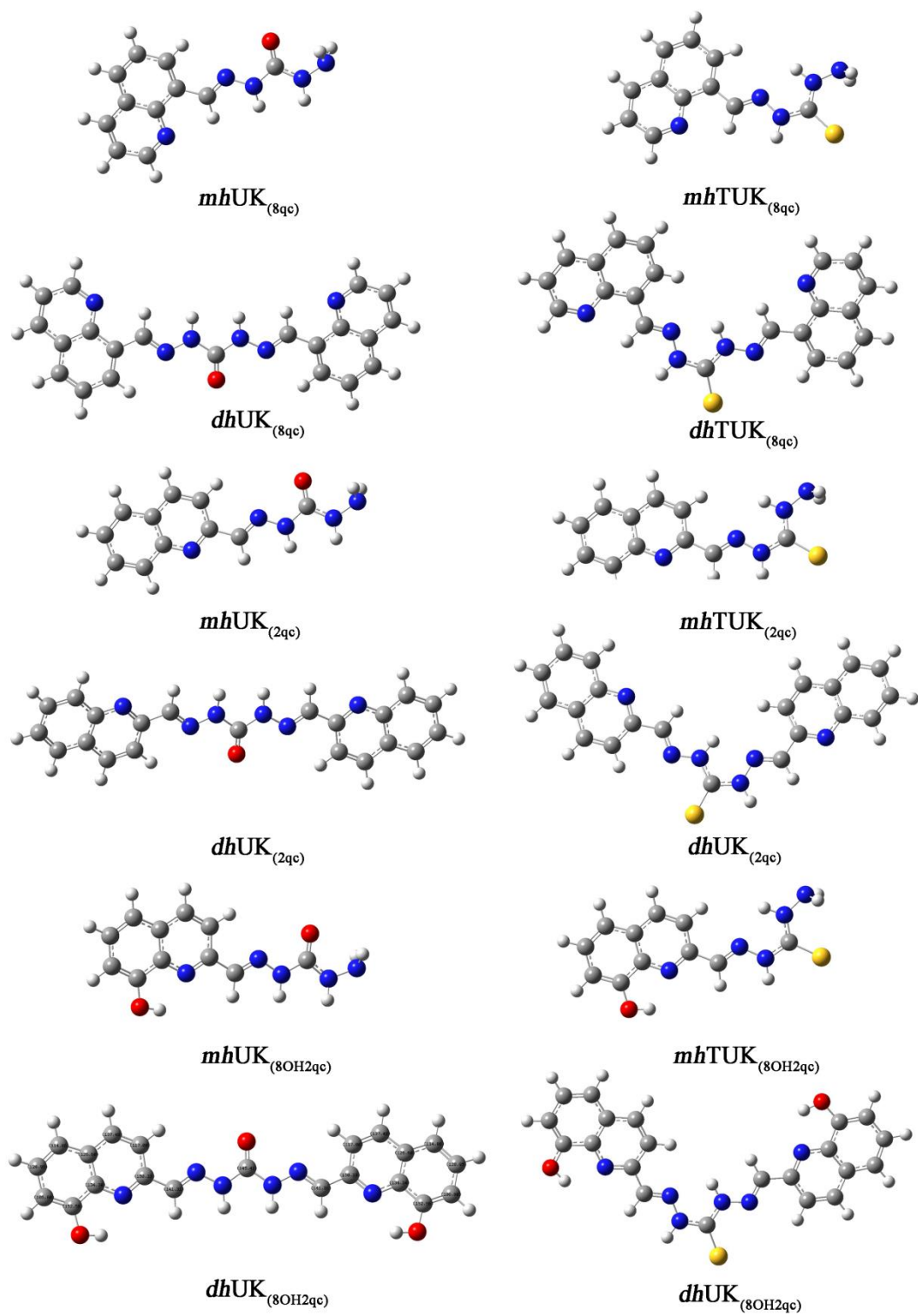
Proces elektronskih pobuđivanja se odvija apsorpcijom fotona koji izaziva pomeranje gustine elektrona iz jednog dela u drugi deo molekula u toku elektronskog prelaza, i generalno rezultira promenom dipolnog momenta u pobuđenom stanju u odnosu na osnovno stanje. Rezultati izračunatog rastojanja između dva baricentra, D_{CT} I

Q_{CT} su prikazani u Tabeli 4.14. Primetno je da se najjači ICT javlja kod $mhUK_{(4pyc)}$ i $mhUK_{(4pya)}$ u E obliku, tj. kod 4-piridinil supstituisanih jedinjenja, pokazujući prenos od $0,743 e^-$ preko $2,378 \text{ \AA}$ i $0,732 e^-$ preko $2,208 \text{ \AA}$ rastojanja, respektivno. Sa druge strane u slučaju $mhUK_{(2qc)}$ prisutan je intramolekulski prenos naelektrisanja od $0,374 e^-$ preko $0,401 \text{ \AA}$ što ukazuje na pojavu uticaja lokalnog procesa koji se javlja u π -elektronskom sistemu supstituenta (Slika. 4.21). Varijacija supstituenta na iminskom delu ispitivanih molekula ukazuje da su doprinosi konformacionog uređenja i donor-akceptorskog karaktera uključeni u ICT mehanizam ispitivanih molekula (Slika. 4.21 i P7.A10). Eksperimentalna i teorijska studija nagoveštava da su solvatohromne i fizičko-hemijske osobine ispitivanih mh -UK posledica ukupnog efekta geometrije molekula sa uticajem efekata elektronskih efekata supstituenata prenetih kroz π - konjugovani sistem, i rezultati dobijeni u ovoj studiji su od pomoći u proceni potencijalne primene ispitivanih jedinjenja.

4.6. Kvantnohemijsko proučavanje stabilnosti hinolinskih derivata h - (T)UK

Optimizacija geometrija hinolinskih derivata izvršena je primenom DFT metode. Nakon optimizacije uvideno je da postoje značajne strukturalne razlike u optimizovanim geometrijama h -UK i h -TUK (Slika 4.22). Analogni mh -(T)UK razlikuju se u atomskoj orijentaciji atoma halkogena, dok su u slučaju dihidrazona dobijene simetrične konformacije kod h -UK a nesimetrične u slučaju h -TUK. Teoretska izračunavanja su potvrđena na osnovu rezultata NMR spektroskopije. Hemijska pomeranja (1H i ^{13}C) optimizovanih geometrija svih jedinjenja (Tabela P7.A6) izračunatih pomoću paketa GIAO/B3LYP su u skladu sa podacima dobijenim eksperimentalnom NMR spektroskopijom (Tabela P7.A7-A10). Slike NMR spektara sa obeleženim atomima od značaja za ovu grupu ispitivanih jedinjenja prikazane su u prilogu. (Slika P7.B1-B72)

Naime, glavna razlika između spektara dh -UK i dh -TUK detektovana je na 1H NMR spektru, pri čemu je kod sumpornih jedinjenja primećeno prisustvom dva različita protonska signala na hidrazidnom atomu azota i iminskom atomu ugljenika. Prisustvo dva različita protonska signala je već literaturno poznato za dh -TUK,⁴⁷ a ovaj fenomen je objašnjem sposobnošću ove vrste jedinjenja da formira intramolekularne vodonične veze između hidrazidnog atoma vodonika i iminskog atoma azota, dok u slučaju dh -UK nema mogućnosti za formiranje ove vrste vodoničnih veza.



Slika 4. 22 Optimizovane geometrije derivata *mh*- i *dh*- (T)UK na bazi hinolina

4.7. Ispitivanje biološke aktivnosti *mh-* i *dh-* (T)UK

4.7.1 Antikancer aktivnost hinolinskih derivata *mh-* i *dh-* (T)UK

Uprkos činjenici da je u terapiji kancera postignut značajan napredak, potpuno izlečenje od maligne bolesti koja je dijagnostikovana u fazi ili nakon formiranja metastatskih ognjišta za sada nije moguće. Hirurškim odstranjenjem primarnog malignog ognjišta i potonjim hemio i/ili radioterapijskim tretmanom može se postići i značajno produženje života pacijenta. Međutim, osnovni razlog smrtnog ishoda malignih bolesnika jeste ponovna pojava bolesti (relaps) koji se može razviti i godinama nakon što je naizgled uspešna terapija okončana. Ključni uzrok ovakvog epiloga leži u otpornosti CSC subpopulacije malignih ćelija na primenjene tretmane.²⁵⁹ CSC ćelije poseduju značajno naprednije mehanizme adaptacije na stres u poređenju sa ne-matičnim ćelijama tumora^{260,261}. Osim što je njihova sposobnost popravke oštećenja DNA nastale usled delovanja hemio i radio terapije znatno efikasnija, CSC za razliku od ostatka malignog tkiva imaju sposobnost ulaska u fazu mitotičkog mirovanja, čime postižu potpunu zaštitu od delovanja primenjene terapije. Dodatno, CSCs istog tumora se odlikuju visokim stepenom genomske heterogenosti usled čega su u mogućnosti da epigenetskim alteracijama formiraju sub-klonove ćelija kao nosioce različitih fenotipskih adaptacija i posledične rezistencije na antitumorsku terapiju²⁶².). Iz navedenih razloga, uspešnost terapije ponovljene bolesti je znatno manja, a dužina preživljavanja bolesnika nakon pojave relapsa višestruko kraća u odnosu na preliminarnu procenu. Do sada ne postoji niti jedna poznata i pouzdano uspešna terapija za eliminaciju CSCs subpopulacije, tako da potreba za novim lekovima i dalje ne jenjava. Od novih terapeutika se očekuje da zadovolje oba uslova neophodna za potpuno izlečenje maligne bolesti: da izazovu RCD ne-matičnih i CSC ćelija tretiranog tumora. Dodatni taktički pristup u borbi sa CSC sub-populacijom jeste i podsticanje njihovog genomskog reprogramiranja (diferencijacije), čime bi se sprečilo njihovo skrivanje u fazi mitotičkog mirovanja, epigenetskih alteracija i formiranja rezistentnih sub-klonova.

Antikancerska aktivnost jedinjenja iz grupe hinolona i hidrazina su ranije ispitivana, i različite istraživačke grupe su potvrdile njihov obećavajući potencijal¹⁷⁻²². U cilju utvrđivanja sposobnosti novosintetisanih jedinjenja da deluju kao sveobuhvatni anti-kancer agensi sa sposobnošću otklanjanja kancer ne-matičnih i CSC ćelija, u ovoj disetraciji organizovana je biološka studija ispitivanja *h-*(T)UK na bazi hinolina

(*mhUK*_(8qc), *dhUK*_(8qc), *mhTUK*_(8qc), *dhTUK*_(8qc), *mhUK*_(2qc), *dhUK*_(2qc), *mhTUK*_(2qc), *dhTUK*_(2qc), *mhUK*_(8OH2qc), *dhUK*_(8OH2qc), *mhTUK*_(8OH2qc) i *dhTUK*_(8OH2qc)) na nematičnom modelu kancera (THP-1) i CSC modelu poznatom po visokom stepenu rezistencije na hemioterapeutike primenljive u kliničkoj terapiji (AsPC-1)^{263,264}. Dodatno, osim na standardnom 2D (*monolayer*) ćelijskom modelu, aktivnost ovih jedinjenja je ispitivana i na 3D kulturama koje zbog svoje organizacione sličnosti tumorima u organizmu pružaju mogućnost znatno preciznije procene uspešnosti tretmana.

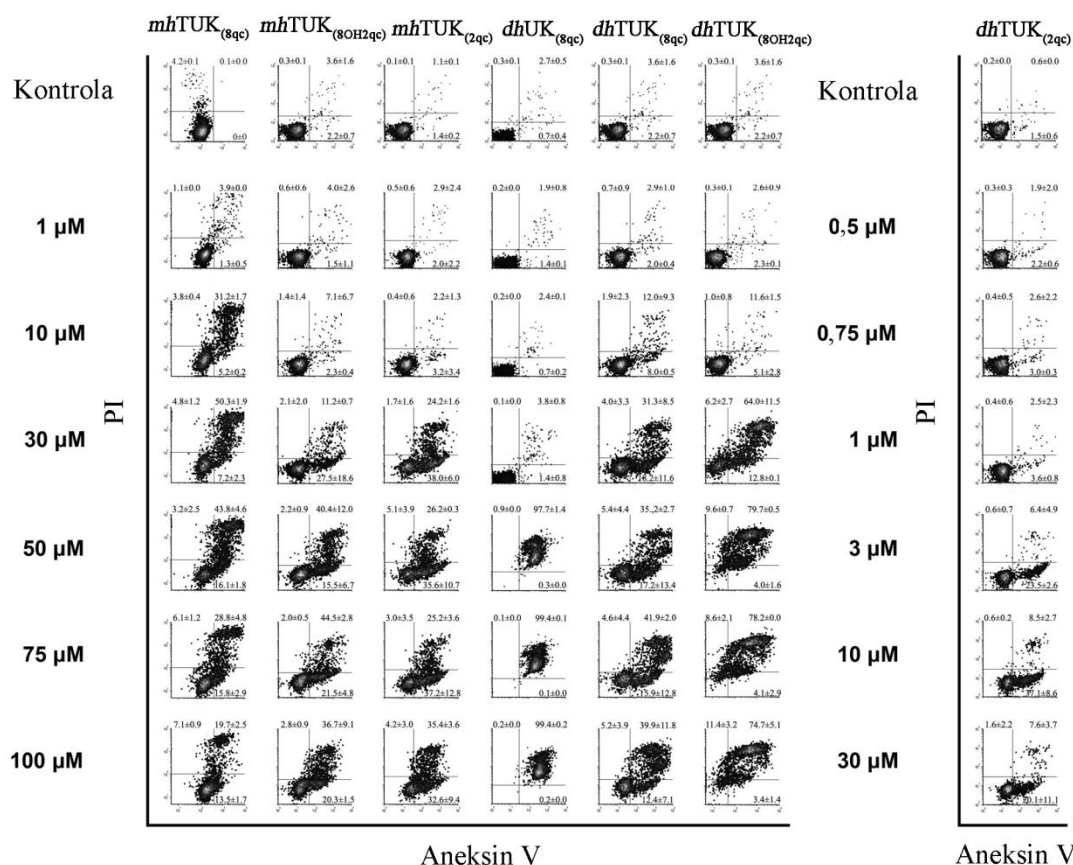
4.7.1.1 Pro-apoptotski potencijal (T)CSs jedinjenja

Pro-apoptotska aktivnost ispitivanih jedinjenja procenjivana je nakon 24 sata delovanja na tretiranim ćelijama. Ispitivana jedinjenja testirana su u šest koncentracija, inicijalno u rasponu od 1-100 μM , da bi ovaj raspon bio naknadno podešavan ukoliko je postojala potreba da donji plato dozno-zavisne krive bude jasno definisan.

Posmatrano u sklopu odnosa strukture i aktivnosti, sva jedinjenja iz *h*-TUK podgrupe pokazala su sposobnost da izazovu apoptozu u THP-1 ćelijama, dok su u podgrupi *h*-UK jedinjenja *dhUK*_(8qc) i *dhUK*_(8OH2qc), bila jedina sa sposobnošću da iniciraju ćelijsku smrt na ovim ćelijama (Tabela 4. 15, Slika 4.23). Obzirom da nekroza nije poželjan oblik ćelijske smrti, ovakav ishod u THP-1 uzorcima tretiranim sa *dhUK*_(8qc) i *dhUK*_(8OH2qc) bio je razlog da se ova jedinjenja povuku iz daljih ispitivanja na ovoj ćelijskoj liniji.

Tabela 4. 15 ED50 koncentracija (μM) postignuta posle 24 h tretmana na THP-1 i AsPC-1 ćelijama sa *h*-(T)UK

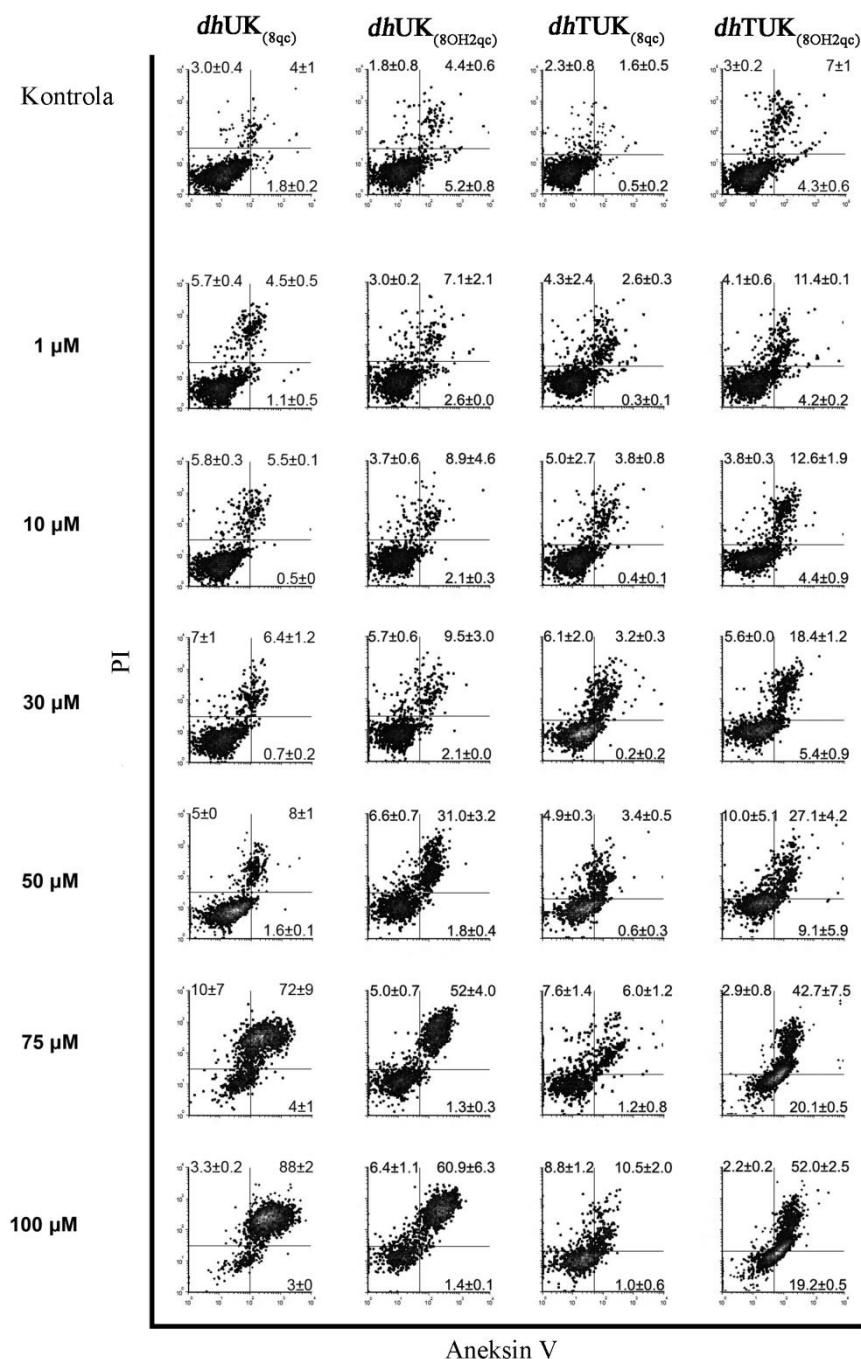
<i>h</i> -UK	THP-1	AsPC-1	<i>h</i> -TUK	THP-1	AsPC-1
<i>mhUK</i> _(8qc)	n.d.*	n.d.	<i>mhTUK</i> _(8qc)	8,4 \pm 0,3	n.d.
<i>dhUK</i> _(8qc)	35,2 \pm 0,7	64 \pm 4	<i>dhTUK</i> _(8qc)	14 \pm 5	75 \pm 3
<i>mhUK</i> _(2qc)	n.d.	n.d.	<i>mhTUK</i> _(2qc)	15,8 \pm 0,5	n.d.
<i>dhUK</i> _(2qc)	n.d.	n.d.	<i>dhTUK</i> _(2qc)	2,4 \pm 0,2	n.d.
<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	n.d.	n.d.	<i>mhTUK</i> _(8OH2qc)	24 \pm 9	n.d.
<i>dhUK</i> _(8OH2qc)	n.d.	57 \pm 2	<i>dhTUK</i> _(8OH2qc)	18 \pm 6	74 \pm 5



Slika 4. 23 Odgovor ćelijske smrti na THP-1 ćelijama mereno posle 24 h inkubacija sa ispitivanim *h*-(*T*)UK pomoću dvojne metode bojenja Aneksinom V i PI

Za razliku od rezultata dobijenih tretmanom THP-1 ćelija, svega je četiri jedinjenja pokazalo sposobnost da izazovu ćelijsku smrt u AsPC-1 ćelijskoj liniji (Tablea 4.15, Slika 4.24). Zanimljivo je da su ta četiri jedinjenja strukturni analozi, odnosno jedinjenja *dhUK*_(8qc) i *dhUK*_(8OH2qc) podgrupe ugljene kiseline i *dhTUK*_(8qc) i *dhTUK*_(8OH2qc) podgrupe tiougljene kiseline. Oba jedinjenja iz podgrupe tiougljene kiseline, *dhTUK*_(8qc) i *dhTUK*_(8OH2qc), pokazala su slabiji pro-apoptotski potencijal na AsPC-1 u odnosu na THP-1 ćelije, što nije bilo iznenađenje imajući u vidu da je ovaj ćelijski model visoko rezistentan na citostatike u kliničkoj upotrebi za terapiju adenokarcinoma pankreasa^{23,265}. Na osnovu procenta Aneksin V pozitivnih ćelija, jedinjenje *dhUK*_(8qc) bi se moglo definišati kao najaktivnije. Slično tome, tretman AsPC-1 ćelija sa *dhUK*_(8OH2qc) je izazvao nakupljanje ćelija obojenih sa Aneksinom V i PI praćeno veoma niskim procentom ćelija markiranih samo Aneksinom V (rana apoptotza, Slika 4.24). Usled naglog nakupljanje duplo markiranih ćelija za koje se ne

može jasno utvrditi da li pripadaju kasnoj apoptozi ili nekrozi, uz istovremeno odsustvo koncentracijaki-zavisnog postupnog povećanja procenta ćelija u ranoj apoptotzi, bilo je veoma indikativno da se dvojno markirane ćelije u AsPC-1 uzorcima tretirane sa $dhUK_{(8qc)}$ i $dhUK_{(8OH2qc)}$, zapravo nalaze u poznoj fazi nekroze. Iz ovog razloga, ova jedinjenja su povučena iz daljeg ispitivanja na AsPC-1 ćelijama.



Slika 4. 24 Odgovor ćelijske smrti na AsPC-1 ćelijama mereno posle 24 h inkubacija sa ispitivanim h -(T)UK pomoću dvojne metode bojenja Aneksinom V i PI

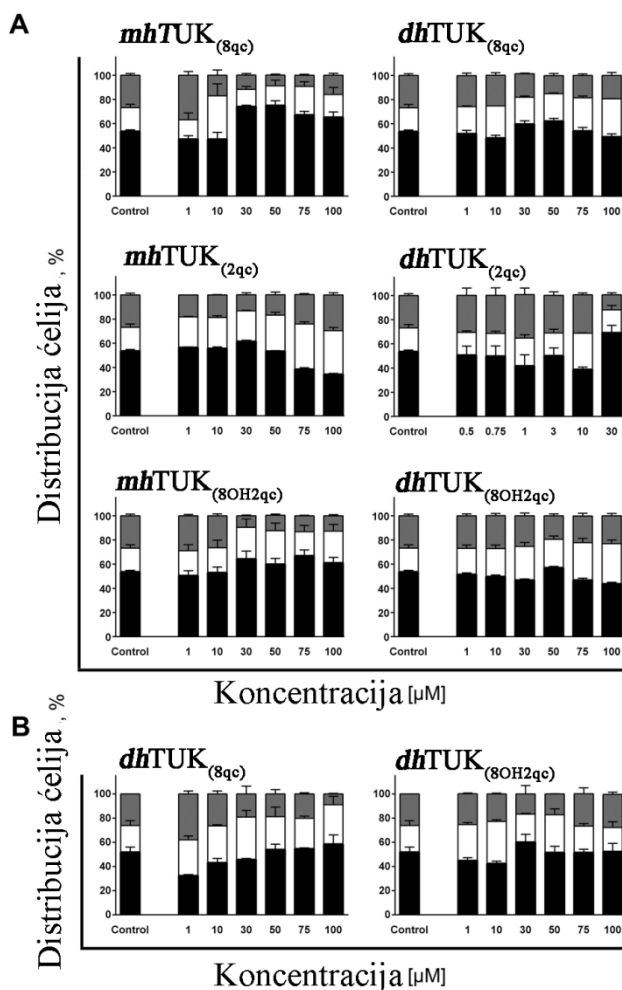
4.7.1.2 Promene zastupljenosti ćelija po fazama ćelijske deobe

Analize promena po fazama ćelijske deobe rađene su na uzorcima tretiranih jedinjenjima za koje je prethodno potvrđeno da imaju sposobnost da izazovu apoptoznu smrt. Za sva ova jedinjenja karakteristično je da su u većoj ili manjoj meri izazvala koncentracijski-zavisne promene u zastupljenosti THP-1 ćelija po fazama deobe. Takođe sva jedinjenja su u nekoj od primenjenih koncentracija dovela do nakupljanja ćelija u G1-S kontrolnom mestu ćelijske deobe. U slučaju jedinjenja **mhTUK_(8qc)**, najniža primenjena koncentracija od 1 μM uslovlila je nakupljanje ćelija u G2/M fazi deobe, da bi se pri sledećem koncentracijskom nivou od 10 μM ćelije zaustavljale u G1-S kontrolnom mestu, a na 30 μM formirale zastoj u G0/G1 fazi deobe. (Slika 4.25) Iako isprva može da deluje da je zastoj u G0/G1 fazi uslovljen istim mehanizmom kojim i nakupljanje ćelija u G1-S mestu, varijacije u intenzitetu apoptoznog odgovora u okviru ovog koncentracijskog opsega jasno ukazuju da se radi o različitim mehanizmima delovanja koji se smenjuju u koncentracijski-zavisnom odnosu.

Veoma slične promene zastupljenosti THP-1 ćelija po fazama deobe i pratećih varijacija u intenzitetu apoptoznih odgovora utvrđene su za jedinjenje **dhTUK_(2qc)**. (Slika 4.25A). U nižim koncentracijama (0,5-1 μM), **dhTUK_(2qc)** je uslovio blagu akumulaciju ćelija u G2/M fazi deobe što je istovremeno praćeno neznajnim procentom ćelijske smrti u odnosu na kontrolne uzorke. Pri koncentraciji od 3 μM ovo jedinjenje je ćelije uvelo u G1-S zastoj, a bi pri najvećoj koncentraciji od 30 μM ćelije su bile zaustavljene u G0/G1 fazi deobe. Promena zastoja od G2/M u G1-S je praćena povećanjem procenta apoptotičnih ćelija sa maksimumom dostignutim u uzorcima tretiranim koncentracijom od 10 μM , da bi njihov procenat bio prepolovljen pri koncentraciji od 30 μM . Interesantno je da se **mhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(2qc)** razlikuju po broju aromatičnih prstenova, kao i po položaju bočnog lanca u odnosu na heteroaromatični prsten, a da su uslovile veoma slične promene u fazama ćelijske deobe i pratećem procentu apoptotičnih ćelija. Ovakav paralelizam u uslovljenom biološkom odgovoru nije utvrđen za njihove strukturne analoge, jedinjenja **dhTUK_(8qc)** i **mhTUK_(2qc)**, koji su zastoj ćelija u G1-S uslovile pri nižim koncentracijama, koji je pri višim koncentracijama progredirao u zastoj u S fazi deobe (Slika 4.25A). Jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju hidroksilnu grupu prikačenu za heteroaromatični prsten (**mhTUK_(8OH2qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)**) izazvala su najmanje varijacija u sklopu ćelijske

deobe THP-1 ćelija (Slika 4.25A). Oba jedinjenja su pri koncentraciji od 30 μM izazvala zaustavljanje ćelija u G1-S kontrolnom mestu deobe, što je u slučaju jedinjenja **mhTUK**_(8OH2qc) intenziviralo koncentracijski-zavisno sve do najveće primenjene koncentracije, dok je u ćelijama tretiranim sa **dhTUK**_(8OH2qc) G1-S zastoj bio preusmeren na nakupljanje ćelija u toku S faze deobe.

U AsPC-1 ćelijama, koncentracijski-zavisne varijacije u rasporedu ćelija po fazama deobe pronađene su u uzorcima tretiranim jedinjenjem **dhTUK**_(8qc) (Slika 4.25B).



Slika 4. 25 Distribucija u fazama mitoze podele THP-1 ćelije (A) i ASPC-1 ćelija (B) određena nakon 24 h inkubacije sa ispitivanim jedinjenjima. Promene u zastupljenosti ćelija po fazama ćelijskog ciklusa su ocenjeni u istim uzorcima prethodno analiziranim na Aneksinu V / PI. Učestalost ćelija nađenih u G0/G1 (crna), S (bela) i G2/M (siva) fazama su određene u odnosu na netretirane kontroln uzorke.

Ćelije izložene najnižoj ispitivanoj koncentraciji *dhTUK*_(8qc) od 1 μM bile su nakupljene u G2/M fazi deobe uz istovremeno nisku incidencu apoptoznih ćelija. Sa povećanjem koncentracije *dhTUK*_(8qc) na 10 i 30 μM, ćelije su se zaustavljale u S fazi deobe, što je praćeno postepenim povećanjem učestalosti apoptotičnih ćelija. Počevši sa koncentracijom od 50 μM, ćelije bivaju zaustavljene u G0/G1 fazi sa istovremenim smanjenjem procenta apoptoze. Za razliku od rezultata dobijenih na THP-1 ćelijama tretiranih sa *dhTUK*_(8OH2qc), ovo jedinjenje je na AsPC-1 ćelijama najveću incidencu apoptoze postiglo pri koncentracijama od 75 i 100 μM pri čemu iste koncentracije nisu izazvale značajne promene zastupljenosti ćelija po fazama deobe u odnosu na netretiranu kontrolu.

Tokom ovog ispitivanja utvrdili smo jasna preklapanje u varijacijama koncentracijski-zavisnih promena po fazama deobe i intenziteta apoptoznog odgovora u THP-1 ćelijama tretiranih jedinjenjima *mhTUK*_(8qc) i *dhTUK*_(2qc). Koncentracijski-zavisne oscilacije u promenama po fazama ćelijskog ciklusa detektovane su i za druga ispitivana jedinjenja, ali u tim slučajevima nije bilo istovremenih varijacija u procentu apoptoznih ćelija. Na osnovu ovih rezultata nije moguće ponuditi tačan odgovor na pitanje koji se konkretni biohemijski mehanizmi nalaze u osnovi opisanih koincidentalnih promena, ali je nesumnjivo da ova jedinjenja imaju osobinu da u različitim koncentracijama ciljaju različite faze ćelijske deobe. Na osnovu ovih činjenica, za ova jedinjenja se može tvrditi da imaju „polifarmakološki profil“ delovanja, što je fenomen vezan za lekove koji samostalno mogu da ciljaju na više unutarćelijskih meta²⁶⁶. Ovakav tip lekova ima više prednosti u odnosu na kombinacije više različitih lekova, a najvažniji među njima su lakše podešavanje primenjene doze sa ciljem postizanja željenog efekta, uz istovremeno izbegavanje ozbiljnih toksičnih posledica usled neželjenih interakcija lekova što je čest slučaj tokom primene kombinacija lekova.

4.7.1.3 Utvrđivanje korelacije između structure jedinjenja i aktivnosti kaspaza tokom apoptozne smrti

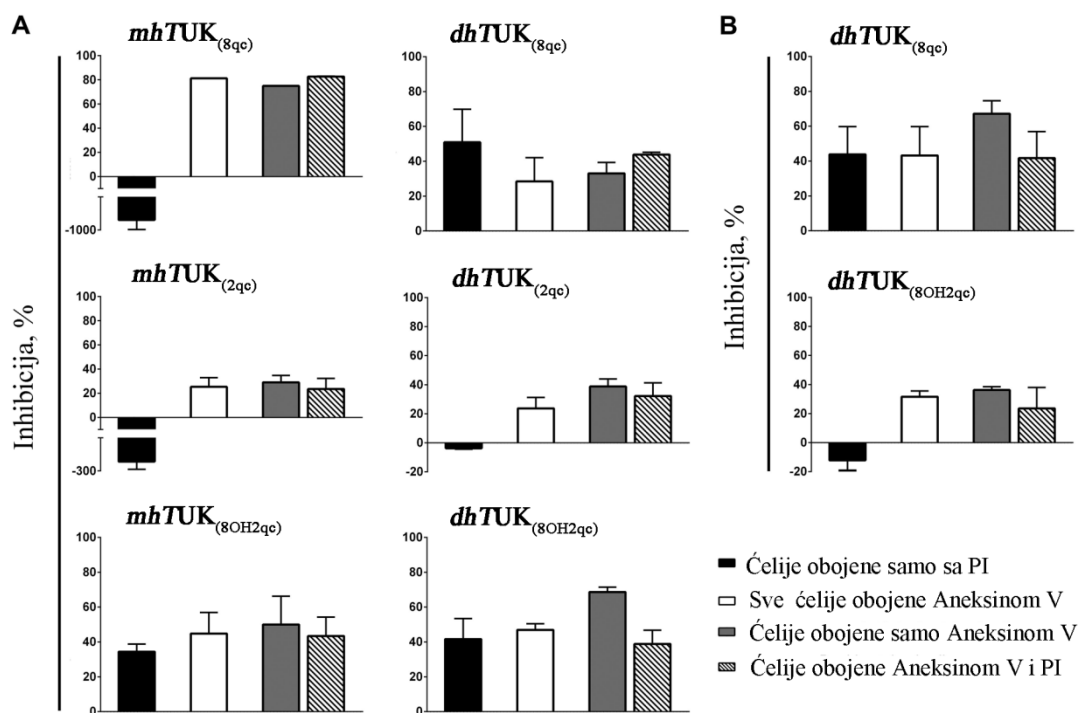
U daljem toku ovog istraživanja, naša interesovanja su bila usmerena na ispitivanje relacije strukture i aktivnosti između mono i bis strukturnih analoga u odnosu na prirodu apoptoznog odgovora u THP-1 ćelijama. Mehanizmi u osnovi

apoptoze u AsPC-1 ćelijama su takođe bili predmet od interesa, ali na ovim ćelijama nije bilo moguće praviti poređenja između strukture i aktivnosti obzirom na ograničen broj aktivnih jedinjenja.

Prvi sledeći eksperiment trebalo je da nam da pruži odgovor na pitanje do koje mere je apoptoza izazvana ispitivanim jedinjenjima bila zavisna od aktiviranja kaspaza u tretiranim ćelijama. U ovu svrhu primenili smo istovremeni tretman ćelija sa ispitivanim jedinjenjem dodatim u prethodno definisanoj ED_{50} koncentraciji i inhibitorom kaspaze širokog spektra delovanja (Z-VAD-fmk). Tokom analize i interpretacije rezultata praćene su promene u učestalosti apoptotičnih i nekrotičnih ćelija kao posledica prisustva Z-VAD-fmk. Iako proces nekroze, bilo akcidentalne ili kontrolisane (*necroptosis*), nije neposredno uslovljen aktivnošću kaspaza, promena učestalosti nekrotičnih ćelija može pružiti dodatne posredne informacije o unutarćelijskim procesima pokrenutim ispitivanim jedinjenjima. Stoga, povećanje incidence nekrotičnih ćelija usled inhibicije aktivnosti kaspaza ukazuje da je ispitivano jedinjenje izazvalo snažan pro-apoptotički stimulus koji, usled inhibicije aktivnosti kaspaza, nije mogao da se sprovede te je ćelija bila prinuđena da završi u nekrozi. Snižanje procenta nekrotičnih ćelija usled inhibicije kaspaza ukazuje da je nekroza ustvari uslovljena inicijacijom apoptoze, odnosno da je posledica aponekroze (*aponecrosis*).

Jasna korelacija između strukture i stepena zavisnosti apoptoze od kaspazne aktivnosti u THP-1 ćelijama utvrđena je za dva para mono i bis strukturnih *h*-TUK analoga: ***mhTUK***_(2qc), ***dhTUK***_(2qc), ***mhTUK***_(8OH2qc) i ***dhTUK***_(8OH2qc) (Slika 4.26). U uzorcima tretiranim ovim jedinjenjima dokazan je gotovo identičan procenat inhibirane incidence apoptoze između mono i bis analoga dodavanjem Z-VAD-fmk ($25 \pm 8\%$ i $24 \pm 8\%$ za ***mhTUK***_(2qc) i ***dhTUK***_(2qc), i $45 \pm 12\%$ i $42 \pm 12\%$ za ***mhTUK***_(8OH2qc) i ***dhTUK***_(8OH2qc)). Istovremeno, dokazana je jaka podudarnost u proporciji inhibicije procenata rane i pozne apoptoze. Dok je između analoga ***mhTUK***_(8OH2qc) i ***dhTUK***_(8OH2qc) postojala i jasna korelacija u inhibiciji nekrotične smrti, Z-VAD-fmk je u uzorcima tretiranim sa ***mhTUK***_(2qc) značajnije stimulisao nekrozu ($-221 \pm 65\%$) u odnosu na uzorke tretiranim sa ***dhTUK***_(2qc) ($-4 \pm 0,6\%$). Jedini par strukturnih analoga između kojih nije definisana podudarnost po pitanju zavisnosti apoptoze od aktivnosti kaspaza jesu ***mhTUK***_(8qc) i ***dhTUK***_(8qc). Dok je Z-VAD-fmk u THP-1 uzorcima

tretiranim sa *dhTUK*_(8qc) uslovio blagu redukciju u incidenci apoptoznih ćelija ($28 \pm 14\%$), u ćelijama inkubiranim sa *mhTUK*_(8qc) inhibicija kaspaza je rezultirala u snažnoj inhibiciji apoptoze ($81,2 \pm 0,3\%$). Nepodudarnost između ova dva analoga dokazana je i na nivou uticaja Z-VAD-fmk po pitanju nekroze.



Slika 4. 26 Stepen zavisnosti ćelijske smrti od aktivnosti kaspaza u THP-1 (A) i AsPC-1 ćelijama (B) nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima.

Zavisnost apoptoze od aktivnosti kaspaza utvrđene u THP-1 ćelijama tretiranim jedinjenjima *dhTUK*_(8qc) i *dhTUK*_(8OH2qc) nije se pokazala podudarnom sa rezultatima dobijenim na AsPC-1 ćelijama. U ovim matičnim ćelijama kancera, apoptoza inicirana inkubacijom sa *dhTUK*_(8qc) pokazala se značajno više zavisnom od aktivnosti kaspaza ($41 \pm 16\%$) u poređenju sa THP-1 ćelijama. Suprotno, Z-VAD-fmk je uslovio manji procenat inhibicije apoptoze u AsPC-1 ćelijama tretiranim sa *dhTUK*_(8OH2qc) ($32 \pm 4\%$) u poređenju sa THP-1 ćelijama. Ovakav rezultat ukazuje da su ova dva jedinjenja THP-1 i AsPC-1 ćelije uvodile u apoptozu različitim mehanizmima, ili drugim rečima, da je njihova aktivnost fenotipski specifična.

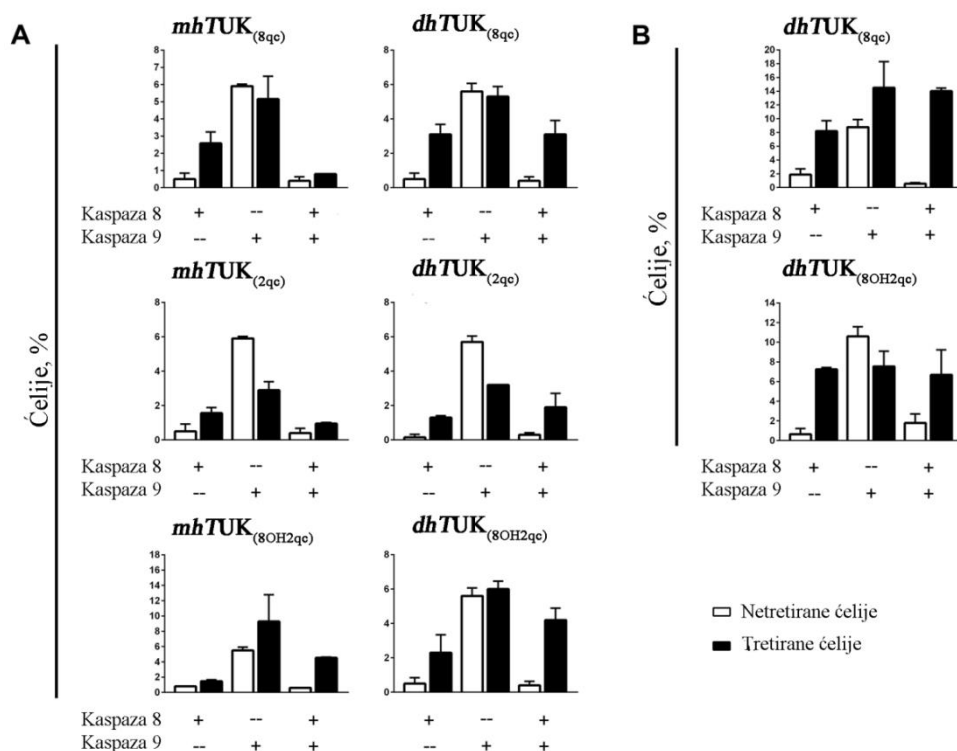
4.7.1.4 Utvrđivanje dominantnog kaspaznog puta u procesu iniciranja apoptozne smrti

U procesu apoptozne smrti uključena su dva dominirajuća kaspazna puta²⁶⁷. Spoljašnji apoptozni put, koji je posredovan aktivacijom kaspaze 8, aktivira se bilo stimulacijom određenih receptora lociranih u ćelijskoj membrani ili usled poremećene aktivnosti endoplazmatskog retikuluma.²⁶⁸ Unutrašnji apoptozni put, koji je posredovan aktivacijom kaspaze 9, aktivira se kao posledica značajnih bioenergetskih i metaboličkih oštećenja u ćeliji. Način utvrđivanja aktiviranja kaspaza 8 i 9 u tretiranim ćelijama koji smo primenili u ovom istraživanju omogućio nam je da odredimo procenat ćelija sa jednom od ove dve aktivirane kaspaze u istom uzorku, kao i procenat ćelija sa obe aktivirane kaspaze. Zahvaljujući ovom tehničkom rešenju bili smo u mogućnosti da utvrdimo koji je od aktiviranih apoptoznih puteva bio dominantno aktiviran tretmanom ćelija ispitivanim jedinjenjima.

Značajna korelacija koju smo prethodno ustanovili između većine mono i bis strukturnih analoga po pitanju zavisnosti apoptoznog procesa od aktivnosti kaspaza, ponovila se i u slučaju rezultata aktivacije unutrašnjeg i spoljašnjeg apoptoznog puta. Najznačajnija podudarnost utvrđena je u THP-1 ćelijama tretiranim jedinjenjima **mhTUK**_(2qc) i **dhTUK**_(2qc) (Slika 4.27A). Oba ova jedinjenja uslovia su značajno smanjenje ćelija sa pojedinačno aktiviranom kaspazom 9 u odnosu na netretiranu kontrolu, što ukazuje da aktivacija unutrašnjeg apoptoznog puta nije bila mehanizam inicijacije apoptozne smrti u ćelijama inkubiranim jednim od ova dva analoga. Takođe, utvrđena je sličnost između rezultata uzoraka tretiranih jedinjenjima **mhTUK**_(8qc) i **dhTUK**_(8qc), pri čemu su ova dva molekula uslovia značajno povećanje procenta ćelija sa pojedinačno aktiviranom kaspazom 8. Prisustvo hidroksilne grupe na heteroaromatičnom prstenu ispostavilo se da je dovelo do razlike u aktivaciji apoptoznih puteva inicirano tretmanom sa jedinjenjima **mhTUK**_(8OH2qc) i **dhTUK**_(8qc). Tako je jedinjenje **mhTUK**_(8OH2qc) bilo jedino koje u THP-1 ćelijama nije dovelo do povećanja procenta ćelija sa pojedinačno aktiviranom kaspazom 8, već je umereno povećalo procenat ćelija sa pojedinačno aktiviranom kaspazom 9.

Daljom analizom ovih rezultata uočava se da je u svim uzorcima koji su tretirani bis analogima *h*-TUK utvrđen značajno veći procenat ćelija sa obe aktivirane kaspaze u odnosu na uzorke inkubirane njihovim mono strukturnim analogima (Slika 4.27A). U

ćelijama postoji mogućnost uzajamne aktivacije unutrašnjeg i spoljašnjeg apoptoznog puta. Stoga, kaspaza 9 koja je aktivirana u sklopu dominantno stimulisanog unutrašnjeg apoptoznog puta, aktivira kaspazu 3 koja naknadno u sklopu pozitivne povratne sprege aktivira kaspazu 8²⁶⁹. Sa druge strane, aktivirana kaspaza 8, usled stimulacije spoljašnjeg apoptoznog puta, transformiše Bid protein i posledično formiranje apoptozoma što dovodi do aktiviranja kaspaze 9²⁶⁷. Kao što je ovde već opisano, sa izuzetkom jedinjenja *mhTUK*_(8OH2qc) svi *mh*- i *dh*-**TUK** su inicirali primarnu aktivaciju kaspaze 8, ali je procenat ćelija sa obe aktivirane kaspaze u uzorcima tretiranim sa *mhTUK*_(8qc) i *mhTUK*_(2qc) bio na nivou netretirane kontrole što ukazuje na mogućnost da su ova dva jedinjenja ometala posrednu aktivaciju unutrašnjeg apoptoznog puta. Sa druge strane, u uzorcima THP-1 ćelija inkubiranim sa jedinjenjima *mhTUK*_(8OH2qc) i *dhTUK*_(8OH2qc) je pronađen skoro jednak procenta ćelija sa obe aktivirane kaspaze, pri čemu je jedino u slučaju *mhTUK*_(8OH2qc) spoljašnji apoptozni put bio aktiviran posredno od strane unutrašnjeg.



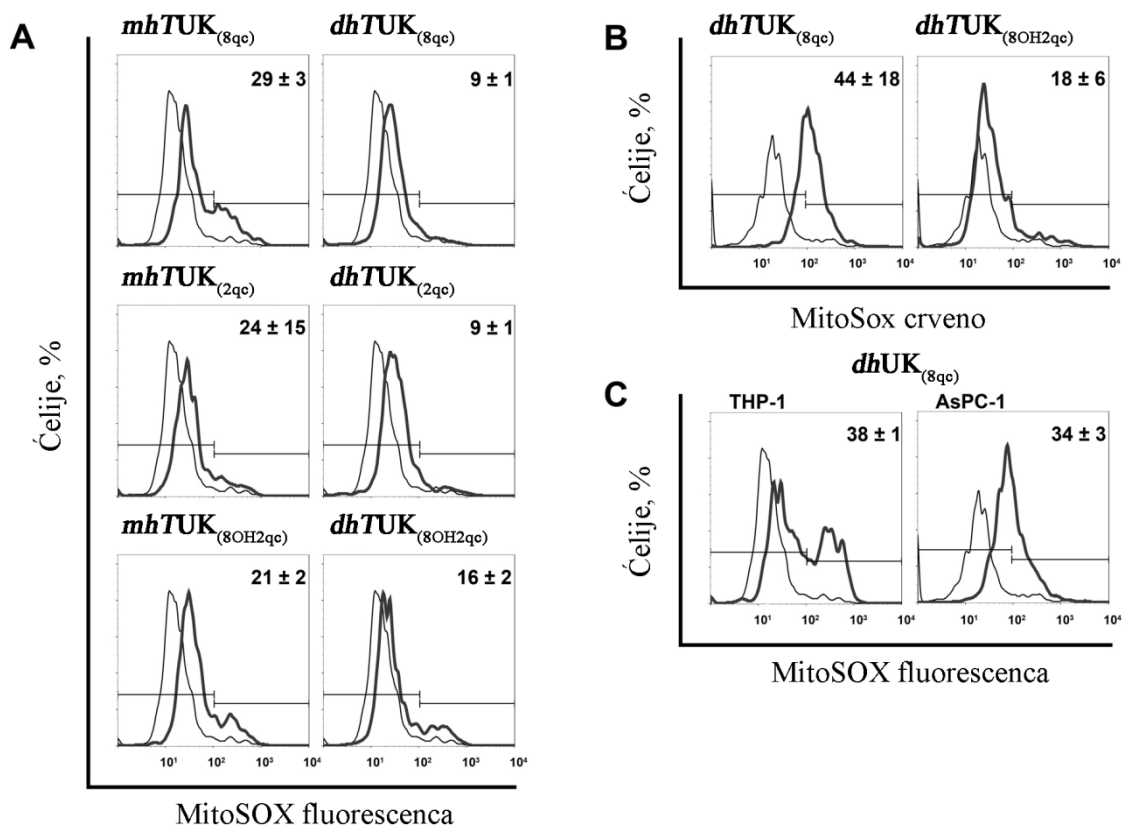
Slika 4. 27 Aktivacija kaspaze-8 i -9 u THP-1 (A) i AsPC-1 ćelijama (B), određeno nakom 6 h inkubacije sa ispitivanim jedinjenjima dodatim na ćelije u njihovim ED₅₀ koncentracijama.

Slično kao i u THP-1 ćelijama, aktivacija kaspaze 8 je bila primaran događaj i u AsPC-1 ćelijama (Slika 4.25B). Izuzetak na ovoj ćelijskoj liniji je jedinjenje **dhTUK_(8qc)** koje je iniciralo istovremenu i nezavisnu aktivaciju oba apoptozna puta. Poređenje rezultata aktivacije kaspaza uslovljenih tretmanima THP-1 i AsPC-1 ćelija jedinjenjima **dhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)** potvrđuje prethodno iznešenu pretpostavku da ova dva jedinjenja imaju fenotipski specifičan mehanizam delovanja.

4.7.1.5 Utvrđivanje pro-oksidativne aktivnosti

Mitochondrije su najvažniji izvor kiseoničnih slobodnih radikala u ćelijama²⁷⁰. U okviru istraživanja biološke aktivnosti ispitivanih jedinjenja testirali smo pro-oksidativna svojstva onih molekula koji su izazvali apoptoznu smrt u THP-1 i AsPC-1 ćelijama. Sa tim ciljem utvrdili smo njihovu sposobnost da izazovu generisanje superoksidnih radikala u mitohondrijama tretiranih ćelija.

U netretiranim uzorcima obe ćelijske linije, bazalna produkcija O[•] je bila na veoma sličnom nivou ($5,4 \pm 0,6\%$ u THP-1 ćelijama i $8,4 \pm 0,3\%$ u AsPC-1 ćelijama). Nakon tretmana u THP-1 ćelija sa *h*-TUK, upadljivo veća produkcija O[•] je utvrđena u uzorcima izloženih *mh*-TUK molekulima **mhTUK_(8qc)** i **mhTUK_(2qc)** u odnosu na uzorke inkubirane sa njihovim bis analogima **dhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(2qc)** (Slika 4.28A). Manje upadljiva razlika uočena je između uzoraka tretiranih *h*-TUK molekulima **mhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)** koji u svom sastavu imaju –OH grupu na heterocikličnom aromatičnom prstenu. Posmatrajući ove rezultate u sklopu strukturnih karakteristika, jedinjenja **mhTUK_(8qc)**, **mhTUK_(2qc)** i **mhTUK_(8OH2qc)** u svom sastavu imaju visoko reaktivnu –NH–NH₂ grupu koja je vrlo verovatno odgovorna za snažniju produkciju O[•] u poređenju sa njihovim bis analogima. Sa druge strane, –OH grupe dodate na hinolinski prsten u slučaju **dhTUK_(8OH2qc)** doprinela je njegovoj većoj pro-oksidativnoj aktivnosti u odnosu na **dhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(2qc)**. Još zanimljiviji su rezultati dobijeni na AsPC-1 ćelijama tretiranih **dhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)** (Slika 4.28B), obzirom da u uzorcima inkubiranim sa **dhTUK_(8OH2qc)** skoro da nije bilo razlike u procentu O[•] pozitivnih ćelija između ove dve ćelijske linije, **dhTUK_(8qc)** je izazvao znatno veću amplitudu u generisanju O[•] u AsPC-1 ćelijama u odnosu na THP-1. Ovako specifičan rezultat za **dhTUK_(8qc)** ne može se komentarisati u sklopu njegove strukture, već samo kao dodatni dokaz njegove fenotipski specifične aktivnosti.



Slika 4. 28 Procenat THP-1 (A), AsPC-1 (B) ćelija pozitivnih na mitohondrijalne O[•] nakon tretmana ispitivanim jedinjenjima, i u obe ćelijske linije nakon tretmana **dhUK**_(8qc) (C). U graficima su predstavljeni rezultati netretiranih uzoraka (tanka linija) i tretiranih uzoraka (debeli linija).

