



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Катарина В. Јаковљевић

**СИНТЕЗА И БИОЛОШКА АКТИВНОСТ ДЕРИВАТА
1,3,4 - ТИАДИАЗОЛА ИЗВЕДЕНИХ ИЗ ФЕНОЛНИХ
КИСЕЛИНА**

Докторска дисертација

Ментор: др Виолета Р. Марковић, доцент

Крагујевац, 2020.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I. Аутор

Име и презиме: **Катарина В. Јаковљевић**

Датум и место рођења: **17. 02. 1991. Крагујевац**

Садашње запослење: **истраживач-сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

II. Докторска дисертација

Наслов: **Синтеза и биолошка активност деривата 1,3,4-тиадиазола изведених из фенолних киселина**

Број страница: **172**

Број слика: **30**, Број схема: **57**, Број табела: **5**

Број библиографских података: **224**

Установа и место где је рад израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област (УДК): **Хемија (54), Органска хемија (547)**

Ментор: **др Виолета Р. Марковић, доцент**

III. Оцена и одбрана

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: **IV-01-804/5, 11.10.2019.**
(Закључак о исправци техничке грешке број IV-01-804/5-1 од 28.10.2019.)

др Виолета Р. Марковић, доцент (ментор)

Природно-математички факултет, Крагујевац

Ужа научна област: Органска хемија

др Милан Д. Јоксовић, редовни професор

Природно-математички факултет, Крагујевац

Ужа научна област: Органска хемија

др Ивана З. Матић, научни сарадник

Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд

Научна област: Молекуларна биологија

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

др Милан Д. Јоксовић, редовни професор (председник комисије)

Природно-математички факултет, Крагујевац

Ужа научна област: Органска хемија

др Снежана С. Трифуновић, научни саветник

Хемијски факултет, Београд

Научна област: Хемија

др Ивана З. Матић, научни сарадник

Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд

Научна област: Молекуларна биологија

Датум одбране докторске дисертације:

Комисија

Др Милан Д. Јоксовић, редовни професор
(председник комисије)

Природно-математички факултет,
Универзитет у Крагујевцу
Ужа научна област: Органска хемија

Др Снежана С. Трифуновић, научни саветник
Хемијски факултет,
Универзитет у Београду
Научна област: Хемија

Др Ивана З. Матић, научни сарадник
Институт за онкологију и радиологију Србије, Београд
Научна област: Молекуларна биологија

*Мајци Зорици, оцу Владану
и брату Горану*

Захваљујем се доц. др Виолети Марковић на предложеној теми докторске дисертације, указаном поверењу, преданости, стрпљењу и свесрдној помоћи у свим фазама израде ове дисертације.

Неизмерну захвалност дугујем др Милану Јоксовићу, редовном професору Природно-математичког факултета у Крагујевцу, за прихватање у своју истраживачку групу, пренесено знање, свесрдну помоћ, подршку и драгоцене савете током студија.

Члановима комисије, др Снежани Трифуновић, научном саветнику Хемијског факултета у Београду и др Ивани Матић, научном сараднику Института за онкологију и радиологију Србије, захваљујем за савете и сугестије који су допринели бољем квалитету ове докторске дисертације.

Млађој колегиници Милени Петровић захваљујем на подршци и бодрењу током писања дисертације и лепим тренуцима проведеним у лабораторији Б-І-4а.

Својим пријатељима и момку захваљујем на бескрајном разумевању, љубави и подршци коју су ми пружили током студија.

Посебну захвалност дугујем својим родитељима и брату на пруженој подршци и безусловної љубави током свих ових година.

Садржај

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ	i
Списак слика	v
Списак схема	viii
Списак табела	x
ИЗВОД	xi
SUMMARY	xiii
1. ОПШТИ ДЕО.....	1
1.1. Тиадиазоли – историјат и значај	3
1.2. Таутомерија 1,3,4-тиадиазола	4
1.3. Методе за добијање 1,3,4-тиадиазола.....	4
1.3.1. Добијање 1,3,4-тиадиазола из ацилхидразина	6
1.3.1.1. Добијање 1,3,4-тиадиазола из моноацилхидразина	6
1.3.1.2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из диацилхидразина	6
1.3.2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиохидразина	7
1.3.2.1. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиосемикарбазида.....	8
1.3.2.2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиокарбазида.....	9
1.3.2.3. Добијање 1,3,4-тиадиазола из дитиокарбазата	10
1.3.2.4. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиохидразида	12
1.3.2.5. Добијање 1,3,4-тиадиазола из дитиоуреа.....	12
1.3.3. Добијање 1,3,4-тиадиазола из 1,3,4-оксадиазола.....	13
1.4. Реактивност 1,3,4-тиадиазола	14
1.4.1. Пиролиза 1,3,4-тиадиазолских деривата	15
1.4.2. Електрофилни напад на атоме азота 1,3,4-тиадиазолског прстена.....	17
1.4.3. Електрофилни напад на атом угљеника 1,3,4-тиадиазолског прстена.....	18
1.4.4. Електрофилни напад на атом сумпора 1,3,4-тиадиазолског прстена	19
1.4.5. Нуклеофилни напад на атом угљеника 1,3,4-тиадиазолског прстена	19
1.4.6. Diels-Alder-ова реакција 1,3,4-тиадиазола	23
1.5. Реактивност супституената везаних за угљеников атом 1,3,4-тиадиазолског прстена	23
1.5.1. C – супституенти	23
1.5.2. N-супституенти	25

1.5.3. <i>O</i> -супституенти.....	28
1.5.4. <i>S</i> -супституенти.....	29
1.6. Реактивност супституената везаних за хетероатоме прстена	32
1.7. Биолошка активност 1,3,4-тиадиазола	32
1.7.1. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола	34
1.7.2. Антитуморска активност деривата 1,3,4-тиадиазола.....	36
1.8. Фенолне киселине	43
2. НАШИ РАДОВИ	49
2.1. Увод.....	51
2.2. Серија А	53
2.2.1. Синтеза амидних деривата 1,3,4-тиадиазола серије А.....	53
2.2.2. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А.....	54
2.2.3. Цитотоксична активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А.....	57
2.2.4. Цитопротективни ефекти деривата 1,3,4-тиадиазола серије А.....	58
2.2.5. Утицај на дистрибуцију ћелијског циклуса	60
2.2.6. Морфолошка анализа типа ћелијске смрти.....	60
2.2.7. Одређивање механизма ћелијске смрти	61
2.2.8. Антиангиогенетска својства деривата 1,3,4-тиадиазола серије А	62
2.2.9. Утицај деривата 1,3,4-тиадиазола серије А на нивое експресије гена у HL-60 ћелијама	64
2.3. Серија Б	65
2.3.1. Синтеза амидних деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б	65
2.3.2. Антиоксидативна активност 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида серије Б .	67
2.3.3. Цитотоксична активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б	70
2.3.4. Цитопротективни ефекти деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б	71
2.3.5. Утицај на дистрибуцију ћелијског циклуса	73
2.3.6. Одређивање механизма ћелијске смрти	74
2.3.7. Утицај 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида серије Б на нивое експресије гена и микроРНК у HeLa ћелијама	76
2.3.8. Интеракције са ДНК.....	80
2.3.9. Комет тест	85
2.3.10. Интеракције са плазмидом pUC19	86
2.4. Серија В.....	88
2.4.1. Синтеза амидних деривата 1,3,4-тиадиазола серије В	88

2.4.2. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије В	90
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО	95
3.1. Физичка мерења	97
3.2. Поступак за синтезу једињења 2 и 2'	97
3.3. Поступак за синтезу једињења 3а-ж и 3'а-ж	98
3.4. Поступак за синтезу једињења 5а-л	106
3.5. Поступак за синтезу једињења 6а-л	110
3.6. Поступак за синтезу једињења 9а-м, 10 и 11	117
3.7. Испитивање антиоксидативне активности DPPH тестом	125
3.8. Испитивање антиоксидативне активности ABTS тестом	125
3.9. Испитивање цитотоксичне активности	126
3.10. Одређивање нивоа интрацелуларног ROS-а	127
3.11. Анализа фаза ћелијског циклуса	127
3.12. Морфолошка анализа типа ћелијске смрти	128
3.13. Одређивање циљних каспаза	128
3.14. <i>In vitro</i> експеримент ангиогенезе – " <i>endothelial cell tube formation</i> "	129
3.15. Анализа експресије гена и микроРНК	129
3.16. Интеракције са ДНК	130
3.16.1. Снимање UV/Vis апсорпционих спектра	130
3.16.2. Снимање флуоресцентних спектра	131
3.16.3. Експерименти са плазмидном ДНК	132
3.16.4. Електрофореза на агарозном гелу	133
3.16.5. Испитивање генотоксичности комет тестом	133
4. ЗАКЉУЧАК	135
5. ЛИТЕРАТУРА	139
6. ПРИЛОГ	153
6.1. NMR спектри	155
6.2. Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације	163
Биографија са подацима о досадашњем раду	171

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА И ТЕРМИНА КОРИШЋЕНИХ У ТЕКСТУ

A549	ћелијска линија карцинома плућа
ABTS	2,2'-азино-bis(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)
Akt/PKB	протеинска киназа Б (енг. <i>Protein kinase B</i>)
AKT1	серин/треонин киназа 1 (енг. <i>Serine-threonine kinase 1</i>)
ANOVA	анализа варијансе
aq	водени раствор (енг. <i>aqueous</i>)
ATCC	америчка колекција узорака култура (енг. <i>American Type Culture Collection</i>)
AZA	ацетазоламид
Bax	Bcl2 сличан протеин X (енг. <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-XL	В-ћелијски лимфом-изузетно велик (енг. <i>B-cell lymphoma-extra large</i>)
BDE	енергија дисоцијације везе (енг. <i>Bond Dissociation Energy</i>)
BGC823	ћелијска линија карцинома желуца
BZA	бензоламид
CA	карбоанхидраза
CAT	каталаза
CHL	хлорзоламид
CPMB	циклопропилметил бромид
CT-DNA	дезоксирибонуклеинска киселина изолована из говеђег тимуса (енг. <i>Calf thymus DNA</i>)
DFT	теорија функционала густине (енг. <i>Density Functional Theory</i>)
DHBA	дихидроксибензојева киселина
DMF	<i>N,N</i> -диметилформаид
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DU145	ћелијска линија карцинома простате
EDC	1-етил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
EDTA	етилендиаминтетрасирћетна киселина
ERK	екстрацелуларним сигналом регулисана киназа (енг. <i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>)
FCS	серум фетуса телета (енг. <i>Fetal Calf Serum</i>)
GAPDH	глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа

GR	глутатион редуктаза
GSHPx	глутатион пероксидаза
H	Hoechst 33258 (боја)
HA22T	ћелијска линија карцинома јетре
HBA	хидроксибензојева киселина (енг. <i>hydroxybenzoic acid</i>)
HCA	хидроксициметна киселина (енг. <i>hydrocinnamic acid</i>)
hCA	хумана карбоанхидраза
HCT15	ћелијска линија карцинома дебелог црева
HCV29T	ћелијска линија карцинома бешике
HeLa	ћелијска линија аденокарцинома грлића материце
HEPG2	ћелијска линија карцинома јетре
HL-60	ћелијска линија акутне промијелоцитне леукемије
HPV	хумани папилома вирус (енг. <i>Human Papilloma Virus</i>)
HSV-2	херпес симплекс вирус 2 (енг. <i>Herpes Simpleks Virus 2</i>)
IP	јонизациони потенцијал/енергија јонизације (енг. <i>Ionization Potential</i>)
IR	инфрацрвено (енг. <i>infrared</i>)
LB	Luria-Bertani медијум
LDA	литијум диизопропиламид
LnCaP	ћелијска линија карцинома простате
LR	Lawesson-ов реагенс
MCF-7	ћелијска линија аденокарцинома дојке
MCPBA	3-хлорпероксибензојева киселина
MDA-MB-231	ћелијска линија аденокарцинома дојке
miRNA	микро рибонуклеинска киселина (енг. <i>micro Ribonucleic acid</i>)
MMP2	матриксна металопротеиназа 2 (енг. <i>matrix metalloproteinase 2</i>)
MMP9	матриксна металопротеиназа 9 (енг. <i>matrix metalloproteinase 9</i>)
MRC-5	ћелијска линија фибробласта плућа
MTT	тетразолијум тест у микрокултури (енг. <i>Microculture Tetrazolium Test</i>)
MW	микроталас (енг. <i>microwave</i>)
MZA	метазоламид
NCI-H460	ћелијска линија аденокарцинома плућа

NDGA	нордихидрогвајаретинска киселина
NMP	нормална тачка топљења (енг. <i>Normal Melting Point</i>)
NMR	нуклеарна магнетна резонанца (енг. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
Notch 3	хомолог протеина 3 неуролошког локуса (енг. <i>Neurogenic locus notch homolog protein 3</i>)
OTf	трифлат
PaCa2	ћелијска линија аденокарцинома панкреаса
PBS	пуферисани физиолошки раствор (енг. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PC3	ћелијска линија аденокарцинома простате
PCA	протокатехуинска киселина
PhA	фенолне киселине
PTEN	фосфатаза и тензин хомолог (енг. <i>Phosphatase and tensin homolog</i>)
PTSA	р-толуенсулфонска киселина
qPCR	квантитативна полимеразна ланчана реакција (енг. <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RIN	идентификациони број РНК (енг. <i>RNA Integrity Number</i>)
ROS	реактивне кисеоничне врсте (енг. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-qPCR	квантитативна полимеразна ланчана реакција у реалном времену (енг. <i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SAR	однос структуре и активности (енг. <i>Structure-Activity Relationship</i>)
SD	стандардна девијација
SOD	супероксид дисмутаза
STB	сулфонил-bis(2,4-дихидроксифенил)метантион
SW1116	ћелијска линија карцинома дебелог црева
SW707	ћелијска линија карцинома ректума
T3P	пропилфосфински анхидрид (анхидрид пропилфосфонске киселине)
T47D	ћелијска линија аденокарцинома дојке
TAE	tris-ацетатни EDTA пуфер
THF	тетрахидрофуран
TIMP3	инхибитор металопроотеиназе 3
TMSCl	триметилсилил хлорид
Tris	tris(хидроксиметил)аминометан
TsCl	4-толуенсулфонил хлорид
TEA	триетиламин

UV	ултраљубичасти регион апсорпционог спектра
VEGFA	васкуларни ендотелијални фактор раста А (енг. <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>)
Vis	видљиви регион апсорпционог спектра
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина (енг. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
екв.	еквивалент
конц.	концентриран
РНК	рибонуклеинска киселина (енг. <i>Ribonucleic acid</i>)
с.т.	собна температура

Списак слика

- Слика 1.** Структурни изомери тиадиазола.
- Слика 2.** Макроциклични деривати 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола.
- Слика 3.** Комерцијално доступни 1,3,4-тиадиазолски лекови.
- Слика 4.** 1,2,4-Тиадиазолски антибиотик Цефозопрам.
- Слика 5.** Познати инхибитори карбоанхидраза.
- Слика 6.** Хемијска структура (E)-3-(4-метоксифенил)-N-(5-(4-метоксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)акриламида.
- Слика 7.** Хемијске структуре 5-супституисаних 2-(2,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазола који показују добру антипролиферативну активност.
- Слика 8.** Хемијска структура (E,E)-2,5-bis[4-(3-диметил-аминопропокси)стирил]-1,3,4-тиадиазола.
- Слика 9.** Хемијска структура деривата индолил-1,3,4-тиадиазола као потенцијалних антитуморских агенаса.
- Слика 10.** Фенолне киселине: хидроксibenзојеве (HBA) и хидроксициметне киселине (HCA).
- Слика 11.** Структурне формуле дихидроксibenзојевих киселина.
- Слика 12.** Серије нових деривата 1,3,4-тиадиазола који у својој структури садрже фенолне хидроксилне групе.
- Слика 13.** Ефекат двадесетчетворочасовног третирања HL-60 ћелија IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'б** и **3'г** на продукцију ROS-а индуковану 5 mM-ним раствором H₂O₂. Резултати су представљени као средња вредност ± SD два независна експеримента.
- Слика 14.** Промене у фазној расподели ћелијског циклуса HL-60 ћелија третираних (А) IC₅₀ и (Б) 2IC₅₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 24 h. Резултати представљају средњу вредност ± SD три независна експеримента. Статистички значајне разлике између контролних и третираних ћелија означене су са * (p<0,05).
- Слика 15.** Фотомикрографије акридин-оранж/етидијум-бромидом обојених контролних HL-60 ћелија и HL-60 ћелија изложених 2IC₅₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 24 h (20x увећање).
- Слика 16.** Утицај специфичних инхибитора каспаза (Z-DEVD-FMK – инхибитор каспазе 3, Z-IETD-FMK - инхибитор каспазе 8, Z-LEHD-FMK - инхибитор каспазе 9) на проценат HL-60 ћелија у субG1 фази третираних 2IC₅₀ концентрацијама једињења (А) **3в**, (Б) **3'в**, (В) **3'е** и (Г) **3'ж**.
- Слика 17.** Фотомикрографије контролних EA.hy926 ћелија и EA.hy926 ћелија изложених субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 20 h.
- Слика 18.** Промене у нивоима експресије гена (А) *MMP2*, (Б) *MMP9* и (В) *VEGFA* у HL-60 ћелијама третираним субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 24 h.
- Слика 19.** Ефекти двадесетчетворочасовног третирања HeLa ћелија IC₂₀ концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (10 μM за свако једињење) на (А) продукцију ROS-а индуковану 10 mM-ним раствором H₂O₂ и (Б) нивое ендогеног ROS-а. Резултати су представљени као средња вредност ± SD два независна експеримента.

- Слика 20.** Промене у расподели фаза ћелијског циклуса HeLa ћелија након 24 h третмана (А) IC₅₀ и (Б) 2IC₅₀ концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**. Резултати представљају средњу вредност $\pm$ SD три независна експеримента. Статистички значајне разлике између контролних и третираних ћелија означене су са * ($p < 0,05$).
- Слика 21.** Утицај 2IC₅₀ концентрација испитиваних једињења (А) **6а**, (Б) **6в**, (В) **6ђ** и (Г) **6л** без и у присуству специфичних инхибитора каспазе 3 (Z-DEVD-FMK), каспазе 8 (Z-IETD-FMK) и каспазе 9 (Z-LEHD-FMK) на проценат HeLa ћелија у субГ1 фази ћелијског циклуса.
- Слика 22.** Промене нивоа експресије (А) *MMP2*, (Б) *MMP9*, (В) *TIMP3* и (Г) *VEGFA* гена у HeLa ћелијама изложеним IC₂₀ концентрацијама једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (10 μ M за свако једињење) током 24 h.
- Слика 23.** Фотомикрографије контролних EA.hy926 ћелија и EA.hy926 ћелија изложених субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **6а**, **6в**, **6ђ** (6,5 μ M за свако једињење) и **6л** (8 μ M) током 20 h.
- Слика 24.** Промене у нивоима експресије (А) *miR-21*, (Б) *miR-133b*, (В) *miR-155* и (Г) *miR-206* у HeLa ћелијама изложеним IC₂₀ концентрацијама једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (10 μ M за свако једињење) током 24 h.
- Слика 25А.** Промене у UV-Vis апсорпционом спектру *CT-DNA* (95 μ M) након интеракције са различитим концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида. Панели А-Г: UV-Vis апсорпциони спектри једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (концентрације 10 μ M, 20 μ M и 40 μ M са свако једињење), респективно, пре и после интеракције са *CT-DNA*.
- Слика 25Б.** Промене у UV-Vis апсорпционом спектру *CT-DNA* (95 μ M) након интеракције са различитим концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида. Панели Д-Ж: поређење апсорпције на 259 nm између *CT-DNA*-1,3,4-тиадиазол-халконских једињења и збирних вредности *CT-DNA* и 1,3,4-тиадиазол-халконских једињења.
- Слика 26.** Криве апсорпционе титрације једињења (А) **6а**, (Б) **6в**, (В) **6ђ** и (Г) **6л** константне концентрације (40 μ M) са растућим концентрацијама *CT-DNA* (2,2, 4,4, 6,6, 8,8, 11 и 13 $\times 10^{-5}$ M); Додатни графици: одређивање константе везивања (*K_b*) на основу графика зависности $[ДНК]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ од $[ДНК]$; Стрелица показује промене апсорбанце при повећању количине *CT-DNA*.
- Слика 27.** Истискивање Hoechst 33258 везане за ДНК једињењима (А) **6а**, (Б) **6в**, (В) **6ђ** и (Г) **6л**. Емисиони спектри ($\lambda_{ex} = 350$ nm) Hoechst 33258 боје (2,8 $\times 10^{-5}$ M) везане за *CT-DNA* (1 $\times 10^{-4}$ M, горња линија) и квенчовање H-*CT-DNA* система једињењима растућих концентрација (0 – 2,2 $\times 10^{-5}$ M, криве од врха ка наниже). Додатни графици: Криве зависности флуоресценције од степена квенчовања Hoechst 33258 везане за *CT-DNA* на $\lambda_{max} = 444$ nm 1,3,4-тиадиазол-халконским једињењима; $r = [једињење]/[CT-DNA]$. Стрелица показује да се интензитет флуоресценције смањује са повећањем концентрације комплекса.
- Слика 28.** Процена оштећења ДНК (% ДНК у репу) применом Комет теста на MRC-5 ћелијама третираним једињењима **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** током 24 h (3,125 – 25 μ M). Као негативна контрола коришћен је фосфатни пуфер, док је H₂O₂ (50 μ M, излагање током 5 минута) коришћен као позитивна контрола. На у-оси налазе се средње вредности $\pm$ SD оштећења ДНК добијене на основу интензитета „репа“ комете.