Iako je jedinjenje **dhUK**_(8qc) prethodno bilo isključeno iz daljih ispitivanja zbog činjenice da je indukovalo nekrozu u THP-1 i AsPC-1 ćelijama, odlučeno je da se ispita njegova pro-oksidativna aktivnost kao strukturnog analoga jedinjenja **dhTUK**_(8qc). U THP-1 ćelijama, O[•] produkcija je bila četiri puta veća nakon tretmana sa **dhUK**_(8qc) u poređenju sa **dhTUK**_(8qc) (Slika 4.28A i C). U odnosu na njihovu strukturnu različitost, kiseonik koje se u **8_hO** nalazi na mestu sumpora u **dhTUK**_(8qc) može biti razlog njegove veće pro-oksidativne sposobnosti. Sa druge strane, **dhUK**_(8qc) je u AsPC-1 ćelijama podstakao nastanak gotovo identičnog procenta O[•] pozitivnih ćelija kao i u THP-1, što je prethodno opisano i u slučaju jedinjenja **dhTUK**_(8OH2qc) (Slika 4.28A-C). Ovakav rezultat dodatno naglašava fenotip-specifičnu aktivnost **dhTUK**_(8qc). Nadalje, poređenjem učestalosti O[•] pozitivnih ćelija i apoptoznog odgovora u THP-1 i AsPC-1 ćelijama (Slika 4.23 i 4.24), uočljiv je izostanak pozitivne korelacije između ova dva

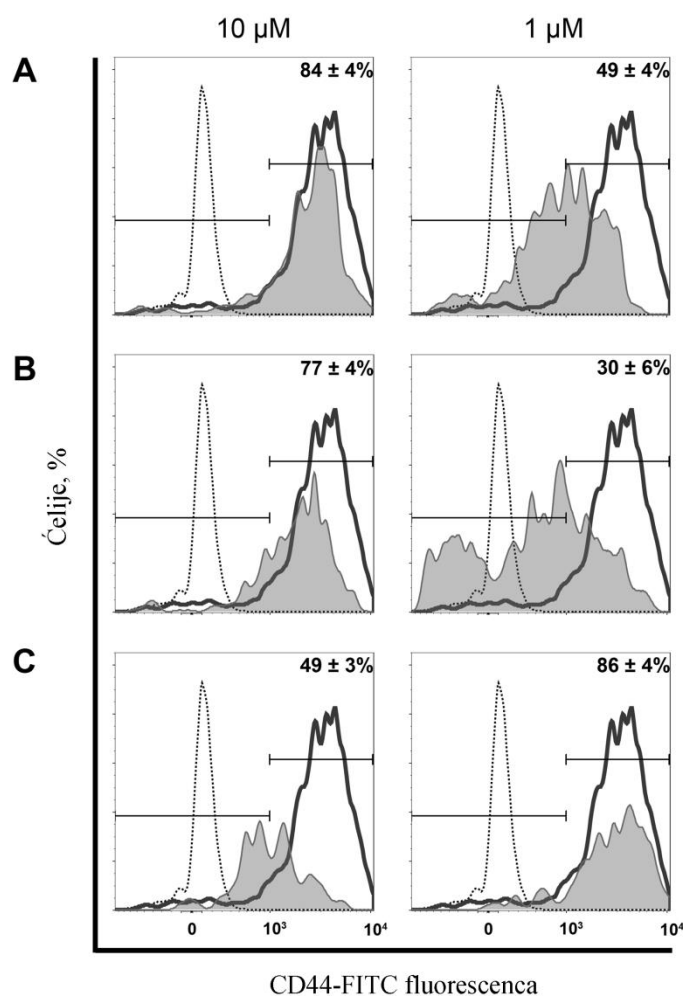
dogadaja. Jedinjenja **dhTUK_(8qc)**, **dhTUK_(2qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)** koji su se pokazali kao snažniji induktori apoptoznog odgovora istovremeno su u manjoj meri generisali produkciju O[•] u odnosu na njihove *mh*-TUK strukturne analoge. Konačno, značajna nepodudarnost O[•] produkcije između THP-1 i AsPC-1 ćelija tretiranih sa **dhTUK_(8qc)** nalazi se u obrnutoj korelaciji sa učestalošću apoptozne smrti u ovim uzorcima. Dominantna aktivacija spoljašnjeg apoptoznog puta, zajedno sa činjenicom da je tretman AsPC-1 ćelija sa **dhTUK_(8qc)** izazvao slab apoptozni odgovor i istovremeno snažnu O[•] produkciju, jasno ukazuju da generisanje mitohondrijalnih superoksidnih radikala nije imalo značajnu ulogu kao mehanizam potencijalno odgovoran za iniciranje apoptoznog odgovora tretiranih ćelija.

4.7.1.6 Sposobnost indukcije reprogramiranja fenotipa matičnih ćelija kancera

Nakon što smo prethodno utvrdili da jedinjenja **dhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)** imaju sposobnost da iniciraju apoptozu u visoko rezistentnim AsPC-1 ćelijama, zanimalo nas je da li ista mogu da izazovu i diferencijaciju ovih matičnih ćelija kancera. Uz ova dva jedinjenja testirali smo i jedinjenje **dhTUK_(2qc)** kao jedinog predstavnika **dh-TUK** podgrupe koje nije uspelo da stimuliše značajan procenat ćelijske smrti u AsPC-1 uzorcima. U sklopu ovog eksperimenta, AsPC-1 ćelije su tokom 72 sata inkubirane sa ispitivanim jedinjenjima dodatim na ćelije u niskim koncentracijama. Po isteku inkubacije ćelije su bojene anti-CD44-FITC antitelima u cilju utvrđivanja promene u ekspresiji ovog površinskog markera kancer stem subpopulacije u odnosu na netretiranu kontrolu^{271,272}. Dobijeni rezultati su analizirani u kontekstu procenta CD44 pozitivnih ćelija i MFI za CD44 pozitivnu subpopulaciju izraženog u arbitrarnim jedinicama (*arbitrary units*, AU). Tako izražen MFI je u korelaciji sa srednjim brojem CD44 receptora po ćeliji u sklopu CD44 pozitivne subpopulacije.

U netretiranim uzorcima, $89 \pm 3\%$ ćelija je na svojoj površini eksprimiralo CD44 receptor, pri čemu je MFI za ovu subpopulaciju iznosio 3416 ± 43 AU. Nakon tretmana sa **dhTUK_(8qc)** i **dhTUK_(8OH2qc)** u koncentraciji od $10 \mu\text{M}$ došlo je do blagog smanjenja u procentu CD44 pozitivnih ćelija (Slika 4.29A i B), kao i smanjenja MFI na 2918 ± 91 AU u **dhTUK_(8qc)** i 2396 ± 167 AU u **dhTUK_(8OH2qc)** tretiranim uzorcima. Ovakav rezultat ukazuje da je osim smanjenja procenta CD44 pozitivnih ćelija, došlo i do smanjenja broja CD44 receptora po ćeliji u CD44 pozitivnoj subpopulaciji. Pri

koncentraciji od 1 μM , oba ova jedinjenja su postigla značajnije smanjenje u procentu CD44 pozitivnih ćelija, zajedno sa nižim MFI vrednostima (1711 ± 42 AU u $dhTUK_{(8qc)}$ i 1876 ± 120 AU u $dhTUK_{(8OH2qc)}$ tretiranim uzorcima). Za razliku od njih, jedinjenje $dhTUK_{(2qc)}$ je postiglo značajniju redukciju CD44 ekspresije pri koncentraciji od 10 μM zajedno sa najnižim detektovanim MFI (1522 ± 48 AU) (Slika 4.29C). Ovi rezultati ukazuju da ispitivana jedinjenja mogu da indukuju reprogramiranje fenotipa matičnih kancer ćelija nezavisno od sposobnosti da li mogu da indukuju i njihovu apoptoznu smrt.



Slika 4. 29 Promena u ekspresiji CD44 površinskog markera na AsPC-1 ćelijama nakon 72 h inkubacije sa supstancama $dhTUK_{(8qc)}$ (A), $dhTUK_{(8OH2qc)}$ (B) i $dhTUK_{(2qc)}$ (C).

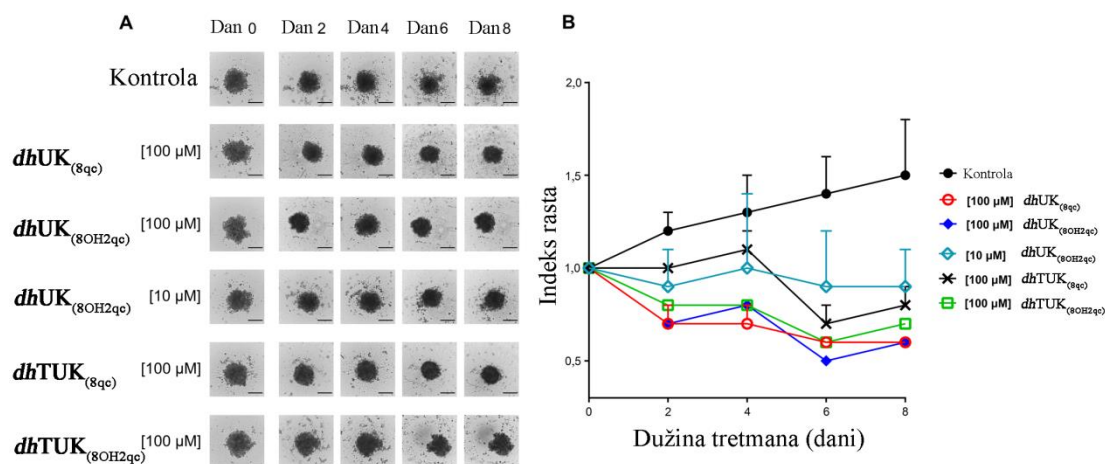
Tanka isprekidana linija predstavlja negativnu kontrolu bojeni sa anti-IgG-FITC antitelima, debela crna linija predstavlja rezultat dobijen u netretiranim kontrolnim uzorcima bojenim sa anti-CD44-FITC, sivo polje predstavlja rezultat tretiranih ćelija bojenih sa anti-CD44-FITC.

4.7.1.7 Aktivnost na 3D ćelijskom modelu

Za razliku od većine modela matičnih kancer ćelija, AsPC-1 ćelije formiraju sferoide neregularnog oblika bez jasno prepoznatljivih karakterističnih zona (nekrotično jezgro, zona mirovanja, zona proliferacije)²⁶⁴. Njihov rast je takođe nepravilan i ne podrazumeva proporcionalno uvećanje diametra sferoida, već prevashodno obrazovanje manjih satelitskih sferoidnih formacija. Iz ovih razloga, kvantitativno praćenje promena u veličini sferoida vršeno je sumiranjem veličine primarnog sferoida i svih satelitskih formacija u bunarčiću. U ovom eksperimentu ispitivana je aktivnost svih jedinjenja koja su izazvala ćelijsku smrt na 2D modelu AsPC-1 ćelija, nezavisno da li je u pitanju bila apoptoza ili nekroza (Slika 4.24). Ovde su predstavljeni samo rezultati za koncentracije koje su na osmi dan tretmana postigli značajno smanjenje početne veličine sferoida (indeks rasta < 1) u odnosu na njihovu veličinu utvrđenu na dan 0, neposredno pre dodavanja ispitivanih jedinjenja (Slika 4.30).

Rast netretiranih sferoida karakteriše se linearnom progresijom, sa maksimalnim povećanjem od $1,5 \pm 0,3$ puta na dan 8 u odnosu na početni volumen. Jedinjenje ***dhUK***_(8OH2qc) je jedino koje je postiglo značajno smanjenje veličine tretiranih sferoida u dve ispitivane koncentracije, pri čemu je u koncentraciji od 100 μ M smanjilo veličinu tumorske mase na pola već nakon šest dana inkubacije. Drugo jedinjenje po uspešnosti je bilo ***dhUK***_(8qc), koje je u koncentraciji od 100 μ M na kraju eksperimenta postiglo isti rezultat kao i ***dhUK***_(8OH2qc). Zanimljivo je da su oba ova jedinjenja bila povučena iz daljih ispitivanja zbog iniciranja nekrotične smrti tretiranih ćelija, što u uslovima živog organizma uslovljava nepoželjnu i štetnu zapaljensku reakciju. Istovremeno, na 2D modelu ***dhUK***_(8qc) je nakon 24 sata inkubacije inicirao ćelijsku smrt u 89% AsPC-1 ćelija, dok je ***dhUK***_(8OH2qc) bio znatno manje efikasan. ***dhTUK***_(8OH2qc) je na 3D modelu pokazalo sposobnot da kontinuirano smanjuje veličinu tretiranih sferoida. Za razliku od njega, tretman sa ***dhTUK***_(8qc) se karatketiše takozvanim odloženim odgovorom, gde se u inkubiranim sferoidima tokom prva četiri dana registrovao porast u njihovoj veličini, da bi nakon toga usledila značajna redukcija u ukupnom volumenu. Interesantno je da je na osnovu rezultata očitanih na 2D modelu ***dhTUK***_(8qc) bilo posmatrano kao jedinjenje od malog interesa obzirom na procenat postignutog apoptotskog odgovora. Rezultati na 3D sferoidima, međutim, pokazali su da je ovaj molekul gotovo identično efikasan kao i

$dhTUK_{(8OH2qc)}$, čime se dodatno potvrđuje značaj primene 3D modela za pravilnu procenu efikasnosti novosintetisanih jedinjenja.



Slika 4.30 Promene u veličini i morfologiji 3D kulture AsPC-1 ćelija posle 8 dana tretmana (A). Stope rasta ne-tretiranih i tretiranih AsPC-1 sferoida tokom 8 dana trajanja eksperimenta (B).

4.7.2 Vezivanje $dhTUK_{(8qc)}$ za HSA

HSA je poznat po svom kapacitetu vezivanja za ligand i kao skladište za neobično širok spektar molekula što ga čini važnim faktorom u farmakokinetičkom ponašanju mnogih lekova, odnosno utiče na efikasnost i brzinu dostavljanja lekova. Kao što je već napomenuto u teorijskom delu, njegova sposobnost akumulacije u čvrstim tumorima izazvala je veliko interesovanje medicinskih hemičara za ovaj protein.

U ovoj disertaciji prikazani su rezultati eksperimenta i protokol doking analize radi dobijanja informacije o vezivanju i interakciji $dhTUK_{(8qc)}$ sa HSA. Kriterijumi koji su korišćeni za izbor jedinjenja pri ispitivanju su prapoptotska aktivnost jedinjenja na obe ćelijske linije i lipofilnost kao jedan od najvažnijih faktora koji određuje obim vezivanja leka.²⁷³ Iako je $\log P$ razmatran kao nepozdan fizičko-hemijski deskriptor za određivanje jačine vezivanja među različitim ligandima²⁷⁴, u ovom slučaju njegova veća vrednost za $dhTUK_{(8qc)}$ u odnosu na $dhTUK_{(8OH2qc)}$ je povećala racionalnost izbora ovog jedinjenja za ispitivanje vezivanja za HSA. Sva ispitivana jedinjenja na bazi hinolina podpadaju pod „pravilo petice“ Lipinskog, po kojem postoje četiri deskriptora na osnovu kojih se može predvideti da li će lek ispoljiti odgovarajuću apsorpciju i

permeabilnost.²⁷⁵ Podaci dati u Tabeli 4.16. ukazuju da su sva ispitivana jedinjenja "drug-like" sa obećavajućom farmakološkom aktivnošću i bioraspoloživošću.

Tabela 4. 16 Lipinskijeve farmakokinetičke osobine ispitivanih jedinjenja

	<i>mhUK</i> _(8qc)	<i>dhUK</i> _(8qc)	<i>mhUK</i> _(2qc)	<i>dhUK</i> _(2qc)	<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	<i>dhUK</i> _(8OH2qc)
<i>MW</i> ^a	229,24	368,39	229,24	368,39	245,24	400,39
<i>logP</i> ^b	1,234	4,115	1,262	3,886	0,825	3,210
HBD ^c	4	2	4	2	5	4
HBA ^d	3	5	3	5	3	5
	<i>mhTUK</i> _(8qc)	<i>dhTUK</i> _(8qc)	<i>mhTUK</i> _(2qc)	<i>dhTUK</i> _(2qc)	<i>mhTUK</i> _(8OH2qc)	<i>dhTUK</i> _(8OH2qc)
<i>MW</i> ^a	245,30	384,46	245,30	384,46	261,30	416,46
<i>logP</i> ^b	1,621	4,223	1,720	4,402	1,227	3,526
HBD ^c	4	2	4	2	5	4
HBA ^d	2	4	2	4	2	4

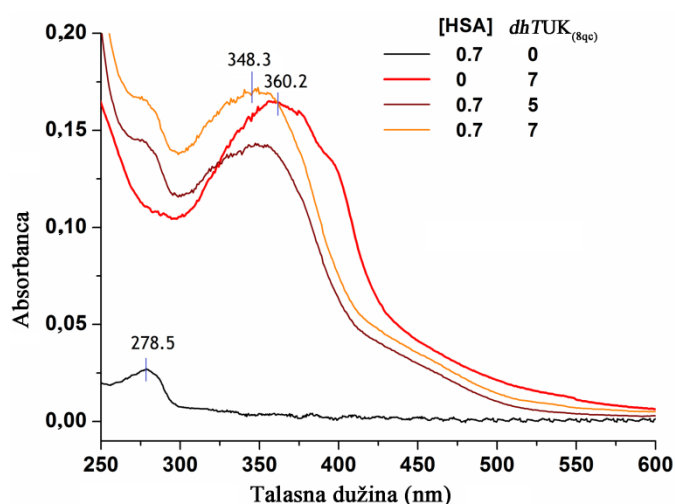
a - molekulska težina

b – predviđen oktanol/voda koeficijent raspodele

c – broj donora (donori H veza po molekulu)

d– broj akceptora (akceptori H veza po molekulu)

Vezivanje *dhTUK*_(8qc) za HSA je proučavano UV-Vis spektrofotometrijskom metodom koja predstavlja jednostavnu i neizostavnu tehniku u proteinskoj biohemiji. Praćenje apsorpcije *dhTUK*_(8qc) koji apsorbuje u vidljivoj oblasti može biti iskorišćeno za detekciju vezivanja za HSA. Vezivanje *dhTUK*_(8qc) za HSA, praćeno je plavim pomerajem apsorpcionog maksimuma za 11,9 nm u spektru (Slika 4.31). Više detalja o interakciji HSA-*dhTUK*_(8qc) dobijeno je metodom spektrofluorimetrije i molekuskog dokinga.

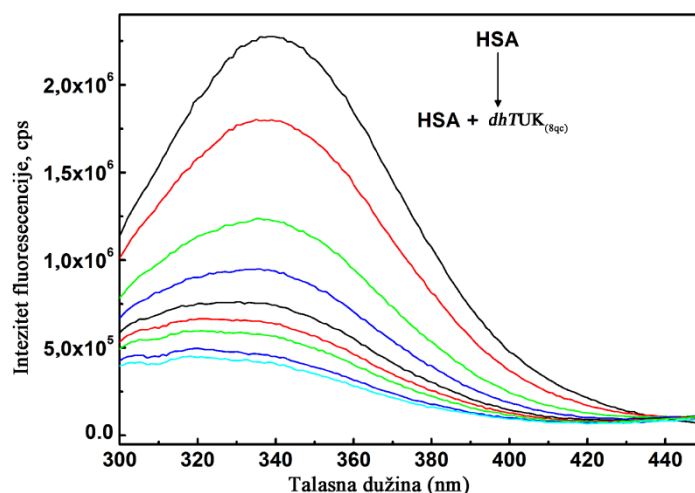


Slika 4. 31 Promena apsorpcionog spektra *dhTUK*_(8qc) posle dodatka HSA. (*c*(μ M)

Spektar je snimljen u 30 mM fosfatnom puferu (PBS), pH 7,36)

4.7.2.1 Spektrofluorimetrijsko merenje interakcije HSA sa $dhTUK_{(8qc)}$

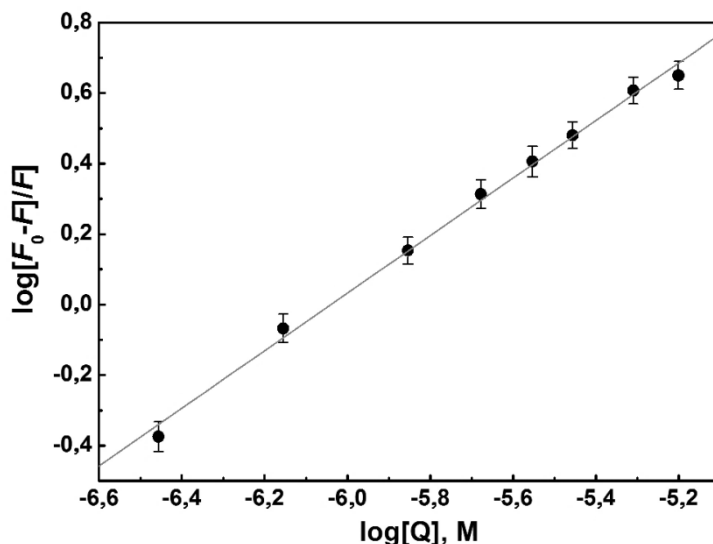
Spektrofluorimetrija predstavlja jednu od najčešće korišćenih i najpogodnijih metoda za karakterizaciju protein-ligand interakcija, i oko sto puta je osjetljivija od spektrofotometrije. Nizak (pozadinski) šum daje dodatnu prednost prilikom karakterizacije HSA-ligand interakcija, a osim toga ova metoda može dati važne informacije o vezivanju malih molekula za protein: mehanizam vezivanja, način vezivanja, konstante vezivanja, mesta vezivanja kao i intermolekulska rastojanja. Promene u fluorescentnom emisionom spektru HSA tokom titracije sa porastom koncentracije $dhTUK_{(8qc)}$ prikazane su na Slici 4.32. Opadanje inteziteta fluorescencije na ~ 340 nm sa porastom koncentracije dodatog jedinjenja ukazuje da $dhTUK_{(8qc)}$ interaguje sa HSA. Plavi pomak maksimuma apsorpcije ukazuje da je okolina oko Trp-124 izmenjena i da se formira kompleks HSA- $dhTUK_{(8qc)}$.



Slika 4. 32 Promene u emisionom fluorescentnom spektru HSA nakon dodatka $dhTUK_{(8qc)}$ u koncentracijama od (0,0; 0,35; 0,7; 1,4; 2,1; 2,8; 3,5; 4,9, 6,3) $\cdot 10^{-6}$ M (T = 310 K; 30 mM PBS, $pH = 7,4$)

Sa povećanjem količine fluorescencije, rezultati mogu odstupati od linearnosti zbog instrumentalnog unutrašnjeg efekta filtera. Ovaj efekat je uklonjen primenom Lakowicz procedure (Jednačina 3.3) pri čemu su korigovani inteziteti fluorescencije korišćeni za sve proračune. Podaci fluorescencije obrađeni su primenom dvoparametraske logaritamske krive (Jednačina 3.4). Linearna zavisnost podataka za

gašenje fluorescencije dobijene na 310 K prikazani je na Slici 4.33, dok su rezultati linearnog fitovanja sa porastom temperature predstavljeni u Tabeli 4.17.



Slika 4. 33 Dvoparameterska kriva za određivanje konstante vezivanja (Kb), i broja mesta vezivanja za HSA- $dhTUK_{(8qc)}$ interakciju

Tabela 4. 17 Konstanta vezivanja (Kb) i broj vezujućih mesta $dhTUK_{(8qc)}$ za HSA na tri temperature

T (K)	$Kb(M^{-1}) \times 10^4$	$\log Kb$	n	r^2
293	$8,5 \pm 2,2$	$4,9 \pm 0,1$	$0,82 \pm 0,02$	0,995
301	$6,1 \pm 2,8$	$4,8 \pm 0,2$	$0,78 \pm 0,04$	0,986
310	$4,6 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,1$	$0,77 \pm 0,01$	0,998

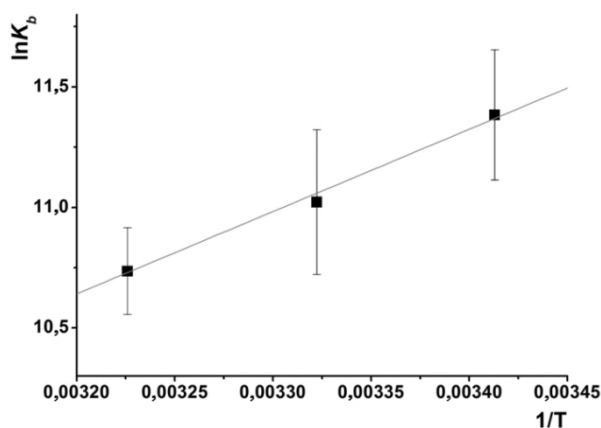
Gašenje fluorescencije može biti klasifikovano kao statičko ili dinamičko, s'tim što dinamičko gašenje zavisi od difuzije. Više temperature rezultiraju bržom difuzijom i samim tim su veće vrednosti za biomolekularne konstante hlađenja. Sa druge strane više temperature su obično rezultat disocijacije slabo vezanih kompleksa i zbog toga u statičkom procesu dolazi do smanjenja biomolekularnih konstanti hlađenja. Vrednost Kb opada sa porastom temperature što je indicacija statičkog mehanizma gašenja^{213,229,230}. Broj vezujućih mesta na sve tri temperature je ~ 1 , što ukazuje da se jedinjenje veže samo za jedno vezujuće mesto u albuminu.

4.7.2.2 Termodinamički parametri vezivanja

U cilju potvrde načina vezivanja $dhTUK_{(8qc)}$ za HSA, izračunati su termodinamički parametri: promjena entalpije (ΔH) i promena entropije (ΔS) interakcije. Temperaturna zavisnost vezivne konstante pri interakcije HSA- $dhTUK_{(8qc)}$ proučena je na tri različite temperature (293, 301 i 310 K) (Tabela 4.18), a na osnovu grafika zavisnosti $\ln K_a$ od $1/T$ (Slici 4.34) određene su vrednosti ΔH i ΔS .

Tabela 4. 18 Termodinamički parametri vezivanja $dhTUK_{(8qc)}$ sa HSA

T (K)	$\ln K_b$ (M^{-1})	ΔG ($kJmol^{-1}$)	ΔH ($kJmol^{-1}$)	ΔS ($Jmol^{-1}K^{-1}$)
293	11,38	27,731	28,731	-3,55
301	11,02	27,584		
310	10,74	27,670		



Slika 4. 34 Zavisnost $\ln K_b$ od $1/T$ za određivanje interakcije $dhTUK_{(8qc)}$ sa HSA

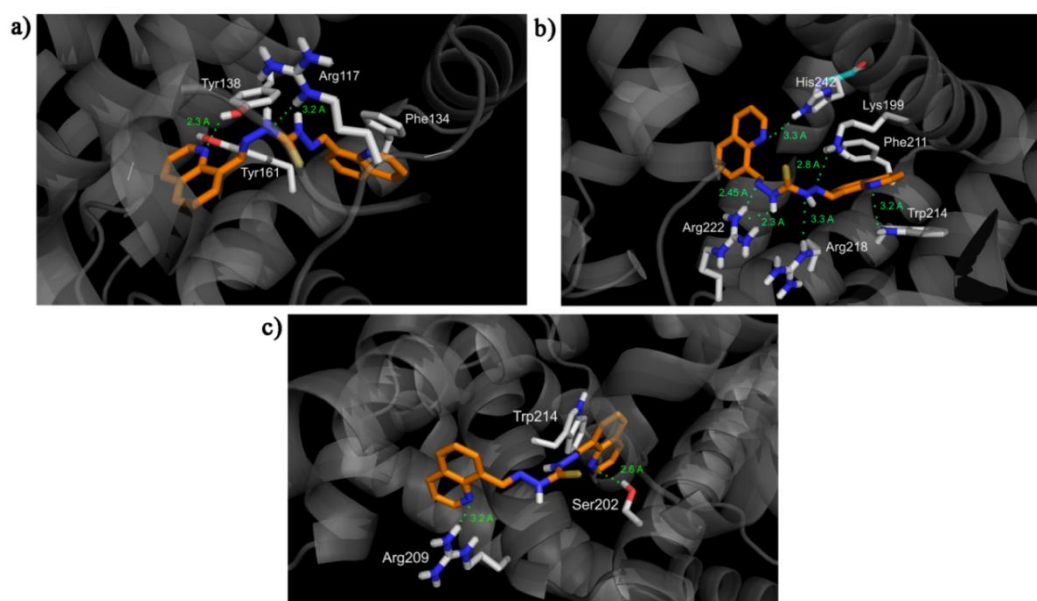
Prema *Ross*-ovom načinu gledanja²⁷⁶ znakovi i veličina termodinamičkih parametara za proteinske interakcije mogu objasniti glavnu snagu koja doprinosi stabilnosti proteina. Sa termodinamičke tačke gledišta vrednosti $\Delta H > 0$ i $\Delta S > 0$ impliciraju hidrofobnu interakciju, $\Delta H < 0$ and $\Delta S < 0$ ukazuju na *Van der Waals*-ove sile ili fomiranje vodoničnih veza, dok vrednosti $\Delta H < 0$ i $\Delta S > 0$ sugerišu na postojanje elektrostatičkih sila. Negativne vrednosti promene entalpije i entropije ukazuju da su *Van der Waals*-ove sile ili fomiranje vodoničnih veza dominantni u HSA- $dhTUK_{(8qc)}$ vezivanju. Proces je entalpijski pokrenut, a vodonične veze između HSA i $dhTUK_{(8qc)}$ su najvažnije intermolekulske sile.

4.7.2.3 Molekulski doking vezivanja $dhTUK_{(8qc)}$ za HSA

Molekulski doking je relativno brza i ekonomična računarska metoda za predviđanje afiniteta i načina vezivanja molekula. Protein-ligand doking je grana molekulskog dokinga, koja nastoji da predvidi strukturu kompleksa koji nastaje vezivanjem liganda za protein, koristeći poznate 3D strukture proteina i liganda. Da bi se istražio način vezivanja izabranog jedinjenja za HSA urađen je doking $dhTUK_{(8qc)}$ u poddomenima IB, IIA i IIIA. Na osnovu rezultata, odnosno energije vezivanja koje su date u Tabeli 4.19 može se zaključiti da $dhTUK_{(8qc)}$ favorizuje interakciju sa vezivnim mestom IIA.

Tabela 4. 19 Doking rezultati vezivanja $dhTUK_{(8qc)}$ u poddomenima IB, IIA i IIIA

Mesto vezivanja (PDB kod)	Afinitet vezivanja (kcal mol ⁻¹)
IB (4LB2)	-9.0
IIA (3LU7)	-11.0
IIIA (2BXE)	-9.7



Slika 4. 35 $dhTUK_{(8qc)}$ (narandžasti) dokovan u poddomen IB (a), IIA (b), and IIIA (c) HSA. Ostaci aminokiselina koje interaguju sa $dhTUK_{(8qc)}$, prikazani su kao štapići sa obojenim atomima. Najvažnije polarne interakcije su istaknute zelenim tačkama i obeleženim razdaljinama

Najpovoljnije doking rešenje za svako vezivno mesto dato je na Slici 4.35. *dhTUK*_(8qc) gradi mnogo polarnih interakcija u HSA poddomenu IIA, odnosno formira vodonične veze sa ostacima aminokiselina, His242 (rastojanje 3.3 Å), Arg222 (2.3-2.45 Å), Lys199 (2.8 Å) i Trp214 (3.2 Å). Hidrofobne i/ili $\pi - \pi$ interakcije između **8_{bs}** i Phe211 i Trp214 su takođe primećene. Manji broj polarnih interakcija *dhTUK*_(8qc) primećen je i u poddomenima IB i IIIA. Vezivanje *dhTUK*_(8qc) u poddomen IIA proteina HSA potvrdilo je dominantan doprinos vodonične veze u sveukupnoj energiji vezivanja.

4.7.3 Antioksidativno dejstvo

Interakcijom sintetisanih jedinjenja sa stabilnim slobodnim DPPH radikalom određuje se njegova sposobnost neutralizacije ili generisanja slobodnog radikala, odnosno mogućnost reakcije prenošenja atoma vodonika²⁷⁷ što u stvari prouzrokuje nastanak novog radikala. Na ovaj način može se pretpostaviti da se veći kapacitet t.j. veća sposobnost supstance da otpusti atom vodonika, odnosno stvori strukturno stabilni radikal, nalazi u korelaciji sa visokom antioksidativnom aktivnošću sintetisanih jedinjenja. Osim ovih faktora, svojstva rastvarača, struktura ispitivanih jedinjenja i elektronska svojstva supstituenata imaju ključnu ulogu u stabilizaciji dobijenog radikala. Poznato je da je odgovarajuća SAR analiza antioksidativne aktivnosti diaril imina u seriji benzo [*b*] tiofena uspostavljena u pogledu položaja i arilaminacije, bilo na prstenu benzena ili tiofena, i u zavisnosti od prisustva različitih susptituenata na oba prstena.²⁷⁸

U ovoj disertaciji ispitivanja su izvršena na 44 jedinjenja i dobijene vrednosti odnosno širok spektar antiradikalne inhibicije DPPH radikala izračunate prema Jednačini 3.2. prikazane su u Tabeli 4.20. Askorbinska kiselina u istim koncentracijama korišćena je kao referentana supstanca za pozitivnu kontrolu. Odgovarajuća veza između strukture i aktivnosti formirana je u odnosu na prisustvo i položaj supstituenata, odnosno hidroksilne grupe na aromatičnom jezgru, prisustvo piridinskog ili hinolinskog prstena i položaj atoma azota u prstenu u odnosu na imino vezu.

Sistematska studija antioksidativne aktivnosti i *mh*- i *dh*- (T)UK do danas nije poznata. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju da su *h*-(T)UK značajno aktivniji u

Tabela 4. 20 Antioksidativna aktivnost jedinjenja

<i>mh</i> -(T)UK	IC ₅₀ (mM)	<i>dh</i> -(T)UK	IC ₅₀ (mM)
<i>mh</i> UK _(sal)	0,25 ± 0,02	<i>dh</i> UK _(sal)	6,48 ± 0,20
<i>mh</i> UK _(2pyc)	0,60 ± 0,06	<i>dh</i> UK _(2pyc)	49,90 ± 0,13
<i>mh</i> UK _(3pyc)	0,82 ± 0,07	<i>dh</i> UK _(3pyc)	59,40 ± 0,11
<i>mh</i> UK _(4pyc)	1,45 ± 0,09	<i>dh</i> UK _(4pyc)	66,90 ± 0,12
<i>mh</i> UK _(2pya)	0,46 ± 0,10	<i>dh</i> UK _(2pya)	12,60±0,11
<i>mh</i> UK _(3pya)	0,13 ± 0,08	<i>dh</i> UK _(3pya)	17,50 ± 0,10
<i>mh</i> UK _(4pya)	0,20 ± 0,07	<i>dh</i> UK _(4pya)	18,20 ± 0,09
<i>mh</i> UK _(2pyb)	0,87 ± 0,11	<i>dh</i> UK _(2pyb)	16,40± 0,02
<i>mh</i> UK _(8qc)	0,67 ± 0,06	<i>dh</i> UK _(8qc)	10,50± 0,46
<i>mh</i> UK _(2qc)	0,21 ± 0,05	<i>dh</i> UK _(2qc)	1,50 ± 0,09
<i>mh</i> UK _(8OH2qc)	0,09 ± 0,01	<i>dh</i> UK _(8OH2qc)	0,83 ± 0,18
<i>mh</i> TUK _(sal)	0,15 ± 0,07	<i>dh</i> TUK _(sal)	0,11 ± 0,08
<i>mh</i> TUK _(2pyc)	0,16 ± 0,08	<i>dh</i> TUK _(2pyc)	0,13 ± 0,04
<i>mh</i> TUK _(3pyc)	0,20 ± 0,07	<i>dh</i> TUK _(3pyc)	0,15 ± 0,05
<i>mh</i> TUK _(4pyc)	0,33 ± 0,1	<i>dh</i> TUK _(4pyc)	0,18 ± 0,07
<i>mh</i> TUK _(2pya)	0,26 ± 0,04	<i>dh</i> TUK _(2pya)	0,12 ± 0,08
<i>mh</i> TUK _(3pya)	0,30 ± 0,05	<i>dh</i> TUK _(3pya)	0,18 ± 0,04
<i>mh</i> TUK _(4pya)	0,33 ± 0,06	<i>dh</i> TUK _(4pya)	0,24 ± 0,02
<i>mh</i> TUK _(2pyb)	0,14 ± 0,03	<i>dh</i> TUK _(2pyb)	0,16 ± 0,04
<i>mh</i> TUK _(8qc)	0,13 ± 0,02	<i>dh</i> TUK _(8qc)	0,11 ± 0,03
<i>mh</i> TUK _(2qc)	0,11 ± 0,02	<i>dh</i> TUK _(2qc)	0,09 ± 0,02
<i>mh</i> TUK _(8OH2qc)	0,34 ± 0,01	<i>dh</i> TUK _(8OH2qc)	0,49 ± 0,09
Askorbinska kiselina			0,08 ± 0,01

odnosu na *h*-UK sa vrednostima bliskim Vitaminu C. Na osnovu toga zaključeno je da supstance koje u svom sastavu imaju tion grupu (C=S) pokazuju bolju aktivnost što je već potvrđeno kod njihovih predhodnika tiosemikabazona.^{279,280} Predpostavlja se da na aktivnost *h*-UK utiče zbirni kumulativni efekat supstituenata na azometinskom ugljeniku kao i slobodna NH-NH₂ grupa. U slučaju *h*-UK pokazalo se da su monohidrazonski derivati do 80 puta aktivniji u odnosu na dihidraznone što predstavlja jedan od dokaza uticaja slobodne NH-NH₂ na povećanje efikasnosti delovanja jedinjenja, odnosno antioksidativne aktivnosti. Kod *h*-TUK ovakva doslednost u aktivnosti nije primećena, već su IC₅₀ vrednosti *dh*-TUK veće ili u bliskom rangu sa vrednostima kod *mh*-TUK.

U obe grupe jedinjenja, hidrazoni koji u svom sastavu imaju hidroksilnu grupu u *o*-položaju heteroaromatičnog jezgra u odnosu na bočni lanac, pokazuju bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na ostala jedinjenja. Sagledavajući strukturu ispitivanih supstanci, očekivano je da fenolni tip jedinjenja pokazuje bolju aktivnost od supstanci koje sadrže azot u piridinskom prstenu zbog nižih energija disocijacije O-H veze u odnosu na N-H vezu. Iz ovoga proizilazi da je za očekivati slične IC₅₀ vrednost jedinjenja sa hidroksilnom grupom. Malo manja antioksidativna aktivnost susptanci ***mhUK***_(sal), ***mhTUK***_(sal), ***dhUK***_(sal), ***dhTUK***_(sal) u odnosu na ***mhUK***_(8OH2qc), ***mhTUK***_(8OH2qc) ***dhUK***_(8OH2qc), i ***mhTUK***_(8OH2qc) indukovana je dodatnom stabilizacijom hidroksilne grupe usled sposobnosti formiranja intramolekulskih vodoničnih veza u molekulima kod jedinjenja koja imaju hidroksilnu grupu u *o*- položaju heteroaromatičnog jezgra. (Slika 4.13)²⁸¹. Hidroksilna grupa u hinolinskim jedinjenjima ne pokazuje mogućnost formiranja intramolekulskih veza usled čega dolazi do lakšeg otpuštanja protona i formiranja radikala koji je stabilisan kroz rezonantnu struktruru.¹⁶³ Ipak slične vrednosti antioksidativne aktivnosti ukazuju na primaran značaj hidroksilne grupe na povećanje antioksidativne aktivnosti.

mh-UK koji u svom sastavu sadrže 8-hinolil i 2-hinolil supstituentu na imino ugljeniku pokazuju osam do deset puta slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na Vitamin C. ***mhUK***_(82qc) pokazuje veću aktivnost u odnosu na ***mhUK***_(8qc) što ukazuje na povoljniji uticaj atoma azota u 2-hinolil susptituentu na rezonancionu stabilizaciju nastalog radikala.

Kod piridinil supstituisanih *h*-UK najslabiju antioksidativnu aktivnost pokazuju ***mhUK***_(2pyc) - ***mhUK***_(4pyc), odnosno ona jedinjenja koja na azometinskom ugljeniku nemaju alkil grupu nego atom vodonika. Uočeno je da pomeranje atoma azota duž heteroaromatičnog jezgra, tj. njegovo udaljavanje od bočnog niza, utiče na smanjenje antioksidativne aktivnosti. Uvođenje metil grupe na azometinskom ugljeniku doprinosi povećanju sternih i elektron-donorskih efekata, a samim tim i antioksidativne aktivnosti. U slučaju ***mhUK***_(3pya) i ***mhUK***_(4pya) redosled u povećanju aktivnosti predstavlja izuzetak gde jedinjenje koje ima "aza" azot u *m*- položaju heteroaromatičnog jezgra u odnosu na bočni niz pokazuje bolju antioksidativnu aktivnost u odnosu na *p*- "aza" supstituisane aromatične hidrazone. Moguć izuzetak ponašanja se može objasniti nemogućnošću

izomerizacije **mhUK**_(3pya) u rastvoru, dok jedinjenja **mhUK**_(2pya) i **mhUK**_(4pya) pokazuju sposobnost izomerizacije (Slika 4.11 i 4.12).

Najaktivniji *mh*-UK predstavlja **mhUK**_(2pyb) čija je vrednost u rangu sa Vitaminom C. Struktura i položaj supstituenata prisutnih na azometinskom atomu ugljenika **h-UK** u velikoj meri utiče na antioksidativnu aktivnost. Osim toga sposobnost supstituenata da učesvuju u π -elektron delokalizaciji značajno doprinosi stabilizaciji nastalog radikala. Najaktivnija jedinjenja među *mh*- i *dh*-UK predstavljaju **mhUK**_(2pyb) i **dhUK**_(2pyb) koja u svom sastavu sadrži 2-piridinil prsten i fenilno jezgro na iminskom atomu ugljenika, čime je potvrđen uticaj proširene π -elektron delokalizaciji u rezonantnoj stabilnosti kreiranog radikala. *dh*-UK pokazuju nižu antioksidativnu aktivnost sa sličnim trendom u aktivnosti kao u slučaju *mh*-UK. Manja antioksidativna aktivnost je objasnjena sternim smetnjama koje utiču na aktivni vodonik, i izmenjenim hemijskim svojstvima amidnog vodonika koji pokazuje nižu sposobnost interakcije sa DPPH.

Rezonanciona stabilizacija nastalog radikala kod *h*-TUK je prevashodno određen prisustvom atoma sumpora, za razliku od *h*-UK gde je zbirni kumulativni efekat i efekat supstituenata zaslužan za antioksidativnu aktivnost. U teorijskom delu je napomenuto da *dhS* mogu lakše formirati tiolni oblik koji najverovatnije jeste i uzrok bolje antioksidativne aktivnosti *h*-TUK, odnosno mogućnost tion/tiol tautomerizacije, usled čega su razlike u IC₅₀ vrednostima između *mh*-TUK i *dh*-TUK skoro beznačajne. Za razliku od *h*-UK kod kojih electron-donorski i sterna efekti povećavaju aktivnost u slučaju *h*-TUK je zapažen obrnuta zavisnost. Prisustvo metil grupe na azometinskom ugljenikovom atomu u maloj meri smanjuje antioksidativnu aktivnost ili kod nekih jedinjenja čak i ne utiče na aktivnost (**mhTUK**_(2pya) i **mhTUK**_(2pya) kod kojih se azot nalazi u *p*-položaju heteroaromatičnog jezgra u odnosu na bočni niz). Najveća promena je uočena u slučaju **mhUK**_(2pyb) i **dhTUK**_(2pyb) kod kojih proširena π -elektron delokalizacija utiče na smanjenje aktivnosti jedinjenja, što predstavlja potvrdu da prisustvo atoma sumpora ima najveći uticaj na antioksidativnu aktivnost.

h-TUK koji u svom sastavu sadrže 8-hinolil i 2-hinolil supstituent na imino atomu ugljenika pokazuju vrlo slične vrednosti aktivnosti kao Vitamin C, s' tim što je i u ovom slučaju aktivnije jedinjenje ono koje u svom sastavu sadrži 2-hinolil supstituent na azometinskom atomu ugljenika.

4.7.4 Antimikrobno dejstvo

Kao što je već opisano u Teorijskom delu, *h*-(T)UK i njihovi analozi pokazuju dobru antimikrobnu aktivnost. Pri sintezi novih lekova u medicinskoj hemiji uvek se polazi do pretpostavke da strukturno slični molekuli mogu pokazivati sličnu biološku aktivnost. Posmatrajući triacetazon (Slika 2.24) i formule *h*-TUK pretpostavljeno je da bi ova vrsta jedinjenja opravdano mogla ispoljavati dobro antimikrobno dejstvo.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio dizajn i sinteza derivata dhO(S) kondenzacijom raznorodnih karbonilnih jedinjenja samo sa jedne ili sa obe strane dhO(S), odnosno ispitivanje uticaja pomeranja "aza" azota duž piridinskog i hinolinskog prstena i prisustva hidroksilne grupe na promene antimikrobne aktivnosti jedinjenja. Ispitana je antimikrobno dejstvo 44 jedinjenja na nekoliko sojeva Gram-pozitivnih: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), Gram-negativnih bakterija: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), i kvasaca: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763) and *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Odnos između strukture i biološke aktivnosti *h*-(T)UK ispitan je poređenjem aktivnosti sa antibiotikom amikacinom i lekom protiv gljivica, nistatinom.

U Tabelama 4.21 i 4.22 prikazane su vrednosti prečnika zone inhibicije (WIZ, *eng.* Width of Inhibition Zone) izražene u mm za sva ispitivana jedinjenja. Na osnovu rezultata odmah se može uočiti da su *h*-TUK značajno aktivniji od *h*-UK i na bakterijama i na gljivice, što je i u skladu sa literaturnim podacima, a njihova bolja aktivnost objašnjena je uticajem tionske grupe za koju se pretpostavlja sa je esencijalna antimikrobnu aktivnost.⁵⁹ Za *h*-TUK jedinjenja razvijen je statistički validan QSAR model zasnovan na MIF-ovima na bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) i gljivici *Candida albicans* (ATCC 10231). Za ove tri mikrobne vrste određena je i MIC radi upoređivanja validnosti rezultata uključenih u proračune. (Tabela 4.23)

Tabela 4. 21 *In vitro* antimikrobna aktivnost supstanci testiranih agar difuzionom metodom izražena WIZ^a

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>K. rhizophila</i>
<i>mhUK</i> _(sal)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhUK</i> _(2pyc)	10	12	10	10	10	10	10	10
<i>mhUK</i> _(3pyc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhUK</i> _(4pyc)	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>mhUK</i> _(2pya)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhUK</i> _(3pya)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhUK</i> _(4-pya)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhUK</i> _(2pyb)	18	15	18	16	16	18	16	18
<i>mhUK</i> _(8qc)	12	12	12	12	12	12	12	12
<i>mhUK</i> _(2qc)	14	14	16	16	14	18	14	18
<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dhUK</i> _(sal)	-	-	-	-	10	10	10	10
<i>dhUK</i> _(2pyc)	-	-	-	-	10	10	10	10
<i>dhUK</i> _(3pyc)	10	10	14	12	14	12	12	14
<i>dhUK</i> _(4pyc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dhUK</i> _(2pya)	-	-	-	-	12	12	12	12
<i>dhUK</i> _(3pya)	10	12	10	10	10	10	10	10
<i>dhUK</i> _(4pya)	10	12	10	10	10	10	10	10
<i>dhUK</i> _(2pyb)	12	12	12	12	14	12	14	12
<i>dhUK</i> _(8qc)	12	12	12	12	12	12	12	12
<i>dhUK</i> _(2qc)	12	12	12	12	12	12	12	12
<i>dhUK</i> _(8OH2qc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(sal)	16	16	18	18	16	14	16	18
<i>mhTUK</i> _(2pyc)	28	26	24	26	26	20	24	24
<i>mhTUK</i> _(3pyc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(4pyc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(2pya)	20	22	20	20	22	18	20	20
<i>mhTUK</i> _(3pya)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(4pya)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(2pyb)	14	14	14	14	14	12	14	12
<i>mhTUK</i> _(8qc)	18	18	16	16	18	14	16	16
<i>mhTUK</i> _(2qc)	10	12	10	12	10	10	10	10
<i>mhTUK</i> _(8OH2qc)	16	18	18	20	18	16	18	20
<i>dhTUK</i> _(sal)	10	12	12	12	14	10	10	10
<i>dhTUK</i> _(2pyc)	24	26	22	22	22	22	22	24
<i>dhTUK</i> _(3pyc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dhTUK</i> _(4pyc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dhTUK</i> _(2pya)	22	24	24	24	26	26	26	26
<i>dhTUK</i> _(3pya)	10	10	10	12	12	12	10	12
<i>dhTUK</i> _(4pya)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dhTUK</i> _(2pyb)	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>dhTUK</i> _(8qc)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>dhTUK</i> _(2qc)	10	10	12	12	10	10	10	10
<i>dhTUK</i> _(8OH2qc)	14	16	22	22	20	18	22	20
Amikacin	42	24	20	24	22	32	20	22

- aktivnost manja od 10 mm (zona inhibicije)

^a uključujući dijаметar filter diska prečnika 8 mm

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da *h*-UK nisu pokazali dobru antimikrobnu aktivnost. Supstance ***mhUK***_(8qc) i ***mhUK***_(8OH2qc) su pokazala najbolje antimikrobno dejstvo u rangu zone inhibicije od 14-18 mm na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, a na gljivice 10-16 mm, s'tim što je bolju aktivnost pokazala supstanca kod koje je azot u položaju 8 hinolinskog prstena u odnosu na imino vezu. Sve ostale supstance su pokazale veoma slabu antimikrobnu aktivnost, čak je uvođenje još jednog hinolinskog prstena na drugi kraj *mh*-UK uzrokovalo smanjenje antimikrobne aktivnosti. Piridinil supstituisani *h*-UK pokazali su nižu aktivnost od *h*-UK koji u svom sastavu sadrže hinolinske prstene. Prisustvo metil i fenil grupe na azometinskom ugljeniku utiče na smanjenje inhibicione zone, iz čega proizilazi da sterni efekti prisutnih grupa indukuju smanjenje antimikrobne aktivnosti.

Osim što aktivnost supstanci zavisi od karakteristika ispitivanih jedinjenja (geometrije, donorske ili proton akceptorske sposobnosti, lipofilnosti, hidrofilnosti) na aktivnost mogu uticati i strukturne karakteristike membrane bakterija. Spoljašnji sloj Gram-negativnih bakterija je sastavljen uglavnom od liposaharida, dok je tanak sloj peptidoglikana koji ćeliji daje čvrstoću i oblik smešten ispod njega. Stoga su Gram-negativne bakterije zaštićenije od efekta delovanja supstanci koje imaju hidrofilni karakter. Sa druge strane poznato je da su Gram-pozitivne bakterije osetljive na dejstvo i liofilnih i hidrofilnih supstanci²⁸². U skladu sa tim zanimljivo je napomenuti da *dh*-UK (***dhUK***_(sal), ***dhUK***_(2pyc) i ***dhUK***_(2pya)) pokazuju umerenu aktivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama, dok prema Gram-negativnim bakterijama ne pokazuju nikakvu aktivnost. Nedostatak aktivnosti navedenih supstanci na Gram negativne bakterije je upravo posledica povećane barijere koju daje spoljašnja membrane ove vrste mikroba.

Za razliku od *h*-UK njihovi sumporni analozi *h*-TUK pokazuju mnogo bolju antimikrobnu aktivnost na oba soja bakterija kao i na gljivice. Za ovo je najvećim delom zaslužno prisustvo tionske grupe koja povećava lipofilnost jedinjenja i ujedno poboljšava sposobnost prolaska supstanci kroz lipidnu membranu bakterija i vezivanje za receptore. Većina *h*-TUK pokazuje umerenu antimikrobnu aktivnost, dok je u slučaju određenih supstanci zona inhibicije veća od amikacina i nistatina. Jedinjenja ***mhTUK***_(2pyc), ***mhTUK***_(2pya), ***dhTUK***_(2pyc) i ***dhTUK***_(2pya) su se pokazala kao najbolji antimikrobni agensi sa zonom inhibicije od 20-26 mm na Gram- pozitivne bakterije, 20-28 mm na Gram-negativne bakterije i 20-32 mm na gljivice.