- Слика 29.** Електрофоретски приказ плазида рUC19 третираног 1,3,4-тиадиазол-халконским хибридима: (А) плазмид рUC19 (12 nM) без (трака Р) и са једињењем **6a** концентрација 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,3 mM и 0,4 mM (траке 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, респективно); (Б) ефекти једињења **6a**, **6в**, **6ђ** и **6л** на оштећење плазида рUC19 изазвано гвожђем (II), при молским односима испитиваних једињења и гвожђа 1:1 и 1:2.
- Слика 30.** Проценат инхибиције (А) DPPH и (Б) ABTS-а праћен током 90 минута реакције за једињења **9в** и **9з**, протокатехуинску киселину (PCA) и NDGA.

Списак схема

- Схема 1.** Таутомерне форме *N*-супституисаних 2-амино-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 2.** Добијање 1,3,4-тиадиазола из ацилхидразина или 1,3,4-оксадиазола.
- Схема 3.** Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиохидразина.
- Схема 4.** „*One-pot*“ синтеза 1,3,4-тиадиазола из ацилхидразина и карбоксилних киселина.
- Схема 5.** Добијање 1,3,4-тиадиазола из диацилхидразина.
- Схема 6.** Механизам циклизације тиосемикарбазида.
- Схема 7.** Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиосемикарбазида помоћу (А) киселинских хлорида и (Б) карбоксилних киселина.
- Схема 8.** Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиосемикарбазида коришћењем гвожђе(III)хлорида.
- Схема 9.** Добијање 1,3,4-тиадиазола реакцијом тиосемикарбазида са сулфонил-bis(2,4-дихидроксифенил)метантионом.
- Схема 10.** Синтеза 2-фенилхидразино-1,3,4-тиадиазола из тиокарбазида.
- Схема 11.** Добијање 2-фенил-5-фенилхидразино-1,3,4-тиадиазола из тиокарбазона.
- Схема 12.** Реакција тиокарбазида и хидразоноил халогенида за добијање (А) деривата 1,3,4-тиадиазола и (Б) bis(1,3,4-тиадиазол-2-ил)хидразона.
- Схема 13.** Уопштена реакција за добијање дитиокарбазата.
- Схема 14.** Синтеза 1,3,4-тиадиазола полазећи од дитиокарбазата добијеног из (А) ацилхидразида и (Б) ациловањем тиохидразида.
- Схема 15.** Добијање 2,5-дифенил-1,3,4-тиадиазола у реакцијама тиобензхидразида са (А) бензалдехидом и (Б) бензонитрилом.
- Схема 16.** (А) Добијање дитиоуреа у реакцији изотиоцијаната и хидразина и (Б) њена циклодехидратација до 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 17.** Добијање 1,3,4-тиадиазола циклизацијом дитиоуреа водоник-пероксидом.
- Схема 18.** (А) Добијање 1,3,4-тиадиазола полазећи од 1,3,4-оксадиазола и (Б) претпостављени механизам реакције.
- Схема 19.** Опште реакције 1,3,4-тиадиазола.
- Схема 20.** Пиролиза *N*-(5-цијанометил-1,3,4-тиадиазол-3-ил)карбамата.
- Схема 21.** Два могућа пута пиролизе 2-(*tert*-бутилдитио)-5-метил-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 22.** Реакције алкиловања 1,3,4-тиадиазола на азотовом атому прстена (А) циклопропилметил бромидом и (Б) алил бромидом.
- Схема 23.** Добијање хидроксиалкил деривата у реакцијама алкиловања 1,3,4-тиадиазола (А) раствором брометанола и (Б) формалдехидом.
- Схема 24.** Електрофилна супституција на угљениковом атому 1,3,4-тиадиазолског прстена (А) молекулом брома и (Б) различитим (хетеро)арил халогенидима.
- Схема 25.** Електрофилна супституција халоген-супституисаних 1,3,4-тиадиазола третирањем (А) натријум метоксидом, (Б) 4-хлорбензентиолом, (В) секундарним амином и (Г) диетил малонатом.
- Схема 26.** Електрофилна супституција сумпорних група 1,3,4-тиадиазола третирањем (А) диетил цинком и (Б) натријум алкоксидом.
- Схема 27.** Sandmeyer-ова реакција 2-амино-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 28.** Диазотовање 2-амино-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 29.** Diels-Alderova реакција 1,3,4-тиадиазола са норборнадиеном.
- Схема 30.** Функционализација метил групе/а 2,5-диметил-1,3,4-тиадиазола адицијом

алдехида.

- Схема 31.** Функционализација метил групе 2,5-диметил-1,3,4-тиадиазола естрима ароматичних карбоксилних киселина.
- Схема 32.** Слободнорадикалско халогеновање 2-меркапто-5-метил-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 33.** *N*-Функционализација 2-амино-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 34.** Реакције диазотовања и купловања 2-амино-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 35.** Реакција 2-амино-1,3,4-тиадиазола са алдехидима.
- Схема 36.** Реакције анулације 2-амино-1,3,4-тиадиазола са амбидентатним електрофилима.⁶⁶⁻⁷¹
- Схема 37.** *O*-Ациловање деривата 1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-она.
- Схема 38.** Деметиловање 2-метокси-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 39.** *S*-Алкиловање 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиола.
- Схема 40.** *S*-Алкиловање 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-тиона.
- Схема 41.** *S*-Деметиловање 2-(метилсулфанил)-1,3,4-тиадиазола.
- Схема 42.** Алиловање 1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-тиона.
- Схема 43.** Оксидација 2(5)-меркапто-1,3,4-тиадиазола при чему се добија (А) одговарајући сулфон; (Б) дисулфидно једињење.
- Схема 44.** Синтеза 2,6-диметилимидазо[2,1-*b*][1,3,4]тиадиазола.
- Схема 45.** Синтеза *N*-(2,4-Диметилфенил)-5-(4-нитрофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-аминa.
- Схема 46.** Синтеза 3,6-дисупституисаних 1,2,4-триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тиадиазола.
- Схема 47.** Синтеза тиолних и аминотиолних деривата 1,3,4-тиадиазола који показују антиоксидативну активност.
- Схема 48.** Синтеза халогенсулфидних деривата тиадиазола који показују инхибиторну активност према карбоанхидразама.
- Схема 49.** Синтеза тиолских деривата 1,3,4-тиадиазола као потенцијалних СА инхибитора.
- Схема 50.** Синтеза ацетамидних деривата 1,3,4-тиадиазола која показују добру цитотоксичну активност.
- Схема 51.** Синтеза деривата 1,3,4-тиадиазола (**161a-j**) који у својој структури садрже пиразолски прстен.
- Схема 52.** Реагенси и услови: i) POCl₃, тиосемикарбазид, 1 h, рефлукс; ii) RCOCl, THF, 24 h, с.т. или диоксан, 12 h, рефлукс.
- Схема 53.** Резонанта стабилизација радикала насталог након апстракције атома водоника са (А) атома кисеоника и (Б) атома азота 1,3,4-тиадиазолског деривата серије А.
- Схема 54.** Реагенси и услови: i) POCl₃, с.т., H₂NHNC(=S)NH₂, 1 h, рефлукс; ii) супституисани ацетофенони, NaOH, MeOH, 2 h, рефлукс, HCl; iii) SOCl₂, DMF, CH₂Cl₂, 2 h, с.т.; iv) 2, диоксан, 12 h, рефлукс.
- Схема 55.** Резонанта стабилизација радикала насталог након апстракције атома водоника са (А) атома кисеоника и (Б) атома азота 1,3,4-тиадиазолског деривата серије Б.
- Схема 56.** Реагенси и услови: i) POCl₃, с.т., тиосемикарбазид, 1 h, рефлукс; ii) 3,4-дихидроксибензоил хлорид, диоксан, 24 h, рефлукс.
- Схема 57.** Реагенси и услови: i) 3,4-дихидроксибензалдехид, AcOH, EtOH, 18 h, рефлукс; ii) NaBH₄, MeOH, 1 h, с.т.

Списак табела

- Табела 1.** Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А.*
- Табела 2.** *In vitro* цитотоксична активност једињења **3а-ж** и **3'а-ж**.*
- Табела 3.** Антиоксидативна активност 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида серије Б.*
- Табела 4.** *In vitro* цитотоксична активност једињења **6а-л**.*
- Табела 5.** Резултати DPPH и ABTS тестова за одређивање антиоксидативне активности 1,3,4-тиадиазола **9а-м**, **10** и **11**.^a

ИЗВОД

У оквиру ове дисертације описани су синтеза, структурна карактеризација и резултати испитивања антиоксидативне и цитотоксичне активности нових деривата 1,3,4-тиадиазола који у својој структури садрже фенолне хидроксилне групе. У циљу одређивања механизма антитуморског деловања, за одабрана једињења извршена су додатна испитивања попут анализе расподеле фаза ћелијског циклуса, испитивања утицаја на стварање ROS-а у малигним ћелијама услед дејства водоник-пероксида, морфолошке анализе типа ћелијске смрти, одређивања циљних каспаза, анализе експресије гена, као и испитивања интеракција са ДНК.

Синтетизоване су три серије једињења које укупно садрже 44 амидна деривата 1,3,4-тиадиазола, полазећи од фенолних киселина. Прве две серије амида синтетизоване су куповањем 5-супституисаних-2-амино-1,3,4-тиадиазола изведених из фенолних киселина са различитим хлоридима киселина, који су у случају серије Б у својој структури садржали и халконску јединицу. Трећа серија амидних деривата добијена је реакцијом хлорида фенолне киселине са супституисаним 2-амино-1,3,4-тиадиазолима. Сва новосинтетизована једињења структурно су окарактерисана применом NMR и IR спектроскопских метода.

Антиоксидативна активност свих синтетизованих 1,3,4-тиадиазолских деривата испитана је применом DPPH методе, а добијени резултати упоређени су са познатим антиоксидантима, аскорбинском и/или нордихидрогвајаретинском киселином. Једињења све три серије показала су умерену до добру активност неутралисања DPPH радикала. Антиоксидативни капацитет синтетизованих једињења може се објаснити могућношћу стабилизације радикала, формираног након апстракције водониковог атома DPPH радикалом, делокализацијом неспареног електрона преко 1,3,4-тиадиазолског прстена. Испитана је и активност неутралисања ABTS радикал-катјона амидних деривата серије В, а добијени резултати су показали да синтетизована једињења, поред капацитета за неутрализацију DPPH радикала, имају бољу способност неутралисања ABTS радикал-катјона у односу на аскорбинску киселину, NDGA и полазну 3,4-дихидроксибензојеву киселину.

Антитуморска активност 1,3,4-тиадиазолских деривата серија А и Б одређена је испитивањем цитотоксичности *in vitro* према ћелијским линијама аденокарцинома цервикса (HeLa), карцинома плућа (A549) и акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) и добијени резултати упоређени су са цитотоксичном активношћу цисплатине, једног од најчешће коришћених хемиотерапеутских лекова. У циљу одређивања селективности и терапеутског потенцијала ових једињења испитана је и њихова токсичност према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Деривати серије А показали су најснажнију активност према ћелијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) и ћелијама карцинома плућа (A549). Једињења са адамантил групом као супституентом, поред најснажније активности неутралисања DPPH радикала, показала су се и као најактивнија према HL-60 ћелијској линији. Деривати серије Б показали су умерену до добру цитотоксичну активност према HL-60 и HeLa ћелијским линијама. Обзиром да резултати не показују значајне разлике између утицаја електрон-привлачних и електрон-донорских супституената ацетофенонске групе, може се закључити да тиадиазол-халконска фармакофора деривата ове серије игра кључну улогу у њиховом цитотоксичном деловању. Цитотоксичност свих деривата серије А и већине једињења серије Б према ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) значајно је нижа у односу на поменуте малигне ћелијске линије, што указује на добру селективност ових једињења. Поред тога, сва испитивана једињења показују мање изражену цитотоксичну активност према MRC-5 ћелијској линији од референтног хемиотерапеутика, цисплатине.

Наведени остварени резултати, као и резултати додатних испитивања механизма цитотоксичног деловања указују на обећавајућа антитуморска својства новосинтетизованих деривата 1,3,4-тиадиазола изведених из фенолних киселина.

SUMMARY

Within this study, the synthesis, structural characterization, and evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of novel 1,3,4-thiadiazole derivatives containing phenolic hydroxyl groups in their structure were described. In order to elucidate the mechanism of the antitumor activity, additional tests were performed for the selected compounds, such as cell cycle phase distribution analysis, investigation of their influence on ROS generation in malignant cells due to the action of hydrogen peroxide, cell death type morphology analysis, target caspase determination, gene expression analysis, and DNA interaction assays.

Three series containing a total of 44 1,3,4-thiadiazole amide derivatives were synthesized starting from phenolic acids. The first two series of amides were synthesized by coupling 5-substituted-2-amino-1,3,4-thiadiazoles derived from phenolic acids with different acid chlorides, which in the case of series B contained a chalcone unit in their structure. The third series of amide derivatives was obtained by the reaction of the phenolic acid chloride with substituted 2-amino-1,3,4-thiadiazoles. All newly synthesized compounds were structurally characterized using NMR and IR spectroscopic methods.

The antioxidant activity of all synthesized 1,3,4-thiadiazole derivatives was examined using the DPPH method, and the obtained results were compared with well-known antioxidants, ascorbic and/or nordihydroguaiaretic acid. Compounds of all three series showed moderate to good DPPH radical scavenging activity. The antioxidant capacity of the synthesized compounds can be explained by the possibility of stabilizing the radical formed after abstraction of the hydrogen atom by the DPPH radical, *via* delocalization of the unpaired electron across the 1,3,4-thiadiazole ring. ABTS radical cation scavenging activity of amide derivatives of series B was also investigated and the obtained results showed that the synthesized compounds, in addition to the DPPH radical scavenging capacity, have a better ABTS radical cation scavenging ability compared to ascorbic acid, NDGA and starting 3,4-dihydroxybenzoic acid.

The antitumor activity of 1,3,4-thiadiazole derivatives of series A and B was evaluated by examining *in vitro* cytotoxicity against cervical adenocarcinoma (HeLa), lung carcinoma (A549) and acute promyelocytic leukemia (HL-60) cell lines and the obtained results were compared with cytotoxic activity of cisplatin, one of the most commonly used

chemotherapeutic drugs. In order to determine the selectivity and therapeutic potential of these compounds, their toxicity towards the normal lung fibroblast cell line (MRC-5) was also examined. Derivatives of series A showed the strongest activity against acute promyelocytic leukemia (HL-60) cells and lung carcinoma cells (A549). Compounds with the adamantyl group as a substituent, in addition to the strongest DPPH radical scavenging activity, have also been shown to be the most active against the HL-60 cell line. Derivatives of series B showed moderate to good cytotoxic activity against HL-60 and HeLa cell lines. Since the results show no significant difference between the effects of electron-withdrawing and electron-donating substituents of the acetophenone group, it can be concluded that the thiadiazole-chalcone pharmacophore of this series plays a key role in their cytotoxic activity. The cytotoxicity of all derivatives of series A and most of series B against the lung fibroblast cell line (MRC-5) is significantly lower relative to the mentioned malignant cell lines, indicating good selectivity of these compounds. In addition, all tested compounds showed lower cytotoxic activity against MRC-5 cell line than the reference chemotherapeutic agent, cisplatin.

The described results, as well as the results of additional evaluation of the cytotoxic activity mechanism, indicate the promising antitumor properties of the newly synthesized 1,3,4-thiadiazole derivatives derived from phenolic acids.

1. ОПШТИ ДЕО

1.1. Тиадиазоли – историјат и значај

Тиадиазоли представљају класу хетероцикличних ароматичних органских једињења чији петочлани прстен садржи атом сумпора и два атома азота. У зависности од међусобног распореда атома S и N, у природи постоје четири изомерна облика тиадиазола: 1,2,3-тиадиазол, 1,2,4-тиадиазол, 1,2,5-тиадиазол и 1,3,4-тиадиазол (Слика 1).



1,2,3-Тиадиазол 1,2,4-Тиадиазол 1,2,5-Тиадиазол 1,3,4-Тиадиазол

Слика 1. Структурни изомери тиадиазола.

Бројни публиковани радови који се могу наћи у литератури говоре у прилог чињеници да су 1,3,4-тиадиазоли проучавани знатно више од осталих изомера. Као разлог томе може се навести широк спектар биолошких активности које овај изомер показује, попут антимикробне,¹ антитуберкулозне,² антиоксидативне,³ антиинфламаторне,⁴ антиконвулзивне,⁵ антитуморске,⁶ антифунгалне⁷ и многих других.

Развој хемије 1,3,4-тиадиазола отпочео је открићем хидразина и фенилхидразина од стране немачког хемичара Emil-a Fischer-a крајем деветнаестог века. Он је 1882. године описао први 1,3,4-тиадиазол, али су стварну природу прстеног система први представили Freund и Kuh 1890. године. Неколико година касније, 1894. године, Busch са својом групом започиње са истраживачким радом у овом пољу и у великој мери доприноси брзој експанзији хемије тиадиазола током првих деценија двадесетог века.

Управо због претходно поменутих биолошких активности, 1,3,4-тиадиазоли су постали важна класа хетероцикличних једињења. Осим у фармацеутској, нашли су примену и у хемији материјала, као и у агрохемији.

1.2. Таутомерија 1,3,4-тиадиазола

Када је прстенасти систем 1,3,4-тиадиазола, који у себи садржи три хетероатома, у потпуној коњугацији, не долази до појаве таутомерије. Међутим, таутомерија је могућа у присуству одређених супституената. Тако, на пример, иако 2-амино-1,3,4-тиадиазоли постоје скоро искључиво у amino форми (А, Схема 1) у раствору и у чврстом стању, бројна литература указује на постојање таутомерних облика *N*-супституисаних 2-амино-1,3,4-тиадиазола (А и Б, Схема 1) у обе фазе, што може бити од изузетног значаја за биолошку активност.⁸ Правац промене равнотеже зависи од природе супституената присутних на тиадиазолском прстену.⁹

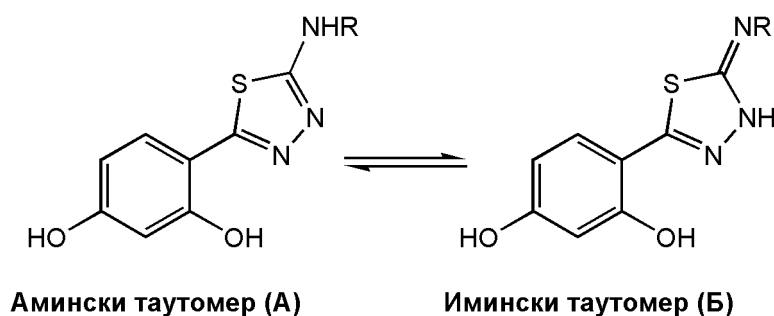


Схема 1. Таутомерне форме *N*-супституисаних 2-амино-1,3,4-тиадиазола.