Tabela 4. 22 *In vitro* antifungalna aktivnost supstanci testirana agar difuzionom metodom izražena WIZ

	<i>C.</i> <i>albican</i> <i>s</i>	<i>S.</i> <i>cerevisi</i> <i>ae</i>	<i>A.</i> <i>brasilien</i> <i>sis</i>		<i>C.</i> <i>albica</i> <i>ns</i>	<i>S.</i> <i>cerevisi</i> <i>ae</i>	<i>A.</i> <i>brasiliens</i> <i>is</i>
<i>mhUK</i> _(sal)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(sal)	-	-	-
<i>mhUK</i> _(2pyc)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(2pyc)	-	-	-
<i>mhUK</i> _(3pyc)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(3pyc)	14	14	12
<i>mhUK</i> _(4pyc)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(4pyc)	-	-	-
<i>mhUK</i> _(2pya)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(2pya)	-	-	-
<i>mhUK</i> _(3pya)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(3pya)	12	14	10
<i>mhUK</i> _(4pya)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(4pya)	-	-	-
<i>mhUK</i> _(2pyb)	12	16	16	<i>dhUK</i> _(2pyb)	14	10	10
<i>mhUK</i> _(8qc)	10	14	12	<i>dhUK</i> _(8qc)	-	-	-
<i>mhUK</i> _(2qc)	12	14	12	<i>dhUK</i> _(2qc)	12	10	10
<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	-	-	-	<i>dhUK</i> _(8OH2qc)	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(sal)	22	28	20	<i>dhTUK</i> _(sal)	16	14	12
<i>mhTUK</i> _(2pyc)	24	32	32	<i>dhTUK</i> _(2pyc)	22	22	24
<i>mhTUK</i> _(3pyc)	12	12	10	<i>dhTUK</i> _(3pyc)	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(4pyc)	10	10	10	<i>dhTUK</i> _(4pyc)	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(2pya)	26	30	24	<i>dhTUK</i> _(2pya)	30	30	26
<i>mhTUK</i> _(3pya)	10	16	12	<i>dhTUK</i> _(3pya)	12	10	10
<i>mhTUK</i> _(4pya)	12	26	12	<i>dhTUK</i> _(4pya)	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(2pyb)	14	16	14	<i>dhTUK</i> _(2pyb)	10	12	10
<i>mhTUK</i> _(8qc)	18	26	22	<i>dhTUK</i> _(8qc)	-	-	-
<i>mhTUK</i> _(2qc)	12	12	10	<i>dhTUK</i> _(2qc)	10	10	10
<i>mhTUK</i> _(8OH2qc)	18	26	20	<i>dhTUK</i> _(8OH2qc)	26	26	22
Nystatin	34	56	32		34	56	32

- aktivnost manja od 10 mm (zona inhibicije); ^a uključujući dijametar filter diska prečnika 8 mm

Uspostavljanjem veze između bioaktivnosti i hemijske strukture ukazuje na to da antimikrobna aktivnost *h*-TUK zavisi od položaja "aza" azota u piridinskom prstenu u odnosu na bočni niz. Zajednički strukturni deo svih derivata koji su ispoljili dobru antibakterijsku i antifungalnu aktivnost bilo je prisustvo 2-piridinil supstituenta na azometinskom ugljeniku, odnosno pomeranje atoma azota duž piridinskog prstena iz položaja 2- ka položaju 4- u odnosu na bočni lanac utiče na smanjenje antimikrobne aktivnosti. Osim toga skoro svi *mh*-TUK imaju bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na *dh*-TUK sa izuzetkom u slučaju *mhTUK*_(2pya)- *dhTUK*_(2pya), *mhTUK*_(8OH2qc)- *dhTUK*_(8OH2qc). Uticaj prisustva metil i fenil grupe na azometinskom ugljeniku na smanjuje antimikrobnu aktivnosti je u skladu sa rezultatima u slučaju *h*-UK. Odstupanje u ovoj pravilnosti primećeno je kod *dhTUK*_(2pya) koji pokazuje bolju aktivnost u odnosu na nesupstituisani *dhTUK*_(2pyc) na svim sojevima bakterija i kvasaca izuzev na

bakterijama *Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa* gde su vrednosti vrlo bliske. U slučaju hinolinskih *h*-TUK aktivnost se nije značajno poboljšala u odnosu na *h*-UK. Jedina razlika je u tome što *h*-TUK koji u svom sastavu imaju azot u položaju 2 na hinolinskom jezgru, pokazuju bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na ona kod kojih je azot u položaju 8. Prisustvo hidroksilne grupe u *mh*-TUK hinolinskim jedinjenjima prouzrokuje smanjenje antimikrobne aktivnosti, dok je suprotno zapaženo u slučaju *dh*-TUK.

4.7.5 Tehnike molekuskog modelovanja u cilju racionalizacije odnosa između strukture i antimikrobne aktivnosti

Jedan od bitnih parametara pri dizajnu novih lekova jeste određivanje tačne mete delovanja novog leka. U većini bioloških ispitivanja na osnovu testova se mogu dobiti potencijalno aktivni molekuli, ali bez ikakvih informacija o mestu delovanja leka i njegovom metaboličkom putu, što naučnike ograničava u sintezi lekova koji ciljano deluju samo na jednu biološku metu. U skladu sa tim veoma je značajno korišćenje molekuskog dokinga koji ima za cilj predviđanje načina vezivanja (orijentacija i oblik) dva molekula kao i struktura nastalog kompleksa, što može poslužiti za predviđanje jačine tog vezivanja i biološkog delovanja testiranih supstanci.

4.7.5.1 Ispitivanje primenljivosti 3D-QSAR metode izvedene iz GRIND metodologije

U okviru ove disertacije ispitana je biološka aktivnost *h*-TUK na dva soja bakterija i jednoj gljivici. Racionalizacija dobijenih bioloških podataka i dizajn novih, aktivnijih struktura, moguća je uz pomoć primene MIF-ova i 3D-QSAR-a zasnovanog na GRIND deskriptorima. Struktura i antimikrobna aktivnosti serije od dvadeset dva *h*-TUK prikazana je u Tabeli 4.23.

U cilju pronalaženja farmakofornih tačaka važnih za antimikrobnu aktivnost ovih jedinjenja napravljenu su modeli korišćenjem molekuskih deskriptora zasnovanih na MIF-ovima.

Tabela 4. 23 Antimikrobna aktivnost *h*-TUK

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>	
	WIZ	pMIC	WIZ	pMIC	WIZ	pMIC
<i>mhTUK</i> _(sal)	16	-	14	2.60	22	2.30
<i>mhTUK</i> _(2pyc)	26	3.81	20	3.50	24	3.50
<i>mhTUK</i> _(3pyc)	-	2.60	-	-	12	2.30
<i>mhTUK</i> _(4pyc)	-	2.60	-	-	10	2.30
<i>mhTUK</i> _(2pya)	22	4.11	18	3.81	26	4.11
<i>mhTUK</i> _(3pya)	-	2.60	-	-	10	2.30
<i>mhTUK</i> _(4pya)	-	2.60	-	2.90	12	2.30
<i>mhTUK</i> _(2pyb)	14	3.50	12	4.11	14	2.60
<i>mhTUK</i> _(8qc)	18	-	14	-	18	2.30
<i>mhTUK</i> _(2qc)	12	2.60	10	2.30	12	2.60
<i>mhTUK</i> _(8OH2qc)	18	-	16	-	18	2.30
<i>dhTUK</i> _(sal)	12	-	10	-	16	2.30
<i>dhTUK</i> _(2pyc)	26	4.11	22	4.11	22	3.81
<i>dhTUK</i> _(3pyc)	-	-	-	-	-	2.30
<i>dhTUK</i> _(4pyc)	-	-	-	-	-	2.30
<i>dhTUK</i> _(2pya)	24	4.41	26	5.30	30	4.70
<i>dhTUK</i> _(3pya)	10	-	12	-	12	-
<i>dhTUK</i> _(4pya)	-	2.60	-	2.60	-	2.30
<i>dhTUK</i> _(2pyb)	10	-	10	-	10	2.30
<i>dhTUK</i> _(8qc)	-	-	-	-	-	-
<i>dhTUK</i> _(2qc)	10	-	10	-	10	2.30
<i>dhTUK</i> _(8OH2qc)	16	-	18	-	26	2.30

- aktivnost manja od 10 mm (zona inhibicije) ili 2.3 (pMIC)

3D-QSAR

Antibakterijska i antifungalna aktivnosti *h*-TUK određene su merenjem WIZ-a i izračunavanjem logaritma od određene minimalne inhibitorne koncentracije ((-log₁₀MIC, pMIC) Tabela 4.23. S' obzorom da su podaci za WIZ i MIC u međusobnoj korelaciji (Tabela 4.24) za sva tri soja odlučili smo da izgradimo QSAR modele sa WIZ-om kao nezavisnom promenljivom jer je broj supstanci sa određenim WIZ-om, veći od broja i promenljivosti MIC vrednosti. Napravljena su tri PLS modela, dva za aktivnosti prema bakterijama i jedan za aktivnosti prema gljivicama.

Tabela 4. 24 Matrica međukorelacije (*r* vrednosti) WIZ i pMIC vrednosti

	<i>P. aeruginosa</i> pMIC	<i>S. aureus</i> pMIC	<i>C. albicans</i> pMIC
<i>P. aeruginosa</i> WIZ	0.83		
<i>S. aureus</i> WIZ		0.96*	
<i>C. albicans</i> WIZ			0.97

* isključujući supstancu *mhTUK*_(8qc)

QSAR model antibakterijske aktivnosti h-TUK na Gram-pozitivnu bakteriju *S. aureus*

Analiza glavne komponente sprovedena je na celom setu GRIND deskriptora. Kako bi se filtrirale neinformativne promenljive iz modela, izvršena su dva ciklusa frakcionog faktorskog dizajna (FFD), a rezultati su prikazani u Tabeli 4.25. PCA model sa 5 glavnih komponenti (PC) koji je obuhvatao ceo set promenljivih, objasnio je 87,59% sume X kvadrata (SSX_{acc}), i 79,66% X varijanse ($VarX_{acc}$).

Tabela 4. 25 Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon dva FFD ciklusa (od 610, u modelu je zadržano 301 promenljivih)

PC	SSX	SSX _{acc}	VarX	VarX _{acc}
1	52,55	52,55	48,51	48,51
2	12,64	65,18	10,21	58,72
3	10,36	75,54	9,33	68,05
4	7,56	83,1	7,39	75,43
5	4,48	87,59	4,23	79,66

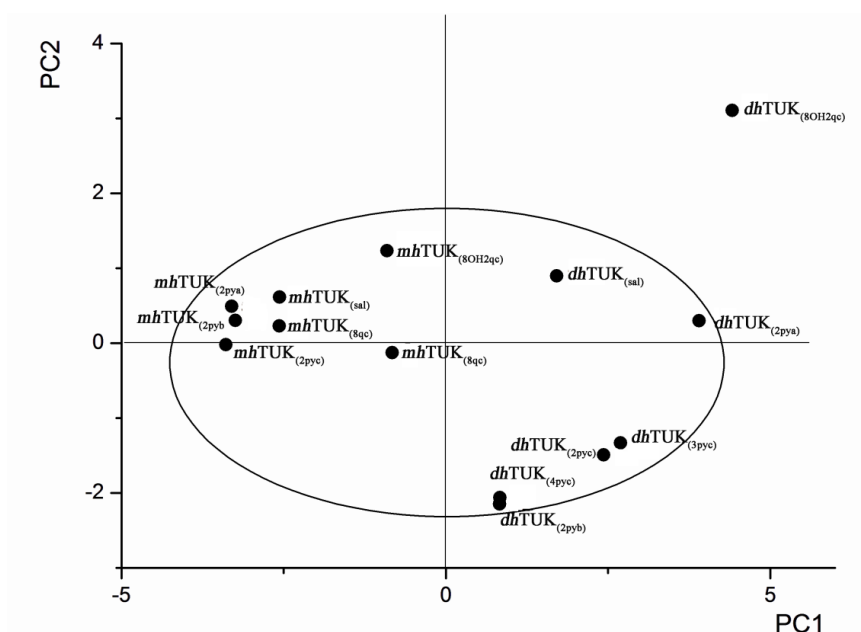
PLS model je napravljen kako bi se izvršila strukturalna korelacija jedinjenja sa potencijalnom biološkom aktivnošću. Nakon primene dva ciklusa FFD, prediktivnost modela je značajno poboljšana, dva modela latentne promenljive (LV) sa $r^2 = 0,84$, q^2 (LOO) = 0,55 i standardnom devijacijom predviđanja greške (SDEP, *eng.* Standard Deviation of Error of Calculation) od 3,29 mm. Pored LOO primenjeni su i LTO i RG metode unakrsne validacije (CV). Najbolji i preporučeni metod validacije, koji se sastoji od deljenja seta podataka na trening i test set nije urađen iz razloga što je naš set sadržavao mali broj jedinjenja (ukupno 14) i što RG validacija daje slične podatke o validnosti modela kao i deljenje podataka na trening i test set. Statistički parametri PLS modela nakon primene svake od pomenutih CV procedura su prikazani u Tabeli 4.26.

Organizacija za ekonomsku saradnju i razvoj (OECD *eng.* Organizations for Economic Cooperation and Development) je postavila pravilo da domen primenljivosti (AD, *eng.* Applicability Domain) za svaki QSAR model treba definisati.²⁸³ AD predstavlja regiju u hemijskom prostoru koja govori o preciznosti aktivnosti predviđanja novih struktura utemeljenim na hemijskoj sličnosti sa setom treninga koji se koriste za razvoj modela. Domen primenljivosti za 3D-QSAR model može se proceniti iz PCA skorova molekula koji predstavljaju hemijsku sličnost između supstanci. (Slika 4.36)

Tačno predviđanje potencijalno novih susptanci se očekuje samo za supstance koji se uklapaju u elipsu koja pokriva 95% intervala pouzdanosti.

Tabela 4. 26 Statistički parametri PLS modela sa dve LV nakon primene tri različite CV procedure. Podešavanja: FFD-LV = 3, 20 % veštačkih promenljivih, 20 nasumičnih ciklusa, 4 nasumične grupe, 2 ciklusa FFD.

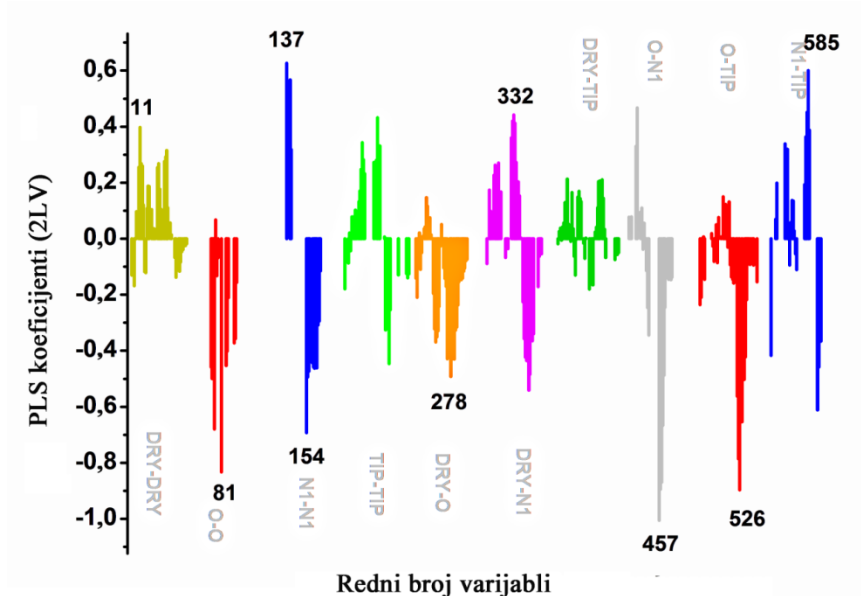
Model	SSX _{acc}	SDEC	SDEP	r ² _{acc}	q ² _{acc}
2 LV (LOO)	63,96	1,96	3,29	0,84	0,55
2 LV (LTO)	67,05	2,00	3,43	0,83	0,51
2 LV (RG)	66,57	1,99	3,53	0,83	0,48



Slika 4. 36 PCA skorovi jedinjenja aktivnih na bakteriji *S. aureus*

Iako je jedinjenje **dhTUK_(8qc)** identifikovano izvan elipse, isključenje ovog jedinjenje smanjilo bi statistički kvalitet modela pa smo zadržali ovu komponentu za trening. Koeficijenti PLS modela (Slika 4.37) ukazuje na strukturni fragment koji ima pozitivan ili negativan uticaj na aktivnost., dok su u Tabeli 4.27. opisane su najvažnije promenljive i njihova povezanost sa strukturnim elementima jedinjenja. Grafik PLS koeficijenata pokazuje koja od promenljivih ima pozitivan uticaj (+ vrednosti) a koja negativan uticaj na biološku aktivnost (- vrednosti koeficijenata). Intenzivnije

promenljive znače da je veći uticaj strukturnih elemenata koje one opisuju, na ukupnu aktivnost jedinjenja.



Slika 4. 37 Grafik PLS koeficijenata (modela sa 2 LV). Najinformativnije promenljive su označene brojevima i dalje diskutovane u tekstu.

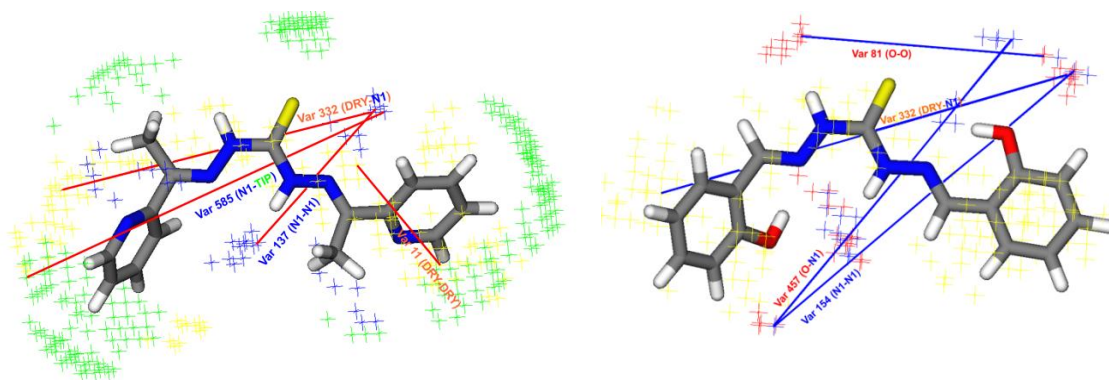
N1- N1 blok promenljive daju informacije o optimalnom rastojanju između dve HBA grupe. Dok dva HBA na rastojanju između 6,00 i 7,60 Å povećavaju aktivnost jedinjenja, ako je HBA > 12,8 Å smanjuje se antibakterijska aktivnost jedinjenja. Atom kiseonika iz hidroksilne grupe je uključen kao pozitivna korelisana promenljiva, sugerišući da bi prevođenje hidroksilne grupe (u HBA i HBD) u metoksi (HBA) najverovatnije bio uzrok povećanja aktivnosti jedinjenja.

Većina promenljivih negativno korelisanih sa aktivnošću su na čvor-čvor rastojanjima većim od 12 Å, ukazujući na činjenicu da su velika jedinjenja među **h-TUK** generalno manje aktivna prema *S. aureus*. Slika 4.38 prikazuje strukturne fragmente koje su najvažniji za delovanje ovih jedinjenja. Pozitivno korelisane promenljive su zastupljene na najaktivnijem jedinjenju **dhTUK**_(2pya), dok je jedinjenje **dhTUK**_(sal) izabrano da pokaže glavne promenljive koje imaju negativan uticaj na aktivnost.

Tabela 4. 27 Pregled promenljivih sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja na *S. aureus*

Blok proba	Blok promenljive N°	Rastojanje (Å)	Uticaj	Strukturni elementi, komentari
DRY-DRY	11	4,40–4,80	+	Atom sumpora i hidrofobni deo između metil grupe i piridinskog prstena. Izraženija kod najaktivnije supstance, (<i>dhTUK</i> _(2pya))
O-O	81	8,00–8,40	–	Izražen samo za najmanje aktivna jedinjenja. Predstavlja rastojanje dve HBD, i supstanci <i>dhTUK</i> _(sal) and <i>dhTUK</i> _(8OH2qc) , koje imaju hidroksilnu grupu i imaju najveću vrednost promenljivih (VV)
N1-N1	154	12,80–13,20	–	Prisutna je samo kod najmanje aktivnih, velikih komponenti. Predstavlja rastojanje između dve HBA (hidroksil O, piridin ili iminski azot)
DRY-O	278	13,60–14,00	–	Izraženija kod manje aktivnih jedinjenja. Najveća vrednost je za jedinjenje <i>dhTUK</i> _(sal) . Nepovoljno rastojanje između hidrofobnog regiona i HBD.
DRY-N1	332	10,80–11,20	+	Optimalno rastojanje između HBA i hidrofobne grupe. Izraženije kod aktivnih jedinjenja, sa najvećom VV za <i>dhTUK</i> _(2pya) . HBA mesto se nalazi između imina i piridinskog azota.
O-N1	457	12,00–12,40	–	Rastojanje između HBA i HBD, sa najvećom VV kada je hidroksilna grupa HBD. Izražen samo u najmanje aktivnim jedinjenjima.
O-TIP	526	12,00–12,40	+	Izražen samo u najmanje aktivnim jedinjenjima. Najveća VV za jedinjenje <i>dhTUK</i> _(8qc) , gde su HBD sterna mesta na suprotnim stranama molekula (velika razdaljina).
N1-TIP	585	16,40–16,80	+	HBD grupe na optimalnoj razdaljini od sternih mesta. Izraženije je kod aktivnijih jedinjenja.

Dobijeni QSAR model prepoznaje značaj HBA grupe u položaju između iminskog aroma azota i piridinskog prstena. Takođe, hidrofobni ostaci na malim čvor-čvor rastojanjima pozitivno doprinose ukupnoj aktivnosti. Na osnovu ovih zapažanja možemo predložiti menjanje -CH₃ sa -CF₃ grupom, što bi povećalo hidrofobnost i HBA sposobnost molekula u povoljnom regionu opisanom sa promenljivim 11, 137, 332 i 585. S druge strane, nepovoljne interakcije O probe sa hidroksilnom grupom kao HBD-om predlažu zamena -OH sa -OCH₃ grupom u cilju povećanja aktivnosti.



Slika 4. 38 Promenljive sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja predstavljene na jedinjenju $dhTUK_{(2pya)}$ kao aktivnijem (levo, crvene linije) i sa negativnim uticajem $dhTUK_{(sal)}$ na aktivnost (desno, plave linije)

QSAR model antibakterijske aktivnosti h-TUK na Gram-negativnu bakteriju *P. aeruginosa*

Drugi statistički značajan 3D-QSAR model antibakterijske aktivnosti h-TUK jedinjenja dobijen je na Gram-negativnoj bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*. Tri neaktivna jedinjenja ($mhTUK_{(4pyc)}$, $mhTUK_{(4pya)}$ i $dhTUK_{(4pyc)}$, Tabela 4.23) su uključena u model, sa proizvoljno izabranim WIZ vrednostima (5 mm) nižim od vrednosti najmanje aktivnog jedinjenja (10 mm). Na ovaj način smo proširili trening set sa najmanje aktivnim jedinjenjima. PCA model sa 5 glavnih komponenti koji je obuhvatao ceo set promenljivih, objasnio je 81,09 % sume X kvadrata (SSX_{acc}), i 72,26 % X varijansi (VarX_{acc}) (Tabela 4.28). Statistički parametri PLS modela nakon primene tri CV procedure za određivanje prediktivnosti modela prikazani su u Tabeli 4.29.

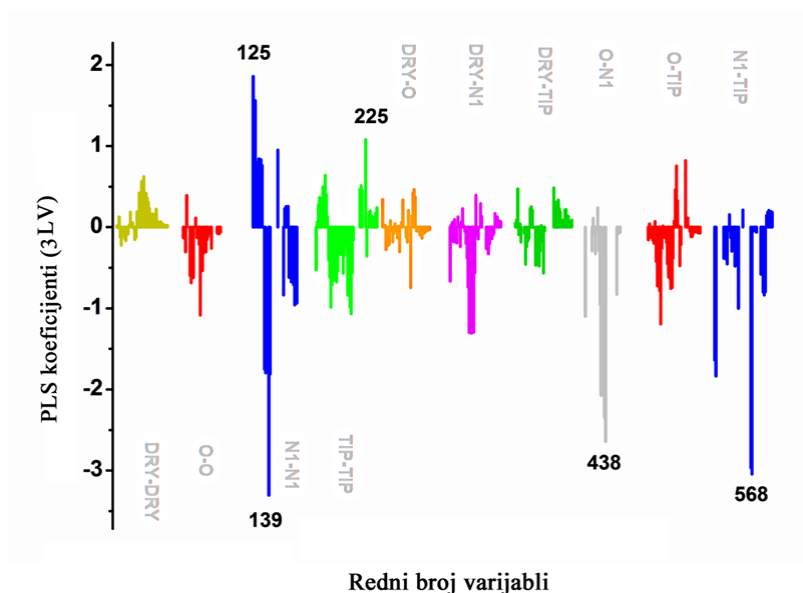
Tabela 4. 28 Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon dva FFD ciklusa (od 590, u modelu je zadržano 364 promenljivih)

PC	SSX	SSX _{acc}	VarX	VarX _{acc}
1	44,76	44,76	40,98	40,98
2	14,77	59,53	12,61	53,60
3	10,94	70,48	9,88	63,48
4	6,00	76,47	4,94	68,42
5	4,62	81,09	3,84	72,26

Tabela 4. 29 Statistički parametri PLS modela sa tri LV nakon primene tri različite CV procedure. Podešavanja: FFD-LV = 3, 20 % veštačkih promenljivih, 20 nasumičnih ciklusa, 4 nasumične grupe, 2 ciklusa FFD.

Model	SSX _{acc}	SDEC	SDEP	r ² _{acc}	q ² _{acc}
3 LV (LOO)	60,69	2,19	4,55	0,92	0,67
3LV (LTO)	59,76	2,26	4,83	0,92	0,62
3 LV (RG)	61,48	2,37	5,36	0,91	0,54

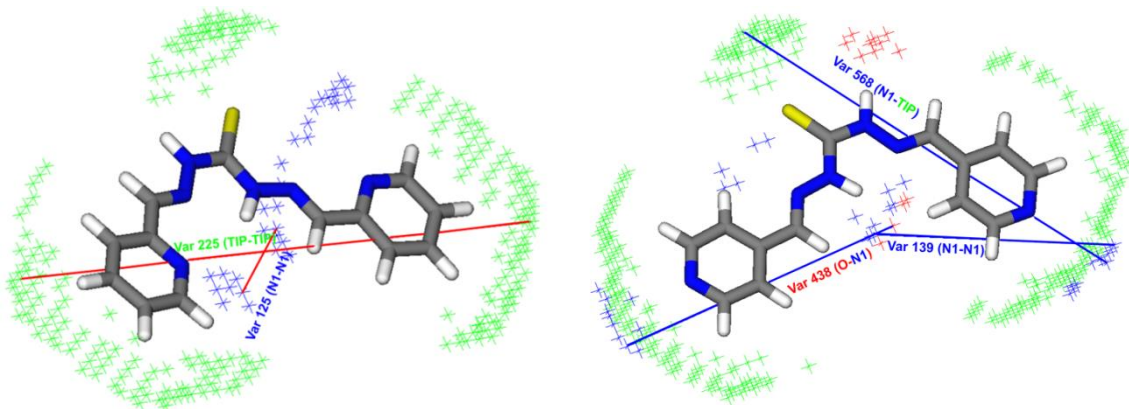
PLS plot skorova najvažnijih strukturnih karakteristika jedinjenja **h-TUK** za antibakterijsko dejstvo prema *P. aeruginosa* prikazani su na Slici 4.39.



Slika 4. 39 Grafik PLS koeficijenata (model sa 3 LV) za bakteriju *P. aeruginosa*.

Ovaj plot je prilično različit od PLS plota za model *S. aureus*. PLS koeficijenti svih korelograma koji sadrže DRY probu su manji od odgovarajućih vrednosti za *S. aureus* model. Stoga, hidrofobni delovi THC_s jedinjenja, koji povoljno interaguju sa DRY probom su mnogo važniji za aktivnost prema Gram-pozitivnoj bakteriji *S. aureus* nego za aktivnost na Gram-negativnoj bakteriji *P. aeruginosa*. Spoljašnja liposolubilna membrane Gram-negativnih bakterija čini difuziju u ćeliju pasivnom. Lipofilna jedinjenja prodiru lakše u Gram-pozitivne bakterije, što objašnjava i veći uticaj DRY probe u modelu u *S. aureus*.

Najinformativnije promenljive su označene brojevima i dalje diskutovane u tekstu. Na Slici 4.40. prikazana je strukturna karakteristika povezanosti sa najvažnijim promenljivim na bakteriji *P. aeruginosa*.



Slika 4. 40 Promenljive sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja, predstavljene na jedinjenju $dhTUK_{(2pyc)}$ kao aktivnijem (levo, crvene linije) i sa smanjenom aktivnošću $dhTUK_{(2pyc)}$ (desno, plave linije)

Kratko rastojanje između dve HBA grupe, kodirane N1-N1 probe bloka (variabla 125), su u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću. 2-piridinila i obezbeđuje optimalno rastojanje između azometinskog atoma azota i azota u piridinu koji predstavljaju dva HBA. Promenljive sa dužim rastojanjima između HBA (4-piridinil prsten na iminskom atomu ugljenika) i druge HBD ili HBA (promenljive O-N1 438 i N1-N1 139) imaju negativan uticaj na aktivnost, što sugerise da atom azota u piridinskom prstenu $mhTUK_{(2qc)}$ i $dhTUK_{(2qc)}$ treba zameniti sa -CH grupom radi povećanja aktivnosti. Sterna mesta (žarišta) oko atoma sumpora su povezana sa smanjenom aktivnosti jedinjenja (variable N1-TIP 568). Zamena tioketo sa keto grupom može povećati moć prema *P. aeruginosa*. Sa druge strane, dva sterna žarišta na velikim čvor-čvor udaljenostima su u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću prema *P. aeruginosa* (variable TIP-TIP 225). Uvođenje -CH₃ grupe u *p*- poziciji piridinskog prstena može povećati aktivnost.

QSAR model antibakterijske aktivnosti h-TUK na kvasac *C. albicans*

Napravljen je i QSAR model antifungalne aktivnosti *h-TUK* na gljivici *C. albicans*. Dve neaktivne supstance su uključene u trening set ($dhTUK_{(4pyc)}$ i $dhTUK_{(4pya)}$) uzimajući proizvoljno izabrane vrednosti WIZ od 5 mm. Dva FFD ciklusa

su izvršena za selekciju promenljivih, a statistika dobijenog PCA modela je prikazana u Tabeli 4.30. Statistički parametri PLS modela nakon primene tri CV procedure za određivanje prediktivnosti modela prikazani su u Tabeli 4.31.

Tabela 4. 30 Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon dva FFD ciklusa (od 600, u modelu je zadržano 316 promenljivih)

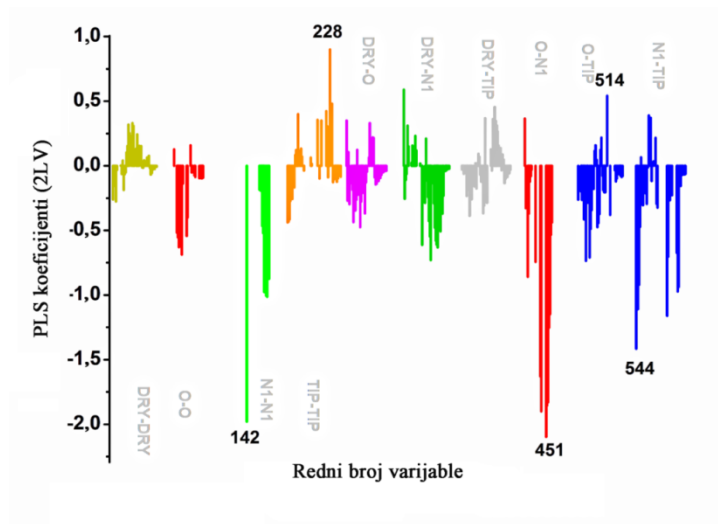
PC	SSX	SSX _{acc}	VarX	VarX _{acc}
1	44,93	44,93	41,78	41,78
2	12,94	57,87	10,98	52,76
3	9,04	66,92	7,75	60,51
4	6,87	73,78	6,06	66,57
5	4,51	78,30	3,72	70,30

Tabela 4. 31 Statistički parametri PLS modela sa tri LV nakon primene tri različite CV procedure. Podešavanja: FFD-LV = 3, 20 % veštačkih promenljivih, 20 nasumičnih ciklusa, 4 nasumične grupe, 2 ciklusa FFD.

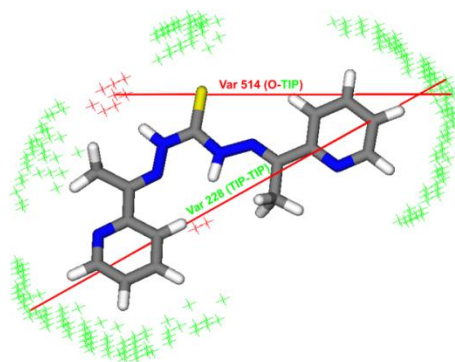
Model	SSX _{acc}	SDEC	SDEP	r^2_{acc}	q^2_{acc}
2LV (LOO)	54,51	3,09	4,51	0,81	0,59
2LV (LTO)	54,27	3,19	4,78	0,79	0,54
2LV (RG)	54,28	3,15	4,82	0,80	0,53

Plot PLS skorova antifungalnog dejstva *h*-TUK jedinjenja prikazan je na Slici 4.41. Najintezivnija i promenljive sa najviše informacija obeležene su brojem na Slici 4.41, a strukturalni fragmenti povezani sa odgovarajućim hemijskim probama prikazani su na Slikama 4.42 i 4.43.

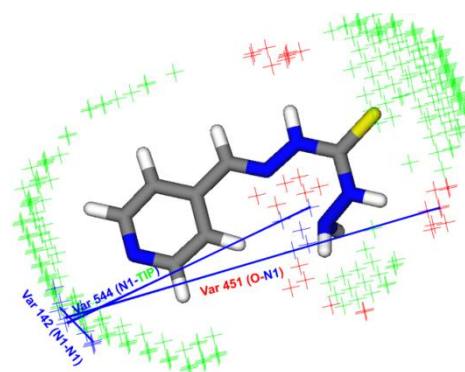
Sterna mesta u *p*- poziciji piridinskog prstena su vazna za aktivnost, što je sugerisano kroz promenljive TIP-TIP 228 i O-TIP 514. Uvođenjem -CH₃ grupe u ovu poziciju može povećati aktivnost jedinjenja prema *C. albicans*. HBA atom azota u *p*- položaju piridinskog prstena u odnosu na bočni lanala TCH-a, povezana je sa mnogim promenljivim u negativnoj korelaciji sa aktivnošću (Slike 4.42 i 4.43).



Slika 4. 41 Grafik PLS koeficijenta (model sa 2 LV) za kvasac *C. albicans*



Slika 4. 42 Promenljive sa najvećim uticajem na antifungalnu aktivnost jedinjenja, predstavljene na *dhTUK*_(2pyc) kao najaktivnijem (crvene linije)



Slika 4. 43 Promenljive sa najvećim uticajem na antifungalnu aktivnost jedinjenja, predstavljene na *mhTUK*_(4pyc) sa smanjenom aktivnošću (plave linije)

5. ZAKLJUČAK

U cilju proučavanja strukturnih i solvatohromnih svojstava, kao i uticaja strukture na biološku aktivnost sintetisano je četrdeset šest mono- i di- hidrazona dihidrazida (tio)ugljene kiseline. Na osnovu FT-IR i NMR spektralnih podataka zaključeno je da sva jedinjenja postoje u (tion)keto obliku u čvrstom stanju kao i u DMSO rastvoru. Detaljnijim ispitivanjem jedinjenja iz serije *mh*-UK zaključeno je da svi zauzimaju *E* konformaciju molekula u DMSO-u, osim jedinjenja ***mhUK*_(2pyb)** kod koga je prisutno fenilno jezgro na azometinskom ugljeniku i koji se u rastvoru pojavljuje kao *Z*-konformer.

Rezultati RSA analize ispitivanih jedinjenja koja u svojoj strukturi imaju 4-piridinil supstituent na azometinskom ugljeniku (***mhUK*_(4pyc)** i ***mhUK*_(4pya)**), u okviru serije *mh*-UK, pokazali su da ova jedinjenja kristališu u *E* obliku. Odsustvo metil supstituenta na azometinskom ugljeniku u jedinjenju ***mhUK*_(4pyc)** u odnosu na jedinjenje ***mhUK*_(4pya)** ne utiče značajno na strukturne parametre.

Optimizacijom geometrije u vakumu i DMSO-u za *mh*-UK, dobijeno je da najstabilnija geometrija odgovara *E* obliku za većinu jedinjenja sa izuzetkom, ***mhUK*_(2pyc)**, ***mhUK*_(af)** i ***mhUK*_(2pya)** koji zauzimaju *Z* konformacije. Geometrija jedinjenaj ***mhUK*_(2pyc)** i ***mhUK*_(2pya)** kod kojih je prisutan 2-piridinil prsten na azometinskom atomu ugljenika po proračunima ukazuje na veću stabilnost *Z*-oblika. Ovi rezultati ukazuju da većoj stabilnosti *Z* oblika doprinosi intramolekulska vodonična veza i sterna uticaj metil grupe kod jedinjenja ***mhUK*_(af)** i ***mhUK*_(2pya)**. Upoređivanjem izračunatih NMR hemijskih pomeranja dobijenih iz optimizovanih geometrija *h*-TUK na bazi hinolina zaključeno je da su oni u skladu sa eksperimentalno dobijenim podacima. Nakon analize torzionih uglova u pogledu imino veze i rotacije oko jednostrukih veza, kao i odgovarajućih dužina veza zaključeno je da su dužine veza u molekulima u skladu sa kristalografskim podacima, odnosno da male promene torzionih uglova ukazuju na planarnost strukture.

Analizom UV-Vis apsorpcionih spektara *mh*-UK došlo se do zaključka da apsorpcioni maksimumi zavise i od supstituenta i efekta rastvarača. Uvođenje supstituenta sa većom elektron-donorskom sposobnošću izaziva veći batohromni pomeraj što je direktna posledica izraženijih ICT interakcija. Hipsohromna pomeranja

UV maksimuma *mh*-UK sa metil supstituentom na azometinskom ugljeniku (*mhUK*_(af), *mhUK*_(2pya) - *mhUK*_(4pya)) ukazuju na značaj elektron-donorske sposobnosti i sternih smetnji na promenu energija pobuđenog stanja kod ovih jedinjenja. Prisustvo metil grupe uzrokuje odgovarajuća prilagođavanja konformacije, koja uzrokuju mala odstupanje molekula od planarnosti i na taj način sprečavaju veći stepen stabilizacije orbitala u toku elektronskih prelaza.

Korelacija UV-Vis apsorpcionih frekvenci *Kamlet-Taft*-ovom i *Catalán*-ovom skalom polarnosti ogleđaju se u velikim varijacijama doprinosa nespecifičnih i specifičnih efekata rastvarača na UV-Vis spektralne promene, s' tim što je *Catalán*-ov model u svim slučajevima pokazao procentualno veći udeo polarizabilnosti, dok su uticaj dipolarnosti, kiselost i baznosti rastvarača bile niže važnosti. Pomeranje UV maksimuma apsorpcije u batohromnom smeru sa porastom dipolarnosti/polarizabilnosti i HBA rastvarača ukazuje na to da je pobuđeno stanje više stabilizovano u odnosu na osnovno stanje. Specifične interakcije kroz HBD efekat uglavnom se pripisuju N-H vodoniku ili karbonilnom kiseoniku, dok je uticaj susptituenata blago izražen.

LFER analiza podataka dobijenih iz UV-Vis, ¹H i ¹³C NMR spektara *mh*-UK dala je odlične rezultate ukazujući da uticaj supstituenata na spektralna pomeranja potiče od elektronskih efekata. Prenos rezonantnog efekta preko proširenog π -konjugovanog sistema u jedinjenjima sa supstituentima koji se ponašaju kao elektron-akceptori podržava pomeranje elektronske gustine ka azometinskoj grupi. Ukupan rezultat navedenih procesa se ogleđa u povećanju elektronske gustine na karbonilnom atomu ugljenika. Supstituenti sa suprotnim efektom imaju visok stepen lokalizovane π -polarizacije na karbonilnom atomu ugljenika usled π -polarizacije.

Proračunom energetskih HOMO-LUMO razlika (E_{gap}) doprinelo je razumevanju mehanizama ekcitanije elektrona. Najveća vrednost je dobijena za *mhUK*_(2pyc) 8,606 V. Najmanje vrednosti E_{gap} su dobijene u slučaju jedinjenja koja u svojoj strukturi sadrže hinolinski prsten (7,610-7,961 eV) što je u skladu sa njihovim najvećim batohromnim pomerajem. Elektronska gustina HOMO i LUMO orbitala za sva jedinjenja pokazala je nizak stepen ICT koji je uglavnom prouzrokovan uticajem elektron-donorskih osobina piridinil i hinolil prstenova. Najznačajniji ICT javlja kod *mhUK*_(4pyc) i *mhUK*_(4pya) u *E* obliku, tj kod 4-piridinil supstituisanih jedinjenja, pokazujući prenos od 0,743 e⁻ preko 2,378 Å i 0,732 e⁻ preko 2,208 Å, respektivno. S druge strane kod supstance koja sadrži

2-hinolil supstituent na iminskom atomu ugljenika ($mhUK_{(2qc)}$) prisutan je intramolekulski prenos naelektrisanja od $0,374 e^-$ preko $0,401 \text{ \AA}$ što je očigledna pojava lokalnog procesa koji se javlja u π -elektronskom sistemu supstituenta.

Ispitivanjem pK_a vrednosti mh -UK i njihovih jonizacionih ravnoteža utvrđeno je da je elektron-acceptorski efekat piridinskog atoma azota veoma važan za prvi proces jonizacije, što potvrđuje prenos elektronskog efekta kroz ceo molekul. Prisustvo metil grupe na azometinskom ugljeniku povećava vrednost pK_a što se može objasniti elektron-donorskim efektom metil grupe, kao i blagim narušavanjem planarne geometrije koja smanjuje mogućnost za stabilizaciju sistema putem konjugacije. Primenom LFER proračuna na dobijene vrednosti primećena je proporcionalnost između pK_a u odnosu na σ_{pH}^+ što što ukazuje da povećanje elektronski-akceptorske snage supstituenta na azometinskom ugljeniku uzrokuje nižu kiselost obe protovane grupe.

Ispitivanjem mogućnosti izomerizacije mh -UK zaključeno je da ovaj proces zavisi najviše od rastvarača i položaja "aza" atoma azota u heteroaromatičnom jezgru, dok manji uticaj ima i prisustvo metil grupe na azometinskom atomu ugljenika. Izvestan uticaj na proces izomerizacije potiče i od mogućnosti građenja inter- i intramolekulskih veza. U cilju procene uticaja intramolekulske vodonične veze na stabilizaciju Z oblika za $mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$ i E oblika kod $mhUK_{(sal)}$ nakon reoptimizacije geometrija ovih izomera u DCM i MeOH dokazano je da intramolekularna vodonična veza doprinosi stabilizaciji Z izomera u slučaju $mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$. Niske energetske razlike između izomera ukazuju da intramolekulska vodonična veza formirana u Z obliku doprinosi stabilizaciji takve strukture. Rastojanja između atoma azota i vodonika uključenih u stvaranju vodonične veze kod Z izomera $mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$ u DCM su $1,908 \text{ \AA}$ i $1,849 \text{ \AA}$, respektivno, dok u MeOH iznose $1,906$ i $1,846 \text{ \AA}$. Kraće dužine vodoničnih veza dobijene su za E oblik jedinjenja $mhUK_{(sal)}$, $1,772 \text{ \AA}$ (DCM) i $1,764 \text{ \AA}$ (MeOH). Veće vrednosti elektronskih gustina E izomera jedinjenja $mhUK_{(sal)}$ dodatno potvrđuju prisustvo jačeg vodoničnog vezivanja u ovom jedinjenju, nego u Z izomerima jedinjenja $mhUK_{(2pyc)}$ i $mhUK_{(2pya)}$, što je u skladu sa podacima dobijenim fotoizomerizacijom kod kojih je pokazano da je za reversnu izomerizaciju $mhUK_{(sal)}$ u MeOH potrebno svega nekoliko minuta nakon

stajanja rastvora ovog jedinjenja u mraku. Pokazano je da rezultati fotoizomrizacije u sva tri navedena slučajua prate kinetiku prvog reda.

Rezultati studije antikancerske aktivnosti hinolinskih derivata pokazali su superiornu pro-apoptotsku aktivnost *h*-TUK u odnosu na *h*-UK na modelu humane leukemije THP-1. Posebno zanimljiva osobina grupe *h*-TUK jedinjenja jeste sposobnost da, u zavisnosti od primenjene koncentracije, tretirane ćelije zaustavljaju u različitim fazama ćelijske deobe, što nedvosmisleno ukazuje da *h*-TUK jedinjenja ciljaju najmanje dva različita biohemijska procesa u tretiranim ćelijama. Apoptoza indukovana *h*-TUK nije isključivo zavisna od aktivacije kaspaza, pri čemu je aktiviranje kaspaze-8 dokazano kao dominantan događaj. Ovakav nalaz govori da *h*-TUK iniciraju ćelijsku smrt aktivacijom spoljašnjeg apoptoznog puta. Među svim testiranim jedinjenjima, samo su dva *dh*-TUK izazvala apoptozu na 2D CSC modelu AsPC-1 ćelija, dok su tretmani njihovim strukturnim analogima *dh*-UK dovela do nekrotične smrti. Ispitivanje na 3D CSC modelu je pokazalo da je jedinjenje ***dh*TUK_(8OH2qc)**, inače i jedino koje je dovelo do značajnog procenta apoptoze u 2D CSC uzorcima, postiglo kontinuiranu inhibiciju rasta tretiranih tumora i statistički značajno smanjenje njihovog volumena u odnosu na isti sa početka eksperimenta. Dodatno, ovo jedinjenje je značajno smanjilo procenat CD44 pozitivnih CSC ćelija tokom trodnevne inkubacije, i time ispoljilo sposobnost da pored apoptozne smrti može da izazove i diferencijaciju CSC. Stoga, akuelni rezultati snažno podstiču dodatna ispitivanja *mh*- i *dh*-TUK, pri čemu je otkrivanje mehanizma odgovornog za aktivaciju kaspaze-8 jedan od primarnih ciljeva.

Negativna entalpija i negativna entropija pri ispitivanju termodinamičkih parametara vezivanja ***dh*TUK_(8qc)** jedinjenja za HSA ukazuju da su *Van der Waals*-ove sile ili fomiranje vodoničnih veza dominantni u HSA-***dh*TUK_(8qc)** interakciji, odnosno proces je entalpijski pokrenut, a vodonične veze između HSA i ***dh*TUK_(8qc)** su najvažnije intermolekulske sile. Na osnovu molekuskog dokinga došlo se do zaključka da je vezivanje ***dh*TUK_(8qc)** u podomen IIA HSA potvrdilo dominantni doprinos vodonične veze u sveukupnoj energiji vezivanja.

Rezultati antioksidativne aktivnosti *h*-(T)UK ukazuju na drugačije mehanizme delovanja *h*-UK u odnosu na *h*-TUK. Na aktivnost *h*-UK utiče zbirni kumulativni efekat supstituenata na azometinskom ugljeniku kao i uticaj slobodne NH-NH₂ grupe. U slučaju *mh*- and *dh* -UK pokazalo su da su mono derivati do 80 puta aktivniji u odnosu

na *dh*-UK. Kod *h*-TUK ovakva doslednost u aktivnosti nije primećena, već su IC₅₀ vrednosti *dh*-TUK veće ili u bliskom rangu sa *mh*-TUK. U obe grupe jedinjenja, hidrazoni koji u svom sastavu imaju hidroksilnu grupu u *o*- položaju heteroaromatičnog jezgra u odnosu na bočni lanac, pokazuju bolju antioksidativnu aktivnost u poređenju sa ostalim jedinjenjima. Najaktivnija jedinjenja među *mh*- i *dh*- UK predstavljaju *mhUK*_(2pyb) i *dhUK*_(2pyb) koja na azometinskom ugljeniku sadrže 2-piridinil prsten i fenil grupu čime je potvrđeno da proširena π - elektron delokalizaciji igra ključnu ulogu u rezonantnoj stabilnosti kreiranog radikala. Uticaj rezonancione stabilizacije nastalog radikala kod *h*-TUK prevashodno je određen prisustvom atoma sumpora. *h*-TUK koji u svom sastavu sadrže 8-hinolil i 2-hinolil supstituente na imino ugljeniku pokazuju vrlo sličnu vrednost aktivnosti kao Vitamin C.

Upoređivanjem rezultata antimikrobne aktivnosti zaključeno je da su *h*-TUK značajno aktivniji u odnosu na *h*-UK. 3D-QSAR zasnovan na GRIND metodologiji pokazao se kao veoma koristan u pronalaženju farmakoloških tačaka neophodnim za antibakterijsko dejstvo *h*-TUK. Na osnovu dobijenih modela na Gram-pozitivnim i Gram negativnim bakterijama i gljivici ukazano je na strukturne fragmente odgovorne za njihovu antimikrobno dejstvo. QSAR model baziran na rezultatima antimikrobne aktivnosti na bakteriji *S. aureus* prepoznaje značaj HBA grupe u položaju između iminskog azota i azota piridinskog prstena. Takođe, hidrofobni ostaci na malim čvor-čvor rastojanjima pozitivno doprinose ukupnoj aktivnosti. Dobijeni rezultati ukazuju da bi zamena -CH₃ sa -CF₃ grupom povećala hidrofobnost, kao i HBA sposobnost molekula u povoljnom regionu opisanom sa varijablama 11, 137, 332 i 585. S druge strane, nepovoljne interakcije O probe sa hidroksilnom grupom kao HBD-om predlažu zamena -OH sa -OCH₃ grupom u cilju povećanja aktivnosti. Zamena tionske sa keto grupom može povećati aktivnost na *P. aeruginosi*. S druge strane, dva sterna žarišta na velikim čvor-čvor udaljenostima su u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću prema *P. aeruginosa* (variable TIP-TIP 225). Uvođenje -CH₃ grupe u *p*- poziciji piridinskog prstena može povećati aktivnost, kao i zamena azota u 4-piridinil supstituentu sa -CH fragmentom. Na osnovu QSAR modela antifungalne aktivnosti *h*-TUK na *C. Albicans* dobijeni rezultati ukazuju da bi uvođenje -CH₃ grupe u *p*- poziciji piridinskog prstena mogla povećati aktivnost jedinjenja prema *C. albicans*.

6. LITERATURA

1. S. Rollas, Ş. G. Küçükgülzel, *Molecules* **12** (2007) 1910–1939.
2. A. Kajal, S. Bala, N. Sharma, S. Kamboj, V. Saini, *Int. J. Med. Chem.* **2014** (2014) 761030.
3. G. Verma, A. Marella, M. Shaquiquzzaman, M. Akhtar, M. R. Ali, M. M. Alam, *J. Pharm. Bioallied Sci.* **6** (2014) 69–80.
4. K. Padmini, P. J. Preethi, M. Divya, P. Rohini, M. Lohita, K. Swetha, P. Kaladar, *Int. J. Pharma Res. Rev.* **2** (2013) 43–58.
5. M. Asif, A. Husain, *J. Appl. Chem.* **2013** (2013) 1–7.
6. V. J. Negi, *Int. J. Pharm. Chem.* **2** (2013) 12–13.
7. X.-H. Liu, L. Pan, C.-X. Tan, J.-Q. Weng, B.-L. Wang, Z.-M. Li, *Pestic. Biochem. Physiol.* **101** (2011) 143–147.
8. X.-H. Liu, C.-X. Tan, J.-Q. Weng, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **186** (2011) 552–557.
9. X.-H. Liu, J.-Q. Weng, C.-X. Tan, *J. Chem.* **2013** (2013) 1–5.
10. N.-N. Su, Y. Li, S.-J. Yu, X. Zhang, X.-H. Liu, W.-G. Zhao, *Res. Chem. Intermed.* **39** (2013) 759–766.
11. X.-H. Liu, L. Pan, Y. Ma, J.-Q. Weng, C.-X. Tan, Y.-H. Li, Y.-X. Shi, B.-J. Li, Z.-M. Li, Y.-G. Zhang, *Chem. Biol. Drug Des.* **78** (2011) 689–694.
12. A. A. Altaf, A. Shahzad, Z. Gul, N. Rasool, A. Badshah, B. Lal, E. Khan, *J. Drug Des. Med. Chem.* **1** (2015) 1–11.
13. P. Martins, J. Jesus, S. Santos, L. Raposo, C. Roma-Rodrigues, P. Baptista, A. Fernandes, *Molecules* **20** (2015) 16852–16891.
14. P. Kovaříková, K. Vávrová, K. Tomalová, M. Schöngut, K. Hrušková, P. Hašková, J. Klimeš, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48** (2008) 295–302.
15. L. Lin, W. Fan, S. Chen, J. Ma, W. Hu, Y. Lin, H. Zhang, R. Huang, *New J. Chem.* **36** (2012) 2562.
16. V. R. Solomon, H. Lee, *Curr. Med. Chem.* **18** (2011) 1488–1508.
17. S. Adsule, V. Barve, D. Chen, F. Ahmed, Q. P. Dou, S. Padhye, F. H. Sarkar, *J. Med. Chem.* **49** (2006) 7242–7246.
18. Q. Ba, M. Hao, H. Huang, J. Hou, S. Ge, Z. Zhang, J. Yin, R. Chu, H. Jiang, F. Wang, K. Chen, H. Liu, H. Wang, *Clin. Cancer Res.* **17** (2011) 7625–7633.
19. M. Serda, D. S. Kalinowski, A. Mrozek-Wilczkiewicz, R. Musiol, A. Szurko, A. Ratuszna, N. Pantarat, Z. Kovacevic, A. M. Merlot, D. R. Richardson, J. Polanski, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **22** (2012) 5527–5531.
20. H. Huang, Q. Chen, X. Ku, L. Meng, L. Lin, X. Wang, C. Zhu, Y. Wang, Z. Chen, M. Li, H. Jiang, K. Chen, J. Ding, H. Liu, *J. Med. Chem.* **53** (2010) 3048–3064.

21. F. Bisceglie, A. Musiari, S. Pinelli, R. Alinovi, I. Menozzi, E. Polverini, P. Tarasconi, M. Tavone, G. Pelosi, *J. Inorg. Biochem.* **152** (2015) 10–19.
22. F. A. French, E. J. Blanz, S. C. Shaddix, R. W. Brockman, *J. of Medicinal Chem.* **17** (1974) 172–181.
23. B. Beck, C. Blanpain, *Nat. Rev. Cancer* **13** (2013) 727–738.
24. K. Brodowska, E. Łodyga-Chruścińska, *Chemik* **68** (2014) 129–134.
25. C. M. Brewster, *J. Am. Chem. Soc.* **46** (1924) 2463–2468.
26. N. Munir, C., Yousaf, S.M. and Ahmad, *J. Chem. Soc. Pakistan* **7** (1985) 301.
27. K. N. Campbell, A. H. Sommers, B. K. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.* **66** (1944) 82–84.
28. J. Hine, C. Y. Yeh, *J. Am. Chem. Soc.* **89** (1967) 2669–2676.
29. S. H. Pine, *Organska kemija*, III, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
30. N. E. S. K. Peter C. Volhardt, *Organska hemija*, Hajdigraf, Beograd, 1996.
31. N. P. Belskaya, W. Dehaen, V. A. Bakulev, *Arkivoc* **2010** (2010) 275–332.
32. N. Karaböcek, *Transit. Met. Chem.* **31** (2006) 118–122.
33. J. A. Gordon, W. P. Jencks, *Biochemistry* **2** (1963) 47–57.
34. M. W. F. Kurzer, *Chem. Rev.* **70** (1970) 111–149.
35. M. Alam, G. Verma, M. Shaquiquzzaman, A. Marella, M. Akhtar, M. Ali, *J. Pharm. Bioallied Sci.* **6** (2014) 69.
36. M. S. Chande, M. A. Pankhi, S. B. Ambhaikar, *Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem.* **39** (2000) 603–609.
37. Z. Shi, Z. Zhao, M. Liu, X. Wang, *Comptes Rendus Chim.* **16** (2013) 977–984.
38. T. Jednačak, P. Novak, A. Hodzic, O. Scheibelhofer, J. G. Khinast, J. Plavec, P. Šket, J. P. Vuković, *Acta Chim. Slov.* **61** (2014) 161–169.
39. T. Okawara, K. Imai, T. Ochiai, Free radical scavenger containing semicarbazide derivatives, WO 2006-JP303703, 2006.
40. A. Karmakar, B. Manna, A. V. Desai, B. Joarder, S. K. Ghosh, *Inorg. Chem.* **53** (2014) 12225–12227.
41. M. S. T. Makki, R. M. Abdel-Rahman, M. S. El-Shahawi, *Int. J. Chem.* **3** (2011) 181–192.
42. A. Bacchi, A. Bonini, M. Carcelli, F. Ferraro, E. Leporati, C. Pelizzi, G. Pelizzi, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* (1996) 2699.
43. D. Maity, A. K. Manna, D. Karthigeyan, T. K. Kundu, S. K. Pati, T. Govindaraju, *Chem. - A Eur. J.* **17** (2011) 11152–11161.
44. Z. Li, W. Zhu, J. Yu, X. Ma, Z. Lu, S. Xiao, *Synth. Commun.* **36** (2006) 2613–2619.
45. M. Rubčić, N. Galić, I. Halasz, T. Jednačak, N. Judaš, J. Plavec, P. Šket, P. Novak, *Cryst. Growth Des.* **14** (2014) 2900–2912.

46. J. Wen, C.-T. Yang, T. Jiang, S. Hu, T.-Z. Yang, X.-L. Wang, *Org. Lett.* **16** (2014) 2398–2401.
47. K. H. M. Ebrahim Tehrani, F. Kobarfard, P. Azerang, M. Mehravar, Z. Soleimani, G. Ghavami, S. Sardari, *Iran. J. Pharm. Res.* **12** (2013) 331–346.
48. E. Manoj, M. R. P. Kurup, E. Suresh, *J. Chem. Crystallogr.* **38** (2008) 157–161.
49. K. Gangarapu, S. Manda, A. Jallapally, S. Thota, S. S. Karki, J. Balzarini, E. De Clercq, H. Tokuda, *Med. Chem. Res.* **23** (2014) 1046–1056.
50. D. Rosales, *Talanta* **32** (1985) 467–474.
51. M. L. Mihailović, *Osnovi teorijske organske hemije i stereo hemije*, Beograd, 1972.
52. P. Novak, T. Jednačak, J. Parlov Vuković, K. Zangger, M. Rubčić, N. Galić, T. Hrenar, *Croat. Chem. Acta* **85** (2012) 451–456.
53. O. A. El-Gammal, G. M. Abu El-Reash, S. E. Ghazy, A. H. Radwan, *J. Mol. Struct.* **1020** (2012) 6–15.
54. K. N. Zelenin, V. V. Alekseev, O. B. Kuznetsova, A. G. Seminskaya, S. L. Yakimovich, I. V. Zerova, *Russ. J. Org. Chem. C/C ZHURNAL Org. KHIMII*; **35** (1999) 357–363.
55. V. V. A. K.N.Zelenin, *Tetrahedron Lett.* **31** (1990) 3927–3934.
56. G. M. Abu El-Reash, O. A. El-Gammal, A. H. Radwan, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **121** (2014) 259–267.
57. D. Dragancea, S. Shova, É. A. Enyedy, M. Breza, P. Rapta, L. M. Carrella, E. Rentschler, A. Dobrov, V. B. Arion, *Polyhedron* **80** (2014) 180–192.
58. A. D. D. Tiwari, A. K. K. Mishra, S. B. B. Mishra, B. B. B. Mamba, B. Maji, S. Bhattacharya, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **79** (2011) 1050–1056.
59. A. Bacchi, M. Carcelli, P. Pelagatti, C. Pelizzi, G. Pelizzi, F. Zani, *J. Inorg. Biochem.* **75** (1999) 123–33.
60. G. M. Abu El-Reash, O. A. El-Gammal, S. E. Ghazy, A. H. Radwan, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **104** (2013) 26–34.
61. R. A. Jones, *Physical and Mechanistic Organic Chemistry*, 2 nd, Cambridge University Press, London, 1984.
62. E. C. Anslyn, D. A. Dougherty, *Modern Physical Organic Chemistry*, University Science Book, Sausalito, California, 2005.
63. L. P. Hammett, *J. Am. Chem. Soc.* **59** (1937) 96–103.
64. H. H. Jaffe, *Chem. Rev.* **53** (1953) 191–261.
65. T. M. Krygowski, B. T. Stępień, *Chem. Rev.* **105** (2005) 3482–3512.
66. H. C. Brown, Y. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 4979–4987.
67. E. S. Lewis, M. D. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1959) 2070–2072.
68. D. J. Cram, *Fundamentals of Carbanion Chemistry*, Academic Press Inc., New

- York, 1965.
69. H. C. Brown, Y. Okamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 4979–4987.
 70. K. Nakata, M. Fujio, K. Nishimoto, Y. Tsuno, *J. Phys. Org. Chem.* **16** (2003) 323–335.
 71. Y. Tsuno, Y. Kusuyama, M. Sawada, T. Fujii, Y. Yukawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **48** (1975) 3337–3346.
 72. Y. Yukawa, Y. Tsuno, M. Sawada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **39** (1966) 2274–2286.
 73. M. Yoshioka, K. Hamamoto, T. Kubota, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **35** (1962) 1723–1728.
 74. R. W. Taft, I. C. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 2436–2443.
 75. I. C. Taft, R. W. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958) 2436.
 76. R. W. Taft, I. C. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **81** (1959) 5343–5352.
 77. C. G. Swain, E. C. Lupton, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 4328–4337.
 78. F. G. Bordwell, F. J. Cornforth, *J. Org. Chem.* **43** (1978) 1763–1768.
 79. H. Neuvonen, K. Neuvonen, A. Koch, E. Kleinpeter, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **815** (2007) 95–104.
 80. H. Neuvonen, K. Neuvonen, F. Fülöp, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 3141–8.
 81. H. Neuvonen, F. Fülöp, K. Neuvonen, A. Koch, E. Kleinpeter, *J. Phys. Org. Chem.* **21** (2008) 173–184.
 82. C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, 3th ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
 83. E. S. Amis, J. F. Hinton, *Solvent Effects on Chemical Phenomena, vol I*, Academic Press, New York, 1973.
 84. E. M. Kosower, *An Introduction to Physical Organic Chemistry*, Wiley, New York, 1968.
 85. J. Kakabadse, *Solvent Problems in Industry*, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1984.
 86. Y. Marcus, *Ion Solvation*, Wiley, Chichester, 1985.
 87. M. H. Abraham, *Pure Appl. Chem.* **57** (1985) 1055–1064.
 88. M. H. . G. Abraham, R. W. P. L.; Abboud, J.-L. M.; Doherty, R. M.; Taft, *Can. J. Chem.* **66** (1988) 2673–2686.
 89. K. A. Connors, *Chemical Kinetics-The Study of Reaction Rates in Solution*, VCH Publishers, Weinheim, 1990.
 90. M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 2877–2887.
 91. M. J. Kamlet, J. L. Abboud, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **99** (1977) 6027–6038.
 92. R. W. Taft, M. J. Kamlet, *J. Am. Chem. Soc.* **98** (1976) 2886–2894.

93. F. Riedel, S. Spange, *J. Phys. Org. Chem.* **25** (2012) 1261–1268.
94. J. Catalán, *J. Phys. Chem.* **113** (2009) 5951–5960.
95. J. Catalán, H. Hopf, *European J. Org. Chem.* (2004) 4694–4702.
96. E. G. Lewars, *Computational Chemistry-Introduction to the Theory and Applications of Molecular and Quantum Mechanics*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2010.
97. F. Jensen, *Introduction to computational chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, 2007.
98. J. H. Jensen, *Molecular Modeling Basics*, CRC Press LLC, 2010.
99. R. F. Bader, *Atoms in molecules*, Wiley Online Library, 1990.
100. P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* **136** (1964) B864–B871.
101. W. Kohn, L. J. Sham, *Phys. Rev.* **140** (1965) A1133–A1138.
102. J. P. Perdew, J. A. Chevary, S. H. Vosko, K. A. Jackson, M. R. Pederson, D. J. Singh, C. Fiolhais, *Phys. Rev. B* **46** (1992) 6671–6687.
103. J. P. Perdew, K. Burke, M. Ernzerhof, *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 3865–3868.
104. A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **38** (1988) 3098–3100.
105. P. Hao, J. Sun, B. Xiao, A. Ruzsinszky, G. I. Csonka, J. Tao, S. Glindmeyer, J. P. Perdew, *J. Chem. Theory Comput.* **9** (2013) 355–363.
106. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 1372–1377.
107. O. Gunnarsson, B. I. Lundqvist, *Phys. Rev. B* **13** (1976) 4274–4298.
108. R. Harris, B. G. Multimani, *J. Phys. F Met. Phys.* **4** (1974) 703–710.
109. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
110. V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, J. Tao, J. P. Perdew, *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 12129–12137.
111. C. Adamo, V. Barone, *J. Chem. Phys.* **110** (1999) 6158–6170.
112. Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **120** (2008) 215–241.
113. A. D. Becke, *J. Chem. Phys.* **98** (1993) 5648–5652.
114. X. Wu, A. K. Ray, *Phys. Rev. B* **65** (2002) 85403.
115. M. E. Casida, C. Jamorski, K. C. Casida, D. R. Salahub, *J. Chem. Phys.* **108** (1998) 4439–4449.
116. L. Wang, X. Yu, J. Zhao, Y. Zhang, H. He, J. Zhang, *Synth. Met.* **175** (2013) 174–182.
117. A. C. Brown, T. R. Fraser, *J. Anat. Physiol.* **2** (1868) 224–42.
118. C. Hansch, T. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 1616–1626.
119. A. G. Dossetter, E. J. Griffen, A. G. Leach, *Drug Discov. Today* **18** (2013) 724–731.

120. M. Clark, R. D. Cramer, *Quant. Struct. Relationships* **12** (1993) 137–145.
121. M. Pastor, G. Cruciani, I. McLay, S. Pickett, S. Clementi, *J. Med. Chem.* **43** (2000) 3233–3243.
122. G. Cruciani, ed., *Molecular Interaction Fields-Applications in Drug Discovery and ADME Prediction*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, FRG, 2005.
123. M. Böhm, J. Stürzebecher, G. Klebe, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 458–477.
124. V. M. Khedkar, P. K. Ambre, J. Verma, M. S. Shaikh, R. R. S. Pissurlenkar, E. C. Coutinho, *J. Mol. Model.* **16** (2010) 1251–1268.
125. Y. C. M. H. Kubinyi, G. Folkers, *3D QSAR in Drug Design*, Vol. 2-3, Kluwer/ESCOM, Dordrecht, 1998.
126. G. Cruciani, M. Pastor, W. Guba, *Eur. J. Pharm. Sci.* **11 Suppl 2** (2000) S29-39.
127. H. Abdi, L. J. Williams, *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2** (2010) 433–459.
128. G. Cruciani, P. Crivori, P.-A. Carrupt, B. Testa, *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **503** (2000) 17–30.
129. F. Fontaine, M. Pastor, F. Sanz, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 2805–2815.
130. A. Durán, G. C. Martínez, M. Pastor, *J. Chem. Inf. Model.* **48** (2008) 1813–1823.
131. S. D. Riganelli, R. Valigi, G. Constantino, M. Baroni, *Pharm Pharmacol Lett.* **3** (1993) 5–8.
132. L. L. Botros, J. Jablonski, C. Chang, M. M. Bergana, P. Wehling, J. M. Harnly, G. Downey, P. Harrington, A. R. Potts, J. C. Moore, *J. Agric. Food Chem.* **61** (2013) 9810–9818.
133. R. do C. Maia, R. Tesch, C. A. M. Fraga, *Expert Opin. Ther. Pat.* **24** (2014) 1161–1170.
134. E. H. Kerns, L. Di, *Drug Discov. Today Technol.* **1** (2004) 343–348.
135. A. Avdeef, J. E. A. Comer, S. J. Thomson, *Anal. Chem.* **65** (1993) 42–49.
136. P. Gans, B. O’Sullivan, *Talanta* **51** (2000) 33–37.
137. E. Bosch, S. Espinosa, R. Martí, *J. Chromatogr. A* **824** (1998) 137–146.
138. A. Avdeef, J. J. Bucher, *Anal. Chem.* **50** (1978) 2137–2142.
139. Bjerrum J., *Metal ammine formation in aqueous solution*, in P. Hasse & Son, Copenhagen, Denmark., 1941, pp. 296–325.
140. P. GANS, A. SABATINI, A. VACCA, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.
141. A. Serjeant, E. P.; Albert, *The Determination of Ionization Constants: A Laboratory Manual*, 2 nd ed., Chapman and Hall, London, 1971.
142. R. C. Finch, D. Greenwood, S. R. Norrby, R. J. Whitley, J. R. Lentino, *Clin. Infect. Dis.* **38** (2004) 1197–1197.
143. A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, M. Turck, *Am. J. Clin. Pathol.* **45** (1966) 493–6.

144. I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, *Nat. Protoc.* **3** (2008) 163–175.
145. A. J. H. A. L. F. JOYCE, J. DOWNES, K. STOCKMAN, *J. Clin. Microbiol.* **30** (1992) 2709–2713.
146. M. Ligozzi, C. Bernini, M. G. Bonora, M. De Fatima, J. Zuliani, R. Fontana, *J. Clin. Microbiol.* **40** (2002) 1681–6.
147. M. Sheikhy, A. R. Jalilian, A. Novinrooz, F. Motamedi-Sedeh, *J. Biomed. Sci. Eng.* **5** (2012) 39–42.
148. K. Raju, A. Elumalai, E. Sridhar, *Int. J. Phytopharm. Res.* **4** (2013) 71–74.
149. T. Nasr, S. Bondock, S. Eid, *Eur. J. Med. Chem.* **84** (2014) 491–504.
150. E. Pelttari, E. Karhumäki, J. Langshaw, H. Elo, *Z. Naturforsch. C.* **62** (n.d.) 483–6.
151. M. A. Al-Omair, A. R. Sayed, M. M. Youssef, *Molecules* **20** (2015) 2591–2610.
152. T. R. Frieden, T. R. Sterling, S. S. Munsiff, C. J. Watt, C. Dye, *Lancet* **362** (2003) 887–899.
153. K. H. M. Ebrahim Tehrani, V. Mashayekhi, P. Azerang, S. Minaei, S. Sardari, F. Kobarfard, *Iran. J. Pharm. Res.* **14** (2015) 59–68.
154. C. E. Barry, R. A. Slayden, A. E. Sampson, R. E. Lee, *Biochem. Pharmacol.* **59** (2000) 221–231.
155. H. Sies, *Exp. Physiol.* **82** (1997) 291–295.
156. M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, *Mol. Cell. Biochem.* **266** (2004) 37–56.
157. R. P. Patel, J. McAndrew, H. Sellak, C. R. White, H. Jo, B. A. Freeman, V. M. Darley-Usmar, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1411** (1999) 385–400.
158. M. Carocho, I. C. F. R. Ferreira, *Food Chem. Toxicol.* **51** (2013) 15–25.
159. B. Halliwell, *Lancet (London, England)* **344** (1994) 721–4.
160. H. Sies, *Exp. Physiol.* **82** (1997) 291–5.
161. N. Hermans, P. Cos, L. Maes, T. De Bruyne, D. Vanden Berghe, A. J. Vlietinck, L. Pieters, *Curr. Med. Chem.* **14** (2007) 417–430.
162. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39** (2007) 44–84.
163. E. Bendary, R. R. Francis, H. M. G. Ali, M. I. Sarwat, S. El Hady, *Ann. Agric. Sci.* **58** (2013) 173–181.
164. A. Shojaii, M. Abdollahi Fard, *ISRN Pharm.* **2012** (2012) 1–8.
165. P. Praveen Kumar, B. L. Rani, *Int. J. ChemTech Res.* **3** (2011) 155–160.
166. M. Singhal, A. Paul, H. P. Singh, S. K. Dubey, R. K. Songara, **3** (2011) 150–154.
167. O. A. El-Gammal, G. M. Abu El-Reash, S. E. Ghazy, A. H. Radwan, *J. Mol. Struct.* **1020** (2012) 6–15.
168. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **100** (2000) 57–70.

169. S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, K. Tada, *Int. J. Cancer* **26** (1980) 171–6.
170. A. M. Rieger, K. L. Nelson, J. D. Konowalchuk, D. R. Barreda, *J. Vis. Exp.* (2011).
171. T. Otto, P. Sicinski, *Nat. Rev. Cancer* **17** (2017) 93–115.
172. D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** (2013) a008656.
173. C. Constantinou, K. A. Papas, A. I. Constantinou, *Curr. Cancer Drug Targets* **9** (2009) 717–28.
174. P. D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, *Cell. Signal.* **24** (2012) 981–90.
175. M. Crompton, *Biochem. J.* **341** (Pt 2 (1999) 233–49.
176. D. Han, E. Williams, E. Cadenas, *Biochem. J.* **353** (2001) 411–6.
177. T. Fukai, M. Ushio-Fukai, *Antioxid. Redox Signal.* **15** (2011) 1583–606.
178. C. E. Meacham, S. J. Morrison, *Nature* **501** (2013) 328–37.
179. F. Kidwai, D. E. Costea, I. Hutchison, I. Mackenzie, *J. Oral Pathol. Med.* **42** (2013) 682–90.
180. K. Williams, K. Motiani, P. V. Giridhar, S. Kasper, *Exp. Biol. Med.* **238** (2013) 324–338.
181. D. Naor, S. B. Wallach-Dayana, M. A. Zahalka, R. V. Sionov, *Semin. Cancer Biol.* **18** (2008) 260–7.
182. L. Li, X. Hao, J. Qin, W. Tang, F. He, A. Smith, M. Zhang, D. M. Simeone, X. T. Qiao, Z.-N. Chen, T. S. Lawrence, L. Xu, *Gastroenterology* **146** (2014) 1108–18.
183. T. E. Andrews, D. Wang, D. A. Harki, *Drug Deliv. Transl. Res.* **3** (2013) 121–42.
184. B. A. Justice, N. A. Badr, R. A. Felder, *Drug Discov. Today* **14** (2009) 102–7.
185. R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, L. Yang, *Assay Drug Dev. Technol.* **12** (2014) 207–18.
186. J. Bin Kim, *Semin. Cancer Biol.* **15** (2005) 365–77.
187. G. Radcliff, M. J. Jaroszeski, *Basics of Flow Cytometry*, in *Flow Cytom. Protoc.*, Humana Press, New Jersey, n.d., pp. 1–24.
188. D. Y. Wu, O. Sato, Y. Einaga, C. Y. Duan, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48** (2009) 1475–1478.
189. J. R. Dimmock, S. N. Pandeya, J. W. Quail, U. Pugazhenthii, T. M. Allen, G. Y. Kao, J. Balzarini, E. DeClercq, *Eur. J. Med. Chem.* **30** (1995) 303–314.
190. F. A. French, E. J. Blanz, *J. Med. Chem.* **9** (1966) 585–589.
191. S. Rhee, *J. Pharm. Soc. Korea* **16** (1972) 162–175.
192. K. Gangarapu, S. Manda, S. Thota, R. Yerra, S. S. Karki, J. Balzarini, E. De Clercq, H. Tokuda, *Lett. Drug Des. Discov.* **9** (2012) 934–941.
193. M. P. Sathisha, U. N. Shetti, V. K. Revankar, K. S. R. Pai, *Eur. J. Med. Chem.* **43**

- (2008) 2338–2346.
194. J. M. Pérez, V. Cerrillo, A. I. Matesanz, J. M. Millán, P. Navarro, C. Alonso, P. Souza, *ChemBioChem* **2** (2001) 119–123.
 195. P. P. Minghetti, D. E. Ruffner, W. J. Kuang, O. E. Dennison, J. W. Hawkins, W. G. Beattie, A. Dugaiczky, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 6747–57.
 196. X. M. He, D. C. Carter, *Nature* **358** (1992) 209–215.
 197. F. Zsila, *Mol. Pharm.* **10** (2013) 1668–1682.
 198. K. K. Park, J. W. Park, A. D. Hamilton, *Org. Biomol. Chem.* **7** (2009) 4225.
 199. G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, *Mol. Aspects Med.* **33** (2012) 209–290.
 200. N. R. Filipović, S. Bjelogrić, G. Portalone, S. Pelliccia, R. Silvestri, O. Klisurić, M. Senčanski, D. Stanković, T. R. Todorović, C. D. Muller, (2016) 1604–1616.
 201. E. Froehlich, J. S. Mandeville, C. J. Jennings, R. Sedaghat-Herati, H. A. Tajmir-Riahi, *J. Phys. Chem. B* **113** (2009) 6986–6993.
 202. J. R. Lakowicz, ed., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, 2006.
 203. T. A. Blumenkopf, T. Spector, D. R. Averett, J. Morrison, Robert William, E. C. Bigham, V. L. Styles, Synergistic antiviral agents containing acyclic 2-aminopurine nucleosides and 2-acylpyridine hydrazone derivatives, ribonucleotide reductase inhibitors, US 1989-371877, 1990.
 204. A. Hoque, Md. Najbul Basu, G. Das, *Cryst. Growth Des.* **14** (2014) 6–10.
 205. J. Szczepanski, Henry; Kristinsson, Haukur; Maienfisch, Peter; Ehrenfreund, Preparation of 3-[(N-heterocycl)iminomethyl]pyridines as pesticides, WO 9518123, 1995.
 206. A. Bacchi, M. Carcelli, P. Pelagatti, C. Pelizzi, G. Pelizzi, F. Zani, *J. Inorg. Biochem.* **75** (1999) 123–133.
 207. M. A. Kamyabi, F. Soleymani-Bonoti, R. Bikas, H. Hosseini-Monfared, N. Arshadi, M. Siczek, T. Lis, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17** (2015) 32161–32172.
 208. Oxford Diffraction CrysAlis CCD and CrysAlis Red. Oxford Diffraction, (2009).
 209. SCALE3 ABSPACK CrysAlisPro, Agilent Technologies, Version 1.171.35.19
 210. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr. Sect. C Struct. Chem.* **71** (2015) 3–8.
 211. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **30** (1997) 565–566.
 212. L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **32** (1999) 837–838.
 213. P. C. D. Hawkins, A. G. Skillman, G. L. Warren, B. A. Ellingson, M. T. Stahl, *J. Chem. Inf. Model.* **50** (2010) 572–584.
 214. T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **20** (1999) 720–729.
 215. J.-D. Chai, M. Head-Gordon, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10** (2008) 6615.
 216. J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, *Chem. Rev.* **105** (2005) 2999–3094.

217. K. Wolinski, J. F. Hinton, P. Pulay, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 8251–8260.
218. P. Gaillard, P. A. Carrupt, B. Testa, A. Boudon, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **8** (1994) 83–96.
219. T. Yanai, D. P. Tew, N. C. Handy, *Chem. Phys. Lett.* **393** (2004) 51–57.
220. T. Le Bahers, C. Adamo, I. Ciofini, *J. Chem. Theory Comput.* **7** (2011) 2498–2506.
221. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision D.01, (2009).
222. T. Lu, F. Chen, *J. Comput. Chem.* **33** (2012) 580–592.
223. P. J. Goodford, *J. Med. Chem.* **28** (1985) 849–857.
224. Á. Durán, G. C. Martínez, M. Pastor, *J. Chem. Inf. Model.* **48** (2008) 1813–1823.
225. J.J.P. Stewart, MOPAC2016. Stewart Computational Chemistry (2016).
226. A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **18** (2004) 167–173.
227. Z. Wang, J. X. Ho, J. R. Ruble, J. Rose, F. Rüker, M. Ellenburg, R. Murphy, J. Click, E. Soistman, L. Wilkerson, D. C. Carter, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830** (2013) 5356–5374.
228. D. Buttar, N. Colclough, S. Gerhardt, P. A. MacFaul, S. D. Phillips, A. Plowright, P. Whittamore, K. Tam, K. Maskos, S. Steinbacher, H. Steuber, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (2010) 7486–7496.
229. J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry, *J. Mol. Biol.* **353** (2005) 38–52.
230. G. M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M. F. Sanner, R. K. Belew, D. S. Goodsell, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **30** (2009) 2785–2791.
231. O. Trott, A. J. Olson, *J. Comput. Chem.* **31** (2010) 455–61.
232. R. L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.* **53** (2005) 4290–4302.
233. C. Perez, M. Pauli, P. Bazerque, *Acta Biol. Med. Exp.* **15** (1990) 113–115.
234. M. Soković, L. J. L. D. van Griensven, *Eur. J. Plant Pathol.* **116** (2006) 211–224.
235. B. Ojha, G. Das, *J. Phys. Chem. B* **114** (2010) 3979–3986.
236. A. Božić, A. Marinković, S. Bjelogrić, T. R. Todorović, I. N. Cvijetić, I.

- Novaković, C. D. Muller, N. R. Filipović, *RSC Adv.* **6** (2016) 104763–104781.
237. A. M. A. Alaghaz, A. I. Hanafy, *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **182** (2007) 2769–2778.
238. A. Pérez-Rebolledo, O. E. Piro, E. E. Castellano, L. R. Teixeira, A. A. Batista, H. Beraldo, *J. Mol. Struct.* **794** (2006) 18–23.
239. T. K. Venkatachalam, G. K. Pierens, D. C. Reutens, *Magn. Reson. Chem.* **52** (2014) 98–105.
240. M. P. Rančić, I. Stojiljković, M. Milošević, N. Prlainović, M. Jovanović, M. K. Milčić, A. D. Marinković, *Arab. J. Chem.* (2016).
241. H. Beraldo, W. F. Nacif, D. X. West, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **57** (2001) 1847–1854.
242. M. J. Kamlet, J. L. M. Abboud, M. H. Abraham, R. W. Taft, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 2877–2887.
243. Y. Marcus, *Chem. Soc. Rev.* **22** (1993) 409.
244. N. B. Chapman, J. Shorter, eds., *Correlation Analysis in Chemistry*, Springer US, Boston, MA, 1978.
245. C. Hansch, A. Leo, D. Hoekman, *Explor. QSAR Hydrophobic, Electron. Steric Constants* (1995).
246. D. J. Craik, R. T. C. Brownlee, *Substituent Effects on Chemical Shifts in the Sidechains of Aromatic Systems*, in *Prog. Phys. Org. Chem.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, n.d., pp. 1–73.
247. W. F. Reynolds, A. Gomes, A. Maron, D. W. MacIntyre, A. Tanin, G. K. Hamer, I. R. Peat, *Can. J. Chem.* **61** (1983) 2376–2384.
248. T. Okawara, K. Imai, T. Ochiai, Free radical scavenger containing semicarbazide derivatives, WO/2006/093124, 2006.
249. K. S. Thanthiriwatte, E. G. Hohenstein, L. A. Burns, C. D. Sherrill, *J. Chem. Theory Comput.* **7** (2011) 88–96.
250. L. Yuan, M. J. Fairchild, A. D. Perkins, G. Tanentzapf, *J. Cell Sci.* **123** (2010) 939–946.
251. U. Koch, P. L. A. Popelier, *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 9747–9754.
252. Z. Kuodis, A. Rutavičius, A. Matijoška, O. Eicher-Lorka, *Cent. Eur. J. Chem.* **5** (2007) 996–1006.
253. N. Galić, A. Dijanošić, D. Kontrec, S. Miljanić, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **95** (2012) 347–353.
254. S. Uchiyama, M. Ando, S. Aoyagi, *J. Chromatogr. A* **996** (2003) 95–102.
255. Y. H. Lu, Y. W. Lu, C. L. Wu, Q. Shao, X. L. Chen, R. N. B. Bimbong, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **65** (2006) 695–701.
256. ADMET Predictor, version 7.2. Simulations Plus, Inc. (2015).
257. I. Ciofini, T. Le Bahers, C. Adamo, F. Odobel, D. Jacquemin, *J. Phys. Chem. C*

- 116** (2012) 11946–11955.
258. D. Jacquemin, T. Le Bahers, C. Adamo, I. Ciofini, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14** (2012) 5383.
259. B. Beck, C. Blanpain, *Nat. Rev. Cancer* **13** (2013) 727–738.
260. M. S. Sosa, P. Bragado, J. A. Aguirre-Ghiso, *Nat. Rev. Cancer* **14** (2014) 611–22.
261. R. P. Galvao, A. Kasina, R. S. McNeill, J. E. Harbin, O. Foreman, R. G. W. Verhaak, A. Nishiyama, C. R. Miller, H. Zong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111** (2014) E4214-23.
262. J. W. Uhr, K. Pantel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108** (2011) 12396–400.
263. M. Yang, H. Wang, Y. Hou, H. Tung, T. Chiu, Y. Shan, *Mol. Cancer* (2015) 1–17.
264. P. Longati, X. Jia, J. Eimer, A. Wagman, M.-R. Witt, S. Rehnmark, C. Verbeke, R. Toftgård, M. Löhr, R. L. Heuchel, *BMC Cancer* **13** (2013) 95.
265. I. Murtaza, V. M. Adhami, B. Bin Hafeez, M. Saleem, H. Mukhtar, *Int. J. Cancer* **125** (2009) 2465–2473.
266. A. S. Reddy, S. Zhang, *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **6** (2013) 41–47.
267. D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7** (2015) a026716.
268. A. Jimbo, E. Fujita, Y. Kouroku, J. Ohnishi, N. Inohara, K. Kuida, K. Sakamaki, S. Yonehara, T. Momoi, *Exp. Cell Res.* **283** (2003) 156–66.
269. R. S. Hotchkiss, D. W. Nicholson, *Nat. Rev. Immunol.* **6** (2006) 813–822.
270. G. C. Brown, V. Borutaite, *Mitochondrion* **12** (2012) 1–4.
271. A. Jaggupilli, E. Elkord, *Clin. Dev. Immunol.* **2012** (2012) 1–11.
272. Y. Yan, X. Zuo, D. Wei, *Stem Cells Transl. Med.* **4** (2015) 1033–1043.
273. L. Deschamps-Labat, F. Péhourcq, M. Jagou, B. Bannwarth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16** (1997) 223–229.
274. K. W. Lexa, E. Dolghih, M. P. Jacobson, *PLoS One* **9** (2014).
275. C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46** (2001) 3–26.
276. P. D. Ross, S. Subramanian, *Biochemistry* **20** (1981) 3096–3102.
277. M. Mohammadpour, A. Sadeghi, A. Fassihi, L. Saghaei, A. Movahedian, M. Rostami, *Res. Pharm. Sci.* **7** (2012) 171–9.
278. I. C. F. R. Ferreira, M.-J. R. P. Queiroz, M. Vilas-Boas, L. M. Estevinho, A. Begouin, G. Kirsch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 1384–7.
279. M. T. Zimmerman, C. A. Bayse, R. R. Ramoutar, J. L. Brumaghim, *J. Inorg. Biochem.* **145** (2015) 30–40.
280. V. Calcaterra, Ó. López, J. G. Fernández-Bolaños, G. B. Plata, J. M. Padrón,

- Eur. J. Med. Chem.* **94** (2015) 63–72.
281. E. Bendary, R. R. Francis, H. M. G. Ali, M. I. Sarwat, S. El Hady, *Ann. Agric. Sci.* **58** (2013) 173–181.
282. I. Novaković, J. Penjišević, V. Šukalović, D. Andrić, G. Roglić, S. Kostić-Rajacić, *Arch. Biol. Sci.* **64** (2012) 15–20.
283. K. Roy, S. Kar, P. Ambure, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **145** (2015) 22–29.

7. PRILOG

Prilog 7. A Tabele i slike

Tabela P7.A 1 Numeracija atoma *mh*-UK

<i>mhUK</i> _(ba)		<i>mhUK</i> _(4pya)		<i>mhUK</i> _(4pya)	
<i>mhUK</i> _(sal)		<i>mhUK</i> _(af)		<i>mhUK</i> _(8qc)	
<i>mhUK</i> _(2pyc)		<i>mhUK</i> _(2pya)		<i>mhUK</i> _(2qc)	
<i>mhUK</i> _(3pyc)		<i>mhUK</i> _(3pya)		<i>mhUK</i> _(8OH2qc)	

Tabela P7.A 2 Geometrijski podaci za Z oblik izomera *mh*-UK dobijen MP2/6-311G(d,p) metodom

Jedinjenje /parametar	<i>mhUK</i> (ba)	<i>mhUK</i> (sal)	<i>mhUK</i> (2pvc)	<i>mhUK</i> (af)	<i>mhUK</i> (2pva)	<i>mhUK</i> (3pva)	<i>mhUK</i> (4pva)
Dužina veza (Å)							
H-C7(C9*)	1,085	1,088	1,086				
H-N3(N2**)	1,017	1,014	1,023	1,016	1,023	1,013	1,013
H-N4(N3**)	1,011	1,007	1,007	1,011	1,007	1,007	1,008
C2-C7(C9*)	1,477	1,484	1,472	1,487	1,489		
C3-C7						1,493	
C4-C7							1,494
C7-C8				1,500	1,507	1,499	1,498
C7(9*)-N2(N1**)	1,297	1,279	1,283	1,299	1,287	1,277	1,277
N2(N1**)-N3(N2**)	1,372	1,351	1,345	1,375	1,347	1,359	1,360
N3(N2**)-C(=O)	1,399	1,388	1,385	1,394	1,381	1,381	1,382
N4(N3**)-C(=O)	1,397	1,370	1,371	1,400	1,374	1,375	1,374
C=O	1,220	1,214	1,215	1,221	1,216	1,215	1,214
Ugao(θ)							
C2(C3,C4,C7)-C7(C9*)-N2(N1**)	128,6	127,2	129,9	124,8	127,1	124,2	124,1
C7(C9*)-N2(N1**)-N3(N2**)	117,1	118,3	119,4	116,9	121,1	118,4	118,5
N2(N1**)-N3(N2**)-C(=O)	117,1	119,3	119,0	117,5	118,8	119,5	119,3
C(=O)-N4(N3**)-N5(N4**)	116,7	120,6	120,7	123,5	120,4	120,1	120,1
Torzioni ugao (θ)							
α	-0,2	1,9	-0,3	0,6	-0,2	-1,8	0,9
β	165,7	175,9	178,5	165,3	179,5	175,0	175,4
χ	7,8	4,6	-1,2	6,8	-0,5	-1,1	2,4
δ	10,3	8,3	8,1	10,4	9,5	8,5	8,6

* za *mhUK*_(af) i *mhUK*_(2pva), ** za *mhUK*_(ba) i *mhUK*_(sal)

Tabela P7.A 3 Kamlet–Taft-ovi parametri rastvarača

	Rastvarač ^a	π^*	β	α
1	Etanol (EtOH)	0,54	0,75	0,86
2	Metanol (MeOH)	0,6	0,66	0,98
3	1-Propanol (1-PrOH)	0,52	0,90	0,84
4	1-Butanol (1-BuOH)	0,47	0,88	0,79
5	<i>izo</i> -Butanol (<i>i</i> -BuOH)	0,4	0,84	0,79
6	1-Pentanol (1-PeOH)	0,4	0,86	0,84
7	<i>izo</i> -Pentanol (<i>i</i> -PeOH)	0,4	0,86	0,84
8	2-Metoksietanol (2ME)	0,71	0	0
9	2-Hloroetanol (2CE)	0,46	0,53	1,28
10	Voda	1,09	0,47	1,17
11	Acetonitril (AcN)	0,75	0,40	0,19
12	Hloroform (Chl)	0,58	0	0,44
13	Dietiletar (Et ₂ O)	0,27	0,47	0
14	Tetrahidrofuran (THF)	0,58	0,55	0
15	Dioksan	0,55	0,37	0
16	2-Pirolidon (2-Py)	0,85	0,77	0,36
17	Etil Acetat (EtOAc)	0,55	0,45	0
18	Dihrometan (DCM)	0,82	0,1	0,13
19	1-metil-2-pirolidon (NMP)	0,92	0,77	0
20	<i>N,N</i> -Dimetilformamid (DMF)	0,88	0,69	0
21	Dimetil sulfoksid (DMSO)	1	0,76	0
22	<i>N,N</i> -Dimetilacetamid (DMA)	0,88	0,76	0

^aSkraćenice za rastvarače su uzete sa www.chemnetbase

Tabela P7.A 4 *Catalán*-ovi parametri rastvarača^a

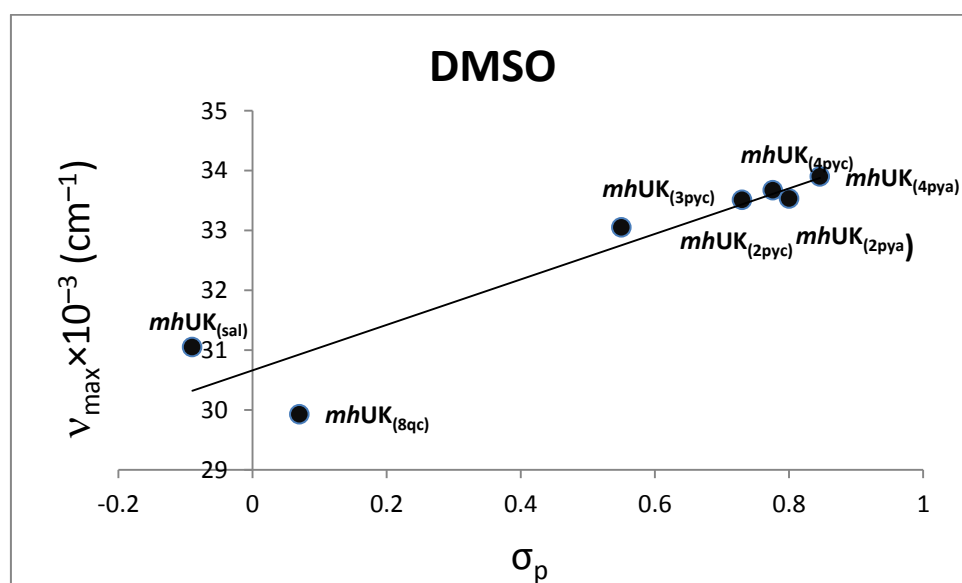
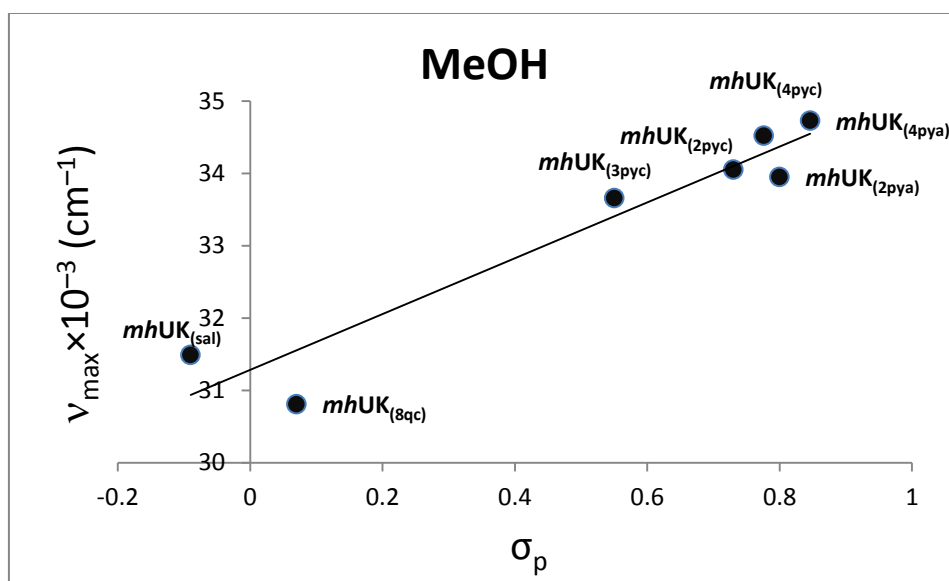
	<i>Rastvarač^a</i>	<i>SP</i>	<i>SdP</i>	<i>SA</i>	<i>SB</i>
1	Etanol (EtOH)	0,608	0,904	0,605	0,545
2	Metanol (MeOH)	0,633	0,783	0,4	0,658
3	1-Propanol (1-PrOH)	0,658	0,748	0,367	0,782
4	1-Butanol (1-BuOH)	0,674	0,655	0,341	0,809
5	<i>izo</i> -Butanol (<i>i</i> -BuOH)	0,656	0,706	0,221	0,888
6	1-Pentanol (1-PeOH)	0,687	0,587	0,319	0,86
7	<i>izo</i> -Pentanol (<i>i</i> -PeOH)	0,667	0,665	0,204	0,916
8	2-Metoksietanol (2ME)	0,7704	0,9736	0,56	0,38
9	2-Hloroetanol (2CE)	0,6996	0,8952	0,36	0,56
10	Voda	0,681	0,997	1,062	0,025
11	Acetonitril (AcN)	0,645	0,974	0,044	0,286
12	Hloroform (Chl)	0,783	0,614	0,047	0,071
13	Dietiletar (Et ₂ O)	0,617	0,385	0	0,562
14	Tetrahidrofuran (THF)	0,714	0,634	0	0,591
15	Dioksan	0,737	0,312	0	0,444
16	Etil Acetat (EtOAc)	0,83	1	0,072	0,647
17	Dihrometan (DCM)	0,814	1,006	0,549	0,414
18	1-metil-2-pirolidon (NMP)	0,656	0,603	0	0,542
19	<i>N,N</i> -Dimetilformamid (DMF)	0,761	0,769	0,04	0,178
20	Dimetil sulfoksid (DMSO)	0,812	0,959	0,024	0,613
21	<i>N,N</i> -Dimetilacetamid (DMA)	0,759	0,977	0,031	0,613

^a*Catalán*-ov parametar za 2-pirolidon nije poznat

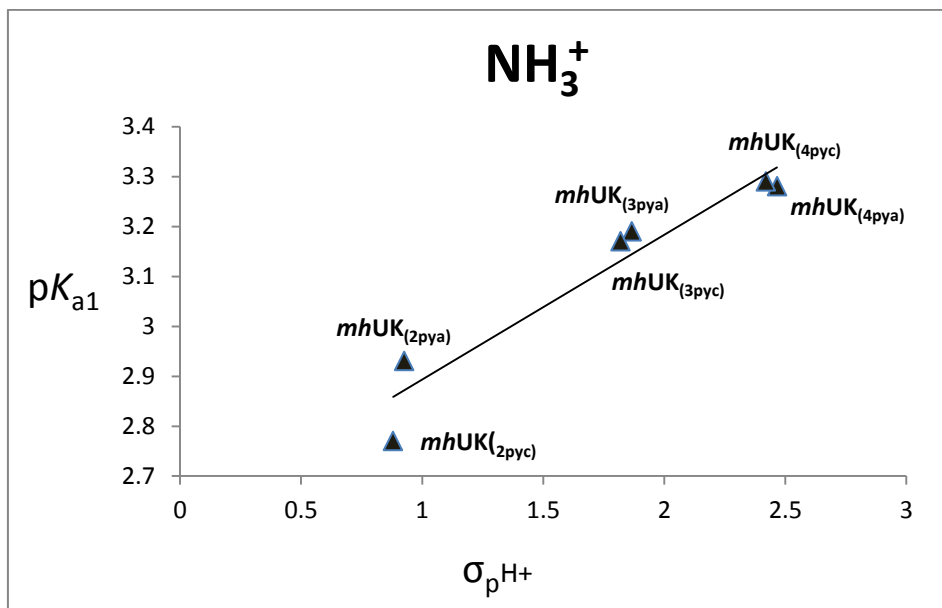
Tabela P7.A 5 Hammett-ovi parametri supstituenata

	R_1	R_2	σ_p	σ_{pH^+}
$mhUK_{(ba)}$	Fenil	H	-0,01	
$mhUK_{(sal)}$	2-Hidroksifenil	H	-0,09	-0,09
$mhUK_{(2pyc)}$	2-Piridinil	H	0,73	0,88
$mhUK_{(3pyc)}$	3- Piridinil	H	0,55	1,82
$mhUK_{(4pyc)}$	4- Piridinil	H	0,80	2,42
$mhUK_{(af)}$	Fenil	Me	0,036	
$mhUK_{(2pya)}$	2- Piridinil	Me	0,776	0,926
$mhUK_{(3pya)}$	3- Piridinil	Me	0,596	1,866
$mhUK_{(4pya)}$	4- Piridinil	Me	0,846	2,466
$mhUK_{(8qc)}$	8-Hinolil	H	0,07	
$mhUK_{(2qc)}$	2-Hinolil	H	1,3	
$mhUK_{(8OH2qc)}$	8-Hidroksi-2-Hinolil	H	0,57	
$mhUK_{(2Ti)}$	2-Tienil	H	0,71	
$mhUK_{(4OHPh)}$	4-Metoksifenil	H	-0,27	
$mhUK_{(4COOHPh)}$	4-Karboksifenil	H	0,45	
$mhUK_{(4OMPh)}$	4-Hidroksifenil	H	-0,37	

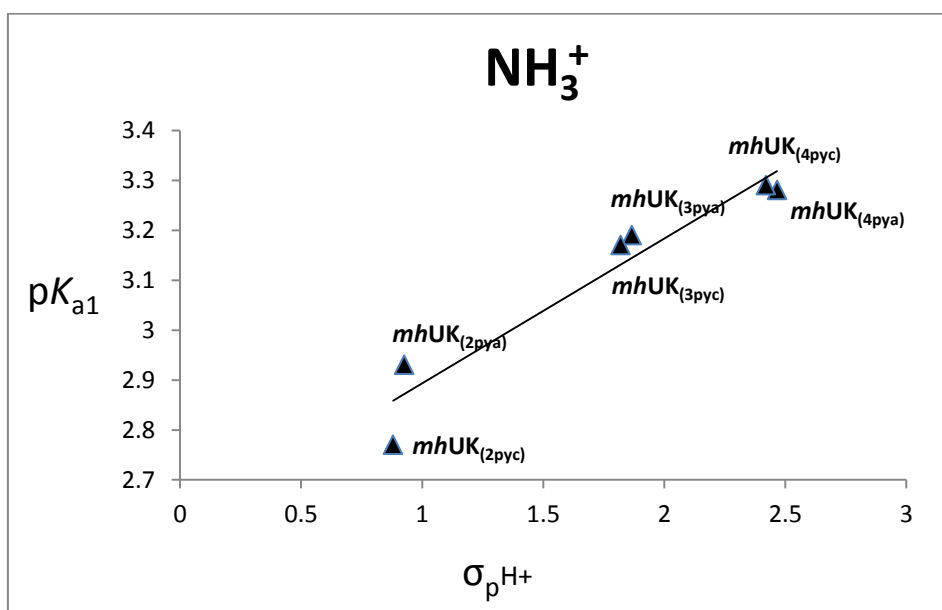
Ti-tienilaldehid; *Ph*-fenil



Slika P7.A 1 Rezultati LFER korelacija UV-Vis spektralnih podataka za *E* izomer *mh*-UK sa σ konstantama u: a) MeOH, b) DMSO

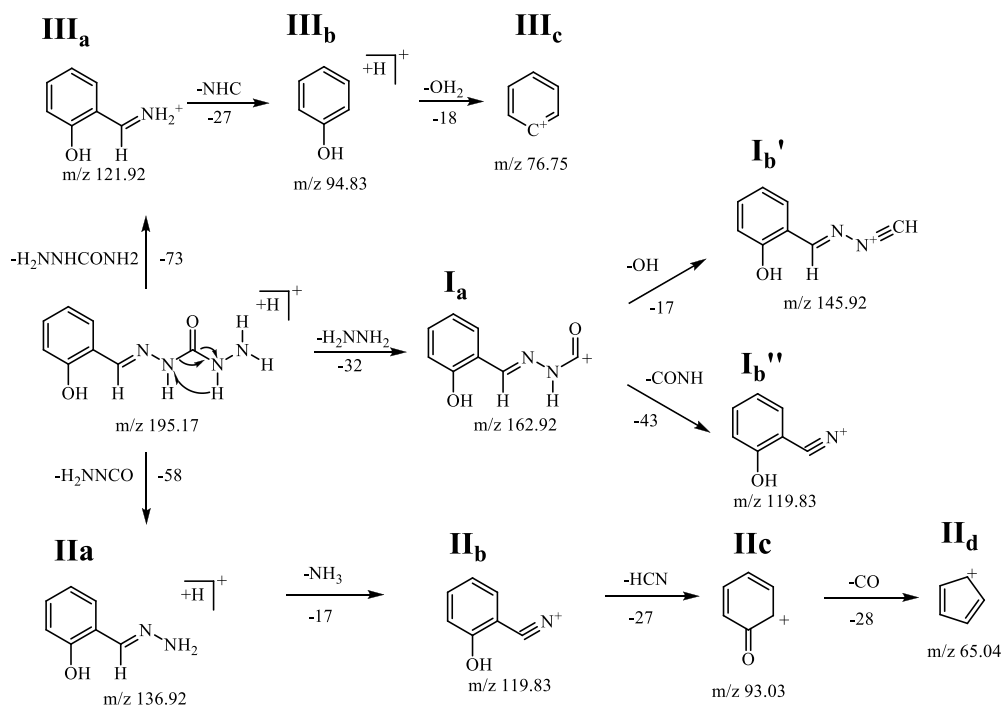


a)