1.3. Методе за добијање 1,3,4-тиадиазола

Постоји више метода чијом применом се може извршити синтеза 1,3,4-тиадиазола. Најчешће се добијају општом методом циклизације моноацилхидразина и *N,N'*-диацилхидразина или методом трансформације 1,3,4-оксадиазола (Схема 2).

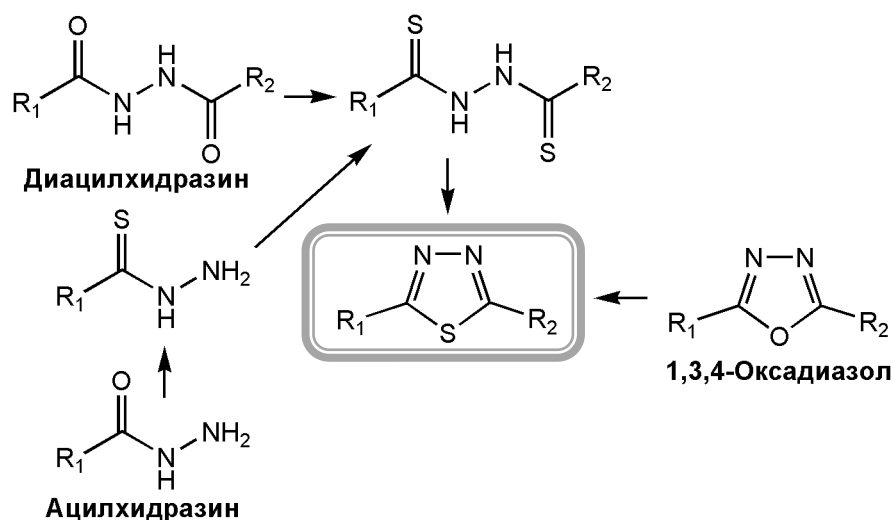


Схема 2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из ацилхидразина или 1,3,4-оксадиазола.

Такође, 1,3,4-тиадиазоли се могу синтетизовати полазећи од тиохидразина, као што су тиосемикарбазиди, тиокарбазиди, дитиокарбазати, тиохидразиди и дитиоуреа (Схема 3).

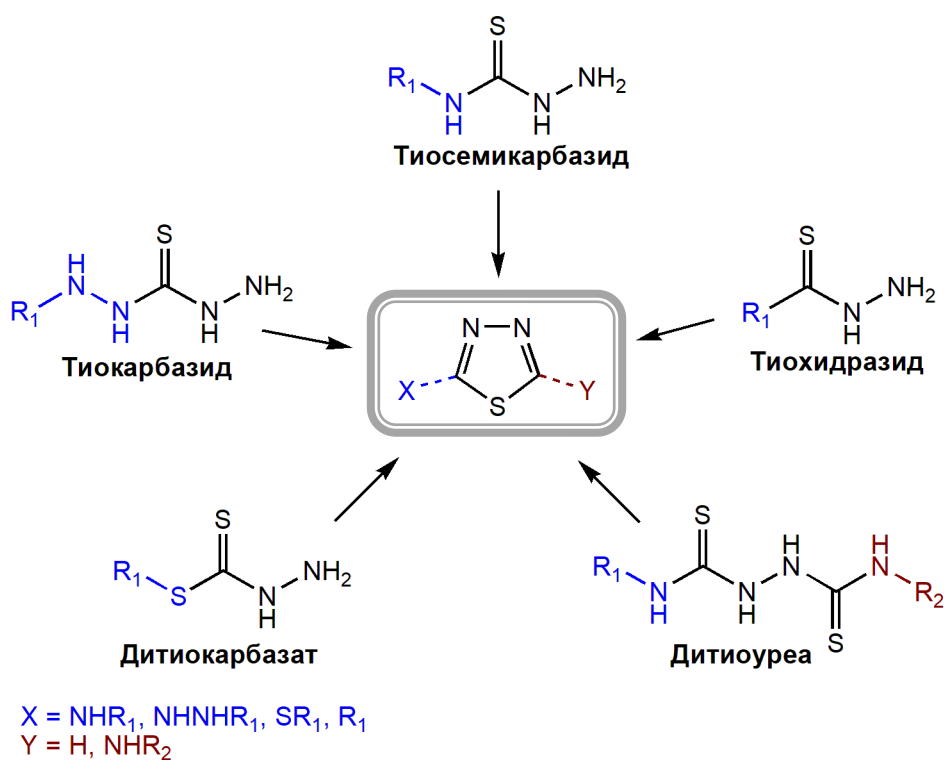


Схема 3. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиохидразина.

1.3.1. Добијање 1,3,4-тиадиазола из ацилхидразина

Као што је претходно приказано у Схеми 2, 1,3,4-тиадиазоли се могу добити сулфурацијом одговарајућих 1,4-дикарбонил или ацил прекурсора коришћењем фосфор пентасулфида (P_2S_5) и Lawesson-овог реагенса (LR).¹⁰ Међутим, ове уобичајене методе подразумевају ригорозне реакционе услове, а такође су често праћене формирањем споредних производа.

1.3.1.1. Добијање 1,3,4-тиадиазола из моноацилхидразина

Протеклих деценија представљено је више врста „*one-pot*“ реакција за добијање 1,3,4-тиадиазола, помоћу којих је избегнута захтевна класична вишестепена синтеза. Иако су многе од ових метода донеле знатно побољшање, неке међу њима и даље захтевају ригорозне реакционе услове.

Augustine и сарадници публиковали су „*one-pot*“ синтезу 1,3,4-тиадиазола директно из карбоксилне киселине и моноацилхидразина у присуству триетиламина (ТЕА) и пропилфосфонског анхидрида (ТЗР), који у овој реакцији има улогу како куплујућег, тако и циклодеhidратационог реагенса (Схема 4).¹¹

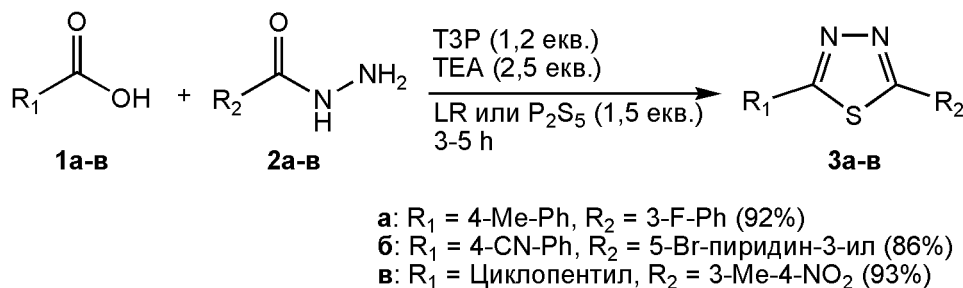


Схема 4. „*One-pot*“ синтеза 1,3,4-тиадиазола из ацилхидразина и карбоксилних киселина.

1.3.1.2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из диацилхидразина

Циклизација N,N' -диацилхидразина је веома погодна и често примењивана метода за добијање 1,3,4-тиадиазола. Сулфурацијом диацилхидразина (**4a-g**, Схема 5) у

присуству Lawesson-овог реагенса, праћеном оксидативном циклизацијом у различитим растварачима (као што су тетрахидрофуран, толуен, диоксан и ксилен) добијају се индолил-1,3,4-тиадиазоли (**5a-г**, Схема 5).¹² Најбољи приноси постигнути су реакцијом у анхидрованом тетрахидрофурану.

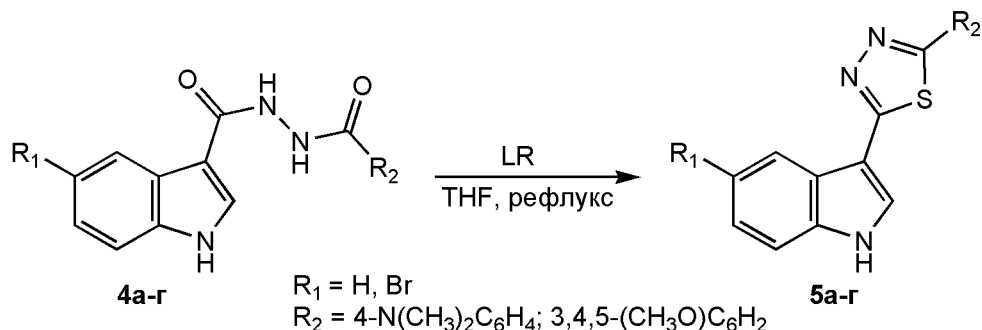


Схема 5. Добијање 1,3,4-тиадиазола из диацилхидразина.

Класичне методе за добијање тиадиазола обично захтевају дуга реакциона времена и високу температуру, употребу реагенса за сулфурацију, као и коришћење анхидрованих угљоводоничних растварача, што их чини веома неповољним за животну средину. Поред тога, често су праћене ниским приносима и нуспроизводима. Осим једноставније обраде и лакшег извођења, значајне предности реакција без присуства растварача могу бити смањење загађења животне средине, као и нижи трошкови. Коришћење микроталасног зрачења као неконвенционалног извора енергије показало се веома корисним у овој области. Међутим, процес приказан у Схеми 5 изведен у присуству Lawesson-овог реагенса у условима без растварача, коришћењем микроталасног зрачења, дао је смесу жељеног тиадиазола (**5a-г**) и споредних производа.¹² Према томе, одговарајући реакциони услови могу допринети побољшању реактивне ефикасности, уз примену специфичних реагенса.

1.3.2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиохидразина

1,3,4-Тиадиазоли се могу добити и циклизацијом тиохидразина или његових аналога. Тиохидразини се могу класификовати као тиосемикарбазиди, тиокарбазиди, дитиокарбазати, тиохидразиди, дитиоурее и други.

1.3.2.1. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиосемикарбазида

Циклизација тиосемикарбазида или супституисаних тиосемикарбазида веома је ефикасна метода за добијање 2-амино-1,3,4-тиадиазола.¹³⁻¹⁸ У литератури се често јављају 2-амино-1,3,4-тиадиазоли као интермедијери у синтези бројних деривата 1,3,4-тиадиазола. Процес циклизације тиосемикарбазида започиње ациловањем α -амино групе или њеном кондензацијом при чему се формирају Schiff-ове базе. Након тога се, услед дејства неког од средстава за дехидратацију као што су TMSCl (триметилсилил хлорид), TsCl (4-толуенсулфонил хлорид), PPh_3 (трифенилфосфин), SOCl_2 (тионил хлорид), PCl_5 (фосфор пентахлорид) и други, добијају одговарајући тиадиазоли (Схема 6).

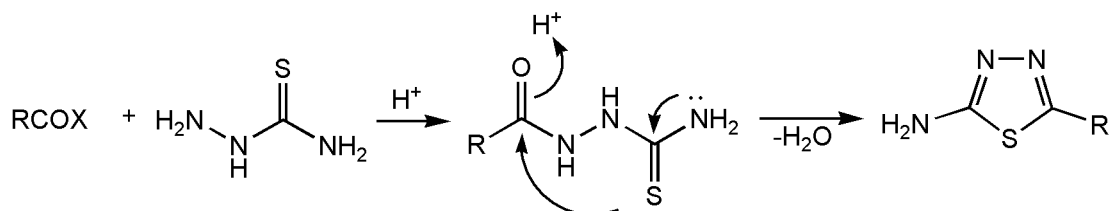


Схема 6. Механизам циклизације тиосемикарбазида.

За добијање тиадиазола на овај начин често се користе уобичајени агенси за ациловање, попут хлорида киселина¹³⁻¹⁶ или саме карбоксилне киселине^{17,18} (Схема 7).

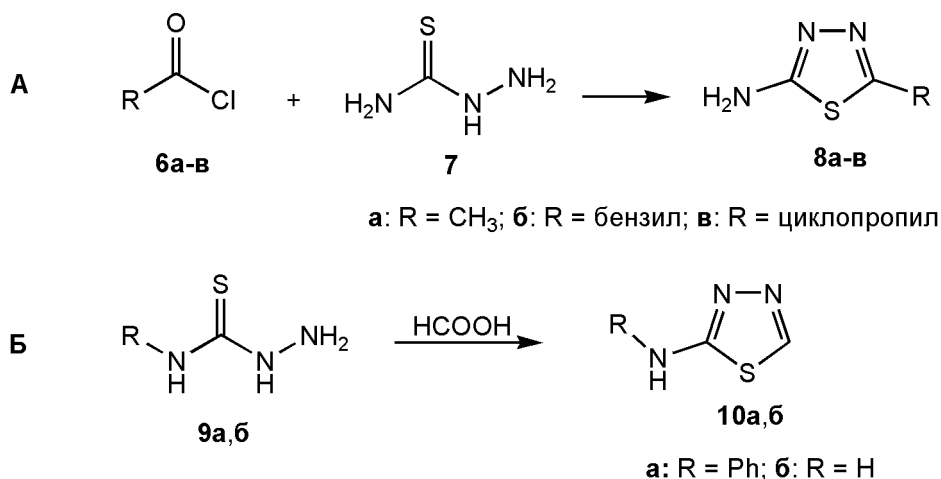


Схема 7. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиосемикарбазида помоћу (А) киселинских хлорида и (Б) карбоксилних киселина.

Метални оксиданти, као што је гвожђе(III) хлорид, могу се такође користити за добијање тиадиазола из тиосемикарбазида (Схема 8).¹⁹ Такође, реакцијом

сулфонил-bis(2,4-дихидроксифенил)метантиона (STB) са тиосемикарбазидом у метанолу, добија се одговарајући *N*-супституисани 5-амино-1,3,4-тиадиазол (Схема 9).²⁰

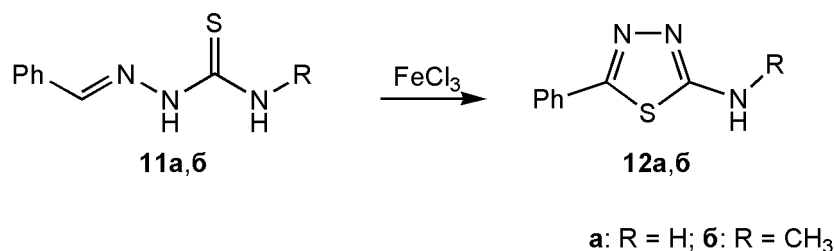


Схема 8. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиосемикарбазида коришћењем гвожђе(III) хлорида.

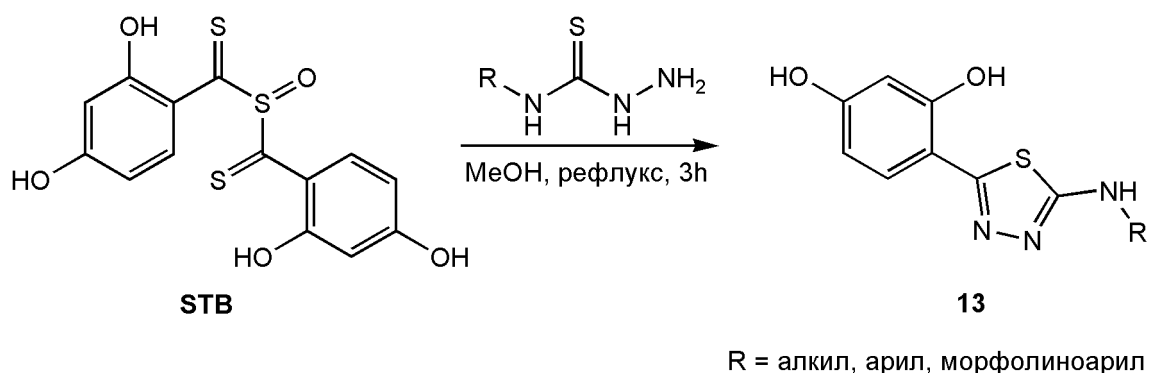


Схема 9. Добијање 1,3,4-тиадиазола реакцијом тиосемикарбазида са сулфонил-bis(2,4-дихидроксифенил)метантионом.

1.3.2.2. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиокарбазида

Реакција за добијање 1,3,4-тиадиазола из тиокарбазида одвија се према сличном механизму као и реакција тиосемикарбазида. Једина разлика огледа се у супституентима који се овим реакцијама уводе на тиадиазолски прстен.

Уколико се фенилтиокарбазид (**14**, Схема 10) загрева у присуству мравље киселине, долази до његове конверзије у фенилхидразино-1,3,4-тиадиазол (**15**, Схема 10).²¹

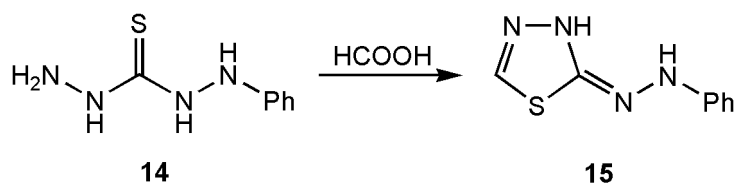


Схема 10. Синтеза 2-фенилхидразино-1,3,4-тиадиазола из тиокарбазида.

На исти начин се, полазећи од 1-фенил бензалтиокарбазона **16**, може добити 2-фенил-5-фенилхидразино-1,3,4-тиадиазол **17** (Схема 11).²¹

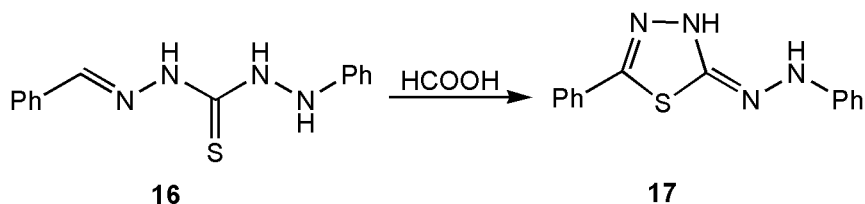


Схема 11. Добијање 2-фенил-5-фенилхидразино-1,3,4-тиадиазола из тиокарбазона.

Sayed је у свом раду показао да се третирањем тиокарбазида са различитим хидразоноил халогенидима (**18a-e**, Схема 12А) добијају одговарајући тиадиазоли (**19a-e**, Схема 12А).²² У истом раду, аутор је такође представио и добијање bis(1,3,4-тиадиазол-2-ил)хидразона (**21**, Схема 12Б) коришћењем исте методе.