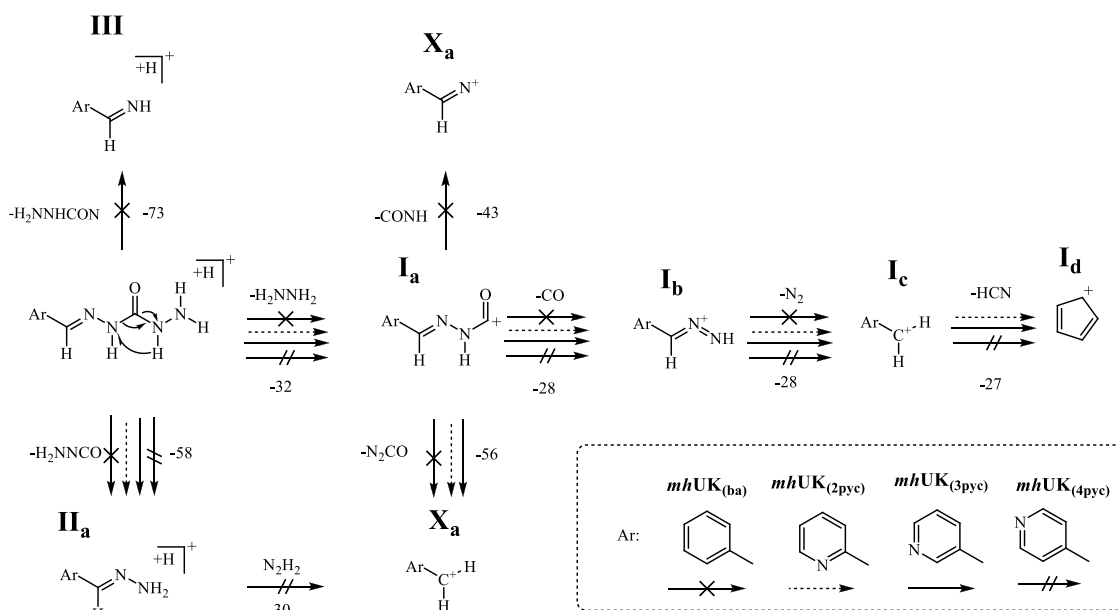


b)

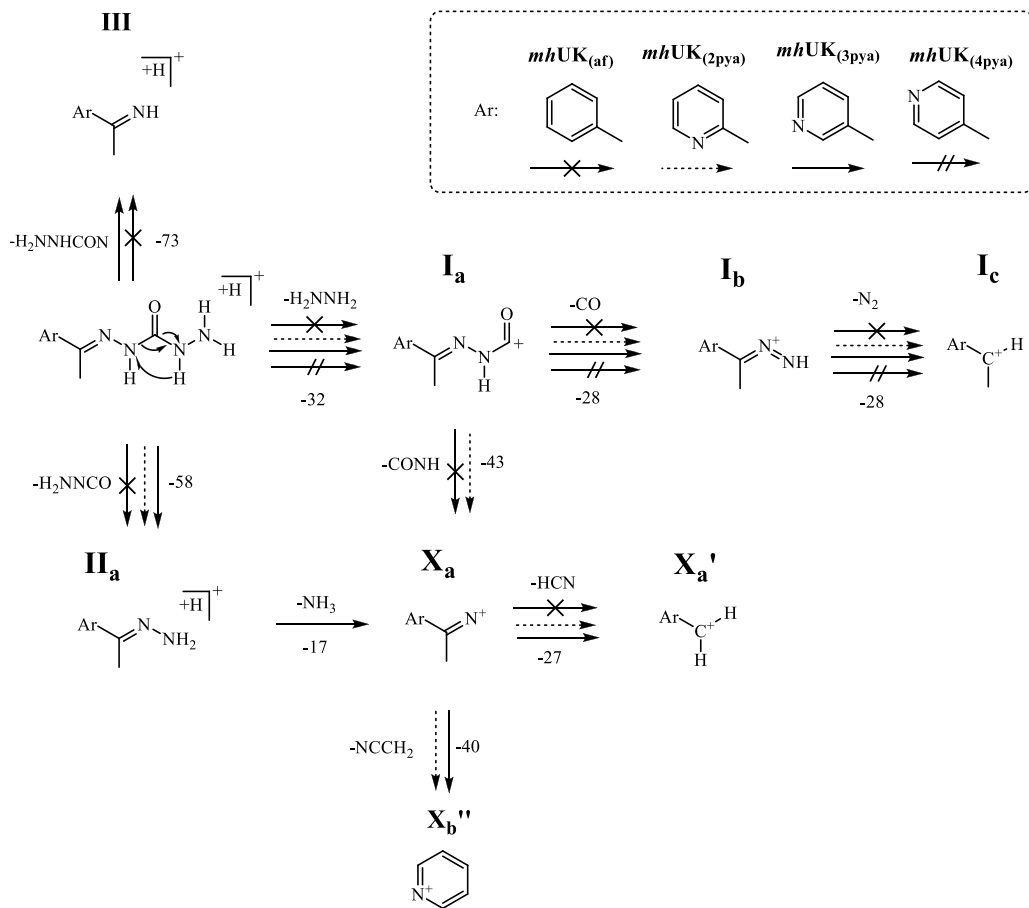
Slika P7.A 2 Rezultati LFER korelacija pK_a vrednosti E izomera mh -UK sa σ_{pH^+} konstantama koje su dobijene *Hammnett*-ovom jednačinom 2.5: a) $(pK_{a1})NH_3^+$, b) $(pK_{a2})NH+(OH)$



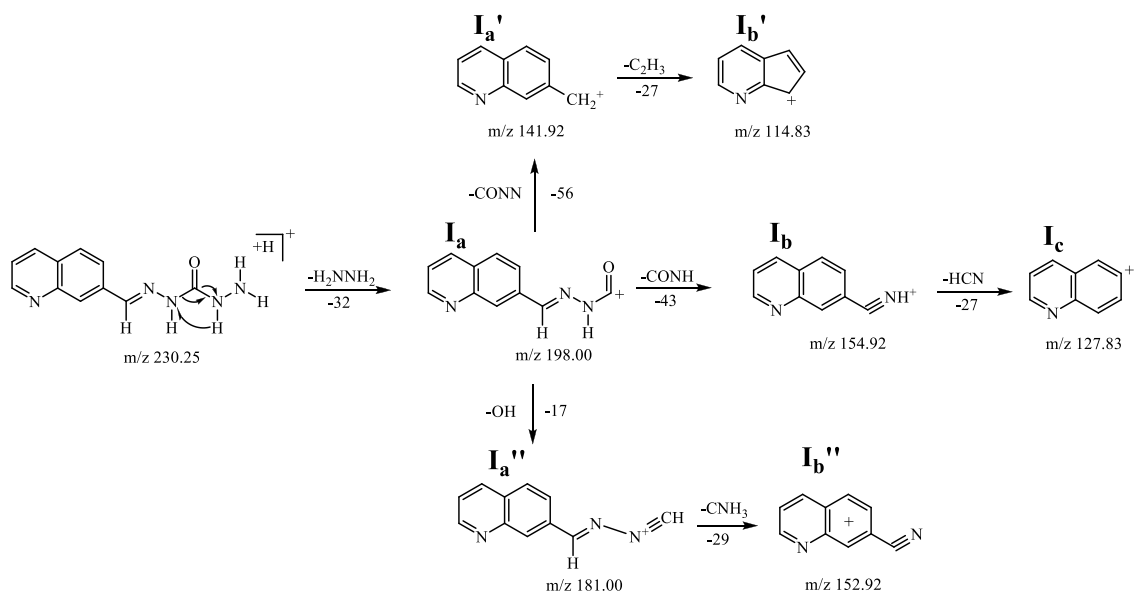
Slika P7.A 3 Put fragmentacije protonovanog molekuskog jona [$mhUK_{(\text{sal})} + H$]⁺ ($m/z = 195,17$)



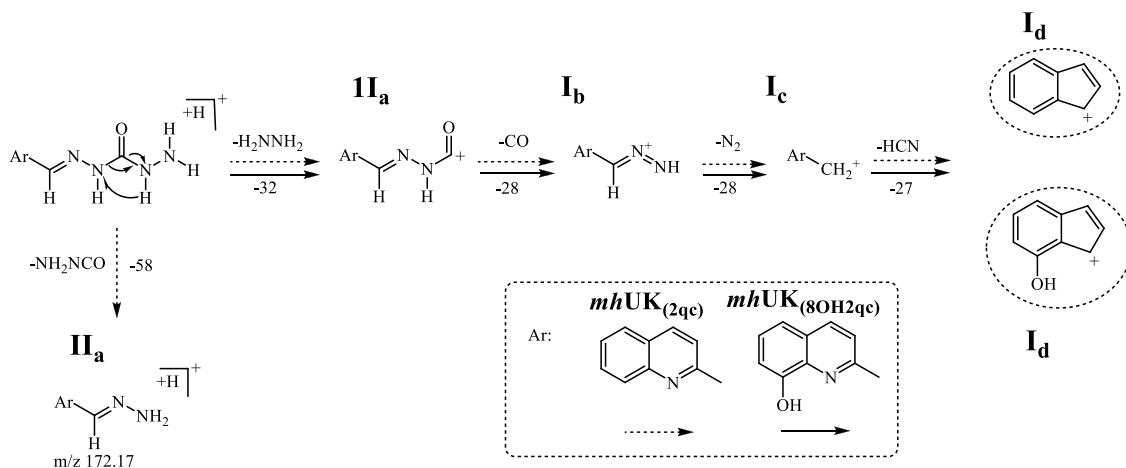
Slika P7.A 4 Put fragmentacije protonovanog molekuskog jona [$mhUK_{(\text{ba})}$, $mhUK_{(2\text{pye})}$, $mhUK_{(3\text{pye})}$ i $mhUK_{(4\text{pye})} + H$]⁺ ($m/z = 179,03$ and $180,11$)



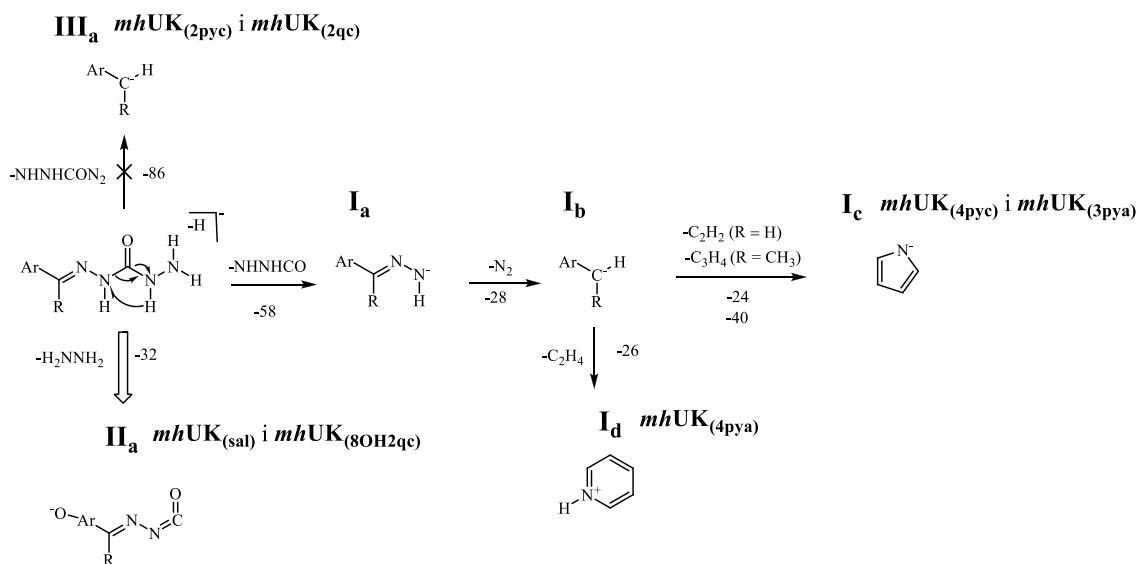
Slika P7.A 5 Put fragmentacije protonovanog molekuskog jona [*mhUK*_(af), *mhUK*_(2pya), *mhUK*_(3pya) i *mhUK*_(4pya) +H]⁺ (*m/z* = 193,07 and 194,14)



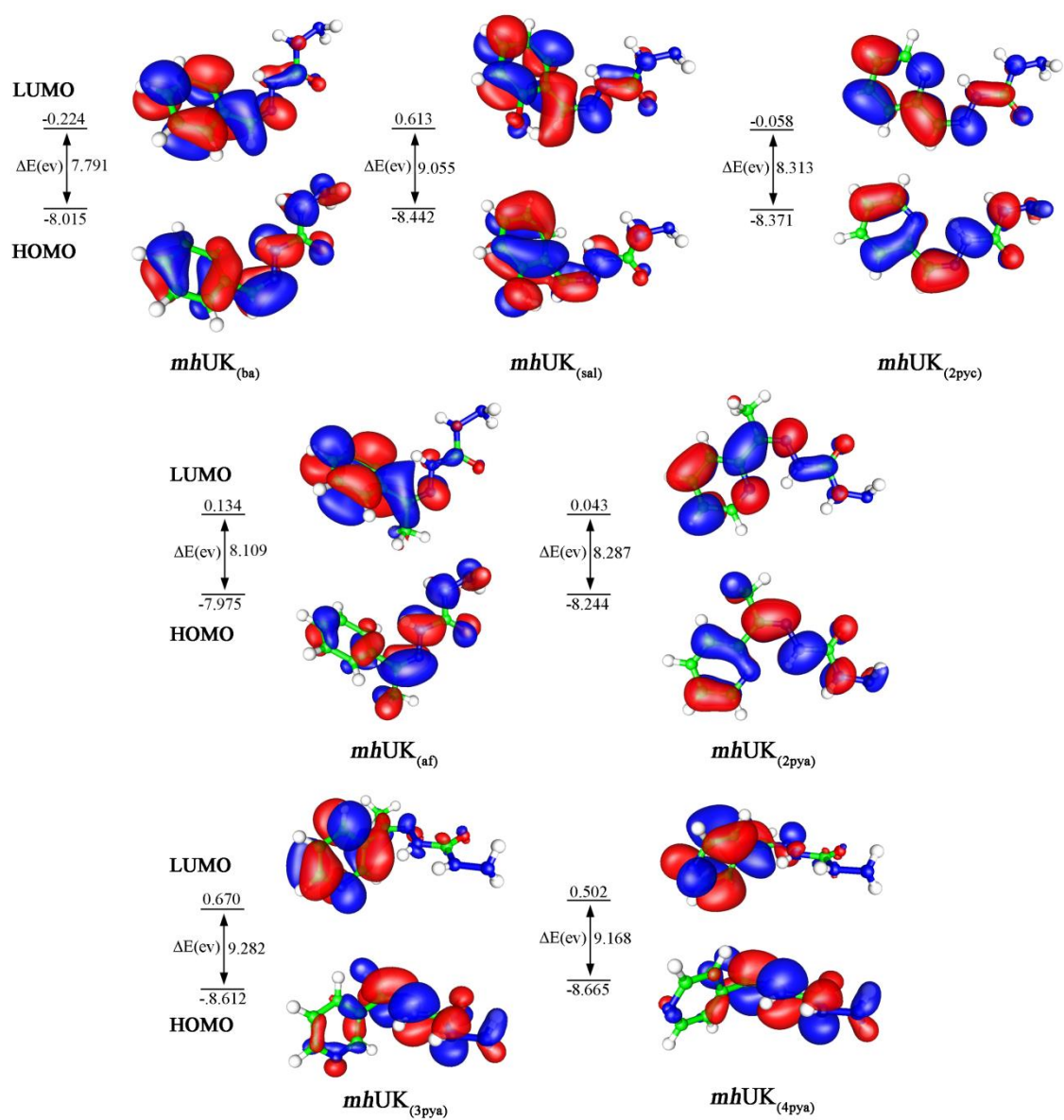
Slika P7.A 6 Put fragmentacije protonovanog molekuskog jona [*mhUK*_(8qc) +H]⁺ (*m/z* = 230,25)



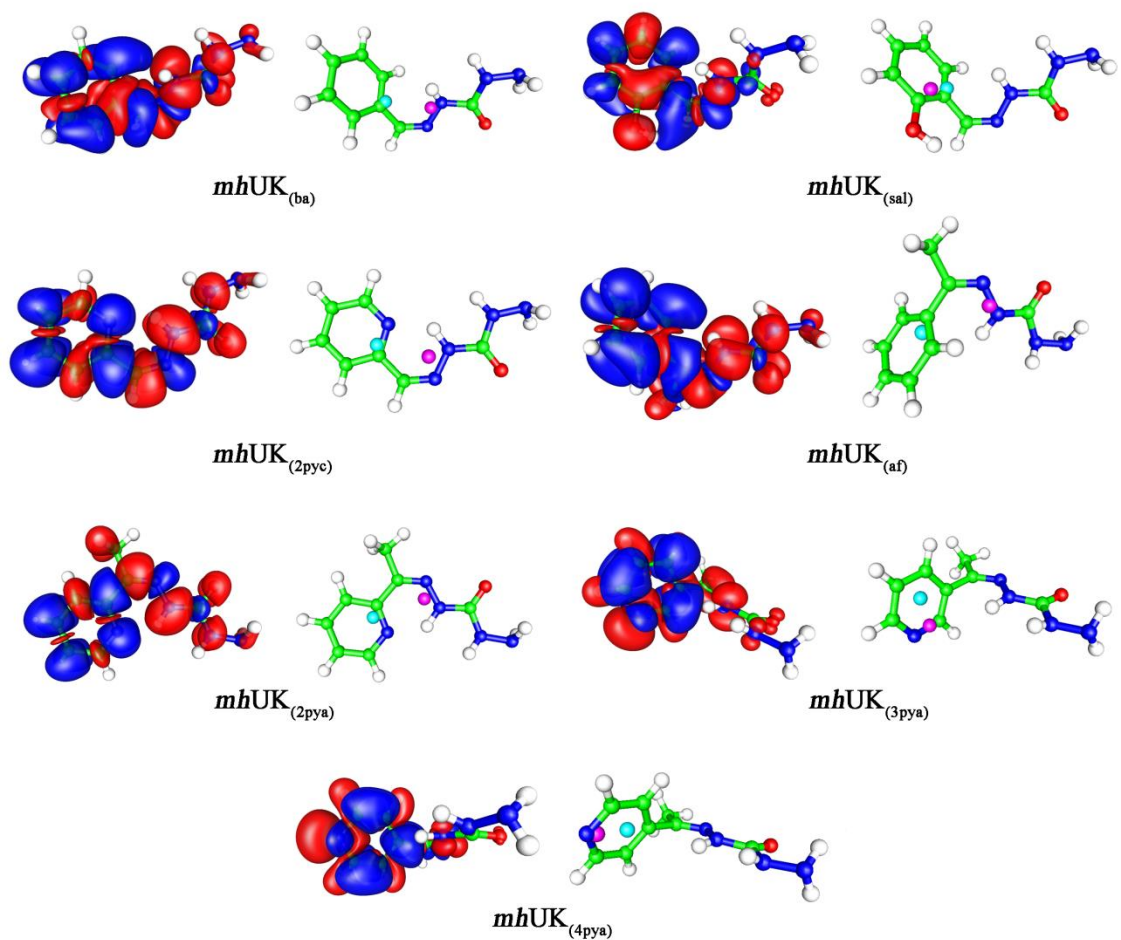
Slika P7.A 7 Put fragmentacije protonovanog molekuskog jona [*mhUK*_(2qc) i *mhUK*_(8OH2qc) + H]⁺ (*m/z* = 246,04 and 230,25)



Slika P7.A 8 Put fragmentacije protonovanog molekuskog jona [*mh-UK -H*]⁻



Slika P7.A 9 Prikaz HOMO/LUMO orbitala i E_{gap} *mh*-UK (Z oblik) u DMSO-u



Slika P7.A 10 ICT procesi u supstancama *mh*-UK (*Z* oblik); Sa leve strane prikazana je razlika u gustini ekcitolanog i pobuđenog stanja (crveno-gustina raste i plavo – gustina opada); Sa desne strane prikazane su pozicije bari centara za gubitak naelektrisanja (plavi krug) i porast naelektrisanja (ljubičasti krug) pri prelazima.

Tabela P7.A 6 Numeracija atoma *h*-(T)UK na bazi hinolina

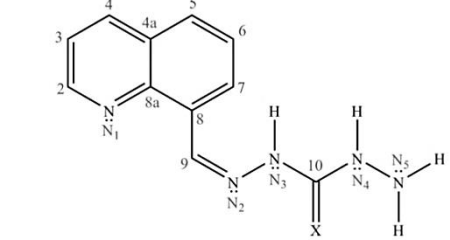
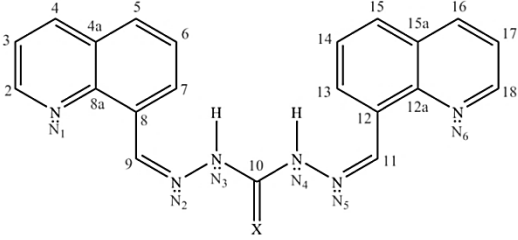
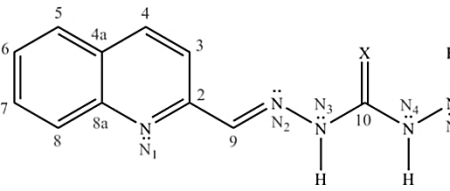
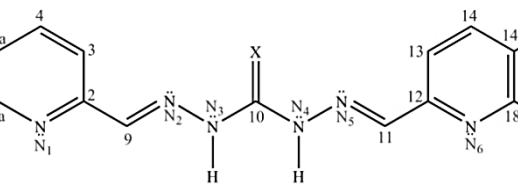
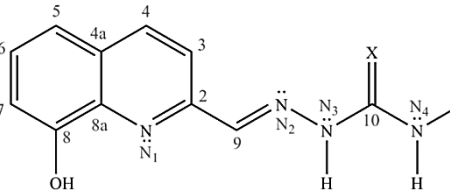
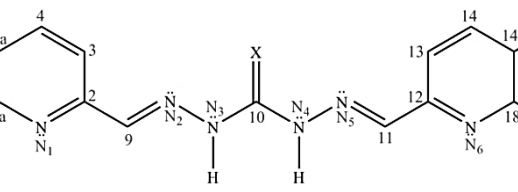
<p>X=O <i>mhUK</i>_(8qc) X=S <i>mhTUK</i>_(8qc)</p>		<p>X=O <i>dhUK</i>_(8qc) X=S <i>dhTUK</i>_(8qc)</p>	
<p>X=O <i>mhUK</i>_(2qc) X=S <i>mhTUK</i>_(2qc)</p>		<p>X=O <i>dhUK</i>_(2qc) X=S <i>dhTUK</i>_(2qc)</p>	
<p>X=O <i>mhUK</i>_(8OH2qc) X=S <i>mhTUK</i>_(8OH2qc)</p>		<p>X=O <i>dhUK</i>_(8OH2qc) X=S <i>dhTUK</i>_(8OH2qc)</p>	

Tabela P7.A 7 Eksperimentalni i teorijski ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) podaci ***h*-UK** na bazi hinolina

δ	<i>mhUK</i> _(8qc)		<i>dhUK</i> _(8qc)		<i>mhUK</i> _(2qc)		<i>dhUK</i> _(2qc)		<i>mhUK</i> _(8OH2qc)		<i>dhUK</i> _(8OH2qc)	
	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.
2	8,94	9,23	8,99	9,27								
3	7,57	7,76	7,61	7,79	8,34-8,46	8,44	8,38-8,60	8,54	8,30-8,50	8,47	8,17-8,39	8,56
4	8,39	8,63	8,43	8,65	8,27	8,56	8,38-8,60	8,62	8,24	8,53	8,17-8,39	8,59
5	7,98	8,27	8,04	8,31	7,93-7,99	8,25	8,02	8,29	7,36	7,62	7,41	7,65
6	7,63	7,98	7,72	8,03	7,58	7,91	7,63	7,95	7,41	7,82	7,45	7,88
7	8,58	8,89	8,60	8,98	7,74	8,08	7,79	8,12	7,08	7,35	7,12	7,39
8					7,93-7,99	8,35	8,02	8,39	*9,71	7,80	*9,80	7,83
9	9,14	9,25	9,50	9,40	8,03	7,92	8,31	8,08	8,09	7,93	8,48	8,09
11			9,50	9,40			8,31	8,08			8,48	8,09
12												
13			8,60	8,98			8,38-8,60	8,54			8,17-8,39	8,56
14			7,72	8,03			8,38-8,60	8,62			8,17-8,39	8,59
15			8,04	8,31			8,02	8,29			7,41	7,65
16			8,43	8,65			7,63	7,95			7,45	7,88
17			7,61	7,79			7,79	8,12			7,12	7,39
18			8,99	9,27			8,02	8,39			*9,80	7,83
N3	10,65	7,38	11,09	7,67	10,84	7,47	11,31	7,73	10,88	7,50	11,34	7,75
N4	8,16	5,02	11,09	7,67	8,34-8,46	5,13	11,31	7,73	8,30-8,50	5,13	11,34	7,75
N5	4,12	3,23	8,99		4,15	3,20			4,14	3,21		
		2,82				2,80				2,89		

* OH

Tabela P7.A 8 Eksperimentalni i teorijski ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) podaci ***h*-TUK** na bazi hinolina

δ	<i>mh</i> TUK _(8qc)		<i>dh</i> TUK _(8qc)		<i>mh</i> TUK _(2qc)		<i>dh</i> TUK _(2qc)		<i>mh</i> TUK _(8OH2qc)		<i>dh</i> TUK _(8OH2qc)	
	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.
2	8,96	9,27	9,00	9,36								
3	7,59	7,80	7,62	7,84	8,52	8,38	8,90	8,66	8,82	8,40	8,05- 8,41	8,68
4	8,41	8,66	8,35- 8,64	8,70	8,34	8,61	8,46- 8,63	8,67	8,27	8,57	8,05- 8,41	8,64
5	8,03	8,37	8,09	7,43	7,97	8,27	8,06	8,29	7,37	7,64	7,43	7,66
6	7,65	7,99	7,75	8,06	7,59	7,96	7,67	8,00	7,42	7,87	7,43	7,92
7	8,73	8,85	8,88	9,14	7,75	8,12	7,82	8,19	7,09	7,39	7,14	7,45
8					7,97	8,40	8,06	8,46	*9,80	7,79	*9,89	7,83
9	9,30	9,35	9,91	9,86	8,18	7,95	8,40	8,48	8,23	7,96	8,89	8,48
11			9,48	9,48			8,20	8,05			8,53	8,06
12												
13			8,35- 8,64	9,04			8,46- 8,63	8,53			8,05- 8,41	8,68
14			7,75	8,11			8,46- 8,63	8,68			8,05- 8,41	8,64
15			8,09	8,41			8,06	8,29			7,43	7,66
16			8,35- 8,64	8,66			7,67	7,98			7,43	7,90
17			7,62	7,82			7,82	8,15			7,14	7,41
18			9,00	9,30			8,06	8,46			*9,89	7,81
N3	11,67	8,26	12,18	10,37	11,78	8,31	12,51	10,33	11,84	8,31	12,52	10,31
N4	9,95	7,91	12,10	8,38	10,18	7,95	12,16	8,48	10,17	7,92	12,18	8,49
N5	4,91	3,22			4,97	3,22			4,96	3,22		

*OH

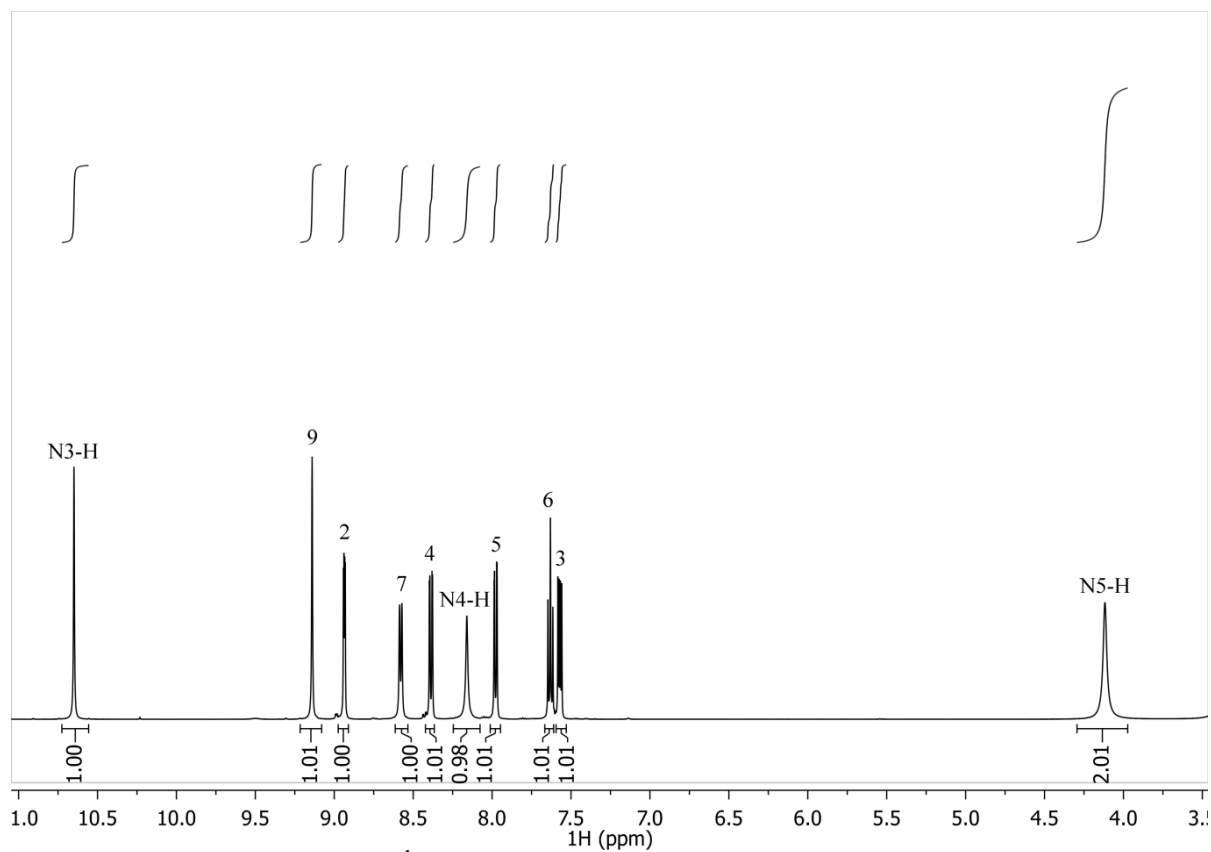
Tabela P7.A 9 Eksperimentalni i teorijski ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) podaci ***h***-UK na bazi hinolina

δ	<i>mhUK</i> _(8qc)		<i>dhUK</i> _(8qc)		<i>mhUK</i> _(2qc)		<i>dhUK</i> _(2qc)		<i>mhUK</i> _(8OH2qc)		<i>dhUK</i> _(8OH2qc)	
	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.
2	150,08	150,03	150,16	150,39	154,34	153,38	151,67	152,88	152,25	151,13	151,92	150,23
3	121,67	120,21	121,77	119,98	118,03	115,51	117,78	115,81	118,35	116,76	118,12	117,00
4	136,55	137,01	136,62	137,81	136,19	137,31	136,47	137,41	136,06	137,37	136,40	137,49
4a	127,94	125,93	128,02	125,,36	127,66	125,50	127,99	125,83	128,52	126,32	128,75	126,60
5	128,90	129,02	129,28	129,69	127,72	127,43	128,84	127,36	117,74	114,86	117,90	114,86
6	126,45	125,33	126,49	125,26	126,84	126,29	127,79	126,64	127,73	128,56	128,13	128,95
7	125,61	124,17	125,72	124,65	129,82	129,13	127,11	129,20	111,59	106,68	112,13	106,80
8	131,59	130,68	131,65	130,19	128,69	129,02	130,00	129,20	153,24	152,48	153,37	152,56
8a	145,01	143,34	145,19	143,61	147,26	145,87	147,35	145,84	137,93	134,42	138,13	134,34
9	136,89	135,46	139,89	136,96	140,64	139,93	144,06	142,52	140,50	138,54	144,02	141,31
10	157,21	153,32	152,28	146,03	156,76	152,74	153,99	145,51	156,83	152,52	162,45	145,41
11			139,89	136,96			144,06	142,52			144,02	141,31
12			131,65	130,19			151,67	152,88			151,92	150,23
12a			145,19	143,61								
13			125,72	124,65			117,78	115,81			118,12	117,00
14			126,49	125,26			136,47	137,41			136,40	137,49
14a							127,99	125,83			128,75	126,60
15			128,28	129,69			128,84	127,36			117,90	114,86
15a			128,02	127,66								
16			136,62	137,81			127,79	126,64			128,13	128,95
17			121,77	119,98			127,11	129,20			112,13	106,80
18			150,16	150,39			130,00	129,20			153,37	152,56
18a							147,35	145,84			138,13	134,34

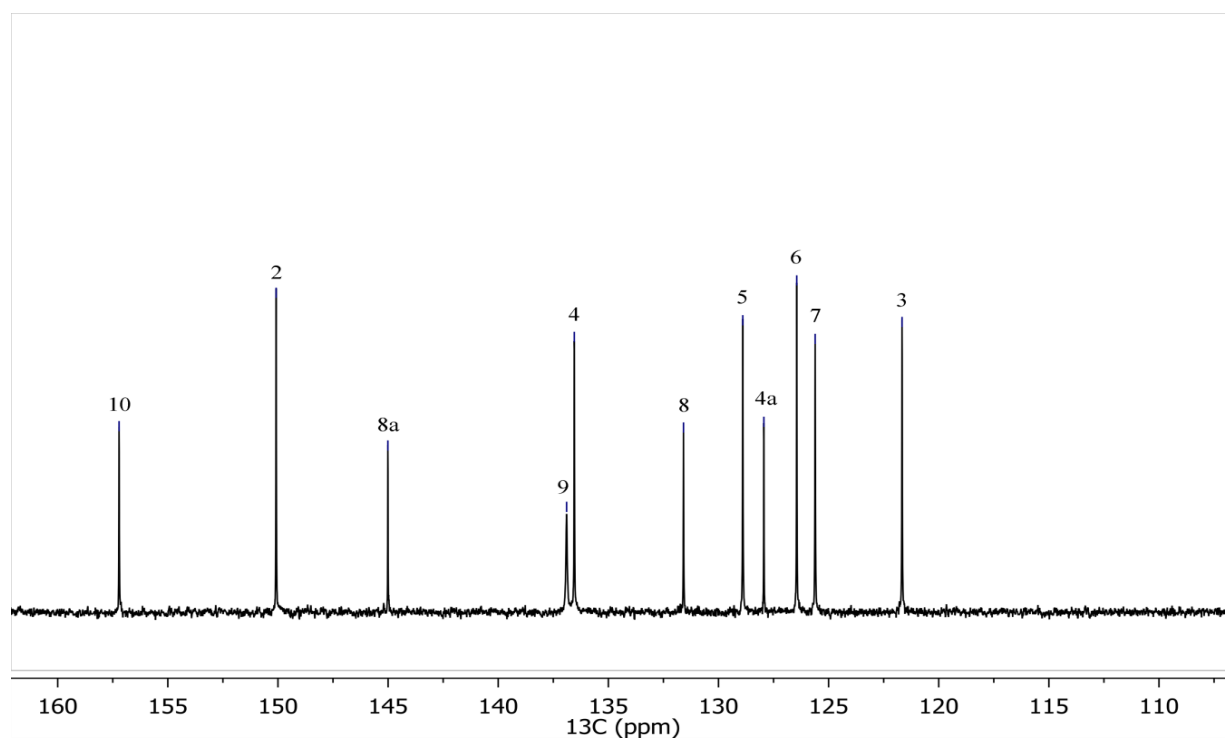
Tabela P7.A 10 Eksperimentalni i teorijski ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) podaci ***h*-TUK** na bazi hinolina

δ	<i>mhTUK</i> _(8qc)		<i>dhTUK</i> _(8qc)		<i>mhTUK</i> _(2qc)		<i>dhTUK</i> _(2qc)		<i>mhTUK</i> _(8OH2qc)		<i>dhTUK</i> _(8OH2qc)	
	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.	Eksp.	Izr.
2	150,29	150,67	150,34	150,999	153,68	151,86	153,96	152,12	151,95	149,01	151,60	149,48
3	121,75	120,65	121,85	120,87	118,00	115,55	118,72	116,21	118,65	116,73	118,62	117,40
4	136,59	137,69	136,65	137,64	135,89	137,77	136,98	137,61	136,03	137,77	136,48	137,67
4a	127,94	125,87	128,01	125,91	127,46	126,00	128,23	126,03	128,71	126,91	128,90	126,92
5	129,59	131,14	129,99	131,07	127,57	127,45	128,37	127,33	117,71	114,87	117,87	114,75
6	126,40	125,19	126,48	125,21	126,75	127,23	127,75	127,27	127,97	129,71	128,38	129,63
7	126,33	125,44	126,67	125,96	129,57	129,45	130,47	129,73	112,00	107,03	112,24	107,33
8	131,21	128,45	131,46	129,06	128,40	129,37	129,21	129,42	153,36	152,71	153,44	152,73
8a	145,30	143,83	140,36	144,00	146,97	145,88	147,70	145,96	138,10	149,01	138,20	134,62
9	138,97	139,68	145,40	144,54	141,98	143,57	149,59	149,27	142,16	142,25	149,17	148,00
10	175,96	182,06	175,21	176,64	175,37	182,93	175,97	177,68	175,72	182,83	175,61	177,76
11			140,48	140,21			144,46	144,71			143,85	143,58
12			130,97	127,99			152,03	151,21			151,60	148,40
12a			140,30	144,16								
13			125,98	125,97			118,41	115,83			118,62	117,00
14			126,48	125,18			136,98	138,02			136,48	138,05
14a							128,23	125,99			128,90	126,99
15			129,99	131,91			128,37	127,59			117,87	115,10
15a			128,01	125,58								
16			136,65	138,00			127,75	126,97			128,38	129,43
17			121,85	120,27			130,47	129,70			112,24	107,24
18			150,34	150,94			129,21	129,45			153,44	152,68
18a							147,70	145,93			138,20	134,75

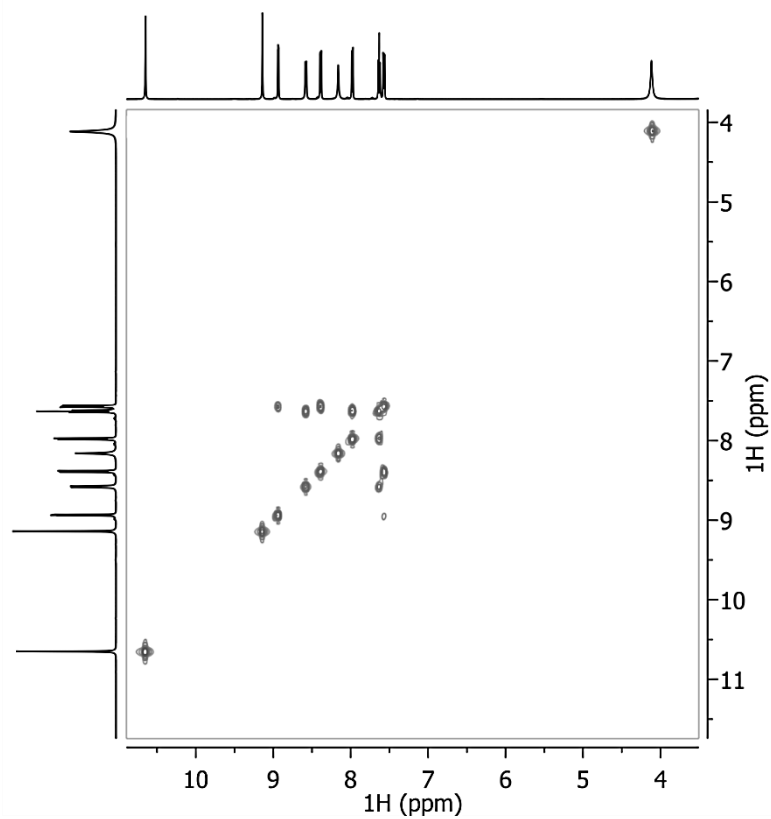
Prilog 7. B NMR spektri



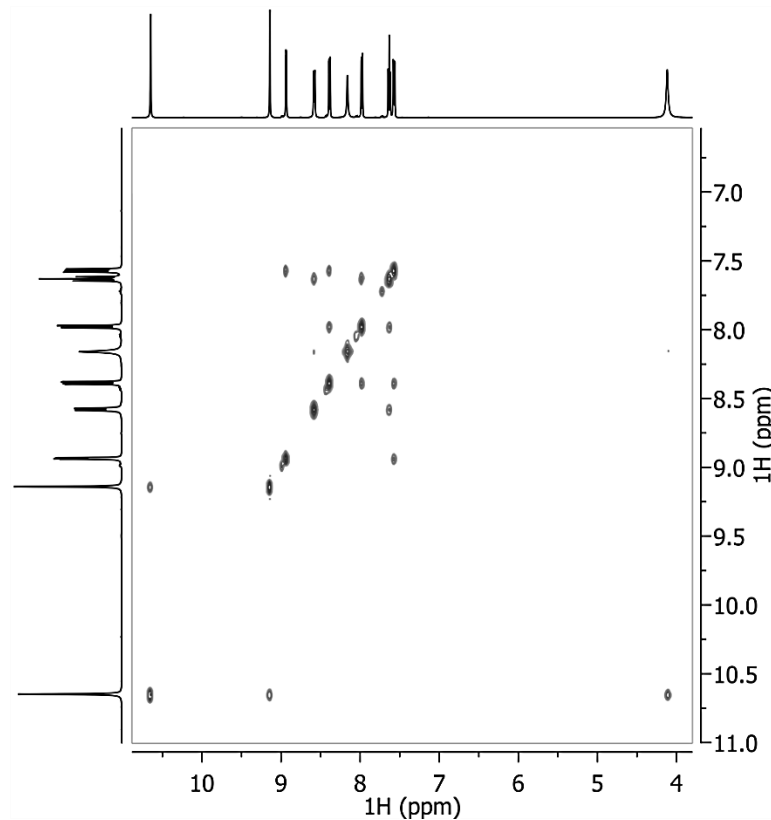
Prilog 7.B 1 ^1H NMR spektar $mhUK_{(8qc)}$ u $\text{DMSO-}d_6$



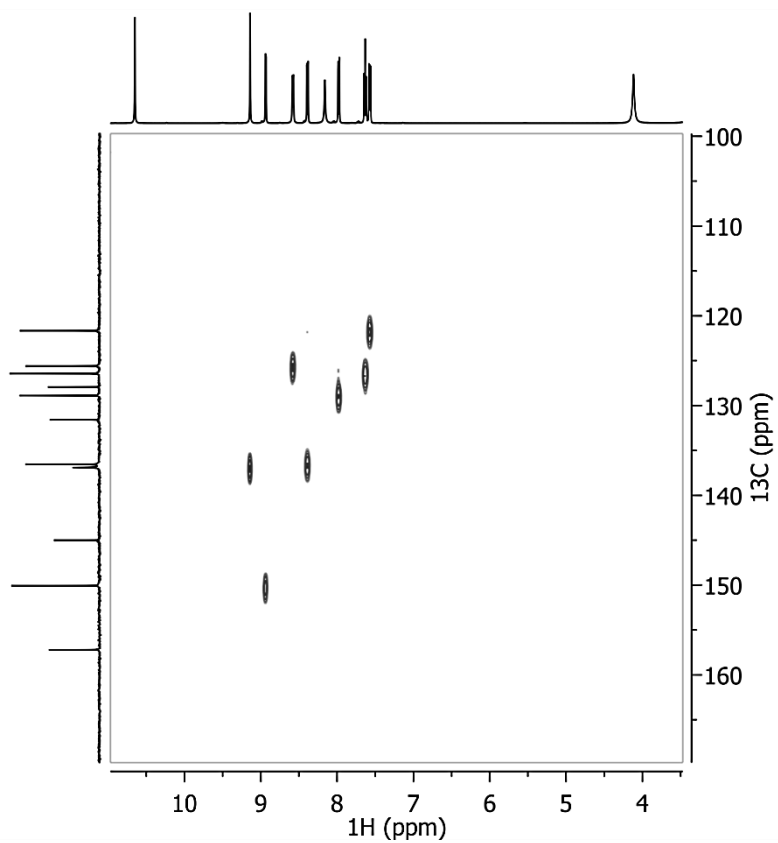
Prilog 7.B 2 ^{13}C NMR spektar $mhUK_{(8qc)}$ u $\text{DMSO-}d_6$



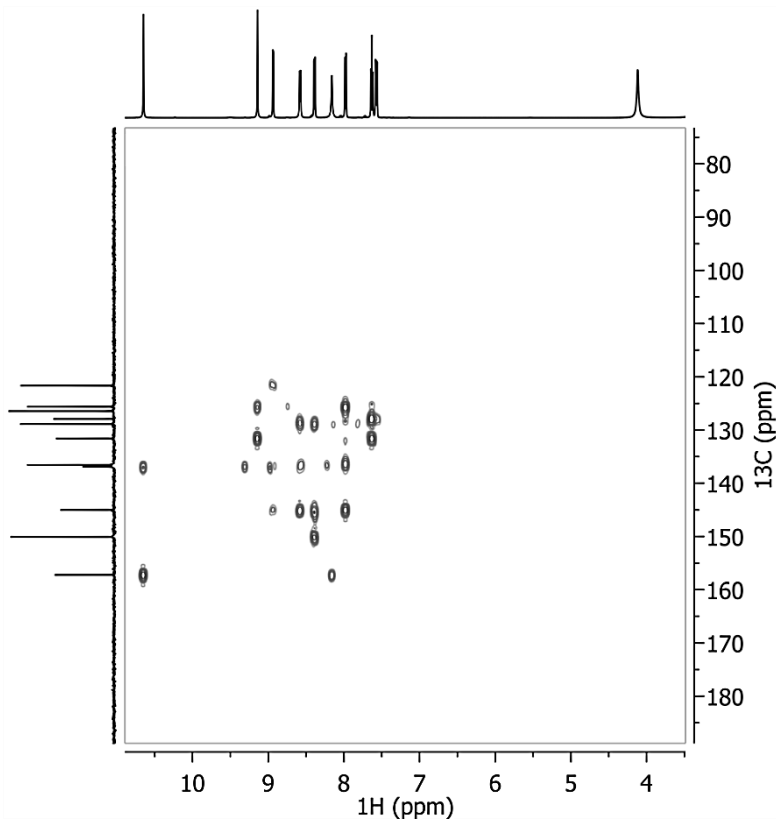
Prilog 7.B 3 COSY spektar *mhUK*_(8qc)



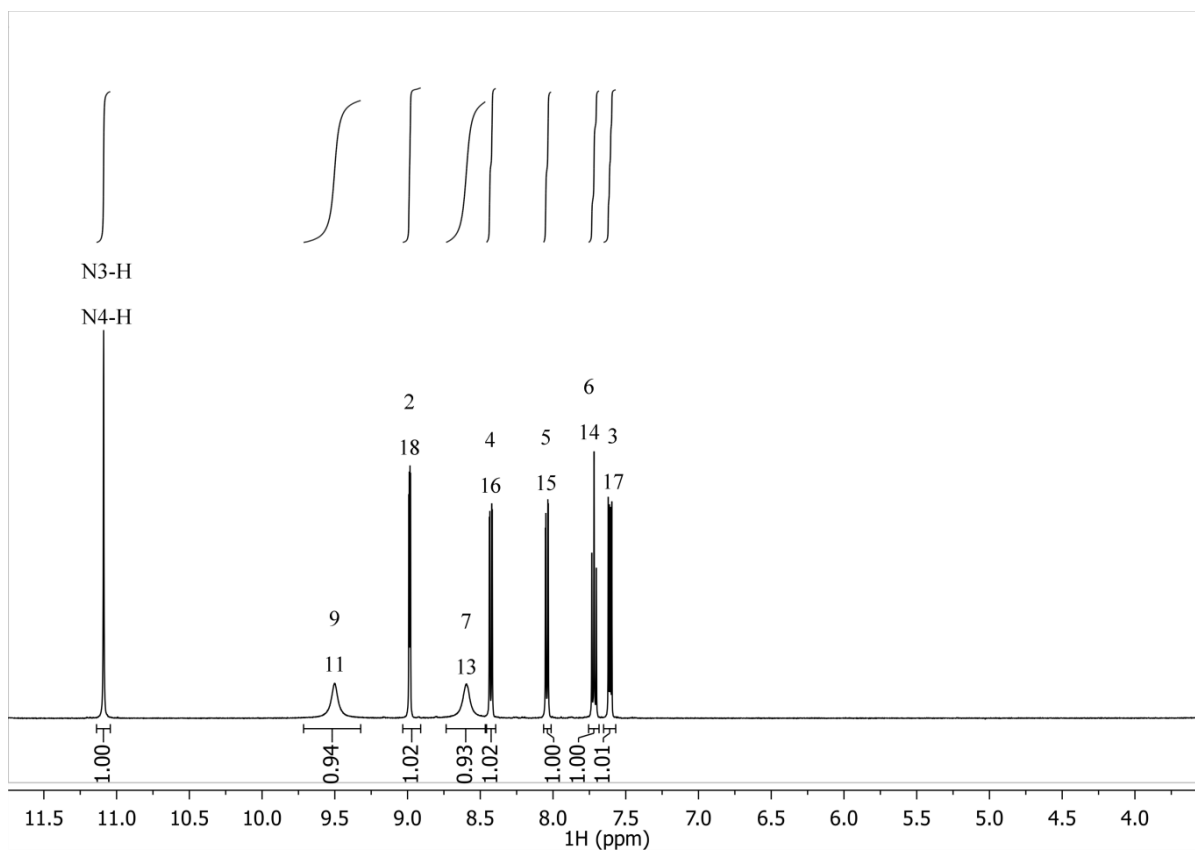
Prilog 7.B 4 NOESY spektar *mhUK*_(8qc)



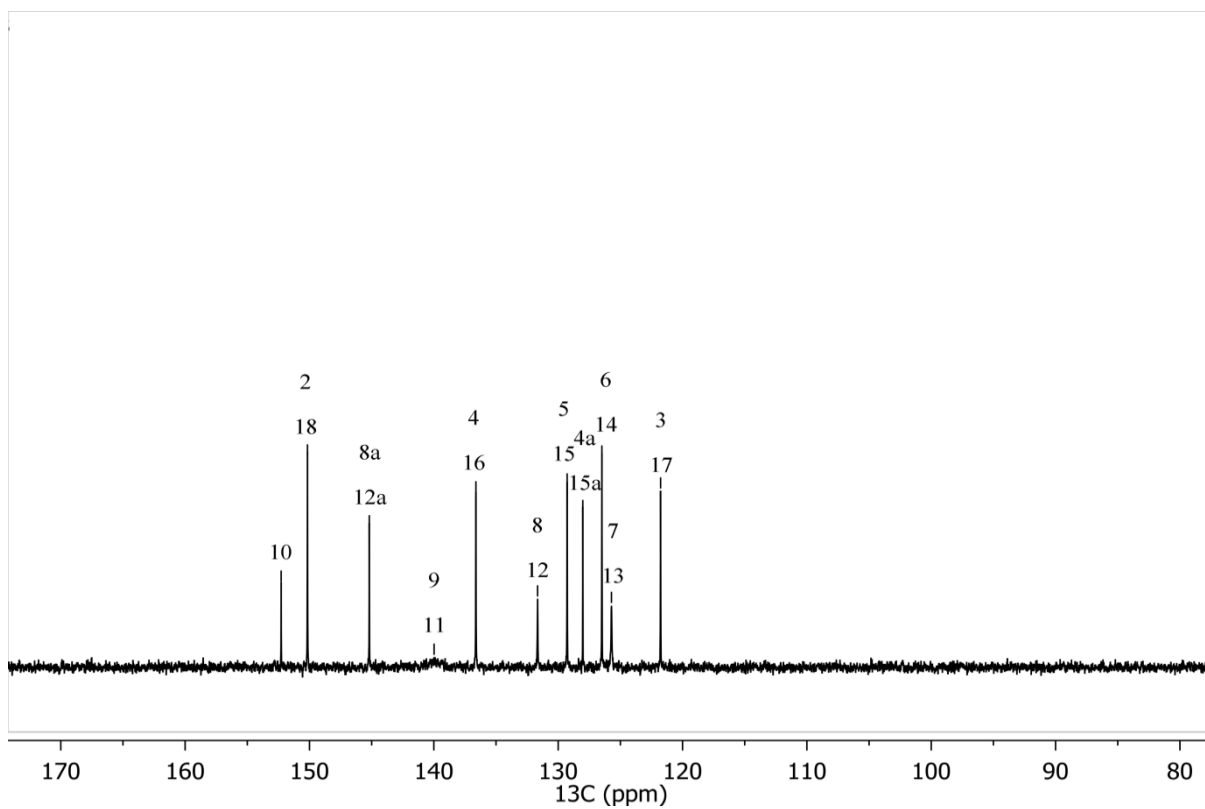
Prilog 7.B 5 ^1H - ^{13}C HSQC NMR spektar **10_{mO} mhUK(8qc)**



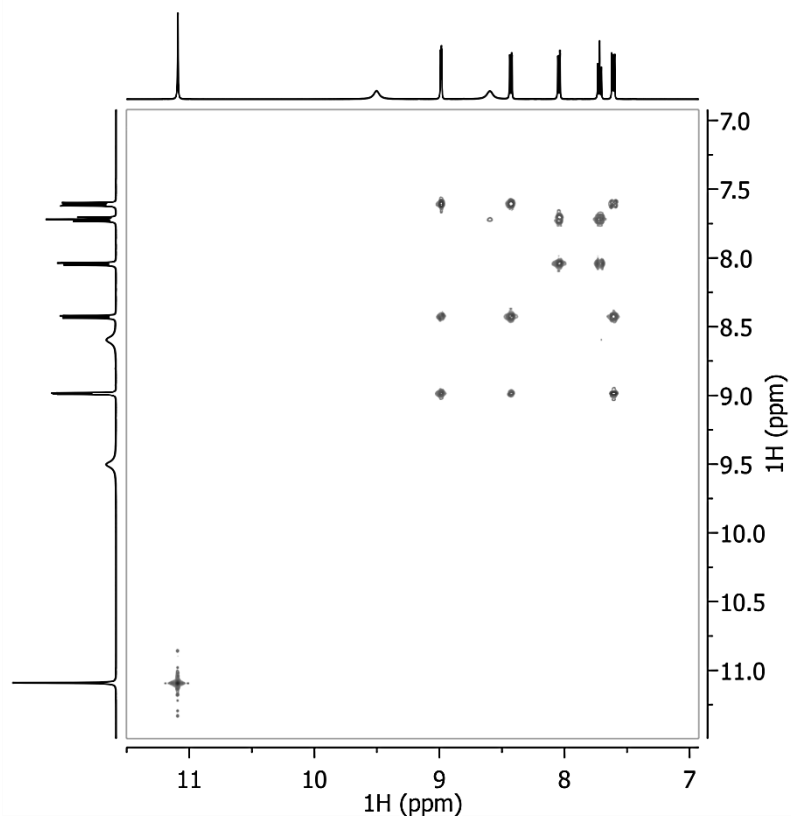
Prilog 7.B 6 ^1H - ^{13}C HMBC speltar **mhUK(8qc)**



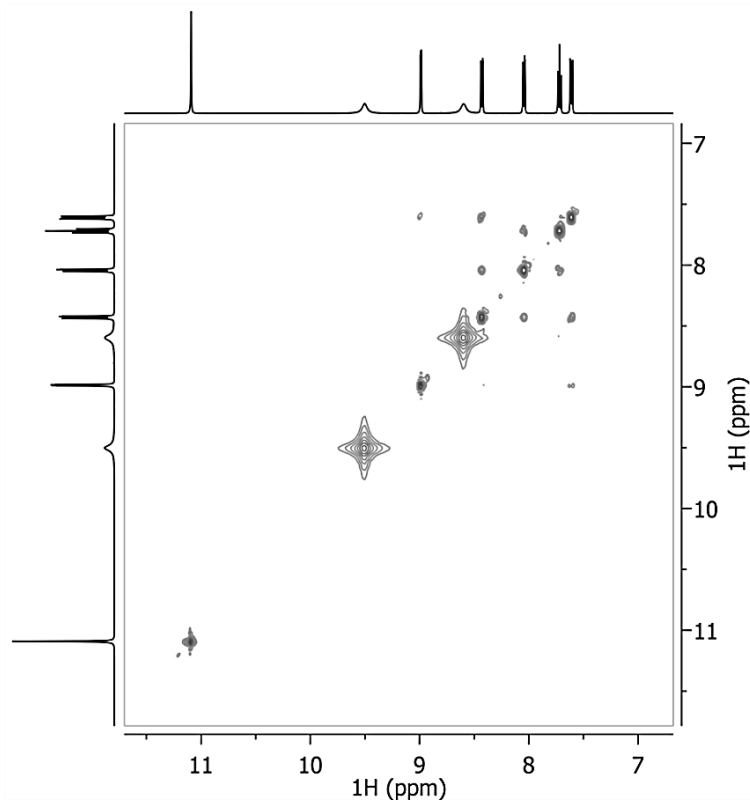
Prilog 7.B 7 ¹H NMR spektar *dhUK*_(8qc) u DMSO-*d*₆



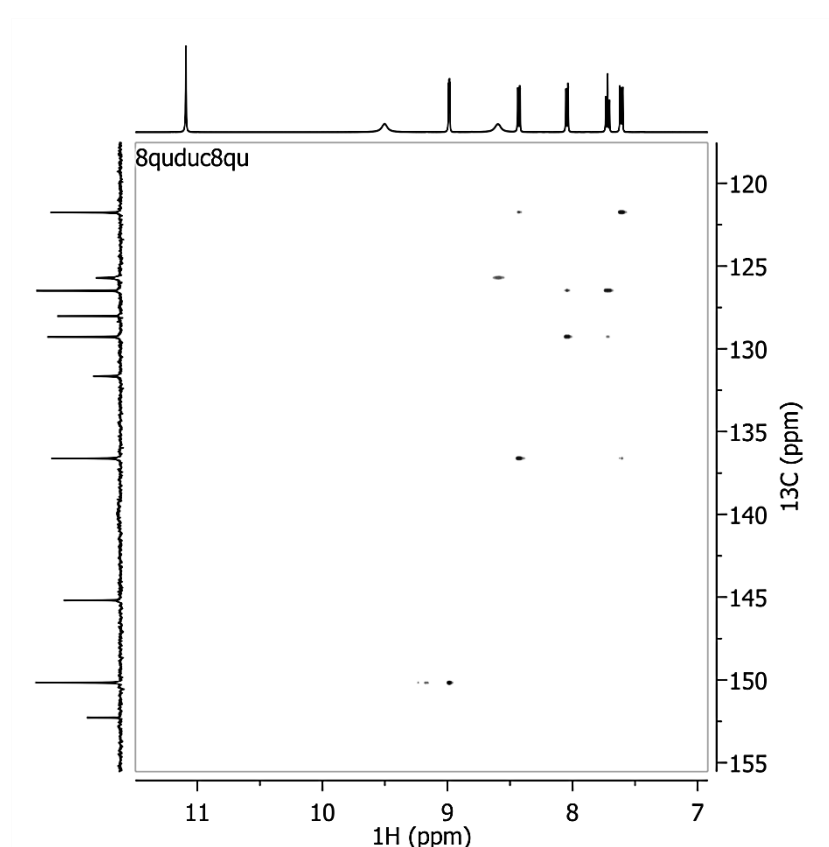
Prilog 7.B 8 ¹³C NMR spektar *dhUK*_(8qc) in DMSO-*d*₆



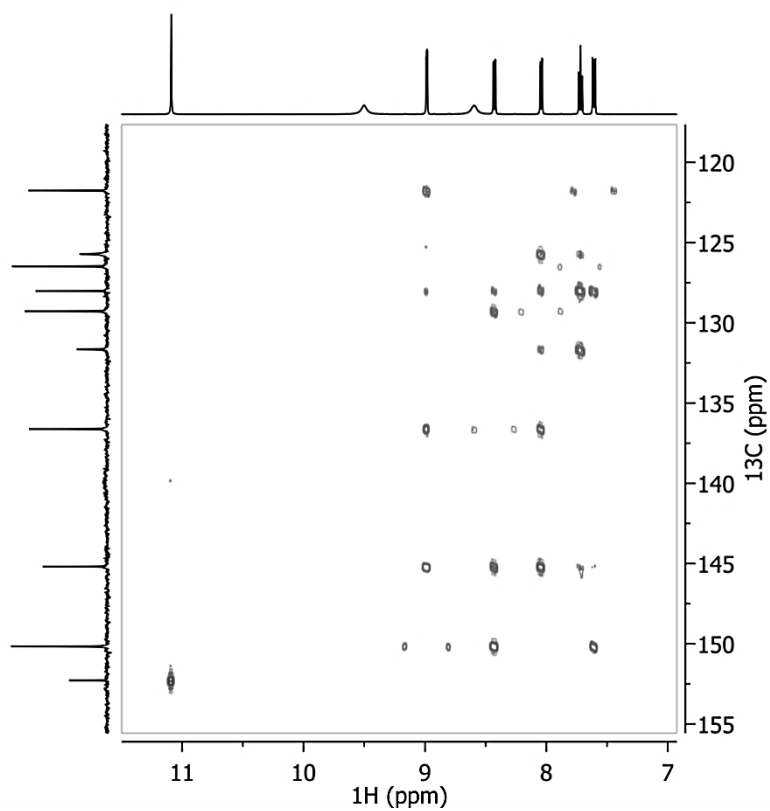
Prilog 7.B 9 COSY spektar *dhUK*_(8qc)



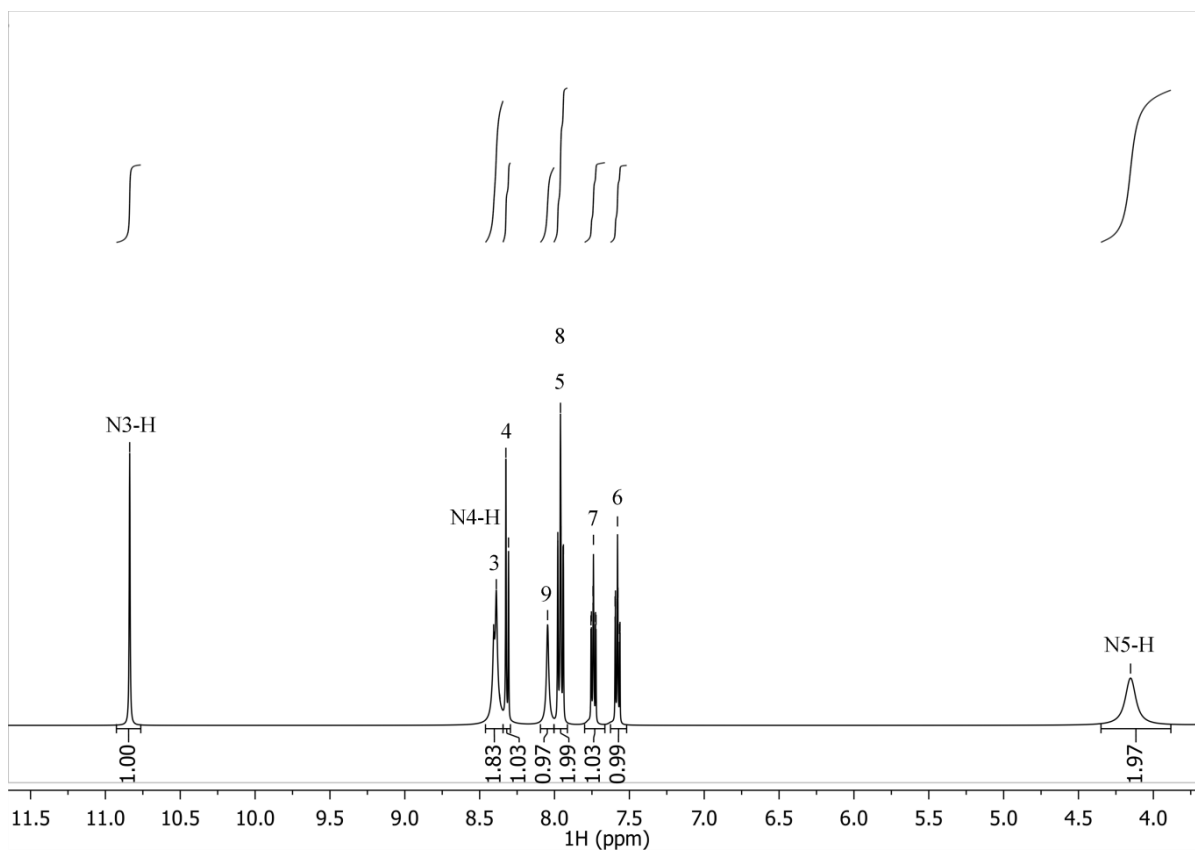
Prilog 7.B 10 NOESY spektar *dhUK*_(8qc)



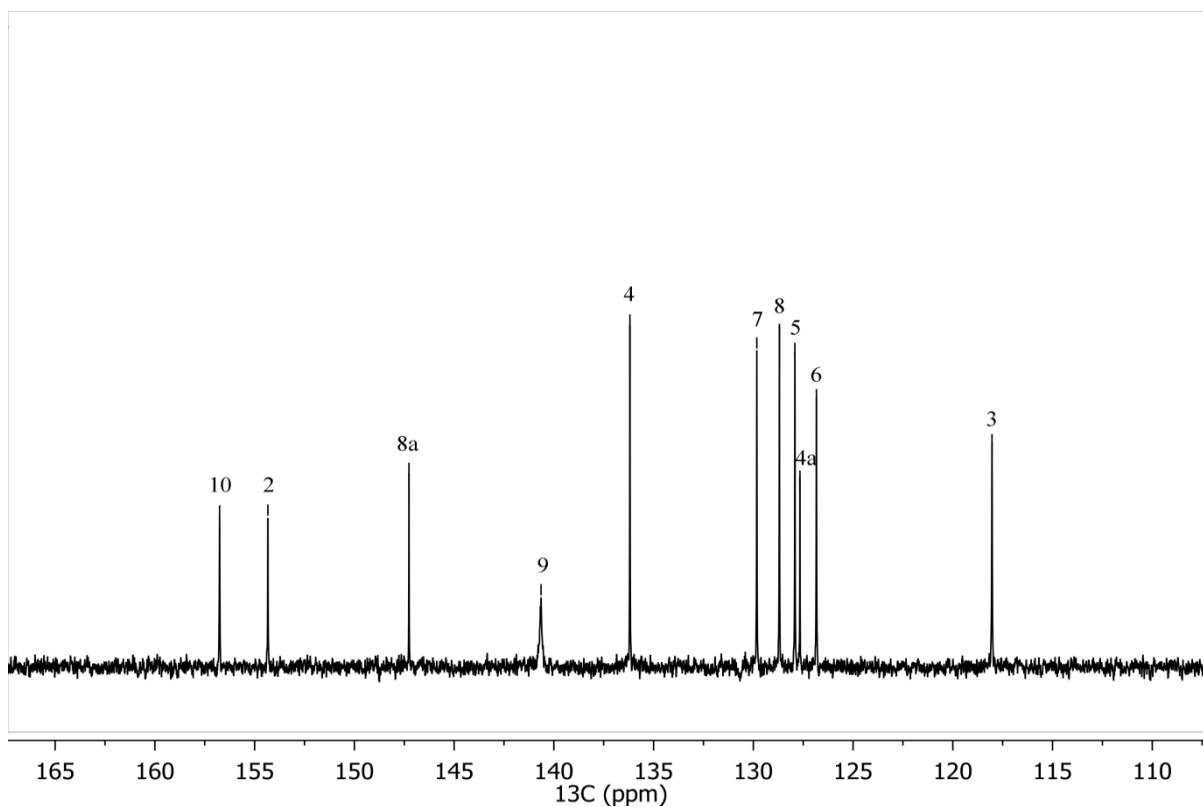
Prilog 7.B 11 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *dhUK*_(8qc)



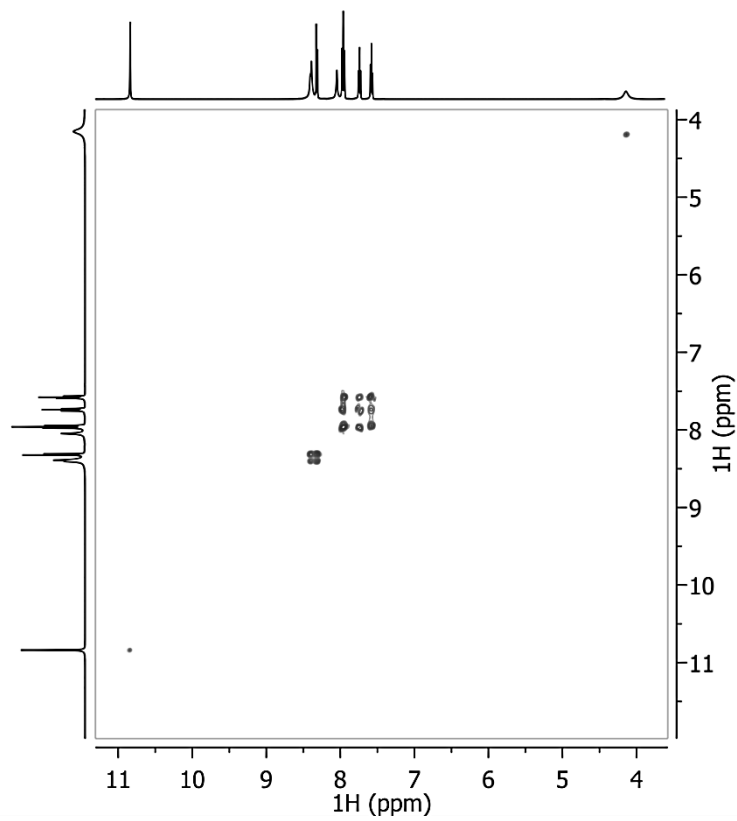
Prilog 7.B 12 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *dhUK*_(8qc)



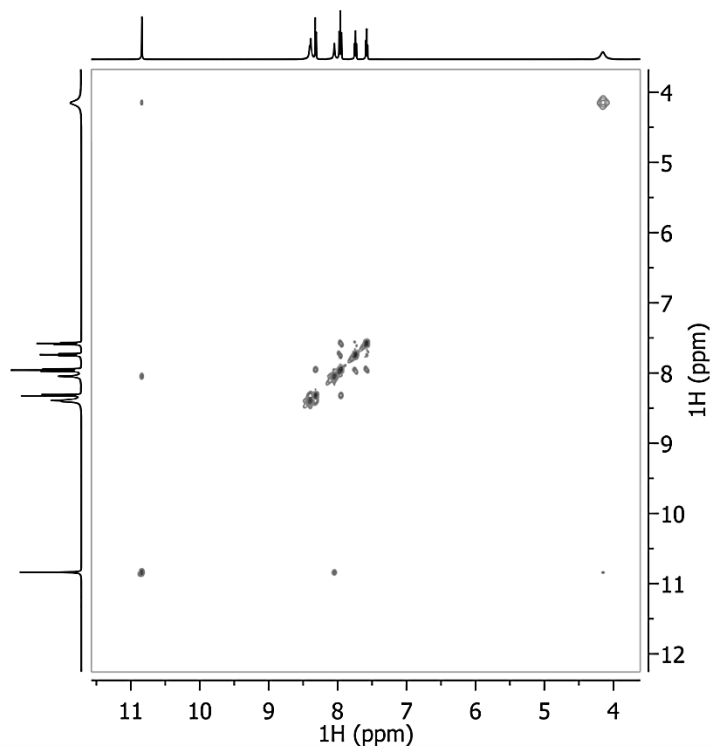
Prilog 7.B 13 ^1H NMR spektar *mhUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



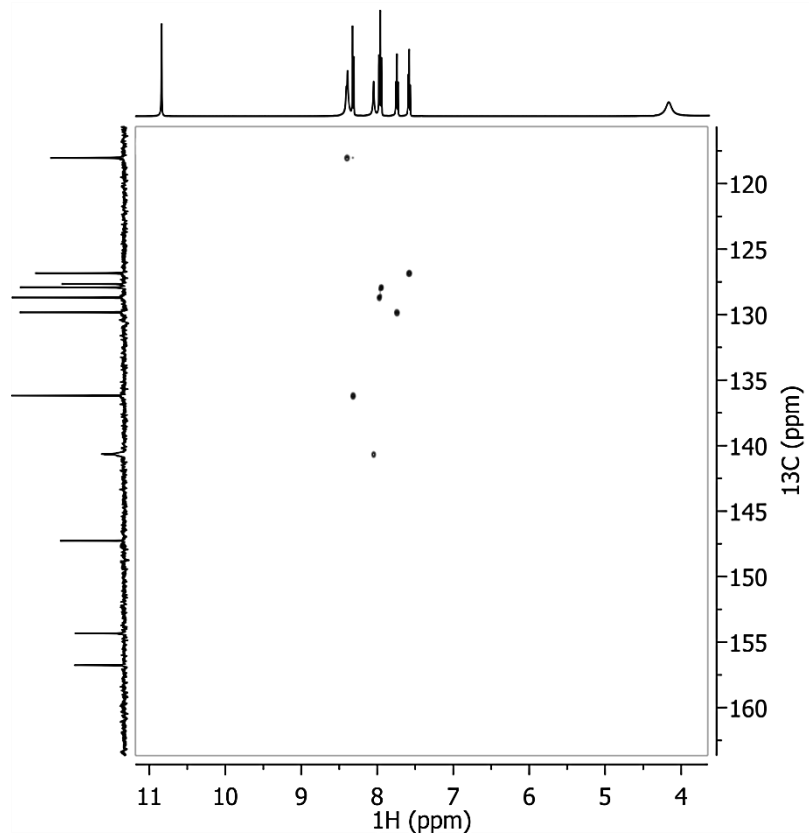
Prilog 7.B 14 ^{13}C NMR spektar *mhUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



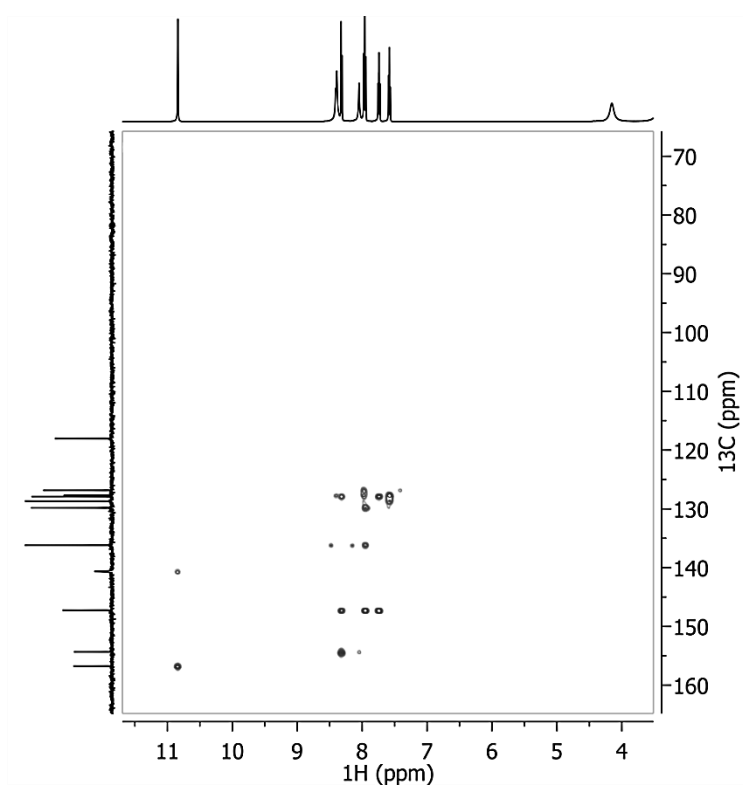
Prilog 7.B 15 COSY spektar *mhUK*_(2qc)



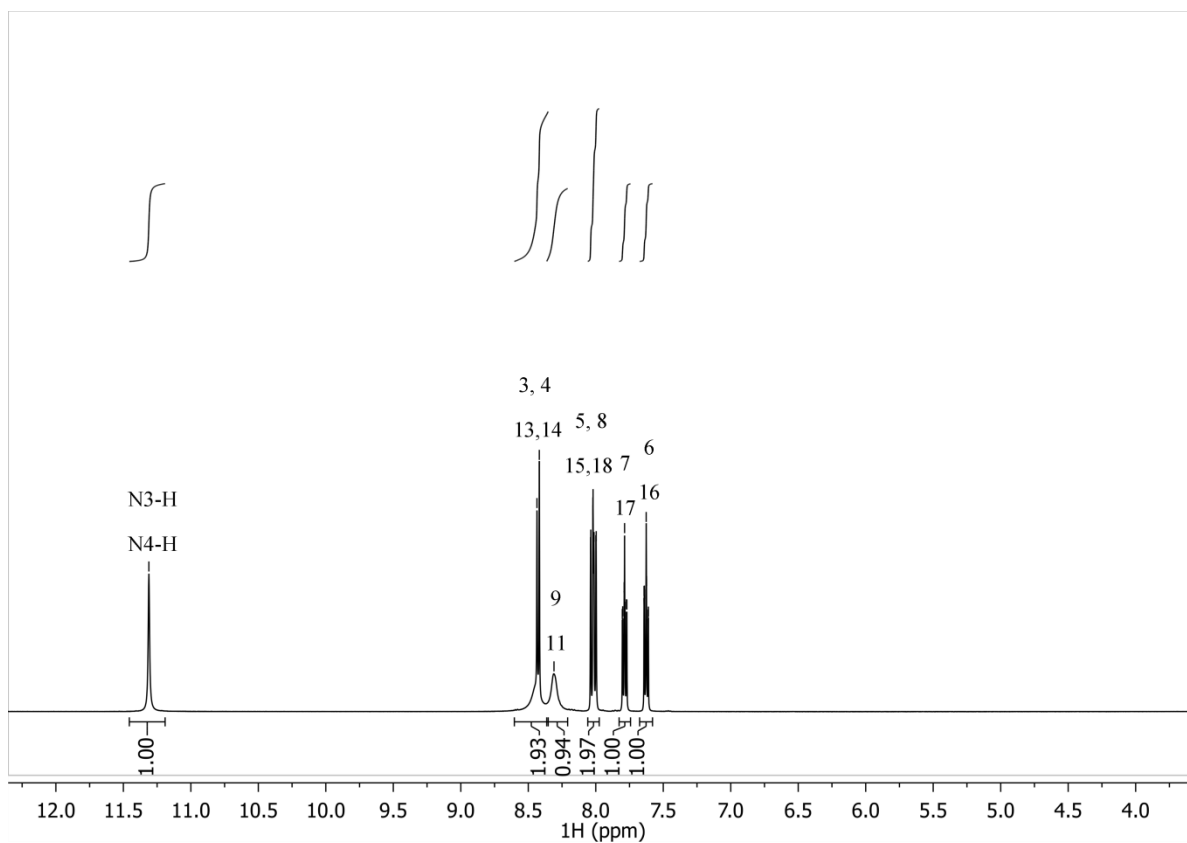
Prilog 7.B 16 NOESY spektar *mhUK*_(2qc)



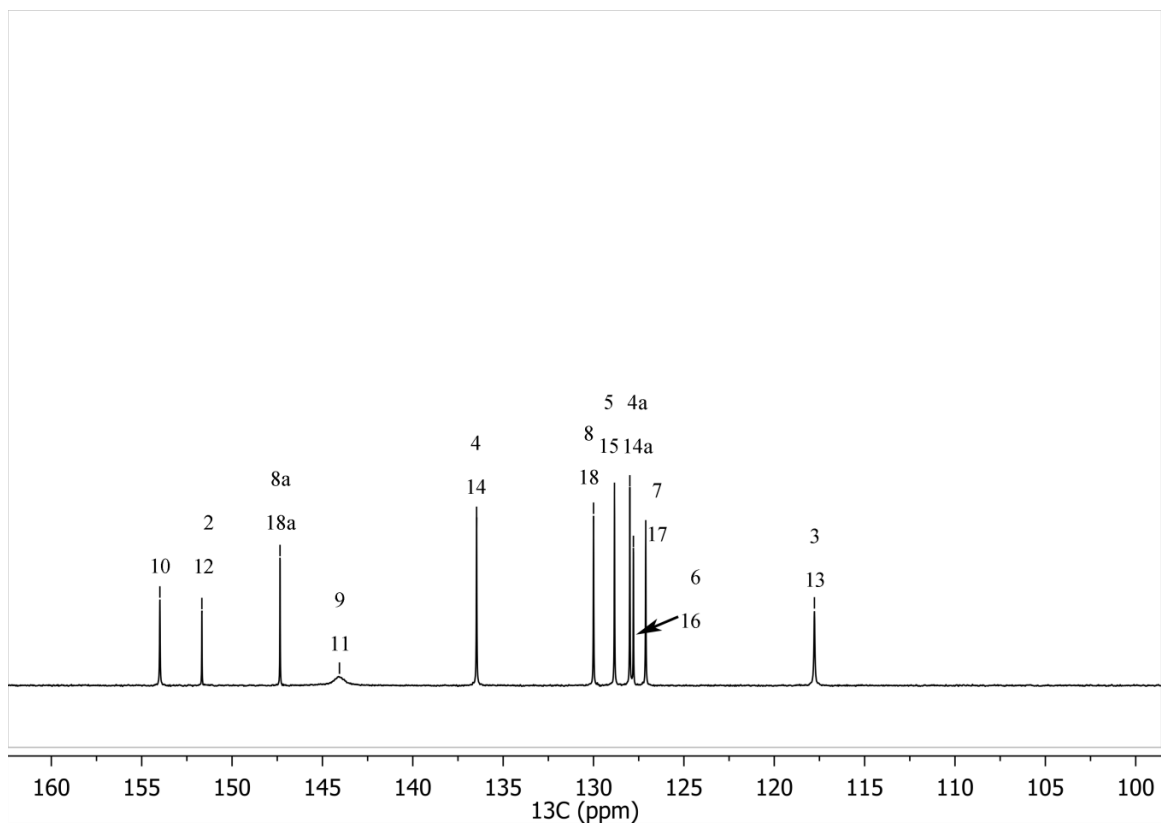
Prilog 7.B 17 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *mhUK*_(2qc)



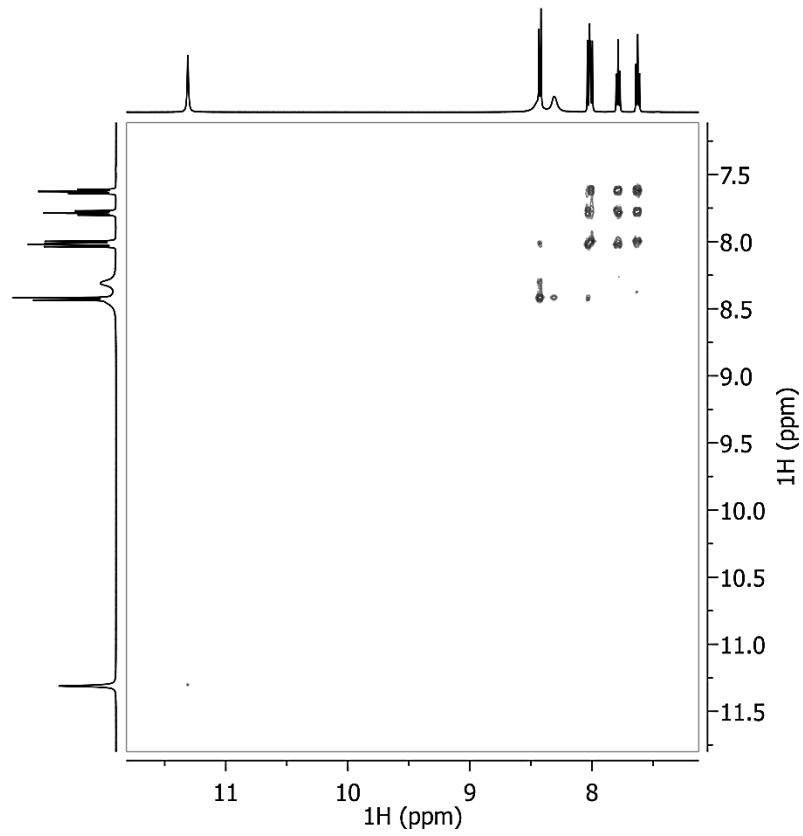
Prilog 7.B 18 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *mhUK*_(2qc)



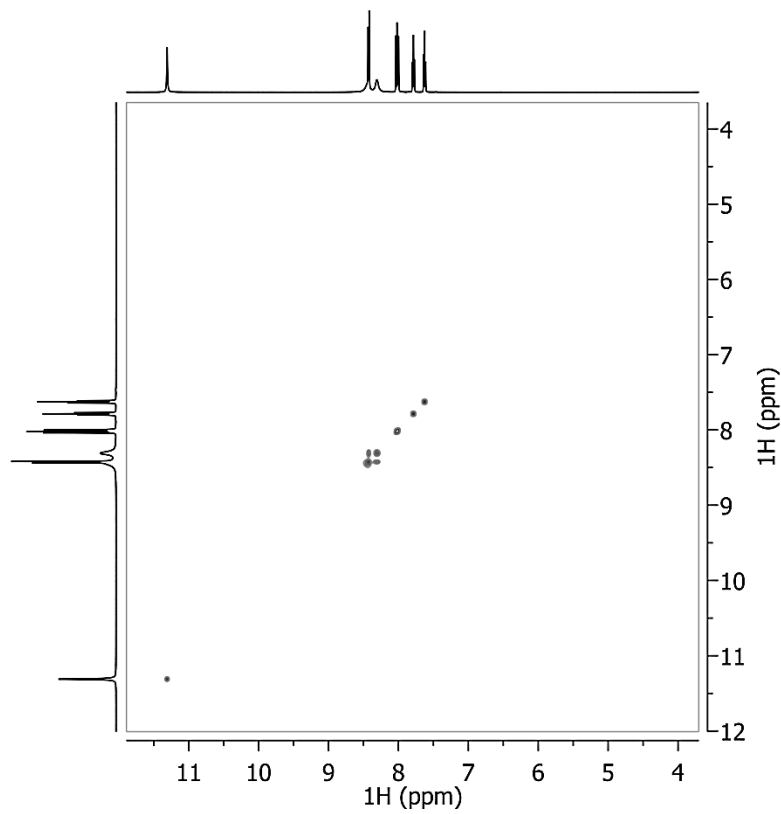
Prilog 7.B 19 ^1H NMR spektar *dhUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



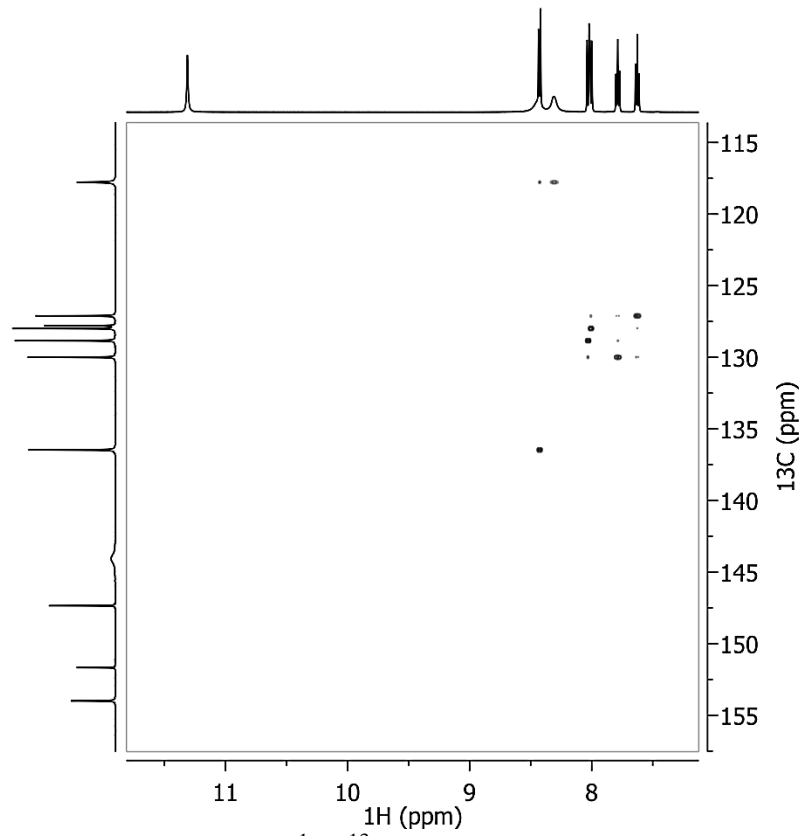
Prilog 7.B 20 ^{13}C NMR spektar *dhUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



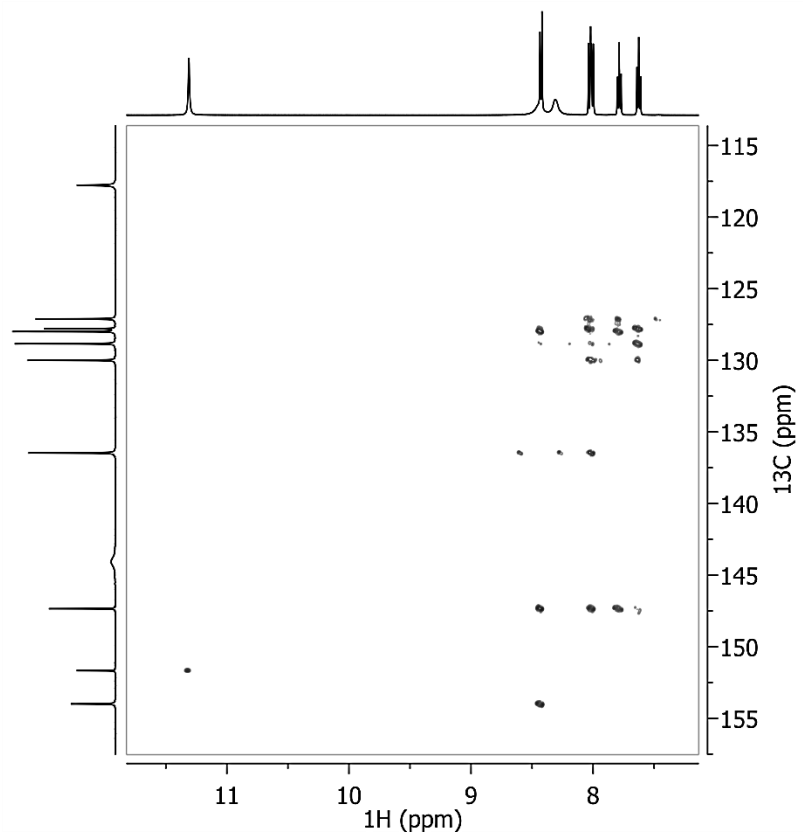
Prilog 7.B 21 COSY spektar *dhUK*(2qc)



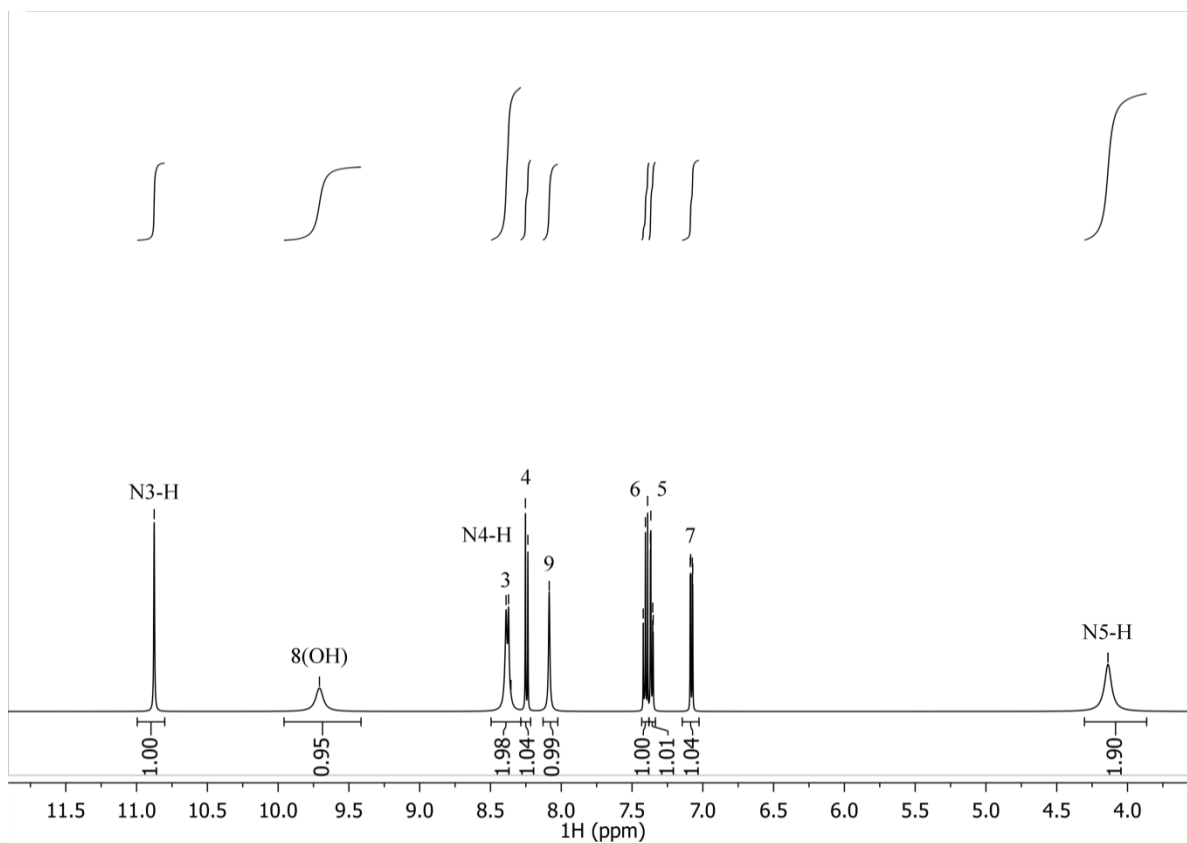
Prilog 7.B 22 NOESY spektar *dhUK*(2qc)



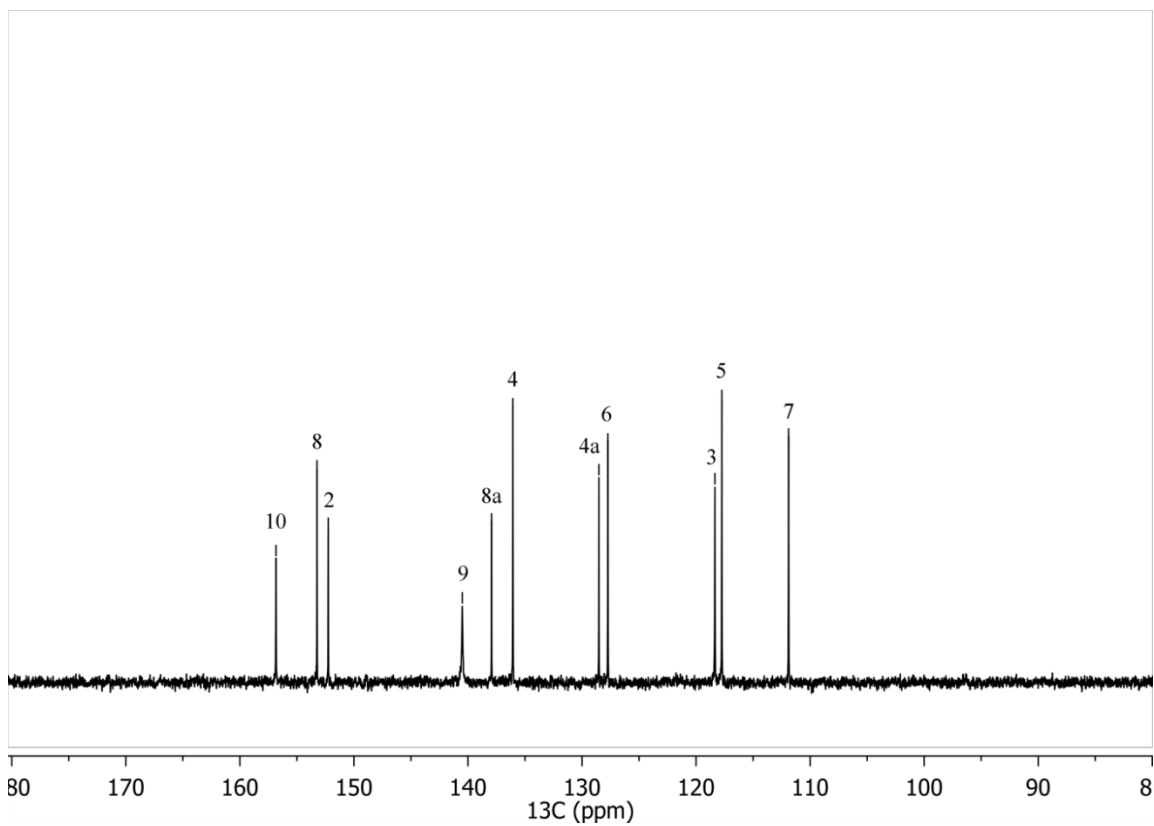
Prilog 7.B 23 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *dhUK*_(2qc)



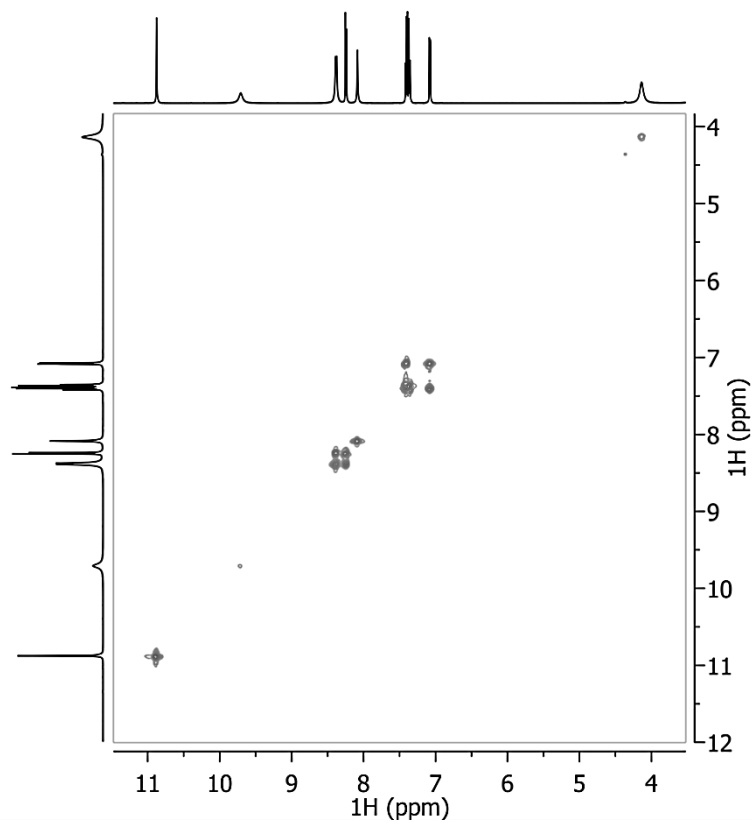
Prilog 7.B 24 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *dhUK*_(2qc)



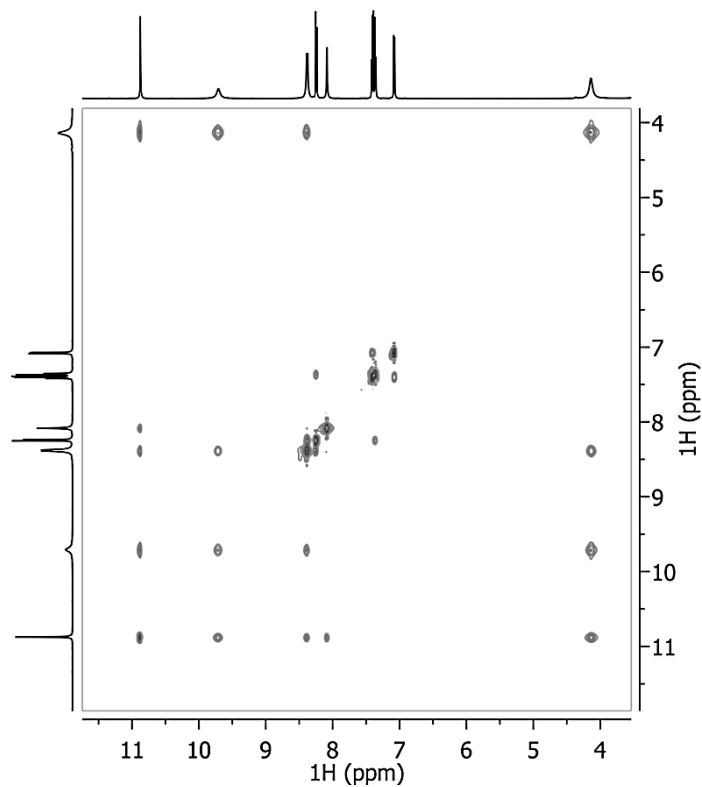
Prilog 7.B 25 ^1H NMR spektar *mhUK*_(8OH2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



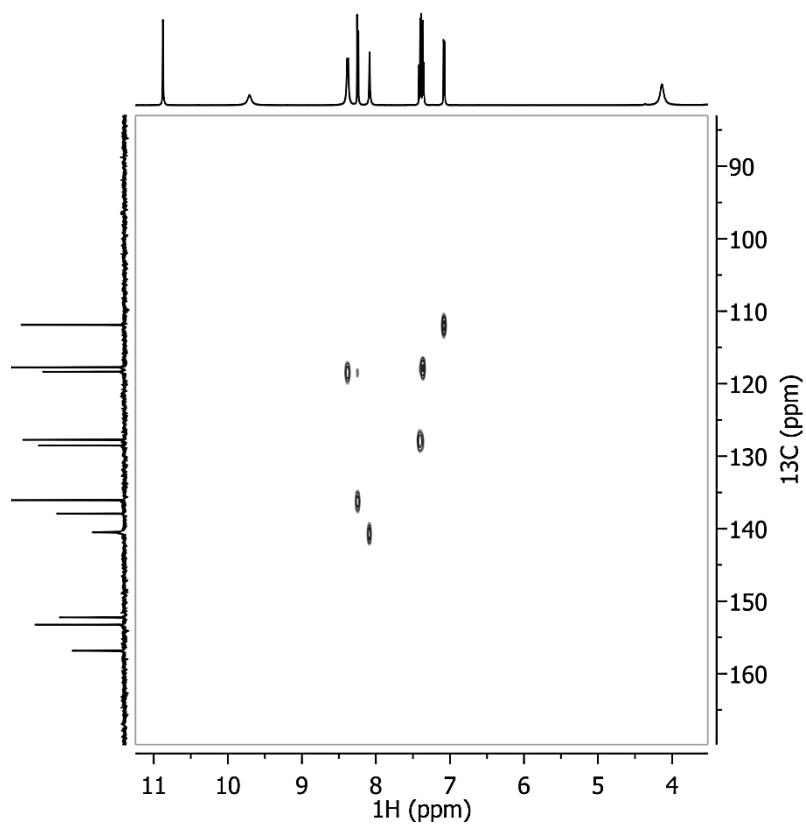
Prilog 7.B 26 ^{13}C NMR spektar *mhUK*_(8OH2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



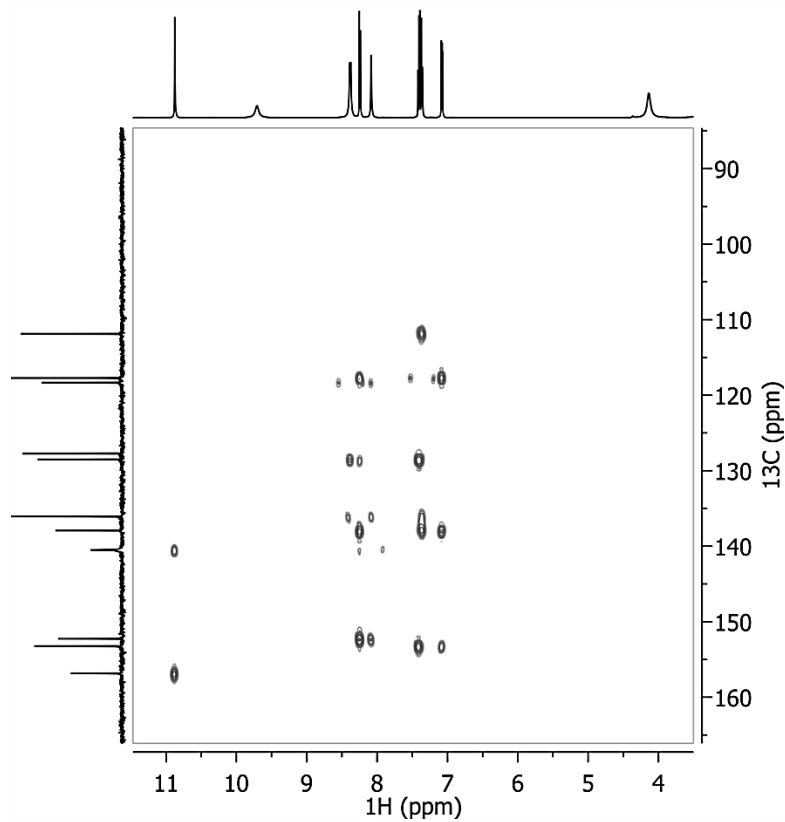
Prilog 7.B 27 COSY spektar *mhUK*_(8OH2qc)