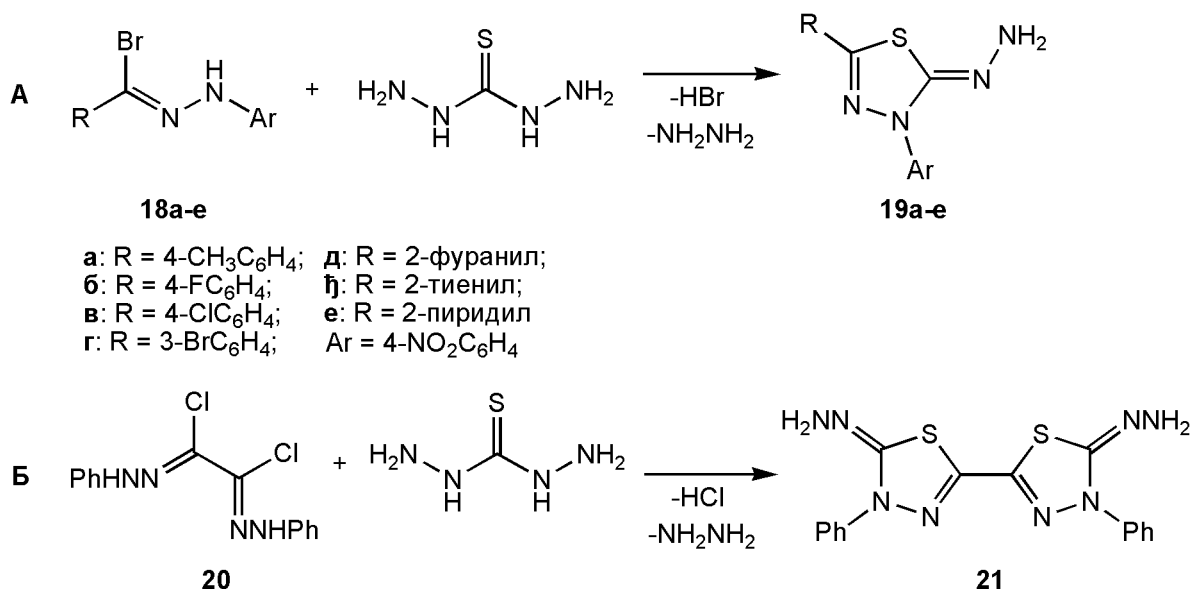


Схема 12. Реакција тиокарбазида и хидразоноил халогенида за добијање (А) деривата 1,3,4-тиадиазола и (Б) bis(1,3,4-тиадиазол-2-ил)хидразона.

1.3.2.3. Добијање 1,3,4-тиадиазола из дитиокарбазата

Дитиокарбазати се могу добити у реакцији угљен дисулфида са хидразином, хидразидом, хидразоном, тиосемикарбазидом или тиоацилхидразином у базним условима (Схема 13).

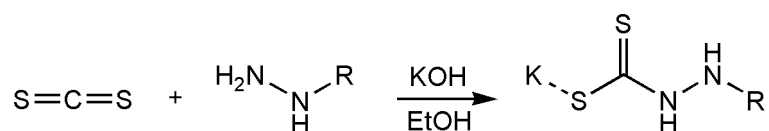


Схема 13. Уопштена реакција за добијање дитиокарбазата.

Истовремено, дитиокарбазати подлежу реакцији ациловања која се одвија уз циклодехидратацију (дехидратационо средство је најчешће концентрована сумпорна киселина, мада се повремено користи и трифлуоросирћетна киселина), при чему се добијају 2-тиол/тион 1,3,4-тиадиазоли.

Wei и Kadi са својим сарадницима публиковали су општу методу за синтезисовање дитиокарбазата и 1,3,4-тиадиазола полазећи од ацилхидразида (Схема 14А).^{23,24} 1,3,4-Тиадиазоли се могу добити на други начин ациловањем тиохидразида **25** при чему се најпре формира дитиокарбазат који се потом дехидратише (Схема 14Б).²⁵

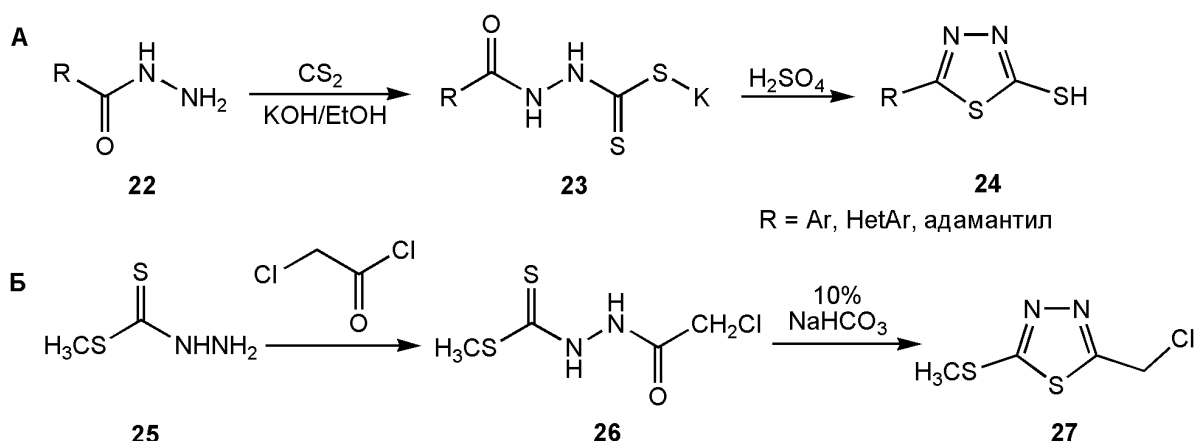


Схема 14. Синтеза 1,3,4-тиадиазола полазећи од дитиокарбазата добијеног из (А) ацилхидразида и (Б) ациловањем тиохидразида.

Раније приказана једињења **19а-е** и **21** (Схема 12) се такође могу добити реакцијом дитиокарбазата са хидразоноил халогенидима (**18а-е** и **20**, Схема 12).²²

1.3.2.4. Добијање 1,3,4-тиадиазола из тиохидразида

Обзиром да су тиохидразиди по хемијској структури слични тиосемикарбазидима (разлика је у α -амино групи), тако је и механизам добијања 1,3,4-тиадиазола из тиохидразида сличан механизму реакције са тиосемикарбазидима. Процес се састоји из ациловања тиохидразида (карбоксилним киселинама, киселинским халогенидима или анхидридима киселина) или формирања Schiff-ове базе (са алдехидом), односно хидразона (са нитрилом), након чега следи циклодехидратација *in situ* ради добијања одговарајућих 1,3,4-тиадиазола.

Третирањем тиобензхидразида **28** бензалдехидом (Схема 15А) добија се дериват тиохидразида **29** који даљом циклодехидратацијом у присуству $K_2S_2O_8$ даје 2,5-дифенил-1,3,4-тиадиазол **30**. У реакцији тиобензхидразида **28** са бензонитрилом (Схема 15Б) најпре се добија тиобензоилбензамидразон **31**, који даље у присуству оксиданта даје исти производ **30**.²⁶

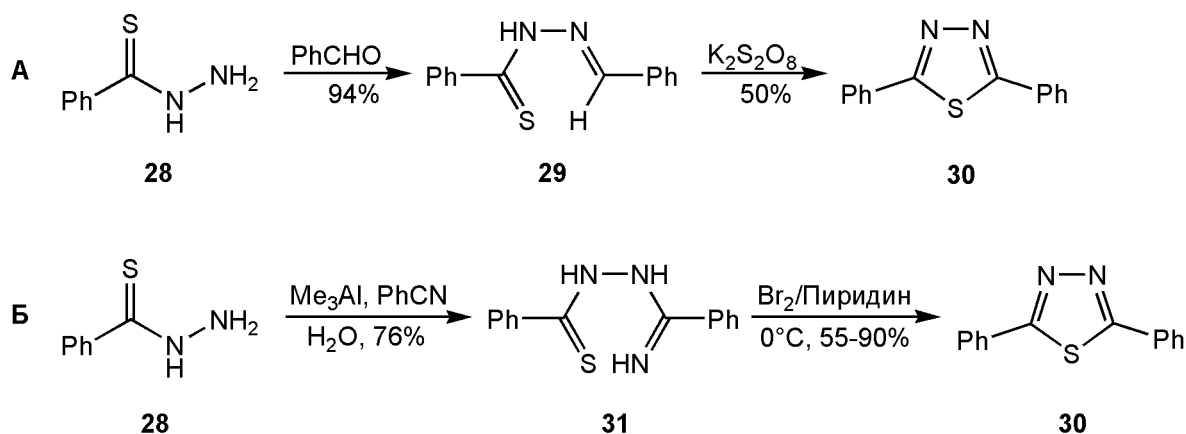


Схема 15. Добијање 2,5-дифенил-1,3,4-тиадиазола у реакцијама тиобензхидразида са (А) бензалдехидом и (Б) бензонитрилом.

1.3.2.5. Добијање 1,3,4-тиадиазола из дитиоуреа

Дитиоуреа се може добити у реакцији изотиоцијаната са хидразином (Схема 16А) или тиосемикарбазидом.²⁷ Даљом циклодехидратацијом дитиоуреа добија се 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазол који је важан прекурсор за добијање других 2,5-дисупституисаних 1,3,4-тиадиазола. Формирање тиадиазола може се објаснити интрамолекулским нуклеофилним нападом сумпора из 2-тиолне или азота из -NH

групе на угљеников атом и елиминацијом RNH_2 или H_2S , као што је приказано у Схеми 16Б. Елиминацијом анилина или алиламина добија се 5-супституисани 3H-[1,3,4]тиадиазол-2-тион (**33**, Схема 16Б), док се елиминацијом H_2S добија N,N'-дисупституисани-[1,3,4]тиадиазол-2,5-диамин (**34**, Схема 16Б).²⁸

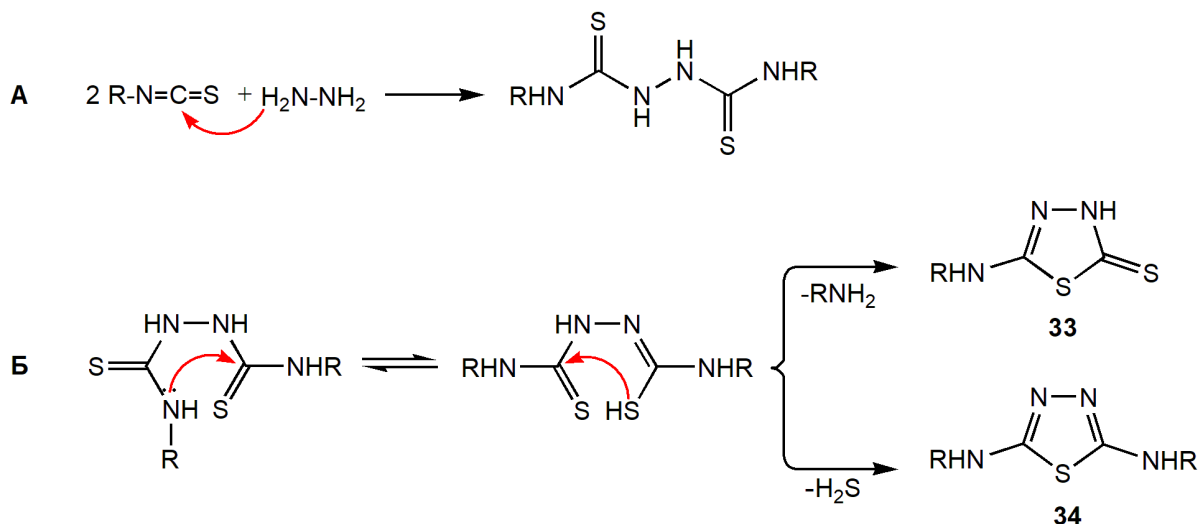


Схема 16. (А) Добијање дитиоуреа у реакцији изотиоцијаната и хидразина и (Б) њена циклодехидратација до 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола.

Уколико се дитиоуреа третира 3%-тним водоник-пероксидом, врши се циклизација до 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола (**35**, Схема 17).²⁹

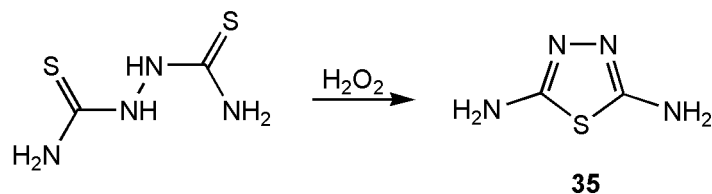


Схема 17. Добијање 1,3,4-тиадиазола циклизацијом дитиоуреа водоник-пероксидом.

1.3.3. Добијање 1,3,4-тиадиазола из 1,3,4-оксадиазола

Трансформација епоксида до еписулфида може се извршити деловањем тиоцијаната или тиоуреа, при чему у поменутим хетероциклима долази до замене атома кисеоника атомом сумпора. Ипак, у литератури постоји мало података о конверзији 1,3,4-оксадиазола до 1,3,4-тиадиазола.³⁰ Padmavathi и сарадници успешно су извели интерконверзију 1,3,4-оксадиазола (**36a-в**, Схема 18А) са тиоуреом у THF-у при чему су добили 1,3,4-тиадиазоле (**37a-в**, Схема 18А) у високим приносима

(70-78%). Претпоставка је да механизам ове реакције (Схема 18Б) почиње нуклеофилним нападом атома сумпора тиоурее на С2 или С5 положај 1,3,4-оксадиазола, услед чега долази до отварања прстена и формирања тиоуронијумове соли. Ова со даље подлеже измени до оксоуронијумове соли, након чега се затварањем прстена уз елиминацију молекула уреје добија одговарајући тиадиазол.³¹

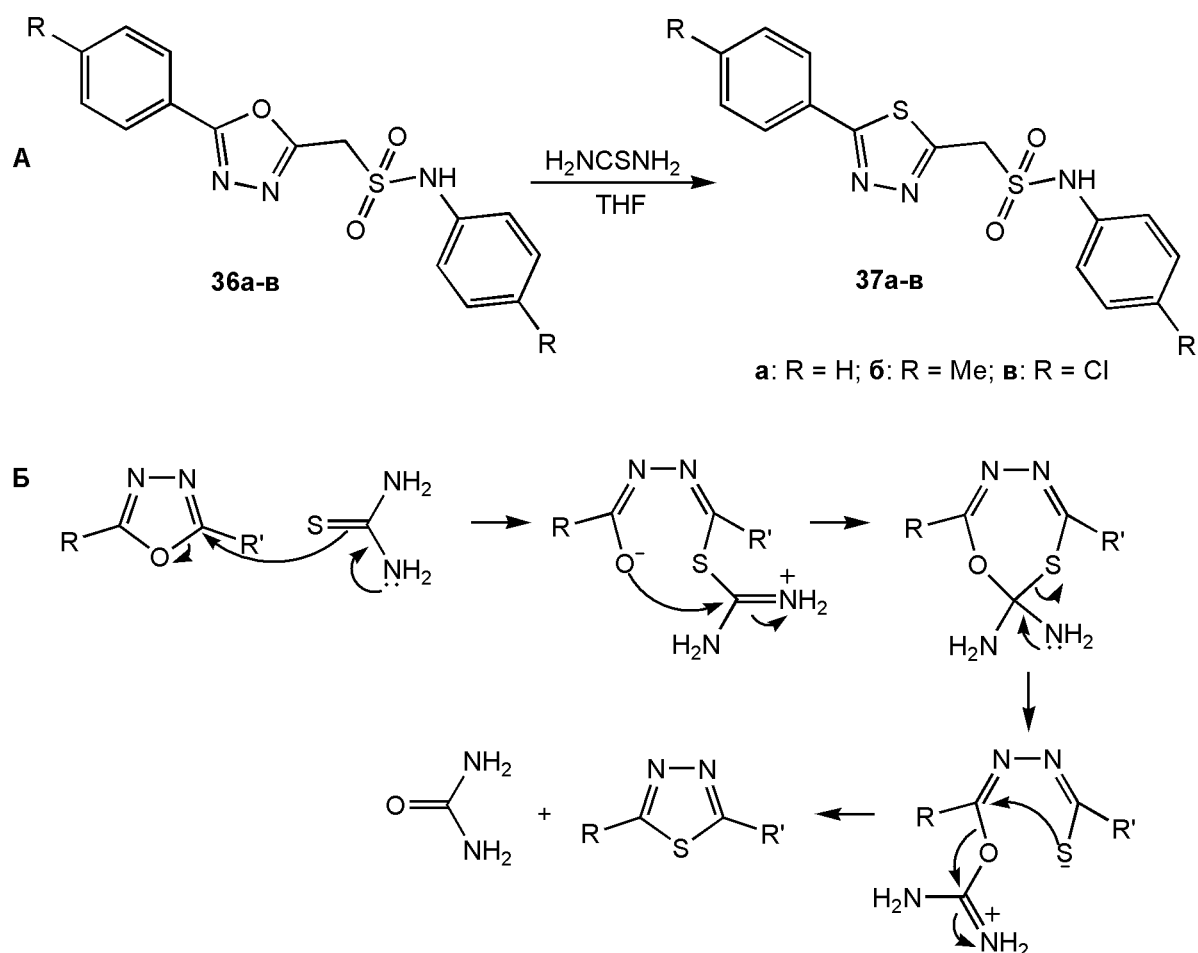
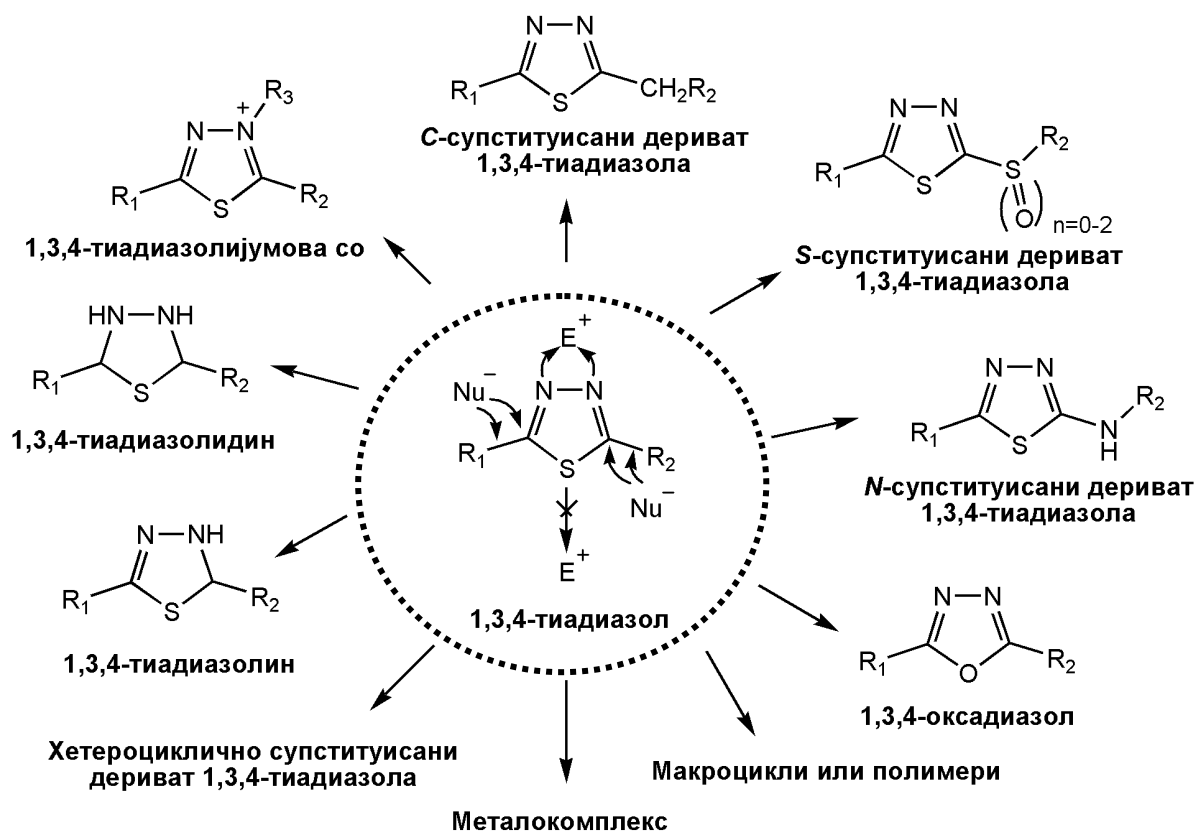


Схема 18. (А) Добијање 1,3,4-тиадиазола полазећи од 1,3,4-оксадиазола и (Б) претпостављени механизам реакције.