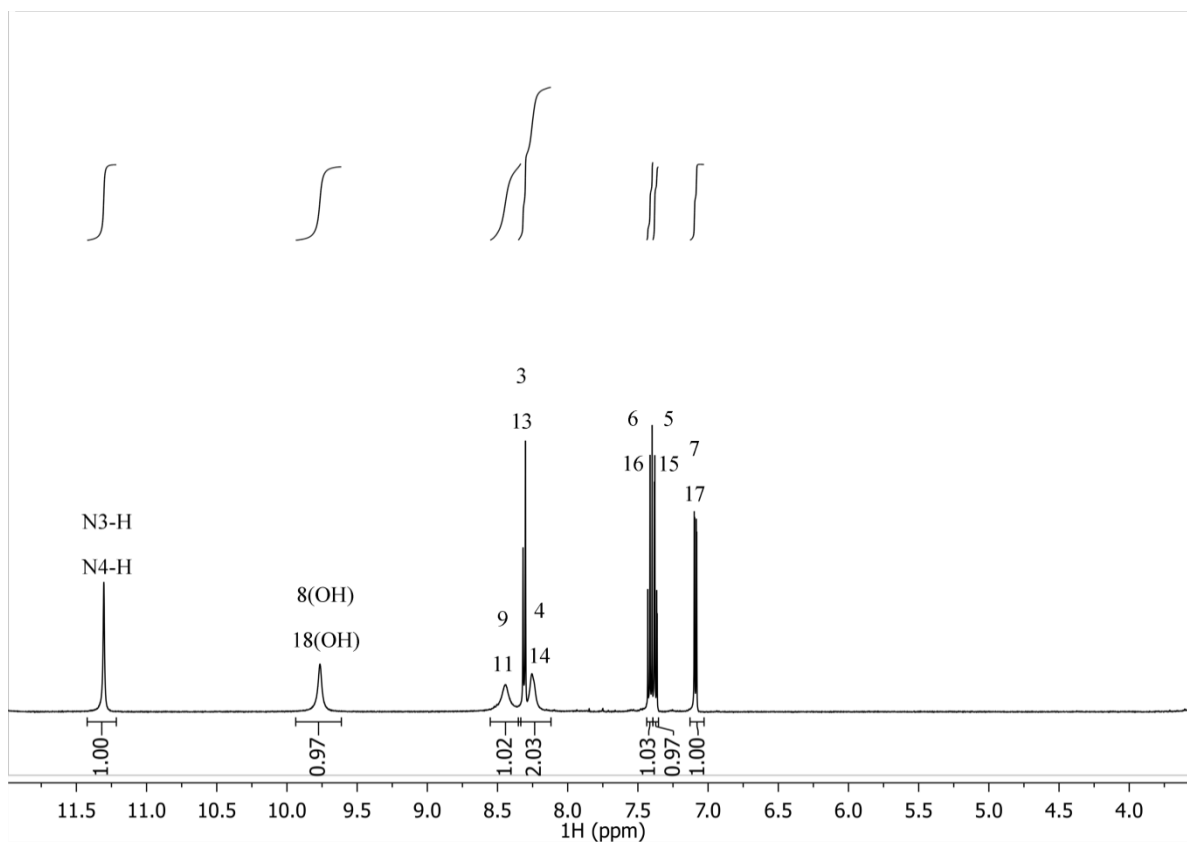
Prilog 7.B 28 NOESY spektar *mhUK*_(8OH2qc)



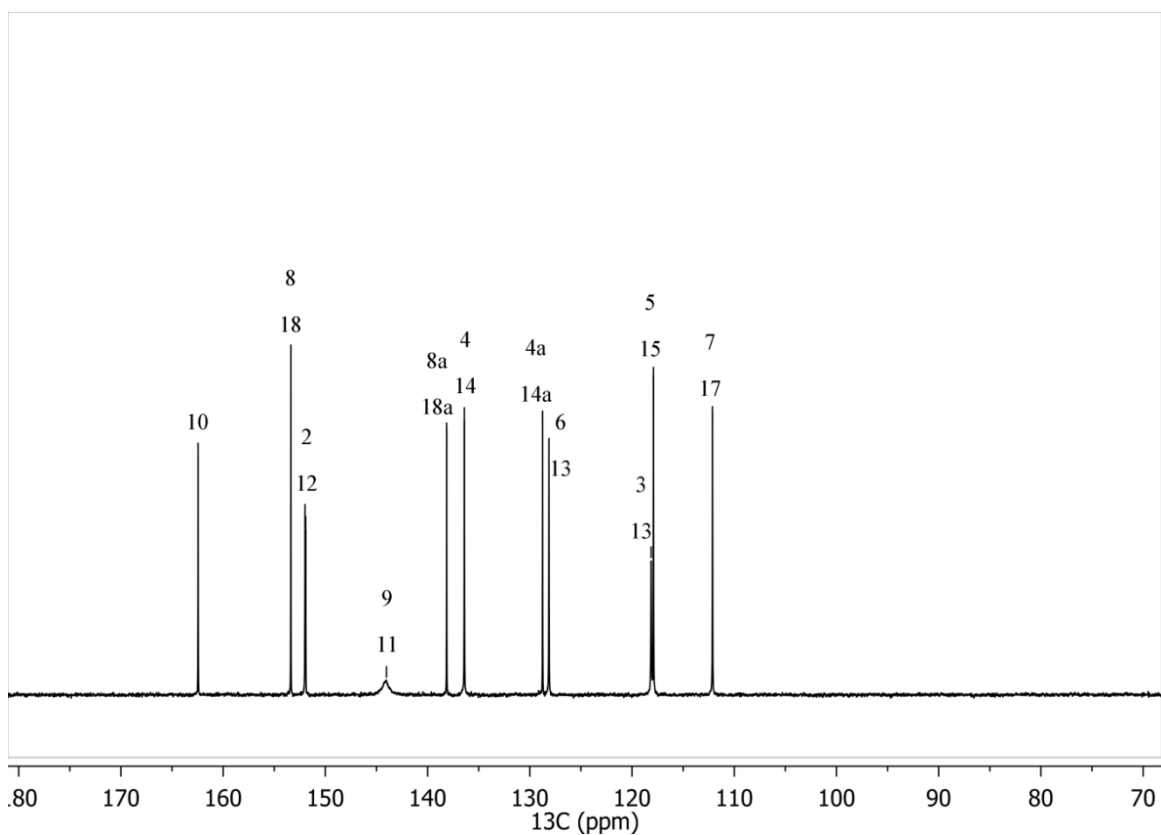
Prilog 7.B 29 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *mhUK*_(8OH2qc)



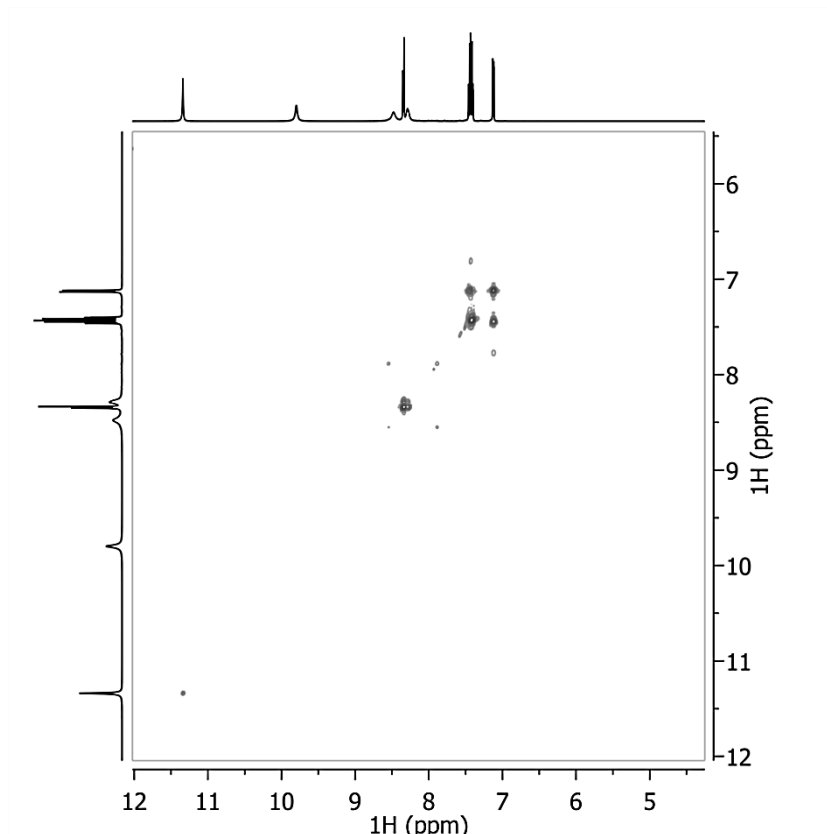
Prilog 7.B 30 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *mhUK*_(8OH2qc)



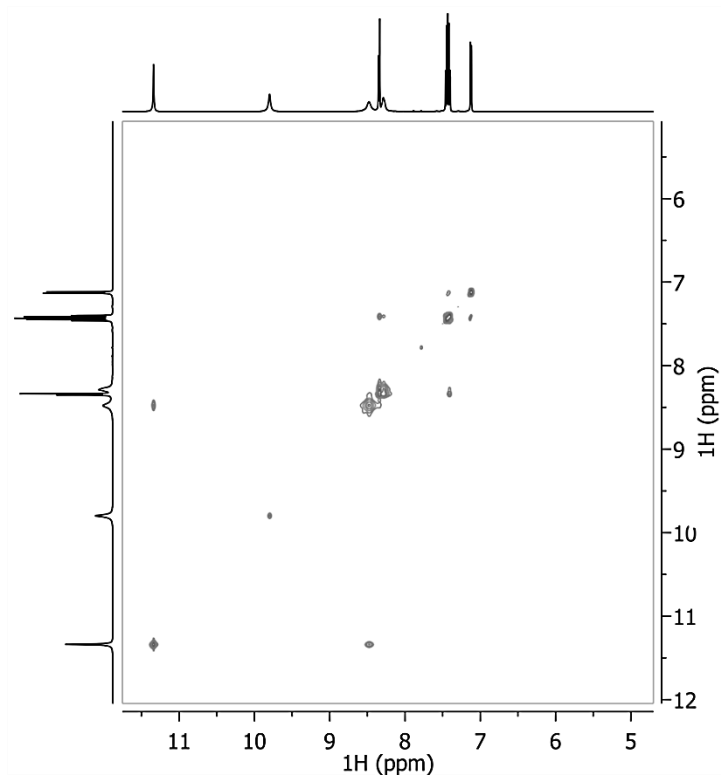
Prilog 7.B 31 ^1H NMR spektar *dhUK*_(8OH_{2qc}) u $\text{DMSO-}d_6$



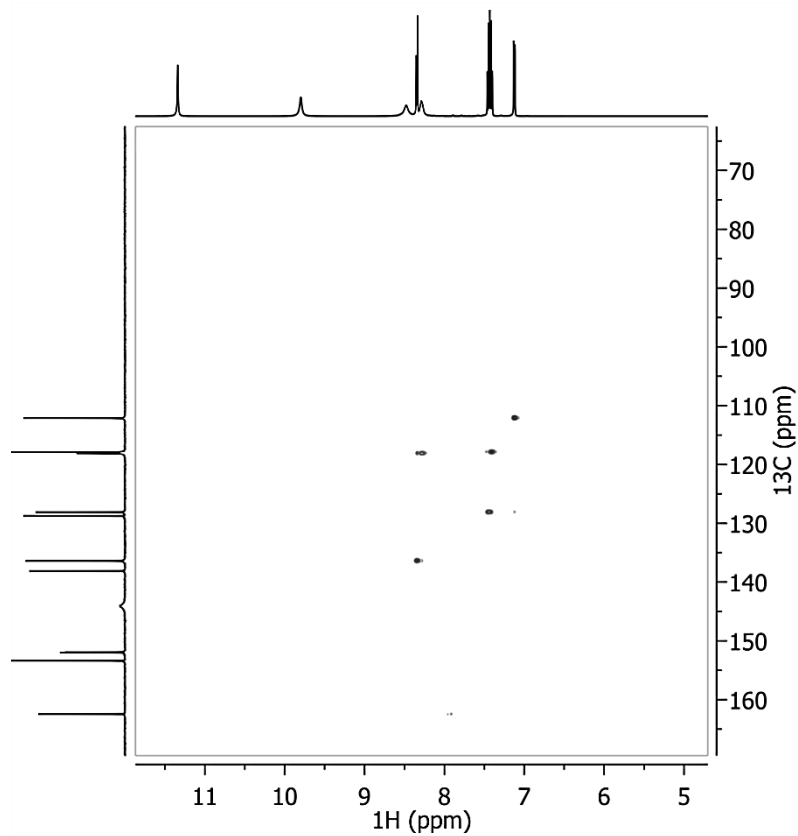
Prilog 7.B 32 ^{13}C NMR spektar *dhUK*_(8OH_{2qc}) u $\text{DMSO-}d_6$



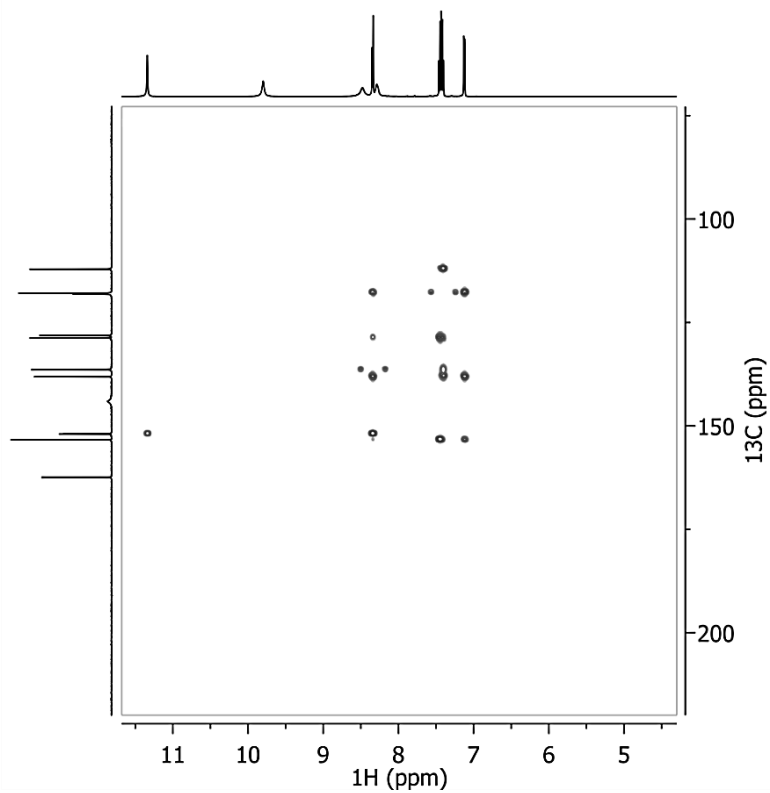
Prilog 7.B 33 COSY spektar *dhUK*(8OH2qc)



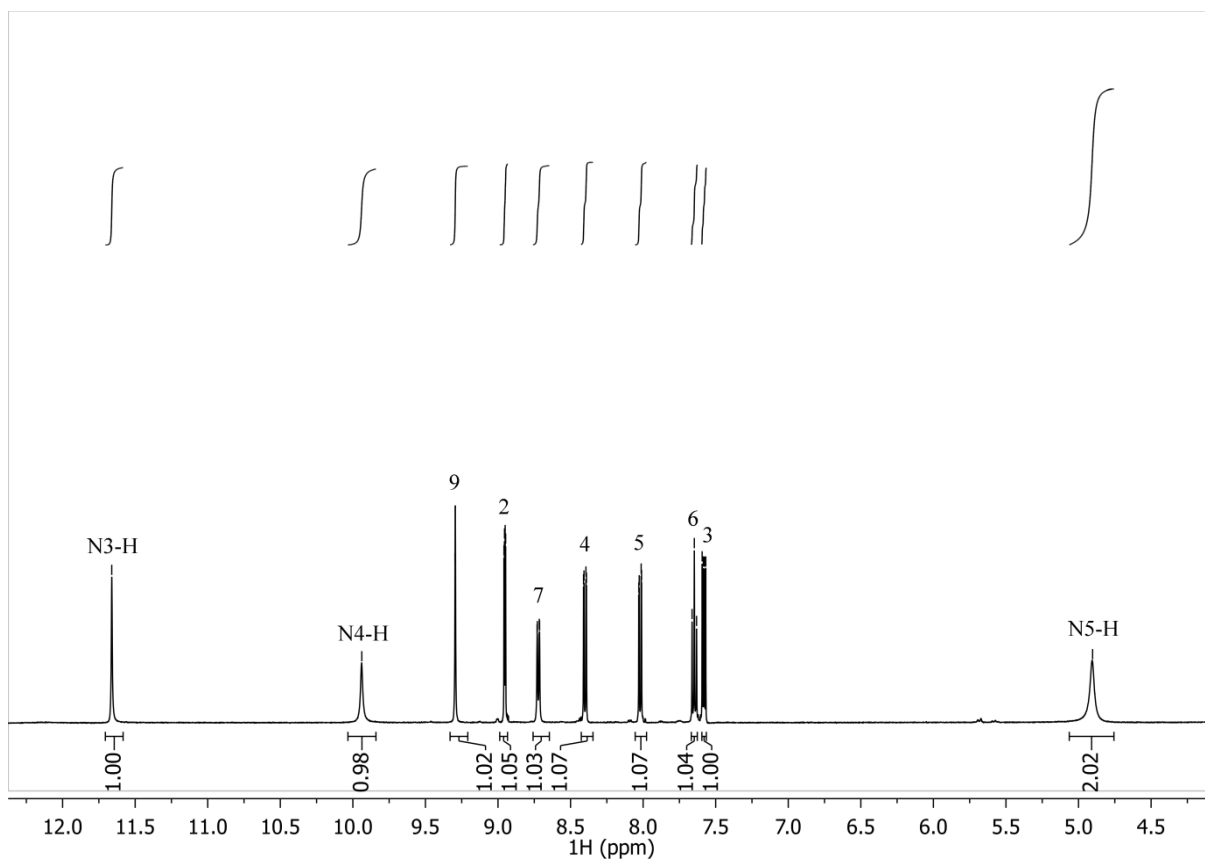
Prilog 7.B 34 NOESY spektar *dhUK*(8OH2qc)



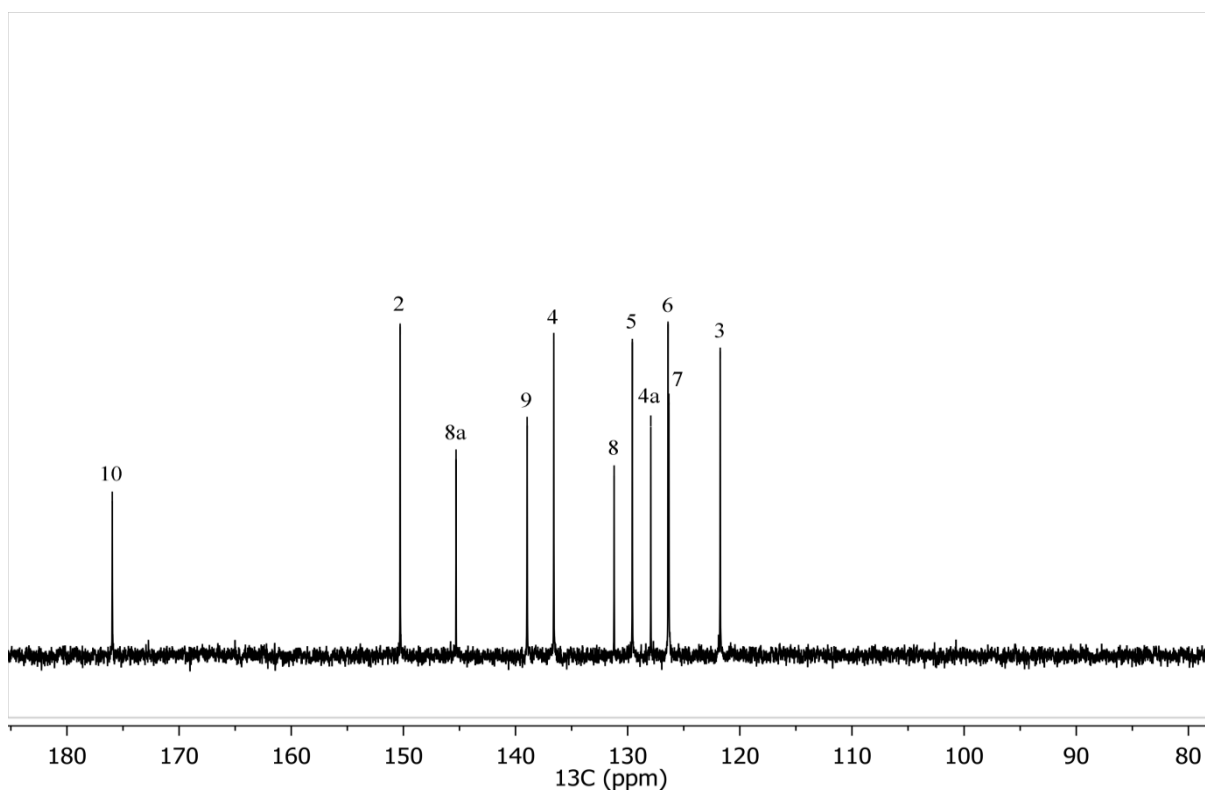
Prilog 7.B 35 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *dhUK*_(8OH2qc)



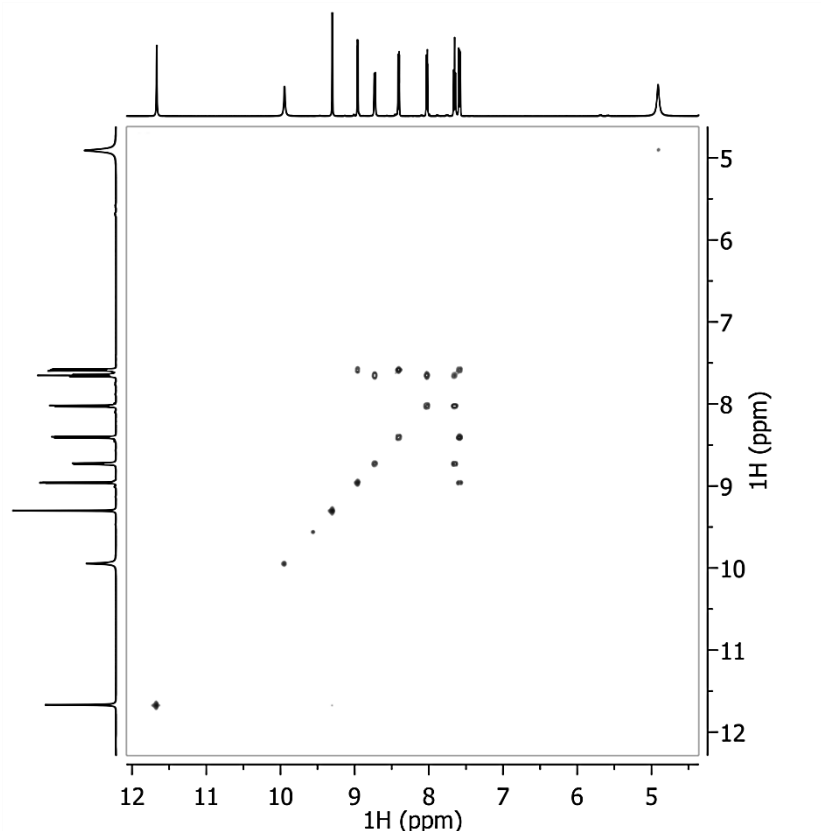
Prilog 7.B 36 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *dhUK*_(8OH2qc)



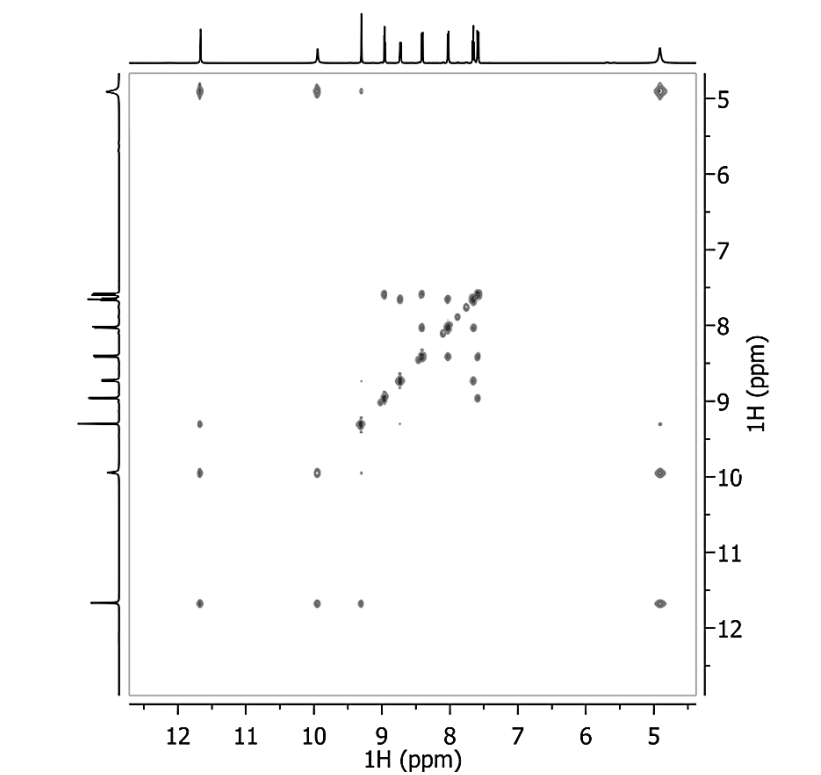
Prilog 7.B 37 ^1H NMR spektar *mhTUK*_(8qc) u $\text{DMSO-}d_6$



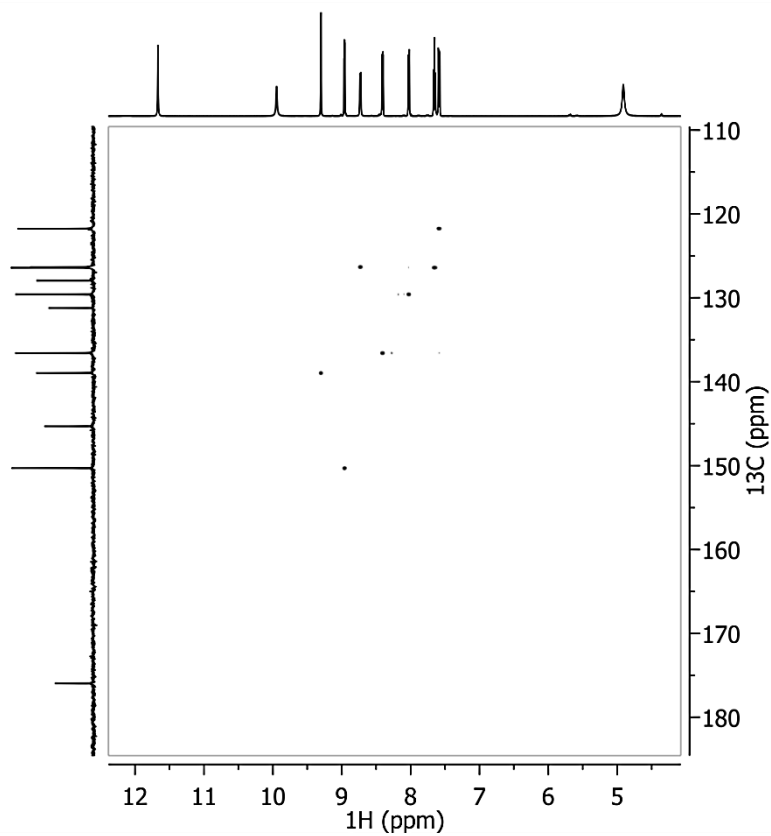
Prilog 7.B 38 ^{13}C NMR spektar *mhTUK*_(8qc) u $\text{DMSO-}d_6$



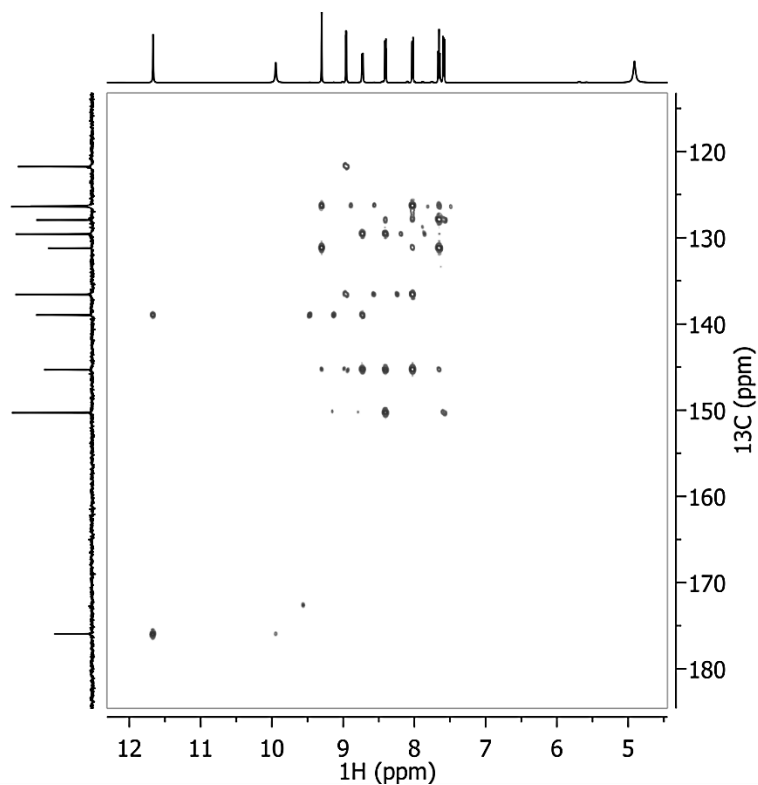
Prilog 7.B 39 COSY spektar *mhTUK*_(8qc)



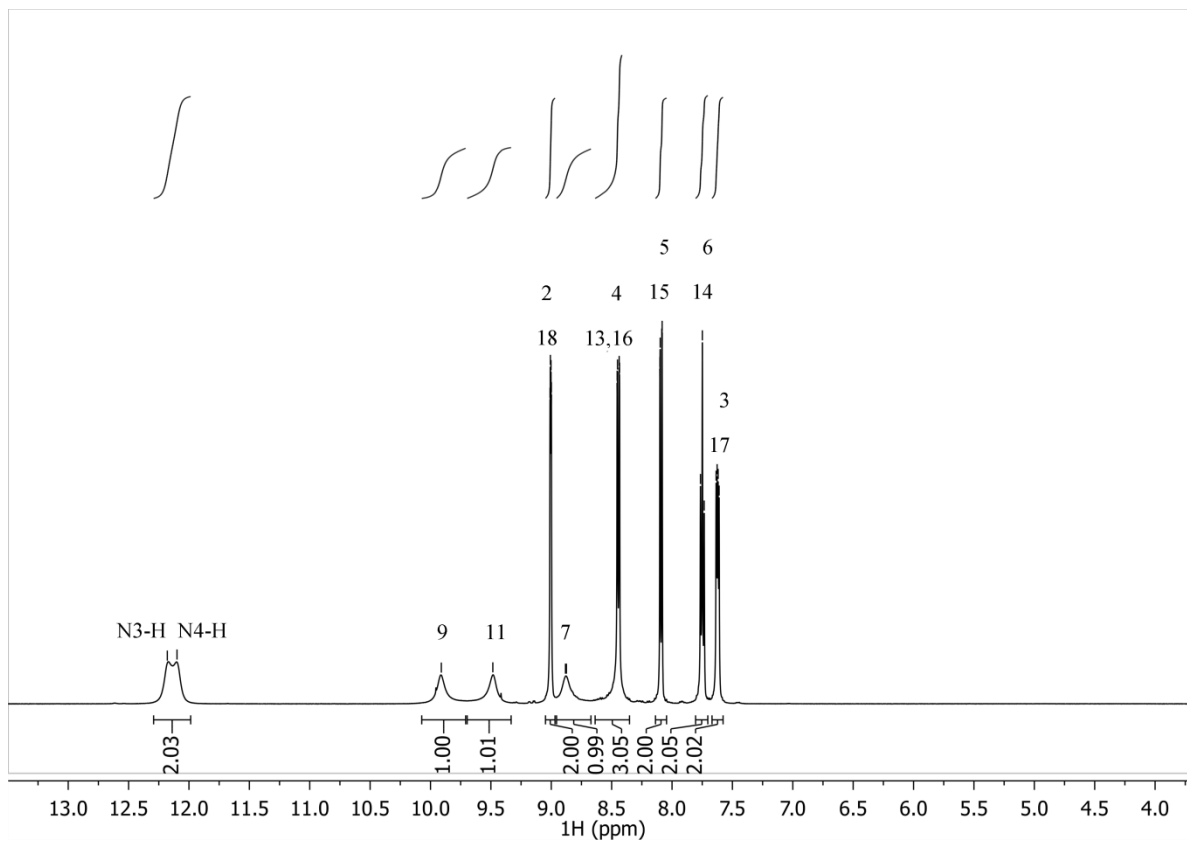
Prilog 7.B 40 NOESY spektar *mhTUK*_(8qc)



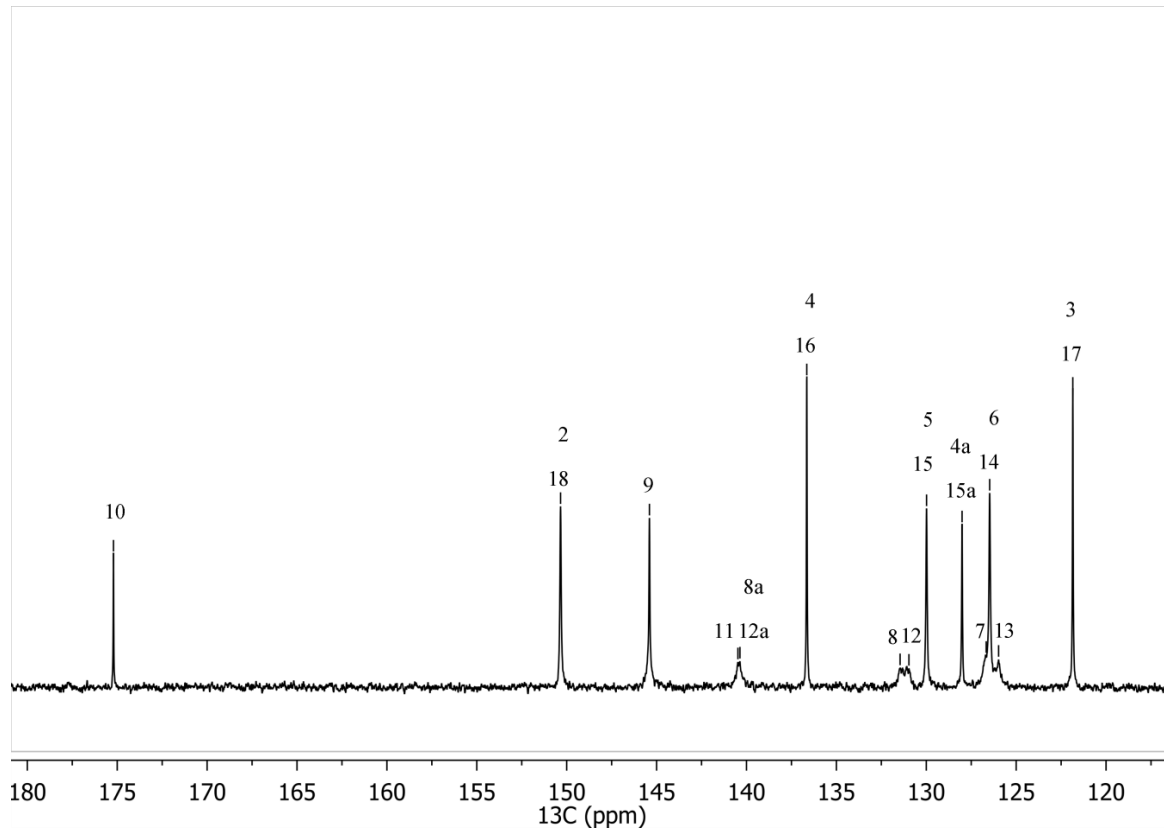
Prilog 7.B 41 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *mhTUK*_(8qc)



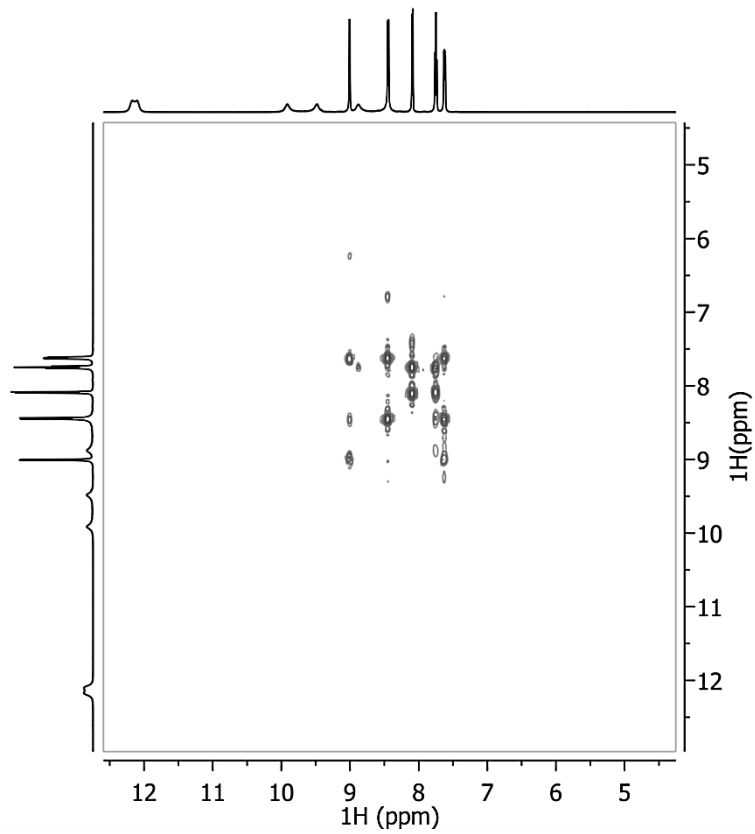
Prilog 7.B 42 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *mhTUK*_(8qc)



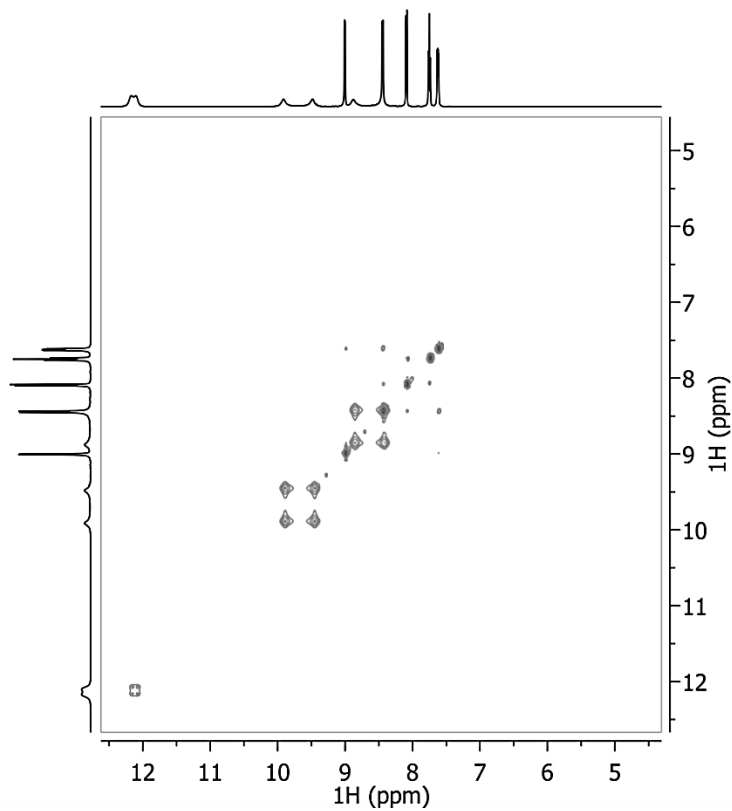
Prilog 7.B 43 ^1H NMR spektar *dhTUK*_(8qc) u $\text{DMSO-}d_6$



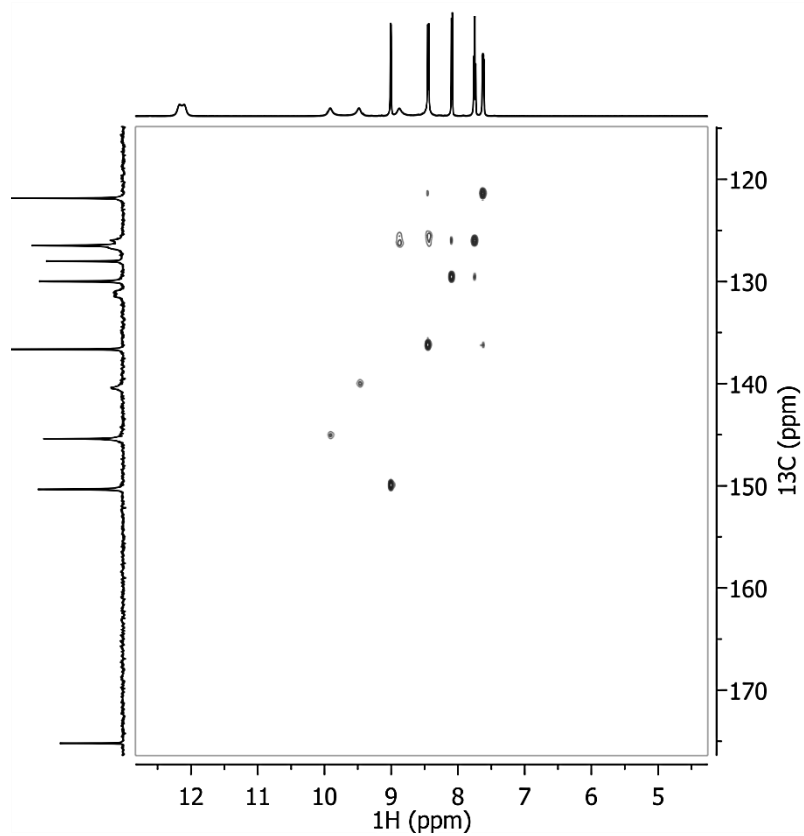
Prilog 7.B 44 ^{13}C NMR spektar *dhTUK*_(8qc) u $\text{DMSO-}d_6$



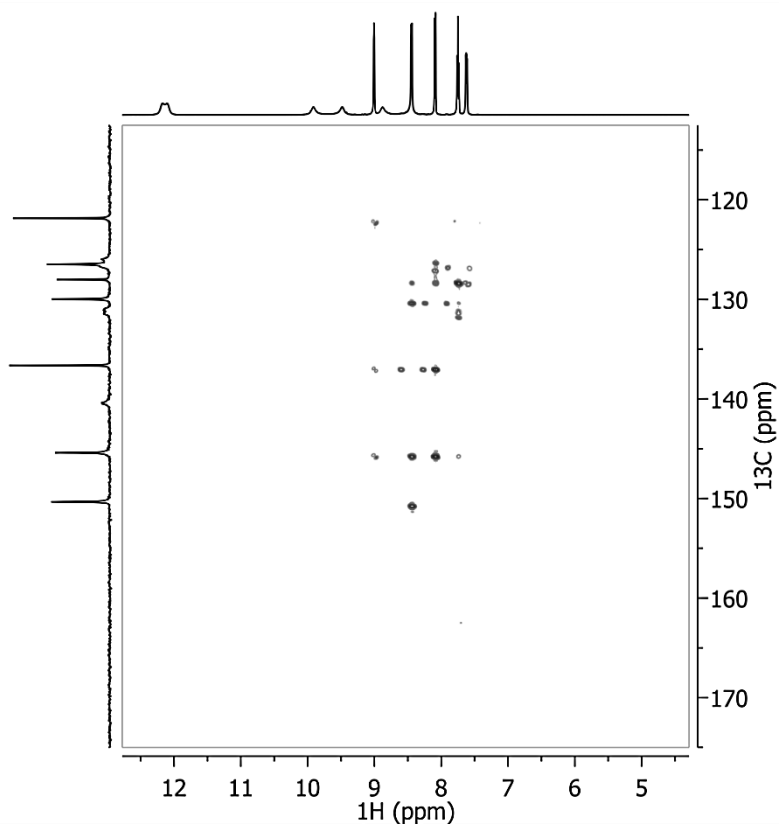
Prilog 7.B 45 COSY spektar *dhTUK*_(8qc)



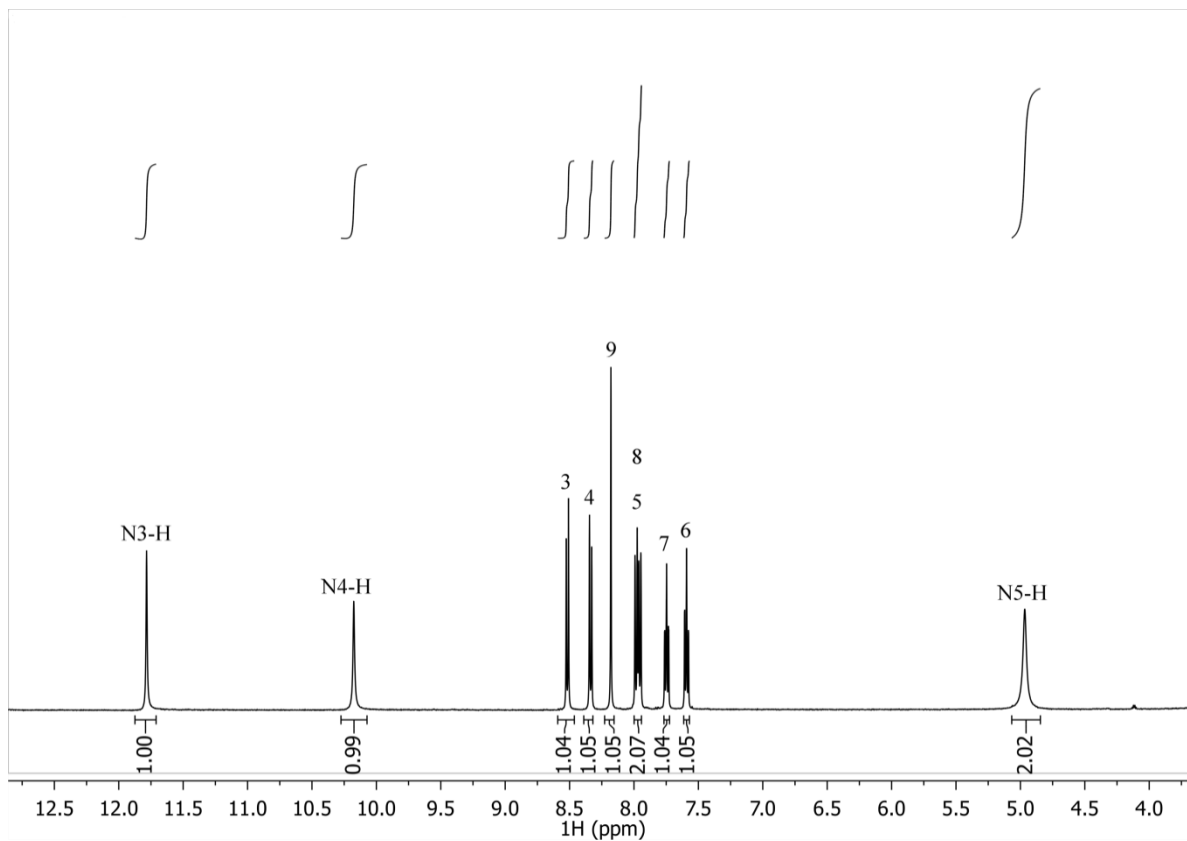
Prilog 7.B 46 NOESY spektar *dhTUK*_(8qc)



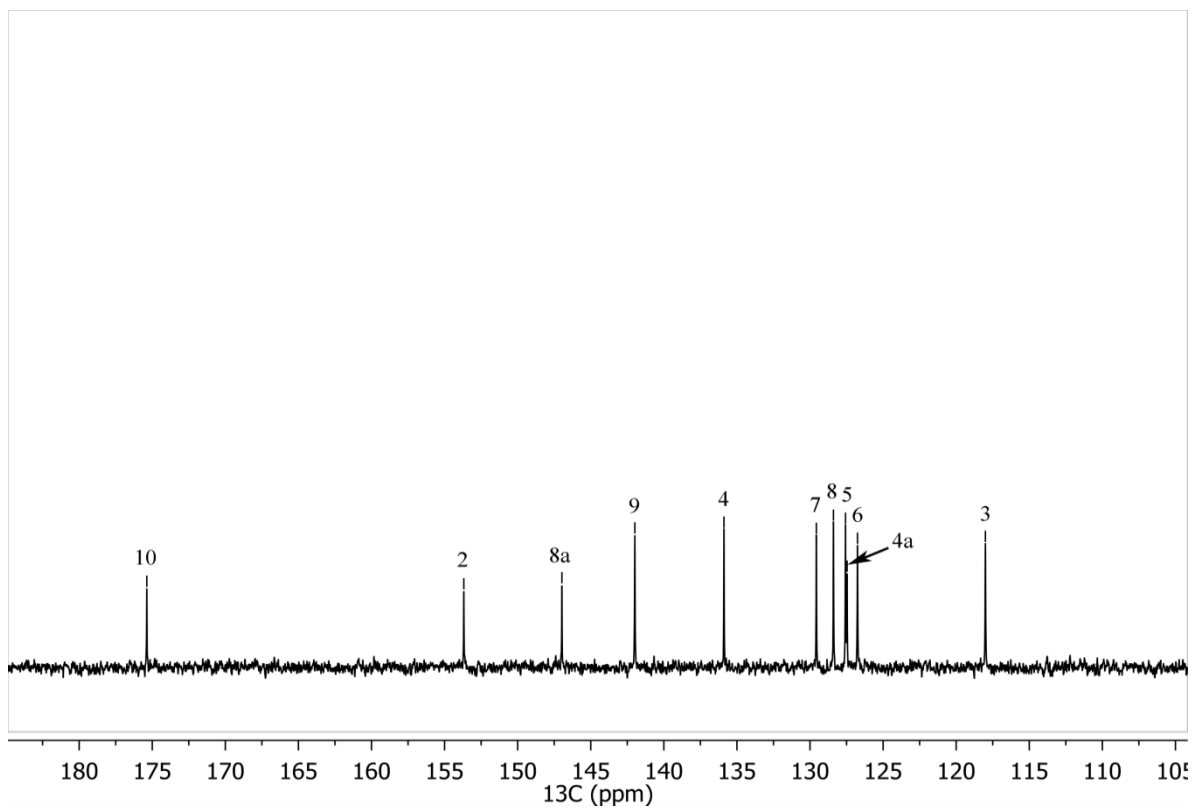
Prilog 7.B 47 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *dhTUK*_(8qc)



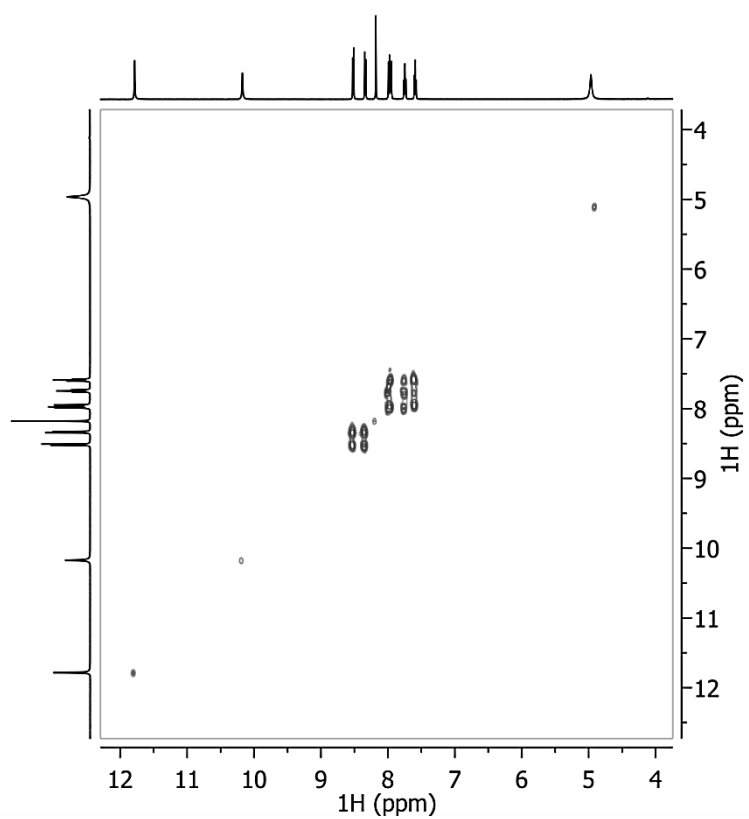
Prilog 7.B 48 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *dhTUK*_(8qc)



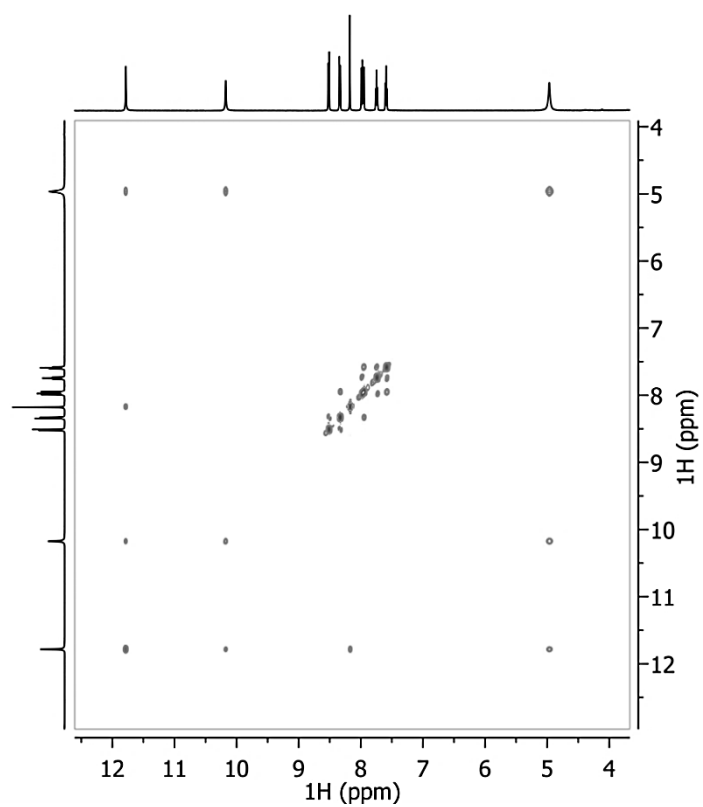
Prilog 7.B 49 ^1H NMR spektar *mhTUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