1.4. Реактивност 1,3,4-тиадиазола

Индуктивни ефекти више хетероатома у прстену чине тиадиазоле, као и већину азола, веома славим базама. Несупституисани 1,3,4-тиадиазолски прстен тешко подлеже реакцијама нуклеофилне супституције, док електрофилна супституција на угљениковом атому није довољно позната. С друге стране, супституисани тиадиазоли

подложни су нуклеофилном нападу на угљеников атом при чему се одлазеће групе лако елиминишу.³² Азотови атоми прстена могу бити мета електрофилног напада у зависности од таутомеризабилности супституената на положајима 2 и 5. Како је електрофилни напад на атом сумпора релативно редак, може се рећи да реактивност 1,3,4-тиадиазола потиче од нуклеофилних центара локализованих на атомима азота и од електрофилних центара локализованих на угљениковим атомима. Додатна реактивност може потицати од могућности трансформације супституената везаних за угљеникове атоме на положајима 2 и 5. Захваљујући овим својствима 1,3,4-тиадиазоли представљају погодне полазне супstrate за добијање различитих једињења (Схема 19).



1.4.1. Пиролиза 1,3,4-тиадиазолских деривата

1,3,4-Тиадиазоли подлежу пиролитичкој фрагментацији која се може упоредити са оним која је примећена у масеној спектрометрији.

Пиролиза *N*-(5-цијанометил-1,3,4-тиадиазол-3-ил)карбамата (**38**) у гасовитом стању (Схема 20) одвија се преко шесточланог прелазног стања, при чему се као

крајњи производи добијају етен, угљендиоксид и 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил-ацетонитрил (**39**).³³

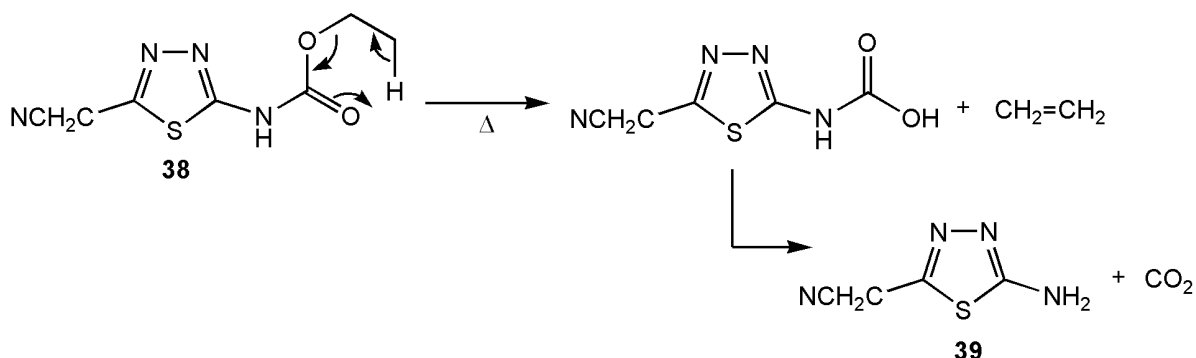


Схема 20. Пиролиза *N*-(5-цијанометил-1,3,4-тиадиазол-3-ил)карбамата.

Пиролизом под високим вакуумом 2-(*tert*-бутилдитио)-5-метил-1,3,4-тиадиазола (**40**, Схема 21) полазећи од собне температуре до 900 °C, добијају се 2-метилпропен, изотиоцијанска киселина (HNCS), тиадиазол **42**, угљен дисулфид (CS₂), ацетонитрил (CH₃CN) и одређене сумпорне врсте.³⁴ Присуство 2-метилпропена може бити узроковано β-елиминацијом водоника. У овој реакцији настаје дисулфидни интермедијер (**41**, Схема 21) који даље подлеже фрагментацији преко два главна пута (А и Б). У реакционом путу А фрагментација дисулфидног деривата тиадиазола даје молекул сумпора и 2-меркапто-5-метил-1,3,4-тиадиазол **42** који се на температури изнад 500 °C разлаже на CH₃CN, HNCS, CS₂ и сумпор. Пут Б резултује директном елиминацијом S₂ из интермедијера **41** при чему се добијају HNCS и CH₃CN.

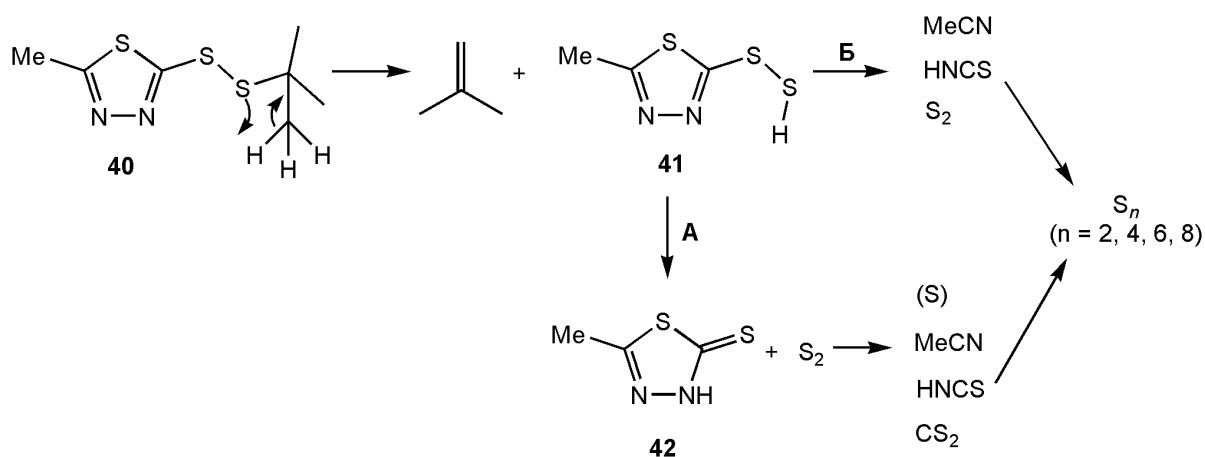


Схема 21. Два могућа пута пиролизе 2-(*tert*-бутилдитио)-5-метил-1,3,4-тиадиазола.

1.4.2. Електрофилни напад на атоме азота 1,3,4-тиадиазолског прстена

Електрофилни напад на атоме азота у прстену 1,3,4-тиадиазола могу вршити различити електрофили, као што су халогениди (алкил халогениди, бензил халогениди, алил халогениди, хидроксиалкил халогениди и хетероциклични халогениди),^{3,35,36} триметилсилилметил трифлуорометансулфонат, формалдехид и други.³⁷

2-Трифлуороацетамид-5-*tert*-бутил-1,3,4-тиадиазол (**43**, Схема 22А) се може алкиловати циклопропилметил бромидом (CPMB) при чему се одговарајући алкиловани производ (**44**) добија у високом приносу (91%).^{35b} Метил халогениди (јодида и бромиди) се често користе за добијање 3-метил-1,3,4-тиадиазола у апротичним растварачима као што је DMF^{35a} у присуству K₂CO₃.³⁸ Polvopov и сарадници су извршили алкиловање 5-супституисаних 1,3,4-тиадиазолин-2-тиона (**45a-в**, Схема 22Б) алил бромидом и као главни производ добили одговарајуће *N*-алиловане деривате (**46a-в**).³⁶

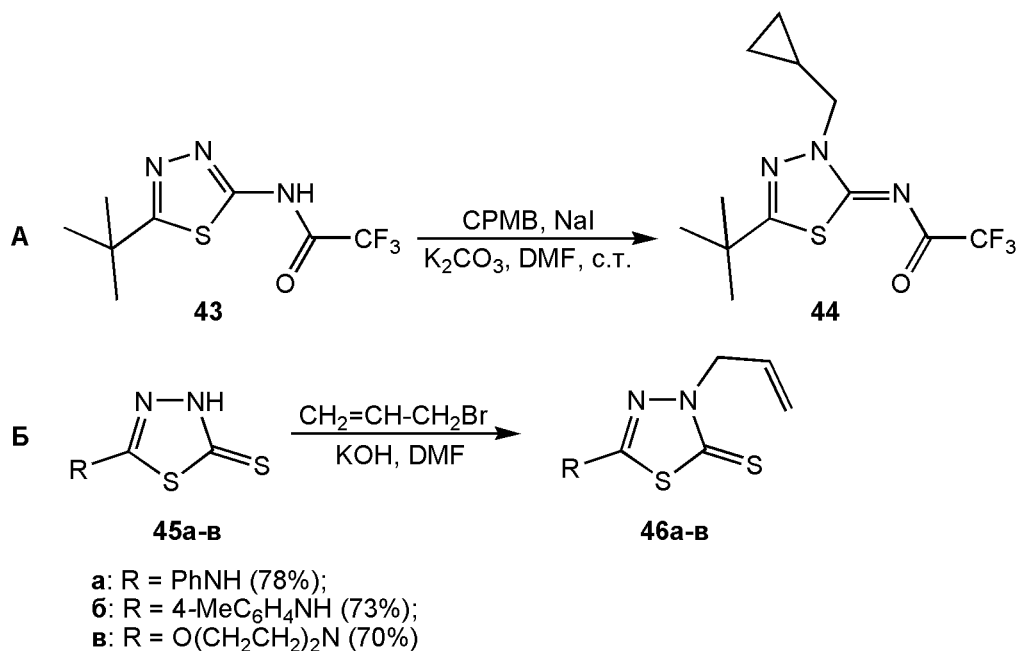


Схема 22. Реакције алкиловања 1,3,4-тиадиазола на азотовом атому прстена (**A**) циклопропилметил бромидом и (**Б**) алил бромидом.

Третирањем аминотиадиазола (**47a,б**, Схема 23А) раствором брометанола добијају се одговарајући хидроксиалкил тиадиазоли (**48a,б**).³ Поред тога, формалдехид такође лако даје хидроксиметил деривате тиадиазола (Схема 23Б).^{37b,c}

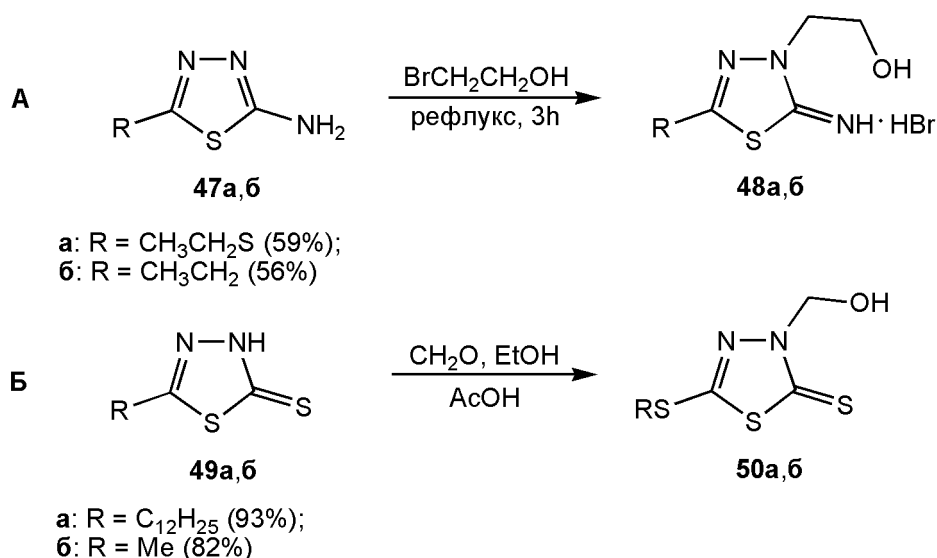


Схема 23. Добијање хидроксиалкил деривата у реакцијама алкиловања 1,3,4-тиадиазола (**А**) раствором брометанола и (**Б**) формалдехидом.

1.4.3. Електрофилни напад на атом угљеника 1,3,4-тиадиазолског прстена

Услед мале електронске густине на атому угљеника 1,3,4-тиадиазола реакције електрофилне супституције су јако ретке. Ипак, електрофилна супституција се може извршити изменом интермедијерног σ -комплекса тиадиазолијум соли, на пример, радикалским халогеновањем, при чему се добијају хлоровани или бромовани 2-хало-5-супституисани тиадиазоли.³³ Електрофилне врсте су обично поларизовани агенси за хлоровање који у присуству катализатора (или без њега) дају одговарајући халонијум јон.

Електрофилном супституцијом на угљениковом атому 2-амино-1,3,4-тиадиазола (**106**, Схема 24А) молекулом брома добија се 2-бром-5-амино-1,3,4-тиадиазол (**51**, Схема 24А).³⁹ Директно ариловање 1,3,4-тиадиазола преко атома угљеника прстена може се извести у присуству Pd/Cu катализатора коришћењем различитих (хетеро)арил јодида, бромида и трифлата (трифлуорметансулфонат).⁴⁰ Ова методологија (Схема 2Б) може бити корисна за супstrate који садрже како електрон-донорске тако и електрон-привлачне супституенте, а такође је погодна и када се користе арил халогениди који због своје структуре могу довести до стерних сметњи.

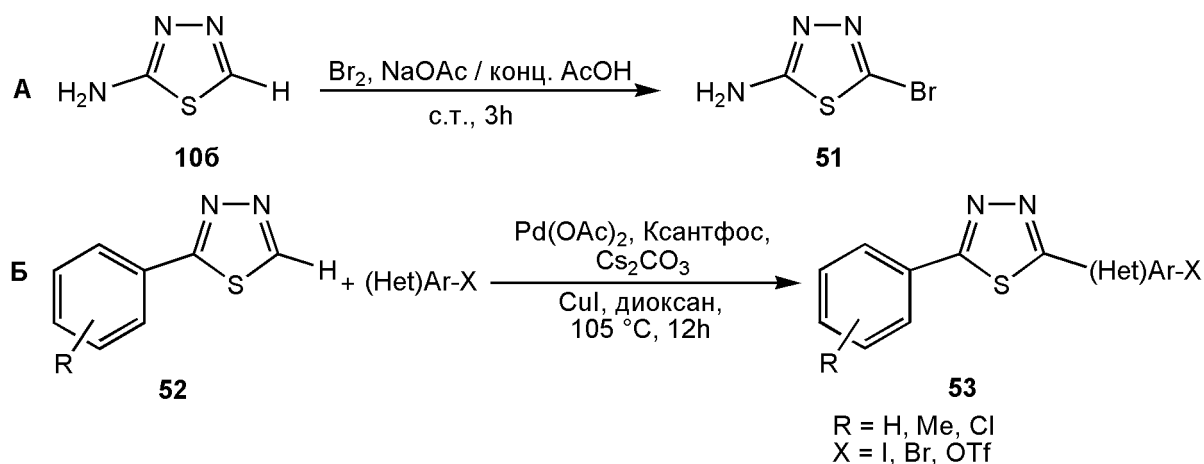


Схема 24. Електрофилна супституција на угљениковом атому 1,3,4-тиадиазолског прстена (**A**) молекулом брома и (**B**) различитим (хетеро)арил халогенидима.

1.4.4. Електрофилни напад на атом сумпора 1,3,4-тиадиазолског прстена

Примери директне оксидације сумпора у прстену 1,3,4-тиадиазола до сулфоксида или сулфона нису нађени. 1,3,4-Тиадиазолин-1-оксид и 1,3,4-тиадиазолин-1,1-диоксид се могу добити другим индиректним методама.⁴¹

1.4.5. Нуклеофилни напад на атом угљеника 1,3,4-тиадиазолског прстена

Захваљујући електрон-дефицитарној природи прстена, до нуклеофилних реакција на атому угљеника 1,3,4-тиадиазолског прстена долази лако.

Електронегативност атома халогена у халоген-супституисаним тиадиазолима смањује електронску густину на атому угљеника због чега он постаје подложнији нуклеофилним нападима којима атом халогена бива истиснут из молекула. Према томе, халоген-супституисани тиадиазоли су веома реактивни и могу реаговати са великим бројем различитих нуклеофила. Најчешће су то кисеонични (нпр. алкохол), азотни (нпр. амиди, хидразиди, хетероциклична једињења која садрже атом(е) азота) и

сумпорни (нпр. тиоуреа, меркапто једињења) нуклеофили, као и алкил или арил једињења.

Третирањем 2-хлор-супституисаног 1,3,4-тиадиазола (**54**, Схема 25А) натријум метоксидом у метанолу добија се одговарајући 2-метокси-1,3,4-тиадиазол (**55**).⁴² У реакцији 2-хлор-5(трихлорометил)-1,3,4-тиадиазола (**56**, Схема 25Б) са 4-хлорбензентиолом добија се одговарајући сулфид (**57**).⁴³ Осим тога, тиоуреа реагује са халотиадиазолима при чему се добијају 1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-тиони.^{44,45} Тиадиазол **54** (Схема 25В) реагује са цикличним секундарним аминима као што су пиперидин, пиперазин и морфолин, при чему се добијају одговарајући супституисани деривати (**58**) у приносу од 80-85%.⁴⁶ Под сличним условима, исти тиадиазол реагује са хидразин хидратом и даје одговарајући тиадиазолхидразин у 97%-тном приносу.⁴⁷ 2-Бром-1,3,4-тиадиазоли (**59a,б**, Схема 25Г) реагују са диетил малонатом у присуству базе при чему се добијају одговарајући 2-супституисани малонати (**60a,б**) који након декарбоксилације и хидролизе дају одговарајуће деривате тиадиазола са карбоксилном групом (**61a,б**).⁴⁸

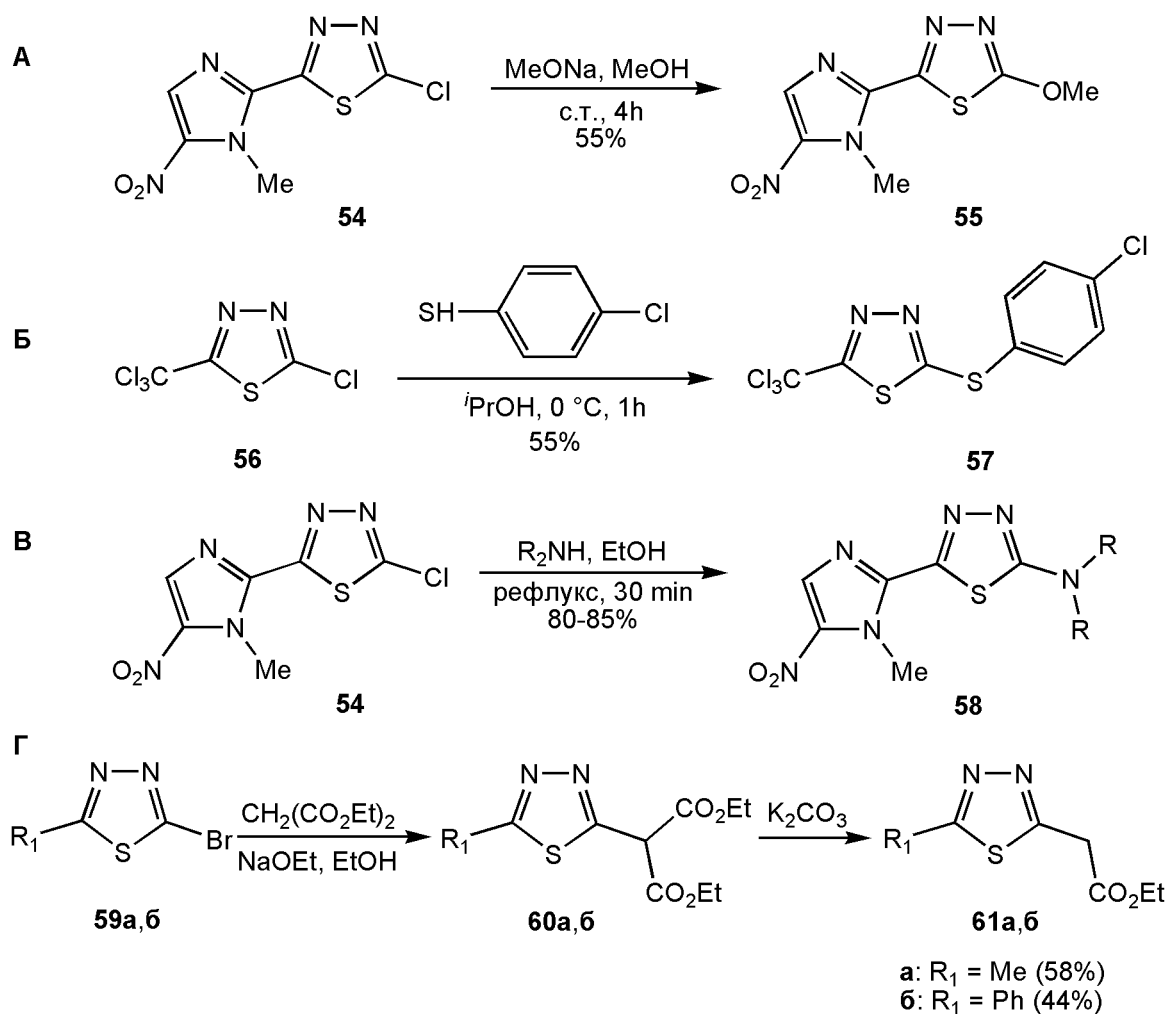


Схема 25. Електрофилна супституција халоген-супституисаних 1,3,4-тиадиазола третирањем (**A**) натријум метоксидом, (**B**) 4-хлорбензентиолом, (**B**) секундарним амином и (**Г**) диетил малонатом.

Сумпорни супституенти било на положају 2 или 5 тиадиазолског прстена такође могу бити супституисани бројним нуклеофилима. Тиогликолна тиадиазолска киселина (**62**, Схема 26A) реагује са диетил цинком у присуству Ni-катализатора при чему се добија 2-етил-5-метил-1,3,4-тиадиазол (**63**).⁴⁹ Сулфонилна група може бити супституисана коришћењем натријум алкоксида при чему се добијају етри (Схема 26B)⁴ или азотним нуклеофилима при чему настају одговарајући аминок деривати.⁵⁰

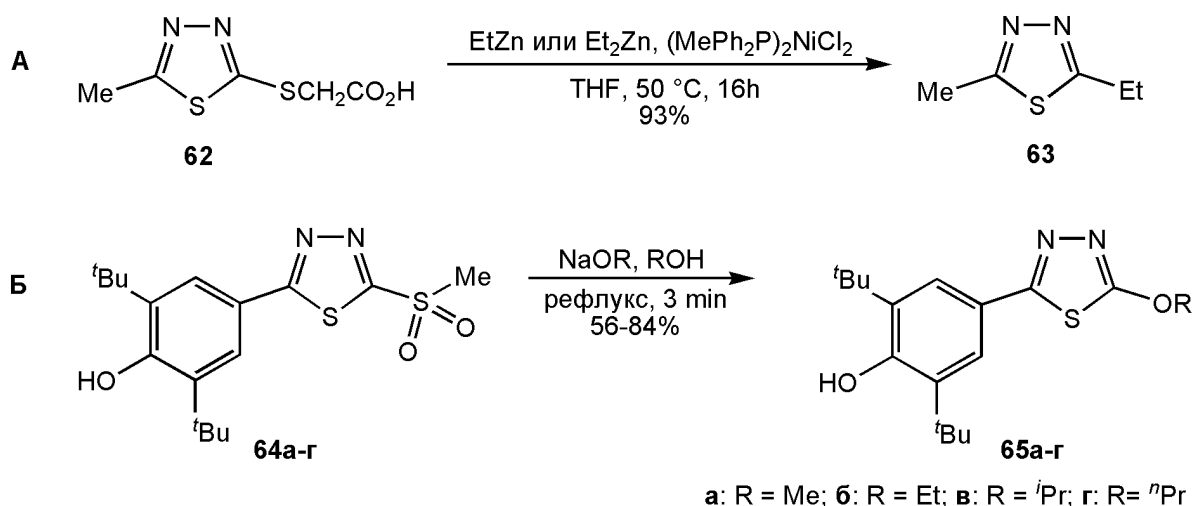


Схема 26. Електрофилна супституција сумпорних група 1,3,4-тиадиазола третирањем (А) диетил цинком и (Б) натријум алкоксидом.

2-Амино-1,3,4-тиадиазоли подлежу Sandmeyer-овој реакцији у којој се као производи добијају 2-хало-1,3,4-тиадиазоли. Sandmeyer-овим бромовањем 2-амино-5-(трифлуорометил)-1,3,4-тиадиазола (**66**, Схема 27) добија се 2-бромо-5-(трифлуорометил)-1,3,4-тиадиазол (**67**) у приносу од 54%.⁵¹

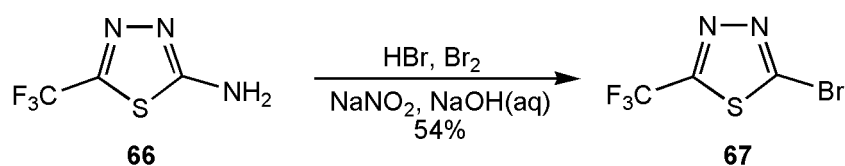


Схема 27. Sandmeyer-ова реакција 2-амино-1,3,4-тиадиазола.

Диазотовањем 2-амино-1,3,4-тиадиазола које је праћено киселом хидролизом интермедијерних диазонијумових соли, добијају се 1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-они. На пример, тиадиазоламин (**68**, Схема 28) је овом процедуром преведен у тиадиазолин (**69**) у приносу од 75%.⁵²

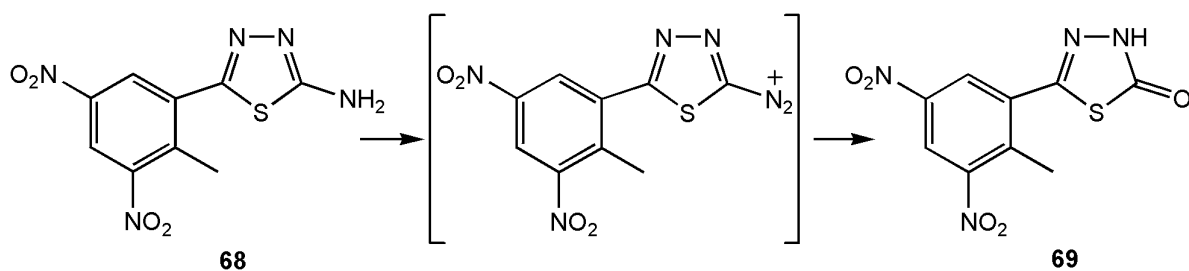


Схема 28. Диазотовање 2-амино-1,3,4-тиадиазола.

1.4.6. Diels-Alder-ова реакција 1,3,4-тиадиазола

2,5-Bis-трифлуорометил-1,3,4-тиадиазол (**70**, Схема 29) подлеже Diels-Alder-овој реакцији са норборнадиеном под високим притиском при чему се добија нестабилни циклоадукт (**71**) који брзо губи атоме азота и формира 1,3-диполарни интермедијер (**72**). Циклоадицијом интермедијера **72** са другим алкеном добија се производ **73** у приносу од 29%.⁵³

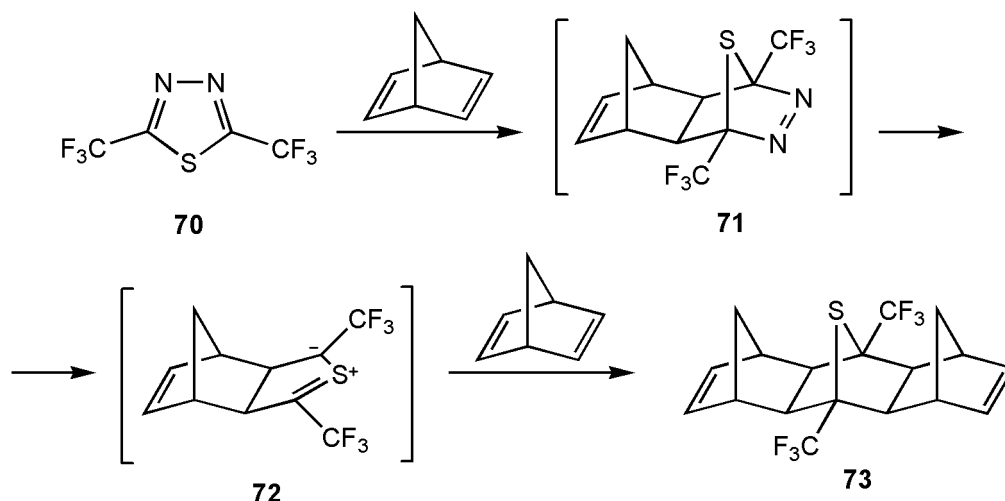


Схема 29. Diels-Alderova реакција 1,3,4-тиадиазола са норборнадиеном.

1.5. Реактивност супституената везаних за угљеников атом 1,3,4-тиадиазолског прстена

1.5.1. C – супституенти

Функционализација метил групе 2-метил-1,3,4-тиадиазола може се постићи третирањем јаком базом након чега долази до адиције електрофила. У реакцији 2,5-диметил-1,3,4-тиадиазола са литијум диизопропиламидом (LDA) и адицијом алдехида или кетона добијају се *mono*- или *bis*-хидрокси ариловани производи (**75** и **76**, Схема 30), у зависности од додате количине базе.⁵⁴

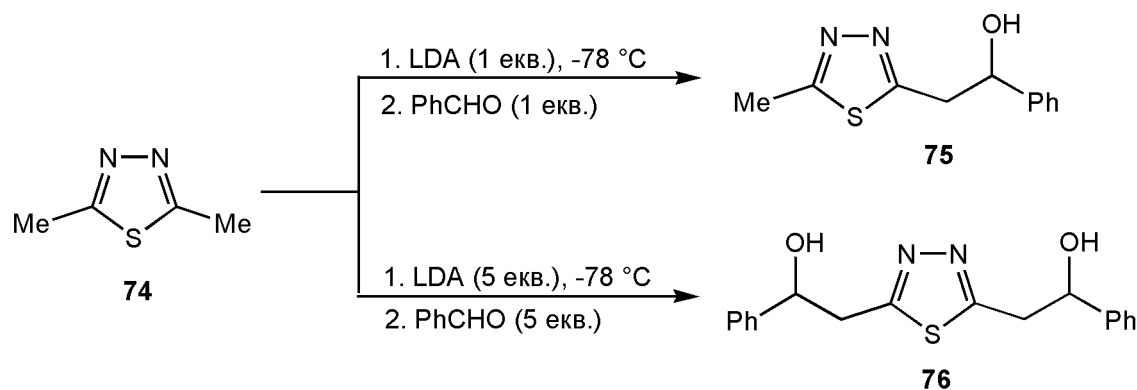


Схема 30. Функционализација метил групе/а 2,5-диметил-1,3,4-тиадиазола адисијом алдехида.

Третирањем 2,5-диметил-1,3,4-тиадиазола естрима ароматичних карбоксилних киселина у толуену, у присуству натријум хидрида, добијају се одговарајући ароил деривати тиадиазола **78a-e** (Схема 31).⁵⁵

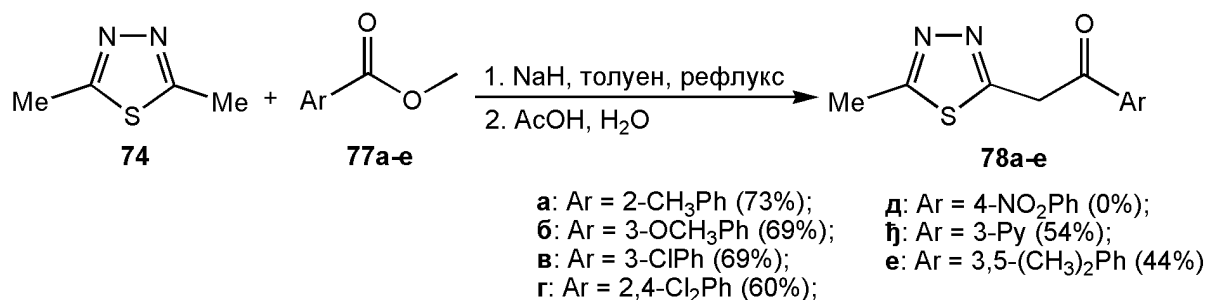


Схема 31. Функционализација метил групе 2,5-диметил-1,3,4-тиадиазола естрима ароматичних карбоксилних киселина.

Брзо и селективно слободнорадикалско монохлоровање 2-меркапто-5-метил-1,3,4-тиадиазола (**79**, Схема 32) постиже се третирањем натријум хипохлоритом уз коришћење микроталасног зрачења.⁵⁶

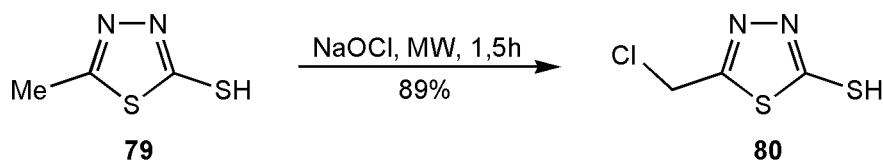


Схема 32. Слободнорадикалско халогеновање 2-меркапто-5-метил-1,3,4-тиадиазола.

1.5.2. N-супституенти

2-Амино-1,3,4-тиадиазоли показују амбидентатно нуклеофилно понашање и селективна функционализација егзоцикличних атома азота може се лако постићи. Стога, могуће су многе стандардне трансформације хетариламина (Схема 33), због чега ови деривати тиадиазола имају велики значај као прекурсори за добијање различитих деривата 1,3,4-тиадиазола.

Егзоцикличним *N*-алкиловањем аминотиадиазола настају секундарни или терцијарни амини (**82**, Схема 33),⁵⁷ ациловањем се добијају одговарајући амиди (**83а-в**),⁵⁸⁻⁶¹ у реакцији са нитрилим формирају се амидини (**84а-д**),⁶² док реакцијом аминотиадиазола са изоцијанатима долази до формирања уреа (**85**).⁶³

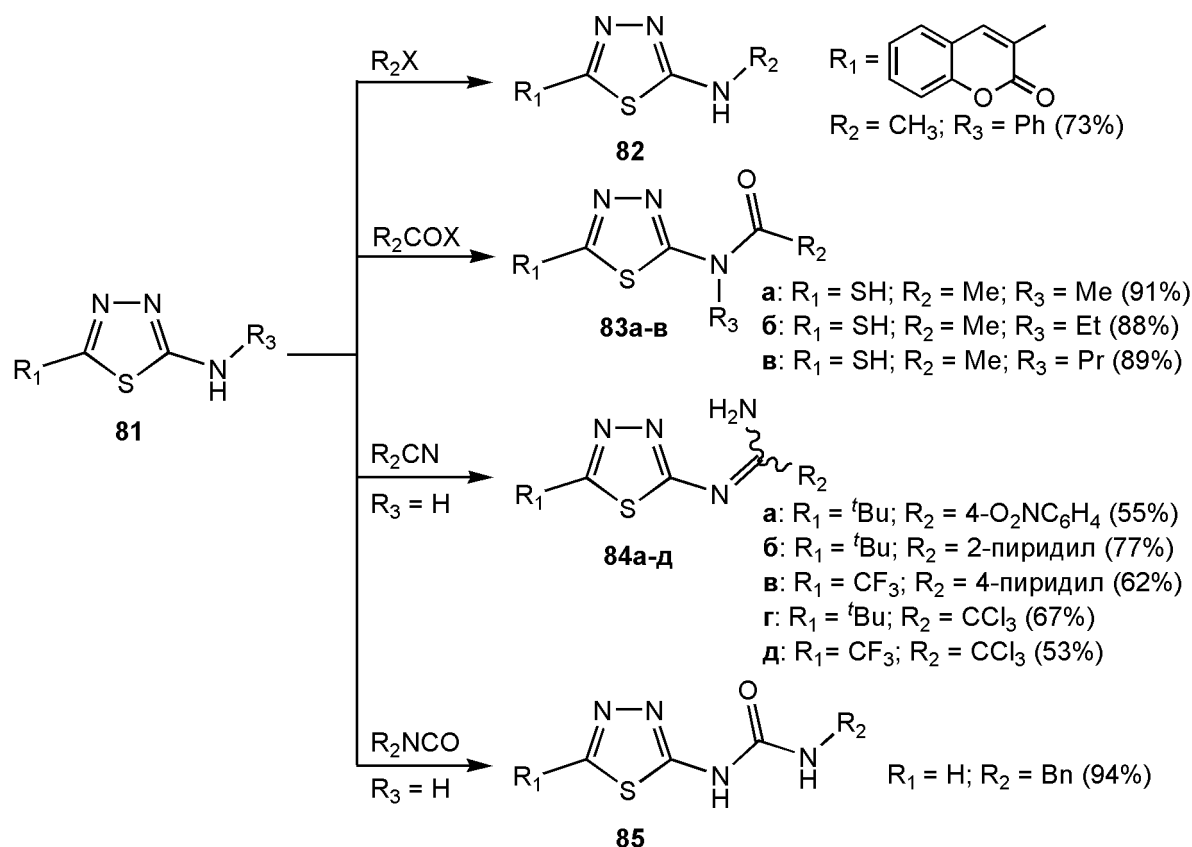


Схема 33. *N*-Функционализација 2-амино-1,3,4-тиадиазола.

У реакцији 2(5)-амино-1,3,4-тиадиазола (**86а,б**) са натријум нитритом и хлороводоничном киселином долази до диазотовања, при чему се добијају тиадиазол диазонијумове соли. Ове соли могу затим реаговати са различитим куплујућим агенсима услед чега долази до формирања одговарајућих азо деривата (**87а,б** и **88а,б**, Схема 34).⁶⁴

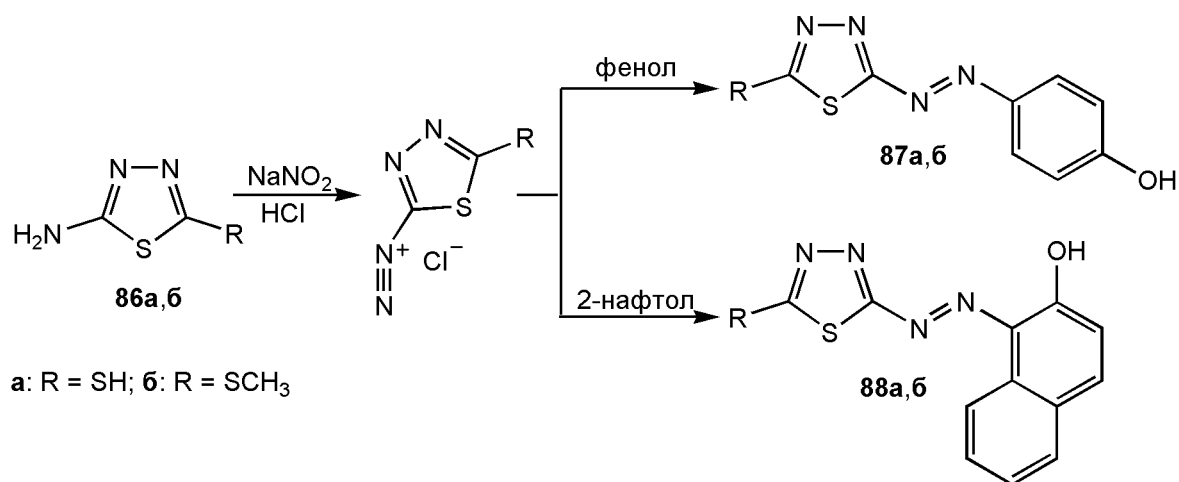


Схема 34. Реакције диазотовања и купловања 2-амино-1,3,4-тиадиазола.