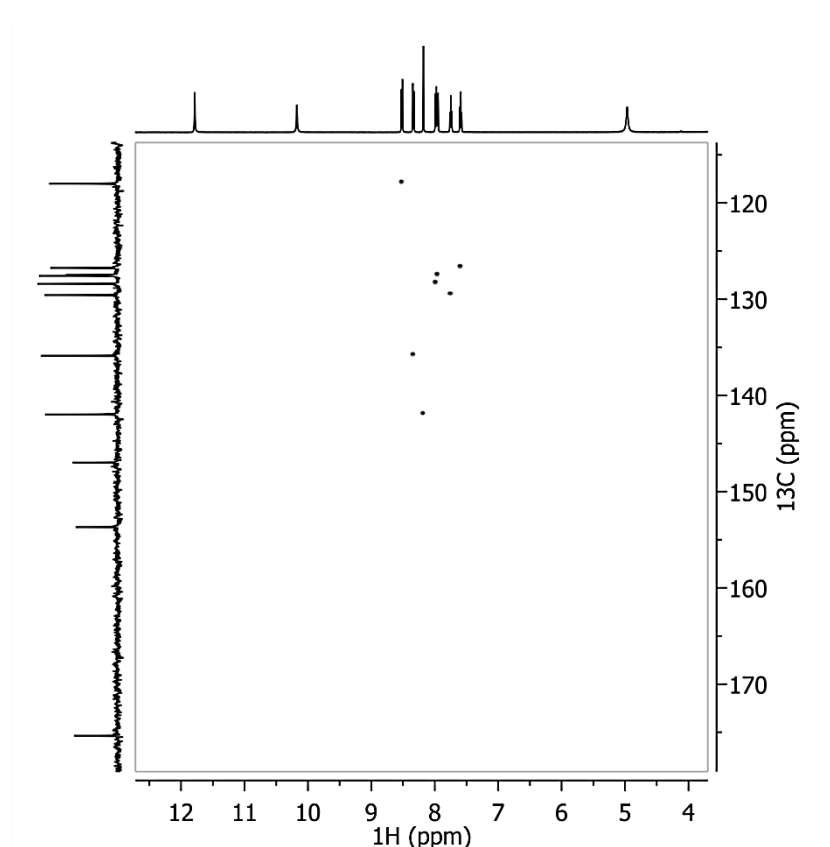
Prilog 7.B 50 ^{13}C NMR spektar *mhTUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



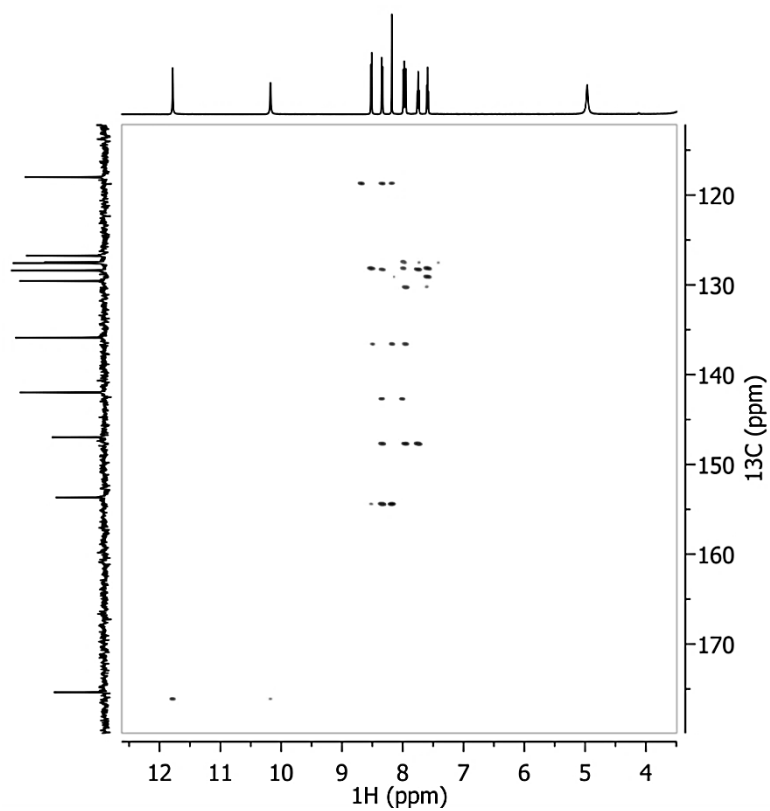
Prilog 7.B 51 COSY spektar *mhTUK*_(2qc)



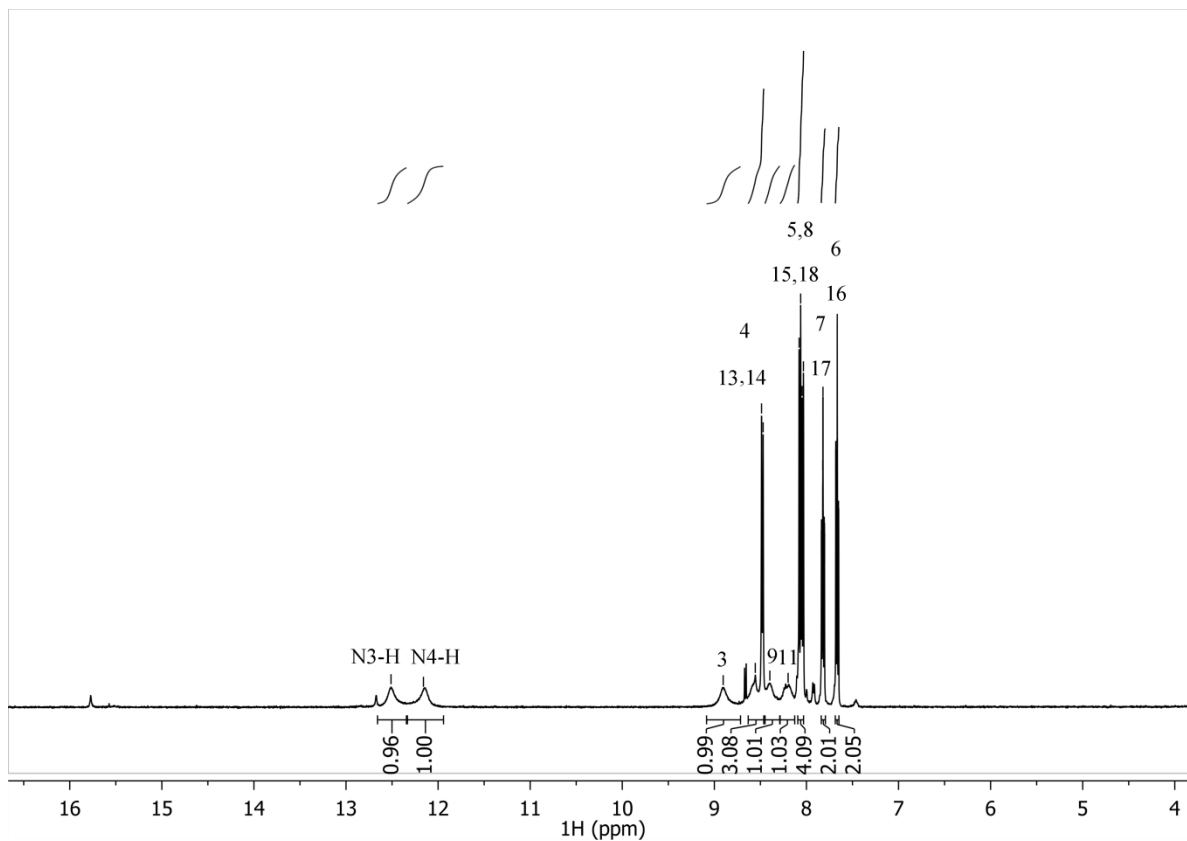
Prilog 7.B 52 NOESY spektar *mhTUK*_(2qc)



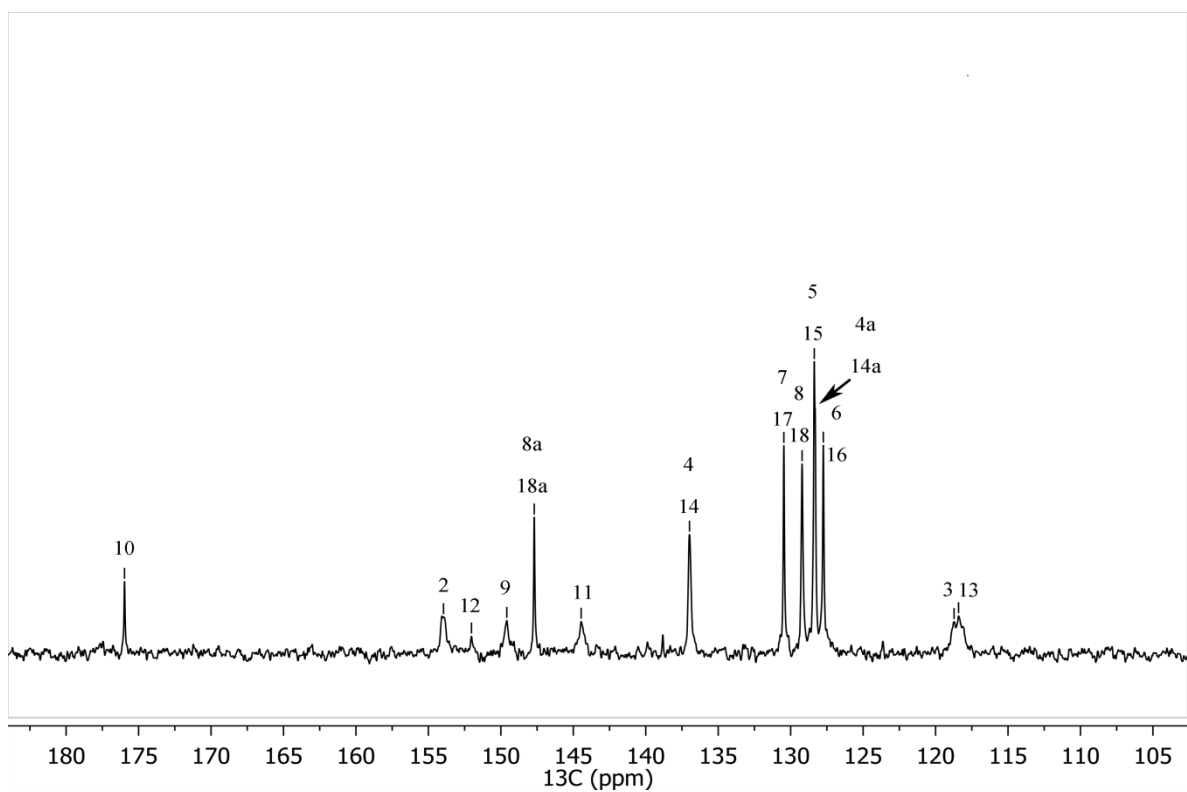
Prilog 7.B 53 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *mhTUK*_(2qc)



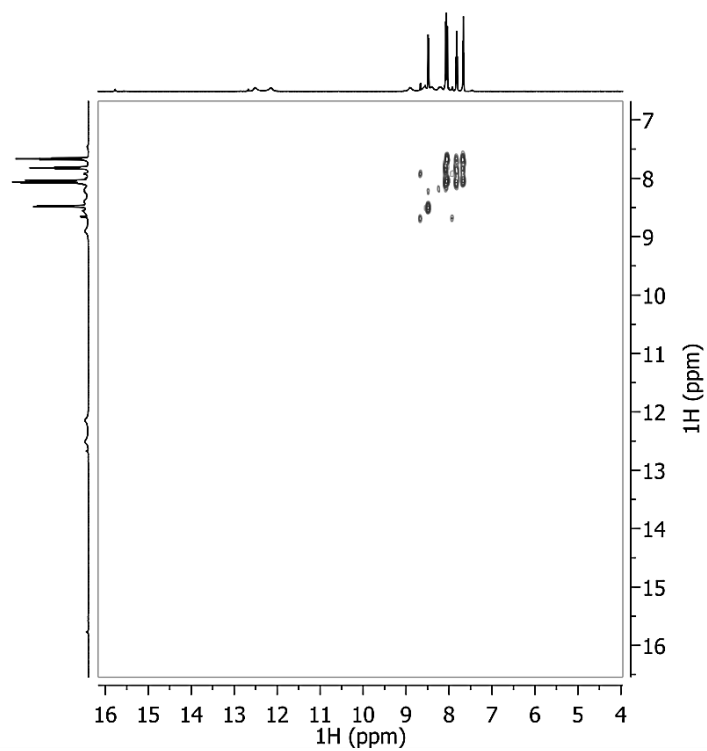
Prilog 7.B 54 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *mhTUK*_(2qc)



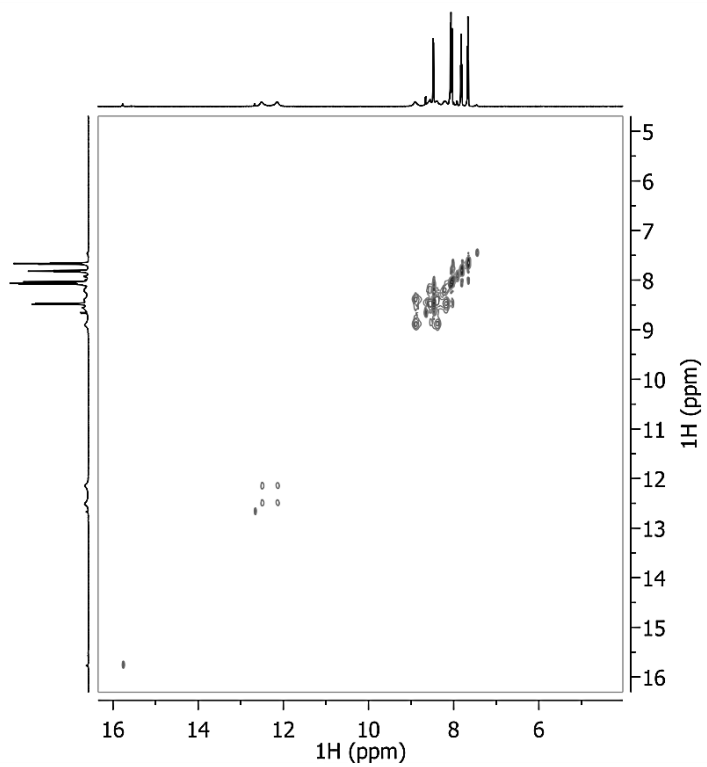
Prilog 7.B 55 ^1H NMR spektar *dhTUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



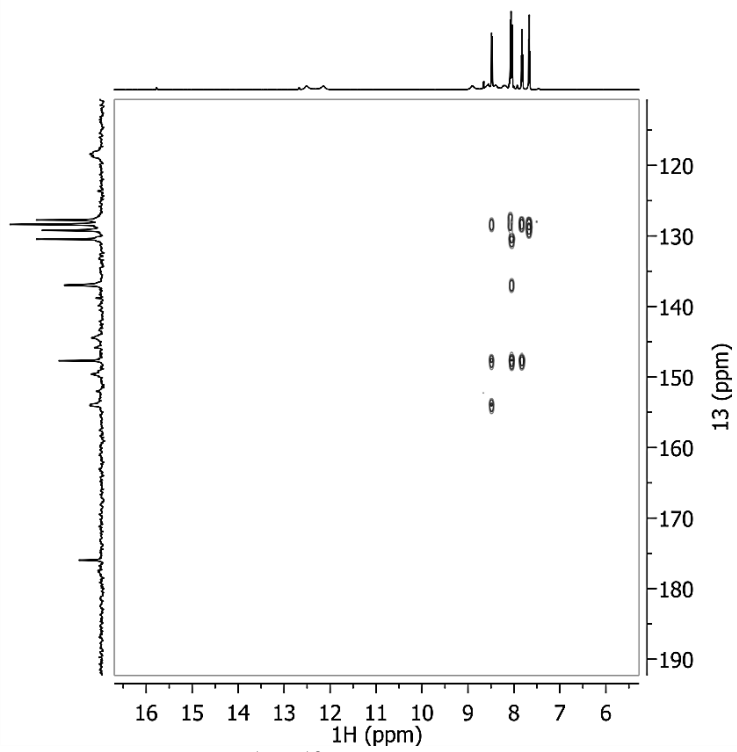
Prilog 7.B 56 ^{13}C NMR spektar *dhTUK*_(2qc) u $\text{DMSO-}d_6$



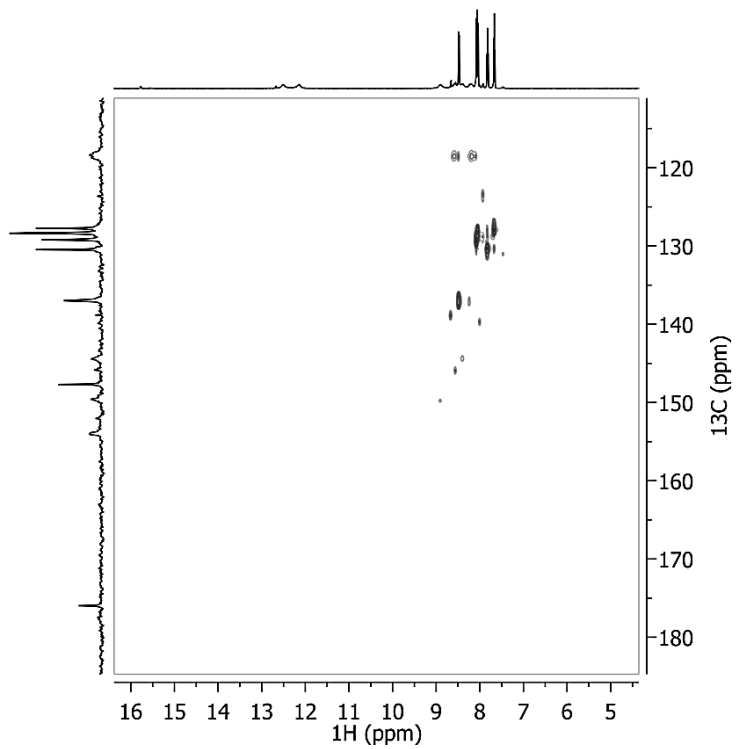
Prilog 7.B 57 COSY spektar *dhTUK*_(2qc)



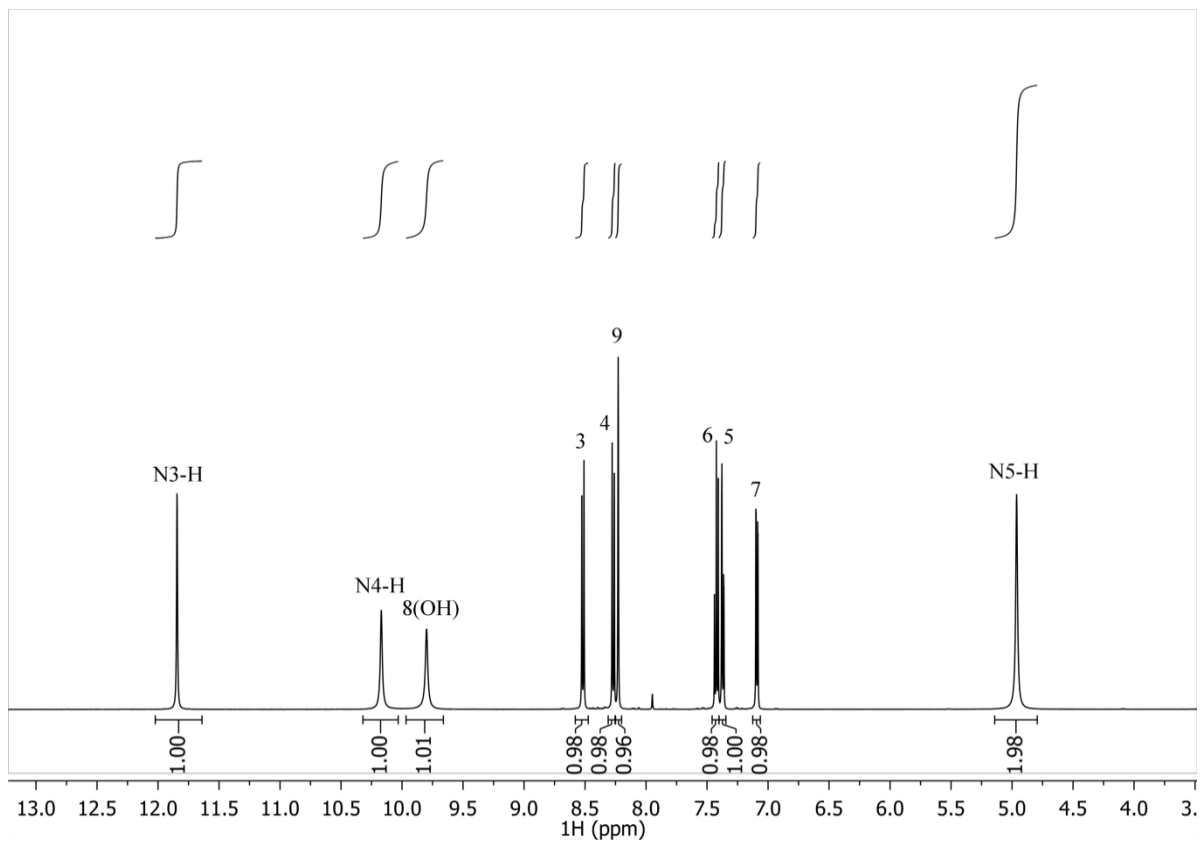
Prilog 7.B 58 NOESY spektar *dhTUK*_(2qc)



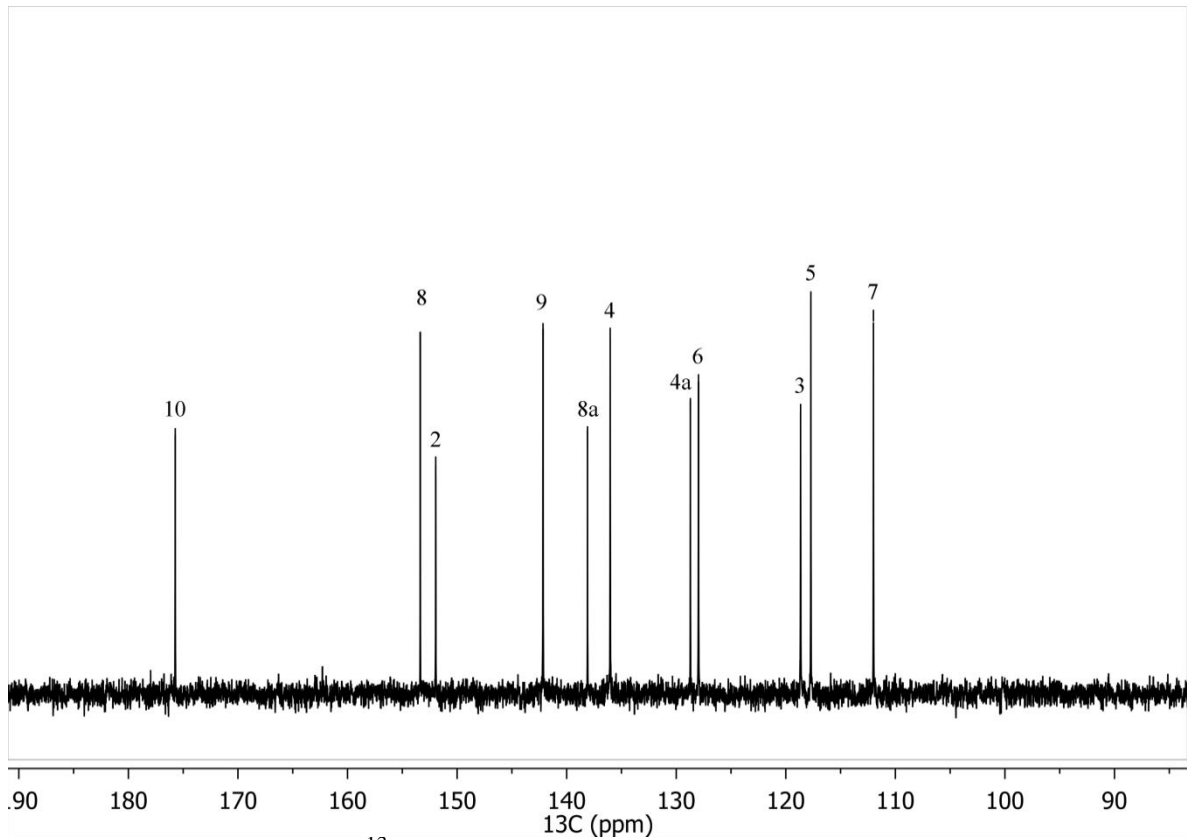
Prilog 7.B 59 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *dhTUK*_(2qc)



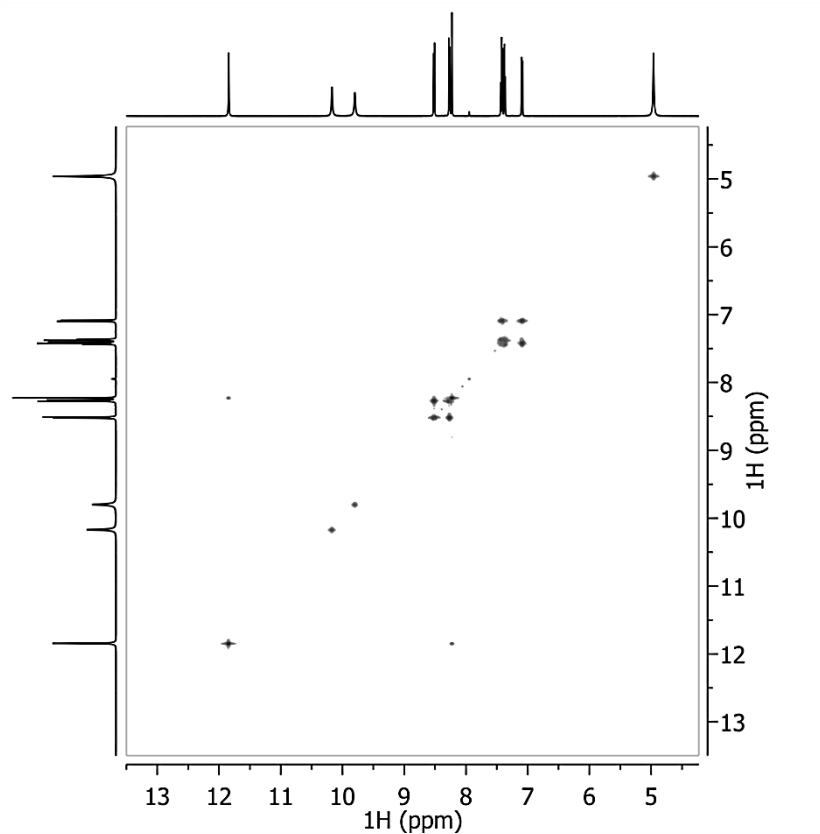
Prilog 7.B 60 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *dhTUK*_(2qc)



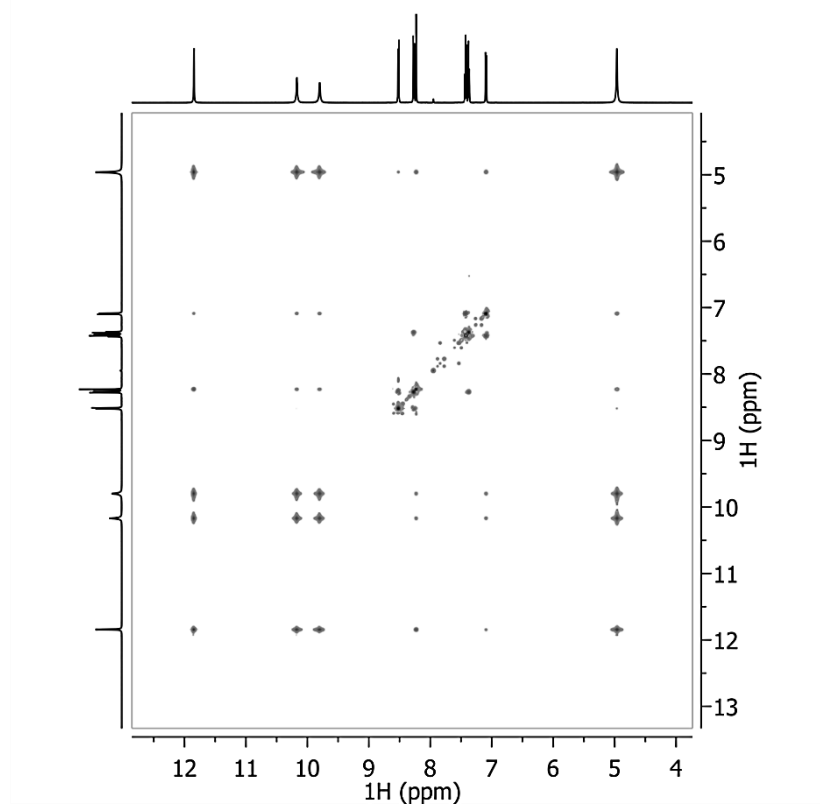
Prilog 7.B 61 ^1H NMR spektar *mhTUK*_(8OH_{2qc}) u DMSO-*d*₆,



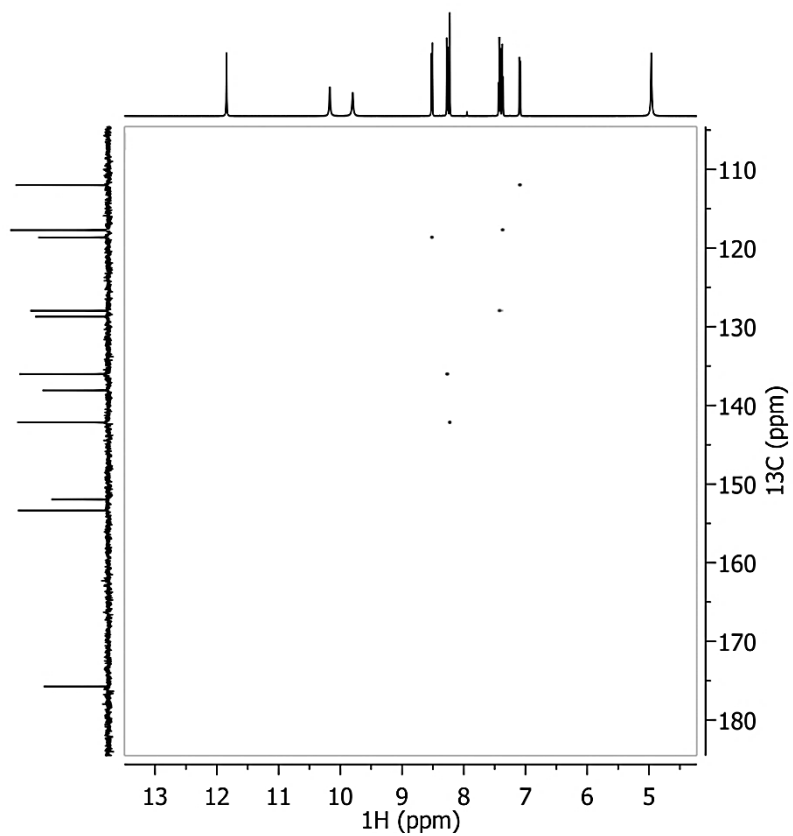
Prilog 7.B 62 ^{13}C NMR spektar *mhTUK*_(8OH_{2qc}) in DMSO-*d*₆



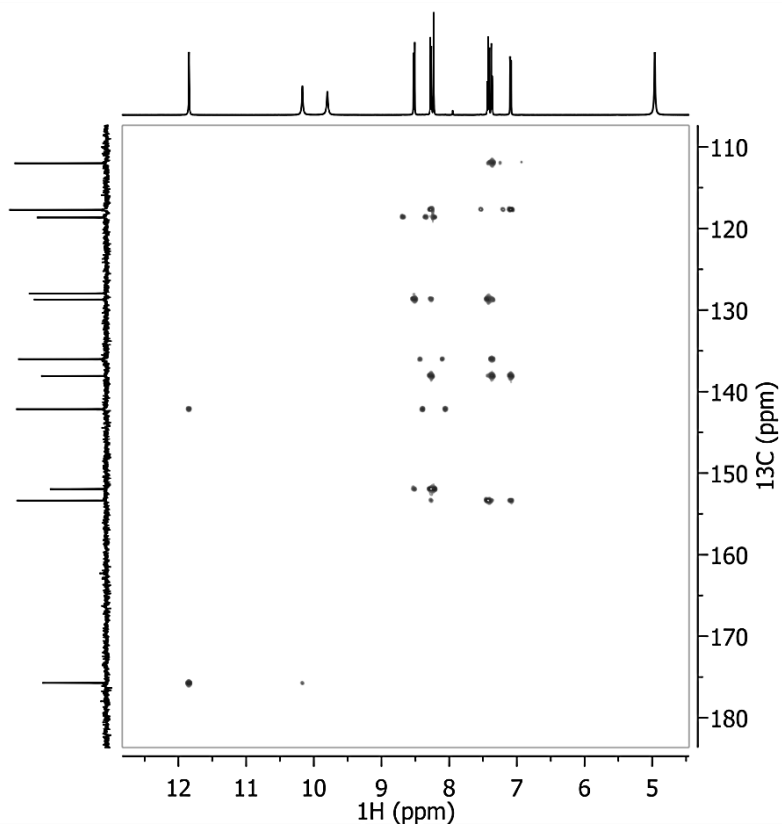
Prilog 7.B 63 COSY spektar *mhTUK*_(8OH2qc)



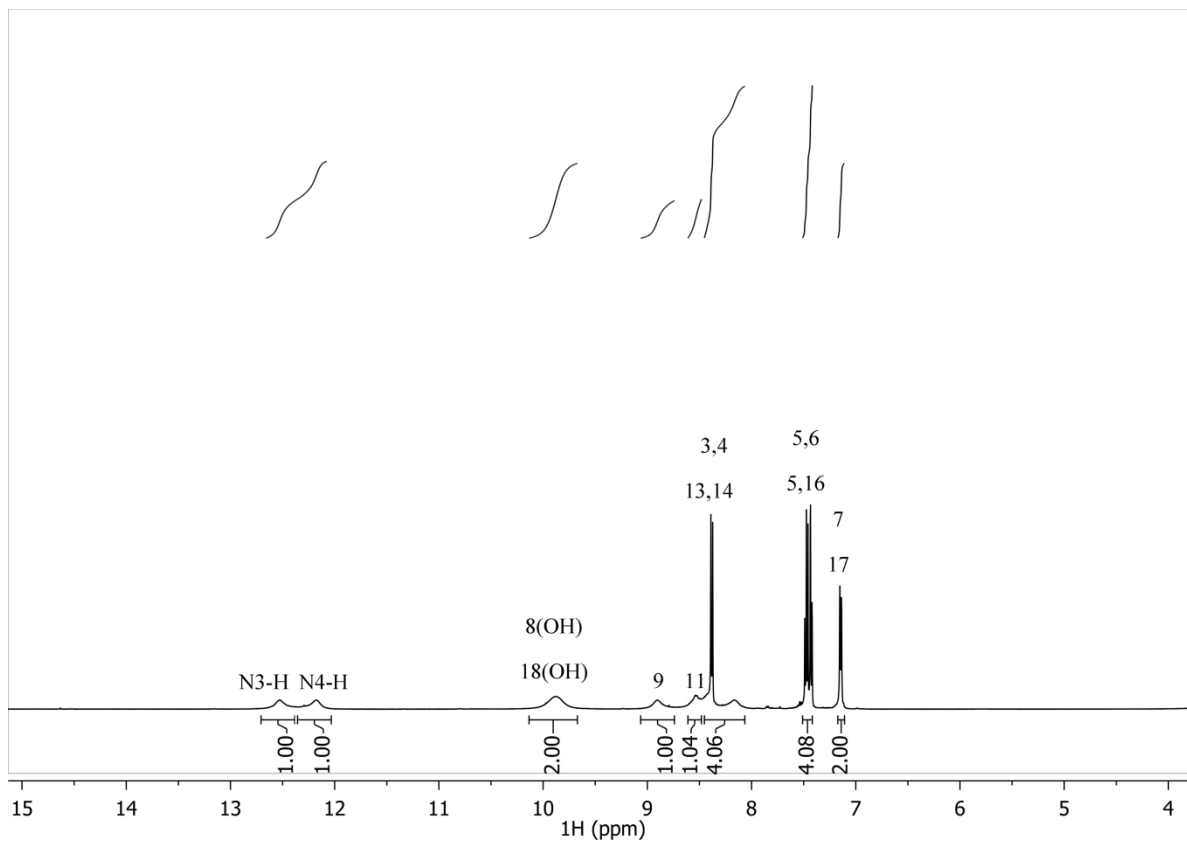
Prilog 7.B 64 NOESY spektar *mhTUK*_(8OH2qc)



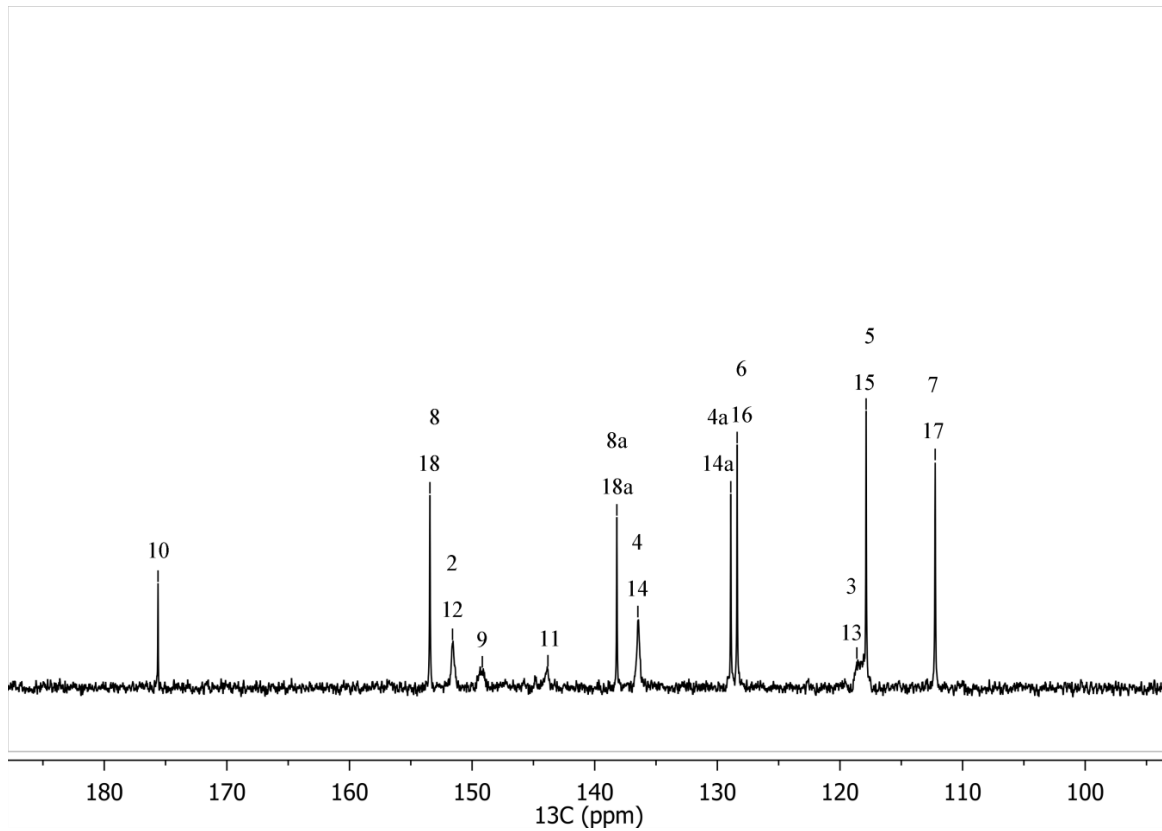
Prilog 7.B 65 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *mhTUK*_(8OH2qc)



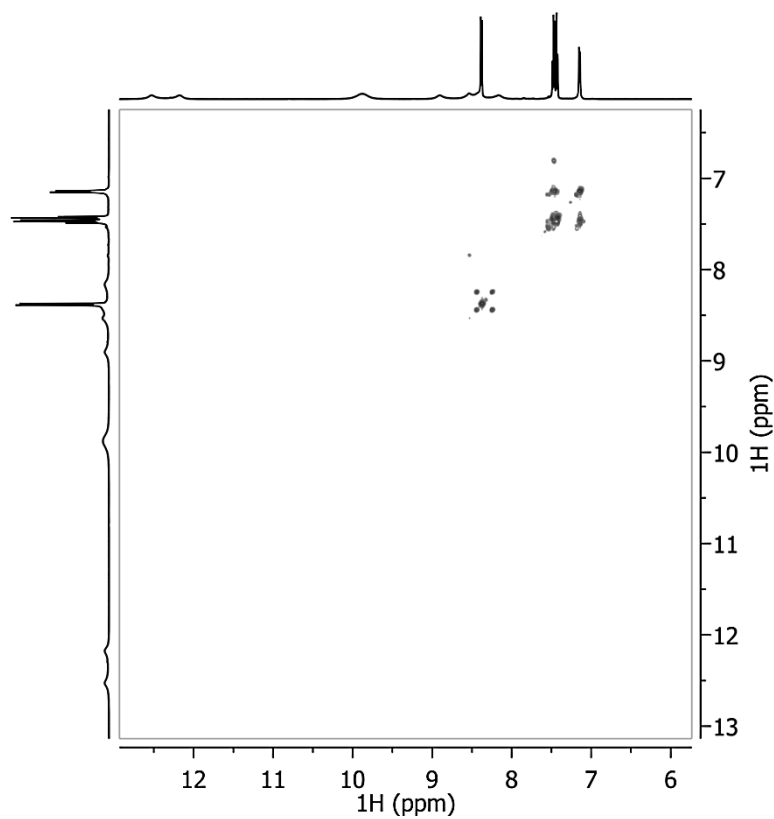
Prilog 7.B 66 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *mhTUK*_(8OH2qc)



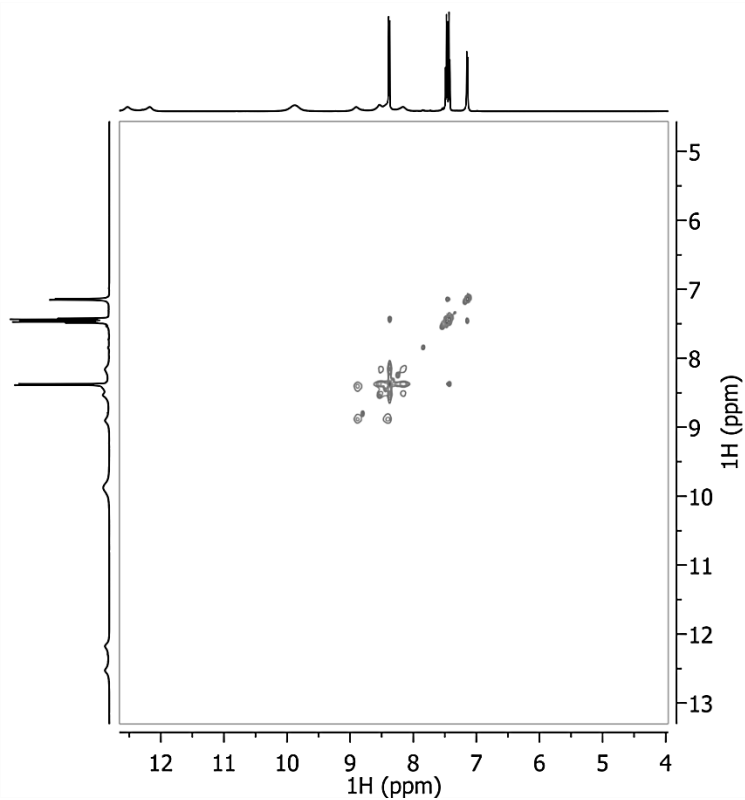
Prilog 7.B 67 ¹H NMR spektar *dhTUK*_(8OH2qc) u DMSO-*d*₆



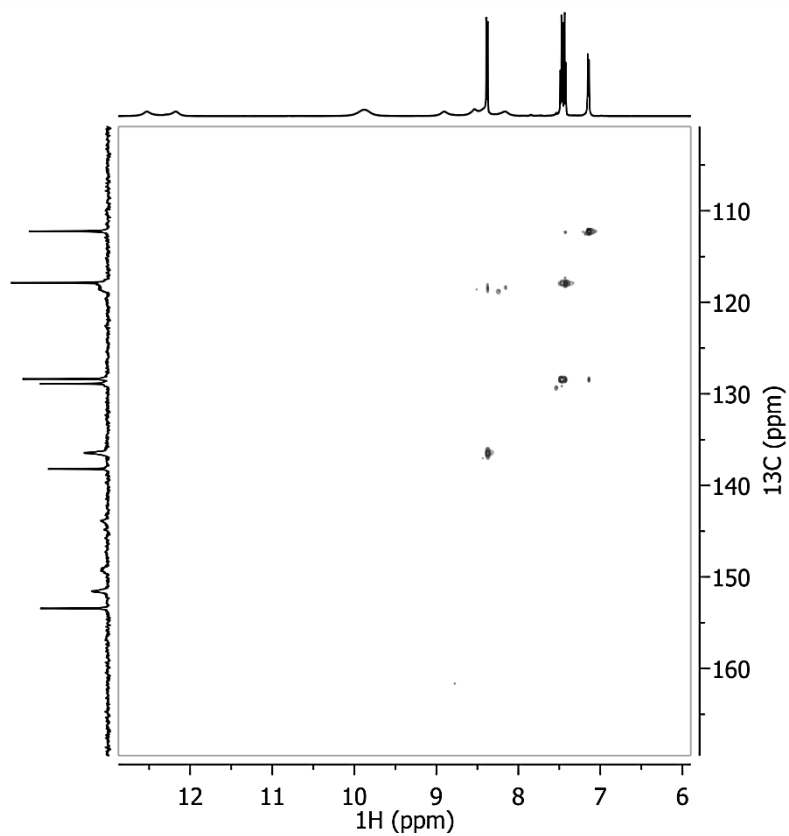
Prilog 7.B 68 ¹³C NMR spektar *dhTUK*_(8OH2qc) u DMSO-*d*₆



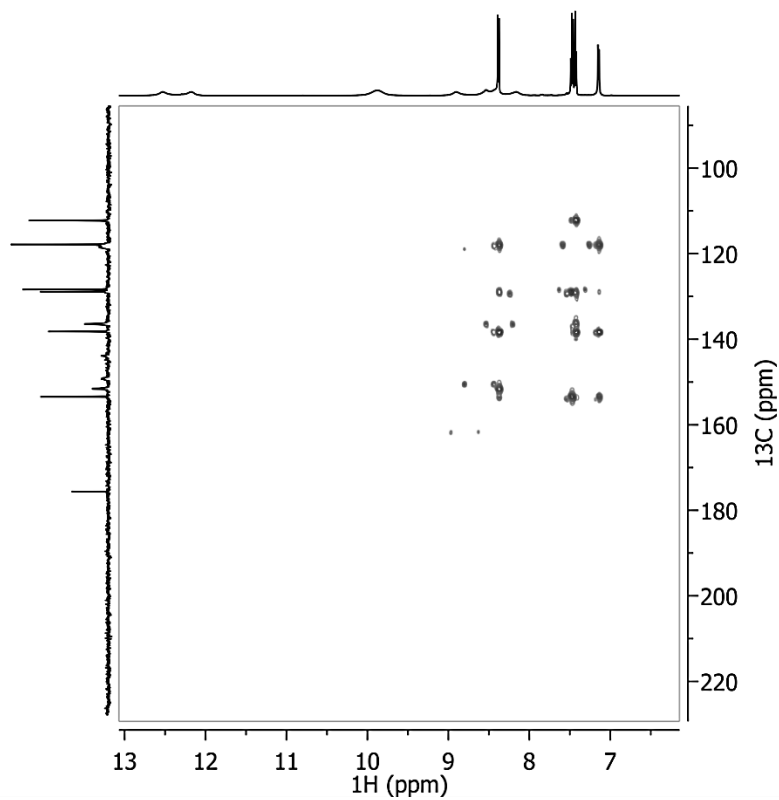
Prilog 7.B 69 COSY spektar *dhTUK*_(8OH2qc)



Prilog 7.B 70 NOESY spektar *dhTUK*_(8OH2qc)



Prilog 7.B 71 ^1H - ^{13}C HSQC spektar *dhTUK*_(8OH2qc)



Prilog 7.B 72 ^1H - ^{13}C HMBC spektar *dhTUK*_(8OH2qc)

Biografija

Kandidat Aleksandra R. Božić, dipl. inž. tehnologije, rođena je 17.08.1985. godine u Ljuboviji, opština Ljubovija, Republika Srbija gde je završila Osnovnu školu. Srednju Medicinsku školu završila je u Beogradu. Godine 2004. upisala je Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu, studijski program Organska hemijska tehnologija i polimerno inženjerstvo i diplomirala 11.10.2010. godine, sa prosečnom ocenom 8,59. Doktorske studije upisala je školske 2011/2012. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu - smer Hemijske nauke. Ispite na doktorskim studijama je položila sa prosečnom ocenom 9,82. Od 2011. godine zaposlena je na Visokoj školi strukovnih studija "Beogradska politehnika" kao saradnik na predmetu Hemija koji se sluša na četiri studijska programa odeljenja za tehnologije. Bila je član je organizacionog odbora III naučno stručnog skupa „Politehnika 2015“ u školskoj 2014/2015. godini. Od 2015. godine angažovana je na projektu „WamPPP 2015, Erasmus +“.

Aleksandra Božić je kao koautor i autor do sada učestvovala u izradi i publikaciji ukupno 17 radova u kategorijama: 1 rad kategorije M21, 1 rad kategorije M22, 2 rada kategorije M23, 1 rad kategorije M24, 5 radova kategorije M33, 7 radova kategorije M63. Iz oblasti istraživanja kojoj pripada predložena tema doktorske disertacije, kandidat je autor 2 naučna rada objavljena u međunarodnom časopisu (oznaka grupe M20: vrsta rezultata M21, M23) i jednog saopštenja (kategorija M64).

Spisak objavljenih radova i saopštenja

Kategorija M21:

1. **Aleksandra Božić**, Aleksandar Marinković, Snežana Bjelogrić, Tamara Todorović, Ilija Cvijetić, Irena Novaković, Christian Muller, Nenad Filipović, Quinoline based mono- and bis-(thio)carbohydrazones: synthesis, anticancer activity in 2D and 3D cancer and cancer stem cell models, *RSC Advances*, 6 (2016), 104763–104781. DOI:10.1039/C6RA23940D (IF=3,485). ISSN: 2046-2069.

Kategorija M23:

1. **Aleksandra Božić**, Nenad Filipović, Irena Novaković, Snežana Bjelogrić, Jasmina Nikolic, Saša Drmanic, Aleksandar Marinković, Synthesis, antioxidant and antimicrobial activity of carbohydrazones, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 82 (2017), 1–14. DOI:10.2298/JSC161220045B (IF=0,997). ISSN: 0352-5139.

Kategorija M64:

1. **Aleksandra Božić**, Aleksandar Marinković, Milan Senčanski, Nenad Filipović, Synthesis, characterization and pro-apoptotic activity of thiocarbohydrazones on pancreatic adenocarcinoma stem cells (AsPC-1), Third Conference of Young Chemists of Serbia, Belgrade, Serbia (2015), Book of abstracts p.28, ISBN 978-86-7132-059-7.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани Александра Божић

Број индекса 4012/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„N-Хетероароматични хидразони и дихидразони дихидразида угљене и тиоугљене киселине: карактеризација, квантномеханичка студија и биолошка активност”

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 22.05.2017. године

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александра Божић

Број индекса 4012/2011

Студијски програм: Хемија

Наслов рада **„N-Хетероароматични хидразони и дихидразони дихидразида угљене и тиоугљене киселине: карактеризација, квантномеханичка студија и биолошка активност”**

Ментор др Александар Маринковић, доцент

Потписани Александра Божић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 22.05.2017. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„N-Хетероароматични хидразони и дихидразони дихидразида угљене и тиоугљене киселине: карактеризација, квантномеханичка студија и биолошка активност”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 22.05.2016. године

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.