Реакција између 5-супституисаног 2-амино-1,3,4-тиадиазола (**89**, Схема 35) и одговарајућег ароматичног алдехида (**90a-и**) одиграва се иницијалним настајањем имиона праћеним интрамолекулском циклизацијом у присуству вишка тиогликолне киселине у толуену, при чему се добијају одговарајући деривати тиазолидина (**91a-и**).⁶⁵

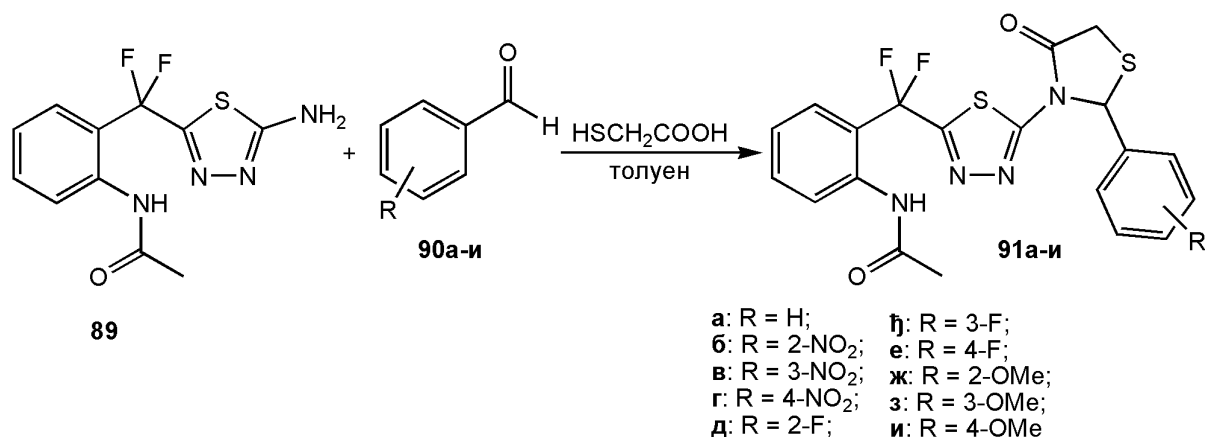


Схема 35. Реакција 2-амино-1,3,4-тиадиазола са алдехидима.

Употреба амбидентатних електрофила у реакцијама са 2-амино-1,3,4-тиадиазолима омогућава анулацију тиадиазолског прстена. У Схеми 36 приказани су неки од многобројних познатих примера.⁶⁶⁻⁷¹

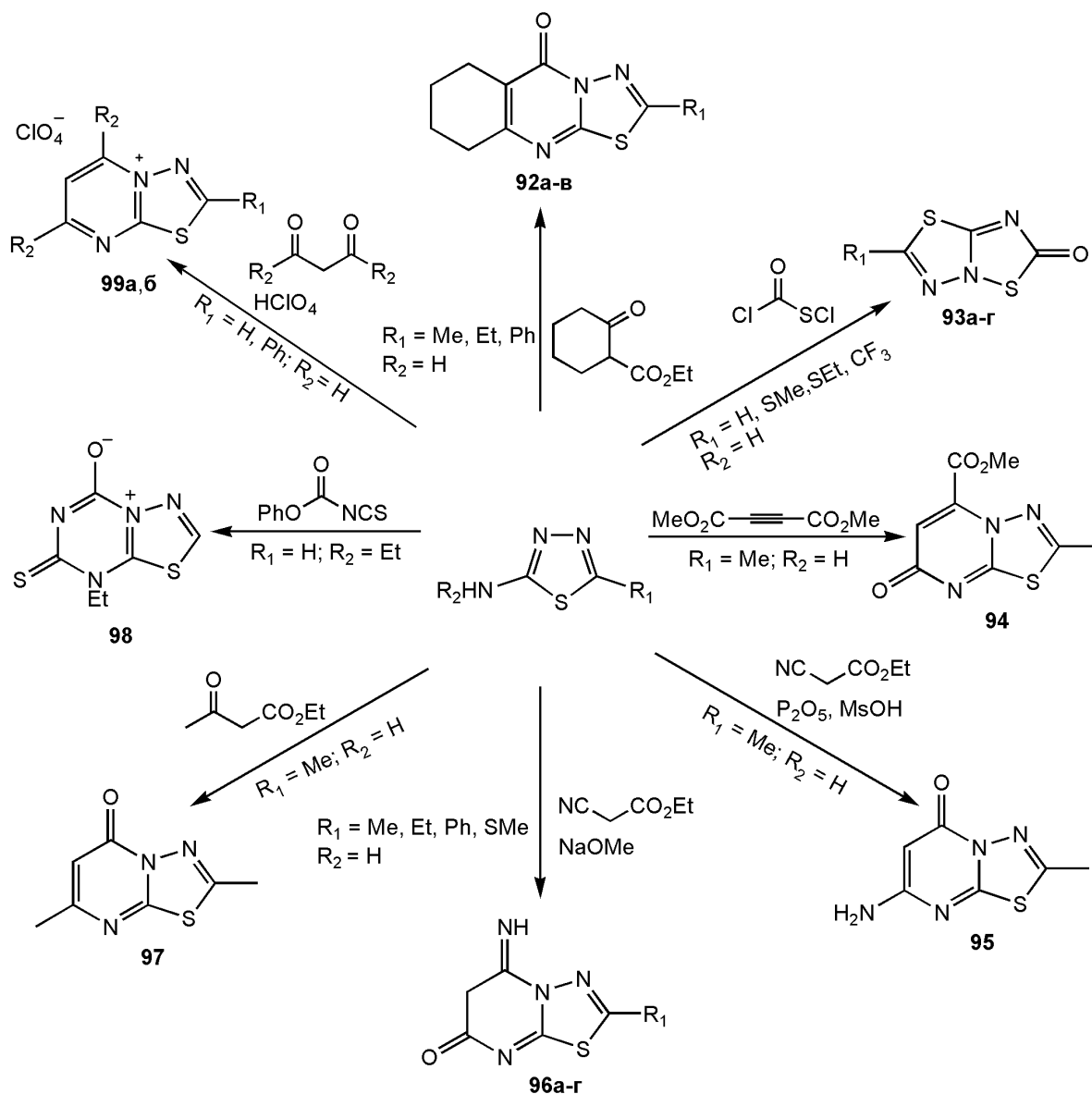
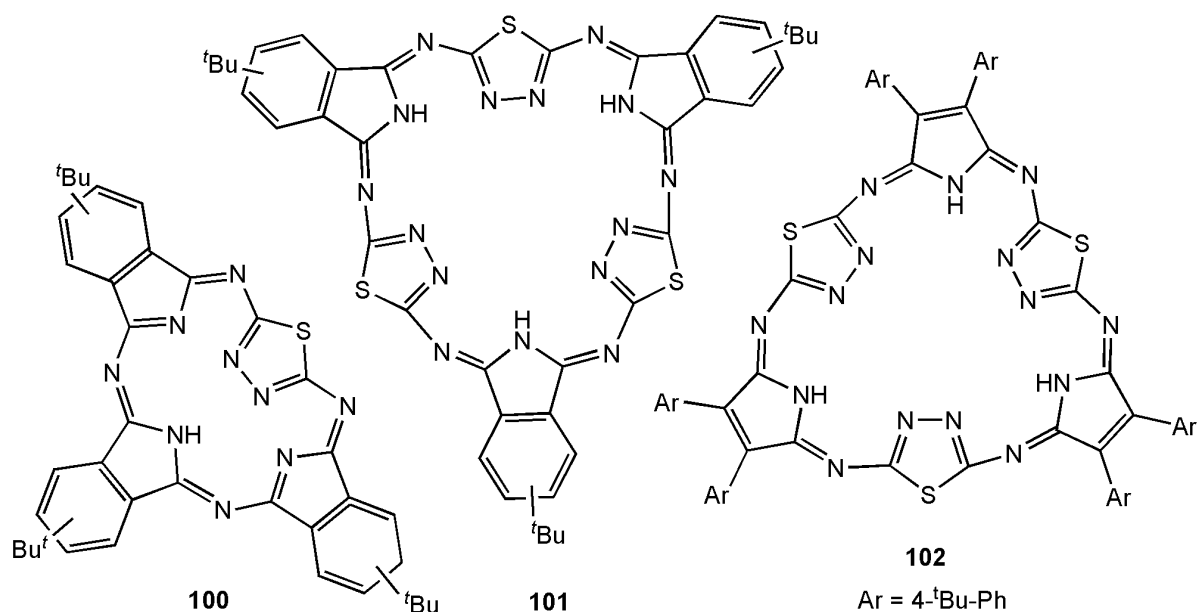


Схема 36. Реакције анулације 2-амино-1,3,4-тиадиазола са амбидентатним електрофилима.

Макроциклични фталоцијанати велике молекулске масе се могу добити реакцијом циклизације 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола. Диаминотиадиазол реагује са одговарајућим дииминоизоиндолином или дииминопиролином у 2-етоксиетанолу на температури од 135 °C у трајању од 24h, при чему се добијају макроцикли **100**, **101** и **102** (Слика 2) у приносима од 54%, 15% и 38%, респективно.⁷²



Слика 2. Макроциклични деривати 2,5-диамино-1,3,4-тиадиазола.

1.5.3. O-супституенти

Реакција ациловања 1,3,4-тиадиазол-2(3H)-она се може извршити на атому кисеоника, док се алкиловање обично одвија на N-3 атому прстена тиадиазола. Тако, третирањем 5-(ациламино)-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-она (**103**, Схема 37) бензоил хлоридом или анхидридом сирћетне киселине добијају се одговарајући естри (**104a,6**), као резултат O-ациловања. У случају 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-она (**105**, Схема 37) долази до ациловања и на атому кисеоника и на атому азота амино групе, при чему се добија исти производ као у претходном примеру (**104a**).⁷³

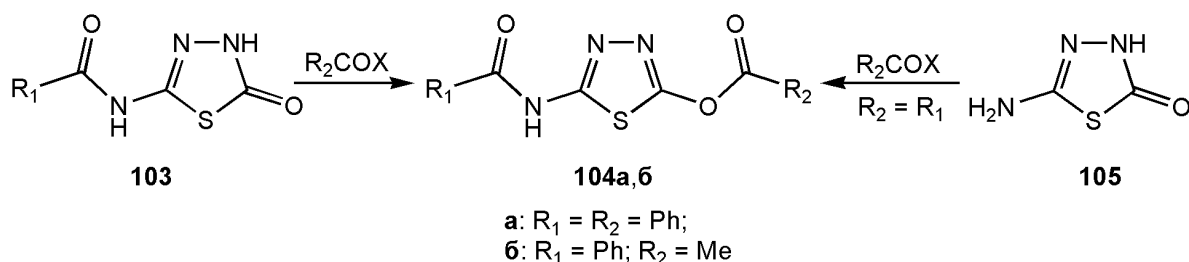


Схема 37. O-Ациловање деривата 1,3,4-тиадиазол-2(3H)-она.

2-Метокси-1,3,4-тиадиазоли (**106a-з**, Схема 38) се могу деметилувати у киселим условима уз формирање 1,3,4-тиадиазол-2(3H)-она (**107a-з**) у високим приносима. За овај тип реакција могу бити погодне јодоводонична⁷⁴ и хлороводонична киселина⁷⁵.

Такође, *O*-деметиловањем 5-метокси-1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-она добија се 3,4-дихидро-1,3,4-тиадиазол-2,5-дион (**108**, Схема 38).⁷⁴ При покушају деалкиловања 2-метокси-1,3,4-тиадиазола примећено је премештање метил групе са кисеоника на азот (Чарпан-ово премештање) и добијање 3-метил-1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-она.⁷⁵

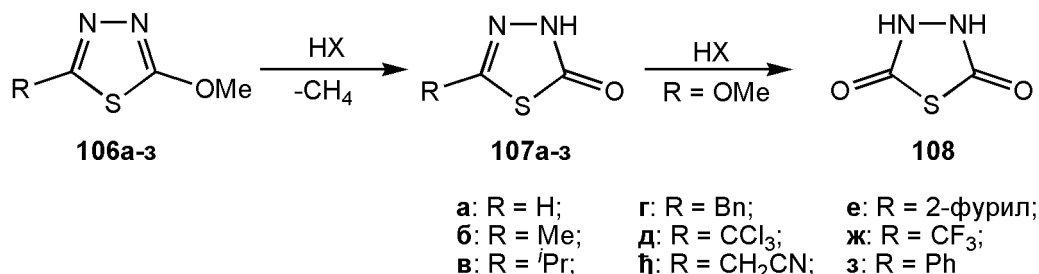


Схема 38. Деметиловање 2-метокси-1,3,4-тиадиазола.

1.5.4. S-супституенти

Супституенти који садрже атом сумпора везан за угљеников атом 1,3,4-тиадиазолског прстена ступају у бројне реакције које су уобичајене за овакве групе присутне у другим сулфанилованим хетероциклима. Тако, подлежу реакцијама алкиловања, деалкиловања и могу се конвертовати у сулфоксиде⁴ или сулфоне^{59,64} у зависности од оксидационих услова. Алкиловање се често изводи помоћу алкил јодида у присуству базе у етанолу, као растварачу.⁴ У реакцијама за добијање сулфоксида или сулфона као оксидациона средства често се користе 3-хлорпероксибензојева киселина (MCPBA)⁴ и калијум перманганат.⁶⁴

Растварањем 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиола (**86a**, Схема 39) у воденом раствору калијум хидроксида и третирањем различитим алкил халогенидима добијају се одговарајући *S*-алкиловани деривати 2-амино-5-сулфонил-1,3,4-тиадиазола (**86б**, **109a-в**).⁷⁶

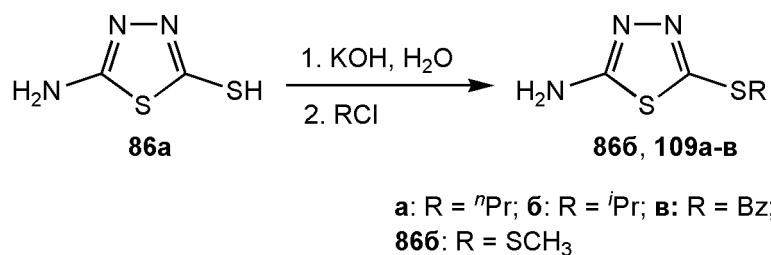


Схема 39. *S*-Алкиловање 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-тиола.

У присуству хидроксида, 1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-тиони (**110a-ђ**, Схема 40) лако подлежу депротонувању, при чему се настали анјони могу *S*-алкиловати алкил-халогенидима формирајући притом одговарајуће тиоетре (**111a-ђ**) у приносима од 35-92%.⁴ Овом реакцијом редуковани тиадиазолински прстен добија ароматични карактер.

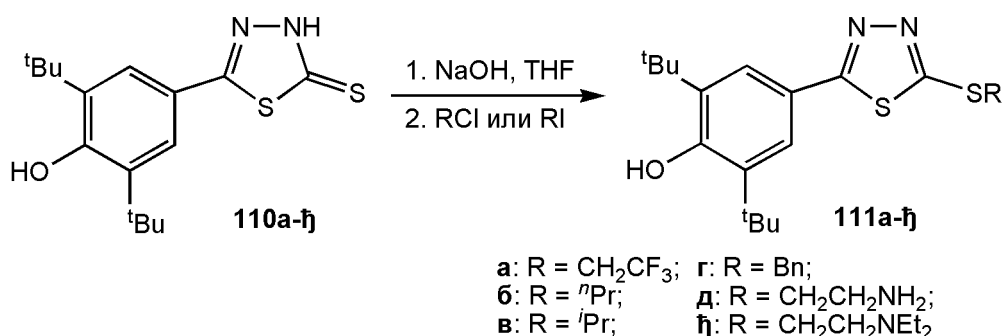


Схема 40. *S*-Алкиловање 5-амино-1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-тиона.

Третирањем 2-(метилсулфанил)-1,3,4-тиадиазола (**112**, Схема 41) натријум метилтиолатом у *N,N*-диметилформамиду на 80 °C долази до његовог *S*-деметиловања и формирања 1,3,4-тиадиазол-2-тиона (**113**) у приносу од 85%.⁷⁷

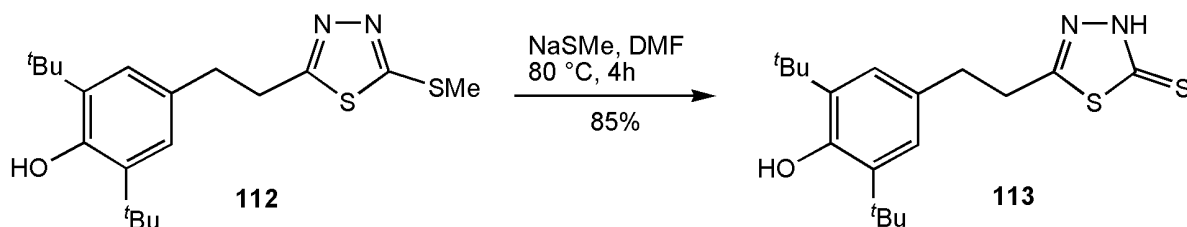


Схема 41. *S*-Деметиловање 2-(метилсулфанил)-1,3,4-тиадиазола.

Алиловањем 1,3,4-тиадиазол-2(3*H*)-тиона (**114**, Схема 42) алил бромидом, као главни производ добија се *N*-алил дериват (**115**), док је одговарајући *S*-дериват (**116**) присутан у траговима. Штавише, показано је да се при рефлуксу у *N,N*-диметилформамиду тиадиазол **116** конвертује до тиадиазол-2-тиона **115** тио-Claisen-овим премештањем.³⁶

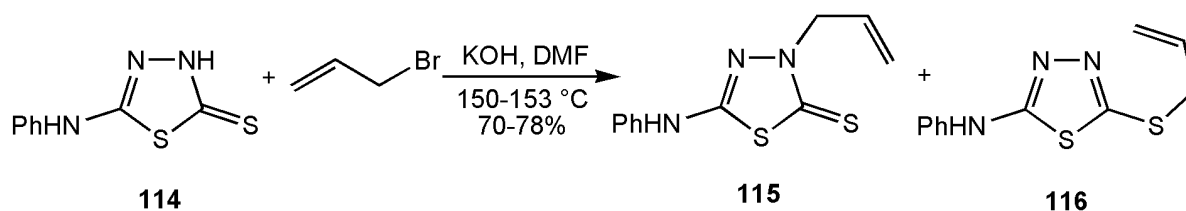


Схема 42. Алиловање 1,3,4-тиадиазол-2(3H)-тиона.

Још једна уобичајена реакција 2(5)-меркапто-1,3,4-тиадиазола је оксидација меркапто групе коришћењем јаких оксиданата, као што су гасовити хлор, водоник пероксид и јод. Pernerstorfer и сарадници су показали два могућа начина за добијање сулфона **118** (Схема 43А). Тиадиазол **117** се може једноставно оксидовати водоник пероксидом у сирћетној киселини, при чему уз додатак воде долази до формирања талог једињења **118**, што ову методу чини погоднијом у односу на другу предложено.^{78a} Оксидацијом одговарајућег меркаптана јодом у базном раствору добијају се дисулфидна једињења која су осетљива на кисеоник и лако се могу даље оксидовати до одговарајућих сулфооксида (Схема 43Б).^{78b} Општа метода за добијање дисулфида подразумева оксидативно купловање помоћу 30%-тног водоник пероксида у смеси вода/етанол; реакција се одвија лако, а производи се добијају у високим приносима (80-90%).^{78c} Присуство јаке електрон-привлачне меркапто групе чини С2, односно С5 атом 2(5)-меркапто-1,3,4-тиадиазола електрон-дефицитарнијим, услед чега је нуклеофилни напад значајно олакшан.

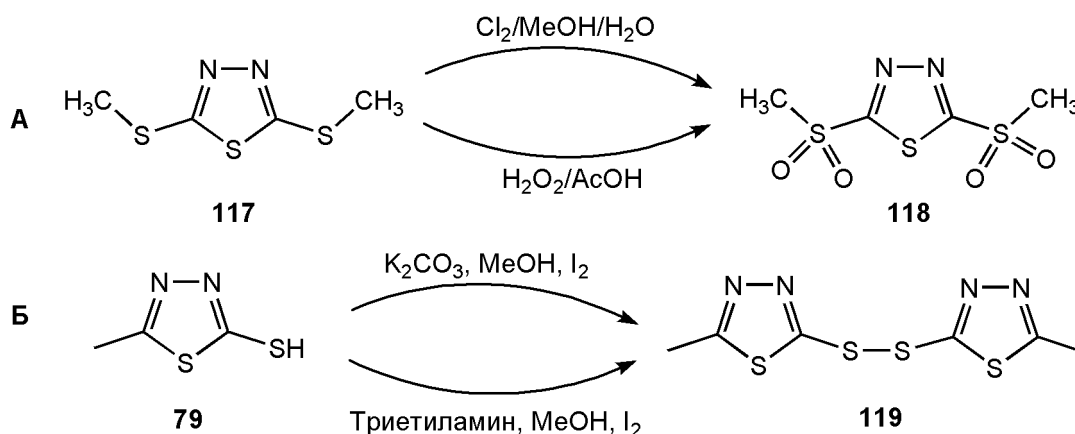


Схема 43. Оксидација 2(5)-меркапто-1,3,4-тиадиазола при чему се добија (**А**) одговарајући сулфон, (**Б**) дисулфидно једињење.

1.6. Реактивност супституената везаних за хетероатоме прстена

Супституенти на азотовом атому прстена често могу подлећи реакцији циклизације формирајући тако фузионисане 1,3,4-тиадиазоле. Тако, третирањем 1-(2-амино-5-метил-3-[1,3,4]-тиадиазолил)ацетона (**120**, Схема 44) бромоводоничном киселином добија се 2,6-диметилимидазо[2,1-*b*][1,3,4]тиадиазол (**121**).⁷⁹

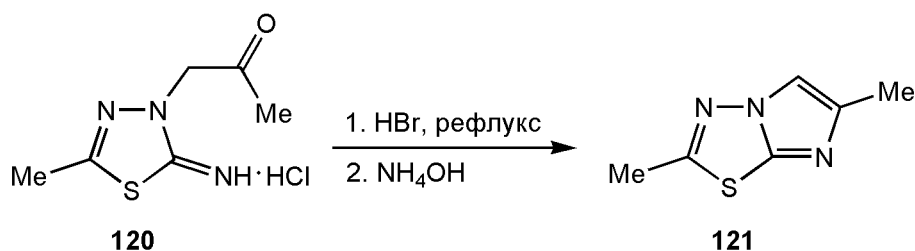
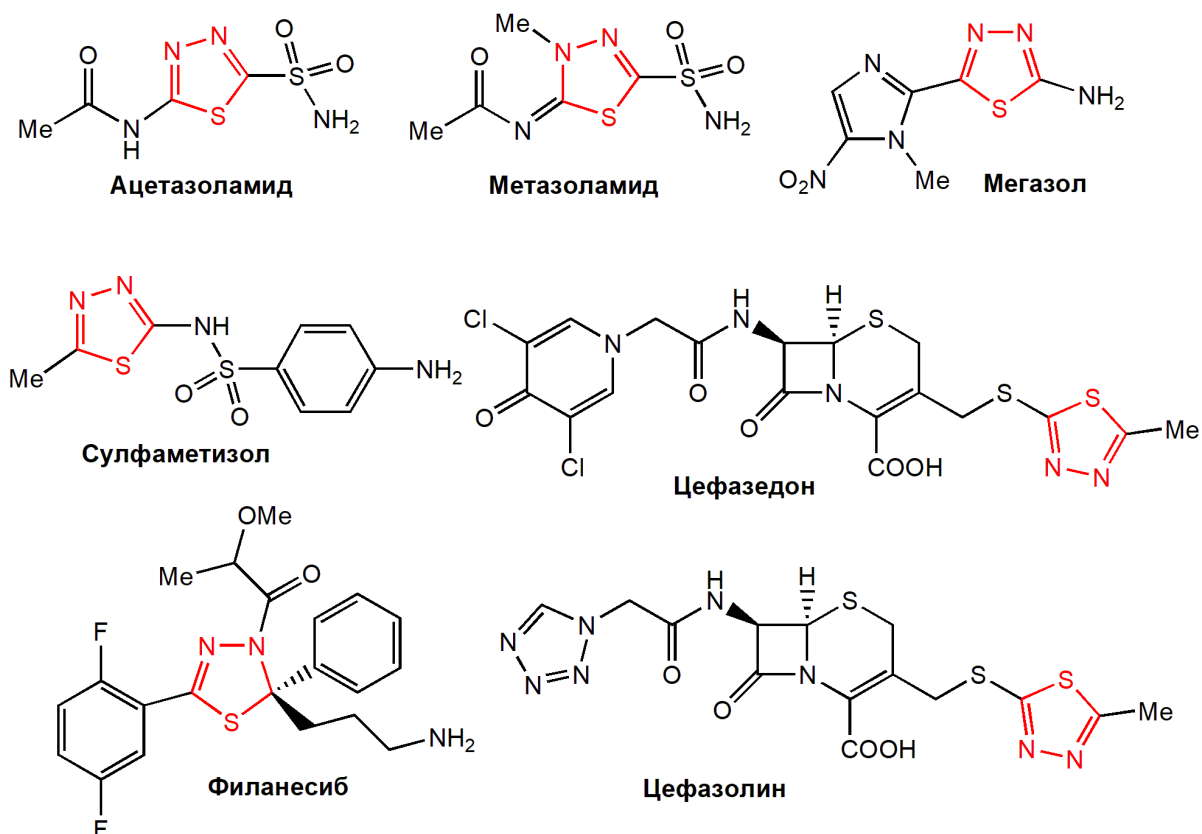


Схема 44. Синтеза 2,6-диметилимидазо[2,1-*b*][1,3,4]тиадиазола.

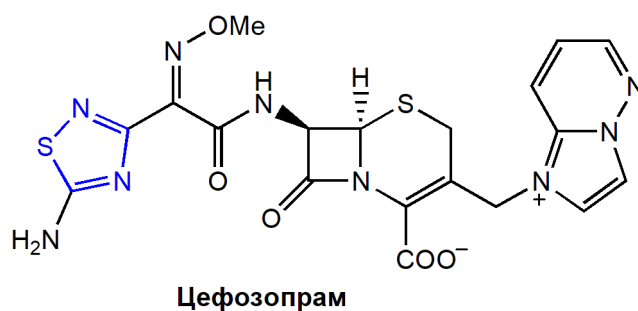
1.7. Биолошка активност 1,3,4-тиадиазола

1,3,4-Тиадиазоли су постали важна класа хетероцикличних једињења од великог интереса за истраживаче због широког спектра биолошких активности које показују, попут антимикуробне, антитуберкулозне, антиинфламаторне, антиконвулзивне, антихипертензивне, антифунгалне, антитуморске, антиоксидативне и других. Није изненађујуће да тиадиазоли показују значајан терапеутски потенцијал ако узмемо у обзир чињеницу да су ова једињења биоизостери пиримидина и оксадиазола. Они стога делују као цефалоспорини треће и четврте генерације.⁸⁰ Захваљујући мезојонској природи,^{81,82} тиадиазоли могу проћи кроз ћелијску мембрану и ступити у интеракцију са биолошким метама. Такође, добра липосолубилност атома сумпора у великој мери доприноси биолошкој активности и фармакокинетичким особинама једињења која садрже тиадиазолски прстен. Због свега наведеног, 1,3,4-тиадиазолски прстен постао је важна градивна јединица при дизајну и развоју нових лекова. На Слици 3 дат је приказ неких комерцијално доступних 1,3,4-тиадиазолских лекова који се користе у терапији глаукома, болести спавања, канцера, а примењују се и као антибиотици за третирање бројних бактеријских инфекција.⁸³⁻⁸⁷



Слика 3. Комерцијално доступни 1,3,4-тиадиазолски лекови.

Вреди нагласити да је за разлику од 1,3,4-тиадиазолских деривата на тржишту доступан само један лек који у својој структури садржи 1,2,4-тиадиазолски прстен, а то је антибиотик Цефозопрам (Слика 4).⁸⁸



Слика 4. 1,2,4-Тиадиазолски антибиотик Цефозопрам.

1.7.1. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола

Антиоксиданти су једињења која могу уклонити слободно-радикалске интермедијере из оксидационих реакција и тиме прекинути ланчане реакције које изазивају оштећење или смрт ћелије. Често су то редукујући агенси, попут тиола, аскорбинске киселине или полифенола.⁸⁹ Осим хемијским антиоксидантима, ћелије су заштићене од оксидативног стреса и мрежом антиоксидативних ензима, попут супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSHPx) и глутатион редуктазе (GR).⁹⁰ У литератури се неретко јавља и антиоксидативна активност 1,3,4-тиадиазолских деривата.

N-(2,4-Диметилфенил)-5-(4-нитрофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-амин (**124**), чија је синтеза приказана у Схеми 45, показује вишу активност у неутрализацији супероксидног анијона, односно нижу IC₅₀ вредност (концентрација тестираног једињења која смањује количину почетног DPPH радикала за 50%) (IC₅₀ = 94,84 µg/mL) од референтног антиоксиданта пропил галата (IC₅₀ = 106,34 µg/mL). За разлику од DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) радикала, супероксид доводи до формирања негативно наелектрисаног адукта, па се активност приказаног тиадиазола може приписати присуству јаке електрон-привлачне групе (као што је NO₂) која стабилизује настали производ.⁹¹

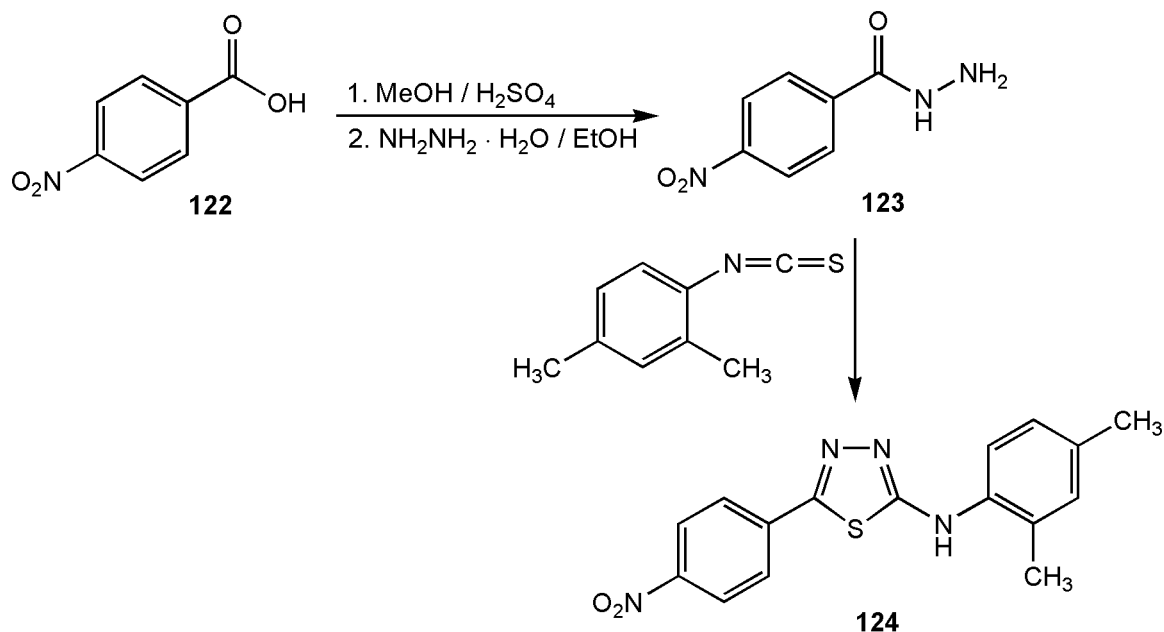


Схема 45. Синтеза *N*-(2,4-Диметилфенил)-5-(4-нитрофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-амина.

Chidananda и сарадници су синтетизовали две серије 1,2,4-триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тиадиазола и испитали њихову антиоксидативну активност.⁹² Једињења **129а-в**, **131г** и **131д** (Схема 46) показују релативно добру антиоксидативну активност са IC₅₀ вредностима од 40,56-62,91 µg/mL. Добра антиоксидативна активност се такође може довести у везу са присуством јаке електрон-привлачне групе (NO₂) или *para* супституисаних фенил група. Једињења **128**, **129г** и **131а-в** (Схема 46), која у својој структури садрже хлоро и метокси функционалне групе, показују бољу антиоксидативну активност (IC₅₀ = 35,85-52,67 µg/mL) у поређењу са аскорбинском киселином као референтним стандардом (IC₅₀ = 87,67 µg/mL).⁹²

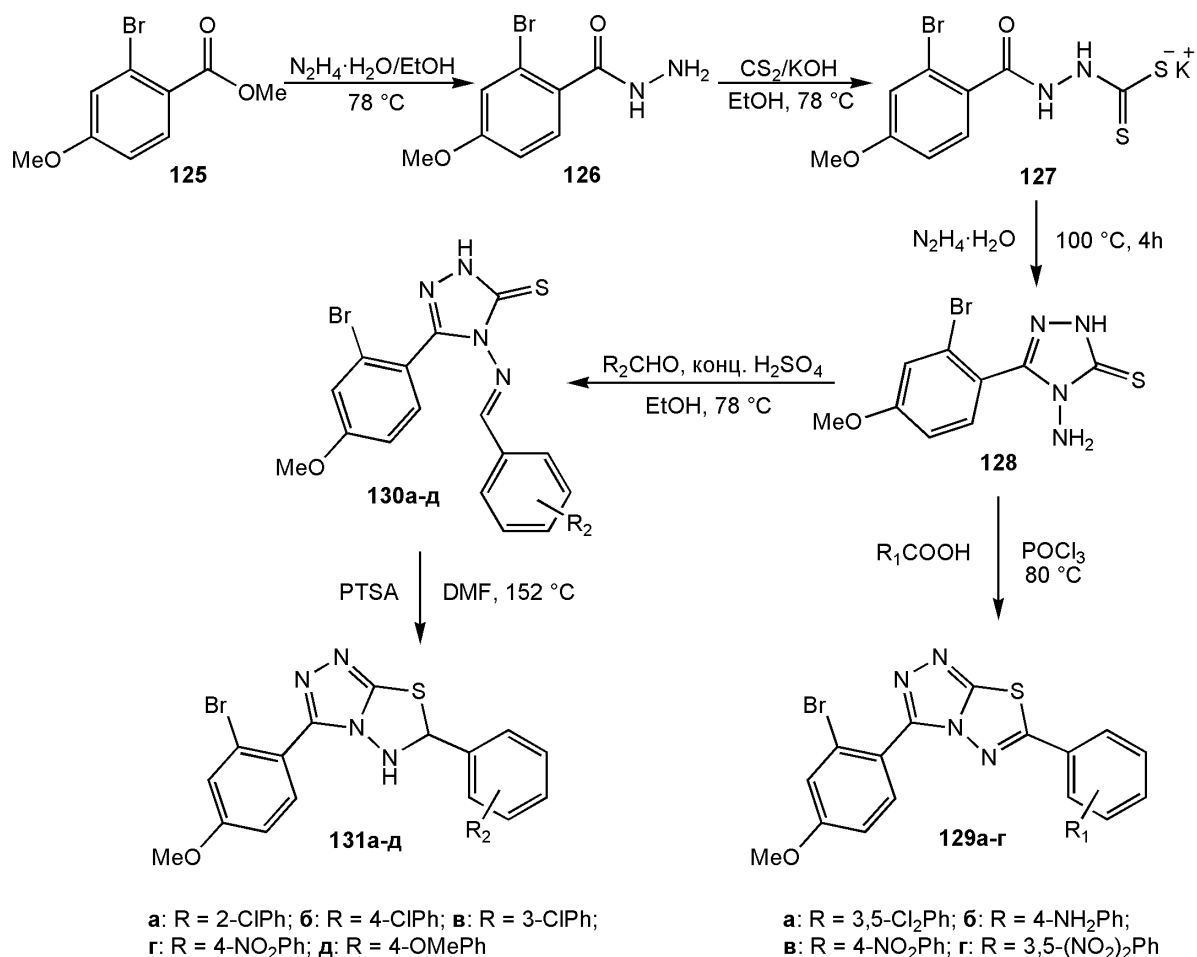


Схема 46. Синтеза 3,6-дисупституисаних 1,2,4-триазоло[3,4-*b*][1,3,4]тиадиазола.

Тиолни и аминотиолни деривати изведени из 1,3,4-тиадиазола показали су знатно бољи антиоксидативни потенцијал при неутрализацији DPPH радикала од одговарајућих аналога изведених из бензотиадиазола. IC₅₀ вредности од 0,053 µg/mL за

једињење **134a** (Схема 47) и 0,11 $\mu\text{g/mL}$ за једињење **135a** (Схема 47) указују на једнаку или бољу антиоксидативну активност ових деривата у односу на референтно једињење амифостин (WR-2721), које показује IC_{50} вредност од 0,100 $\mu\text{g/mL}$.³ Претпоставка је да ароматични прстен може ометати неутралисање радикала, тако да боља активност тиадиазола од бензотиадиазола може бити последица њихове различите ефикасности.

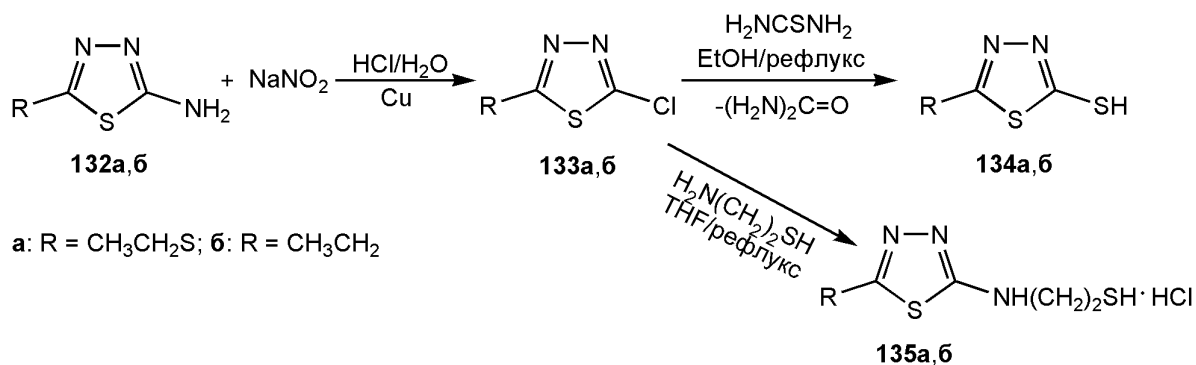


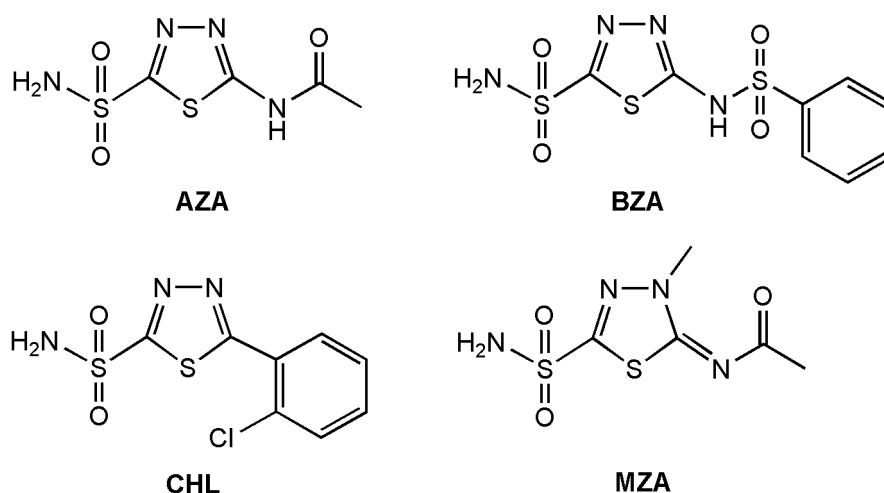
Схема 47. Синтеза тиолних и аминотиолних деривата 1,3,4-тиадиазола који показују антиоксидативну активност.

1.7.2. Антитуморска активност деривата 1,3,4-тиадиазола

Малигни тумори представљају озбиљну претњу по здравље људи. Познато је да многа једињења која у својој структури садрже тиадиазолски прстен поседују антитуморску активност *in vitro*. У литератури се могу наћи бројни тиадиазолски деривати који показују одличне активности према низу ћелијских линија канцера. Како је неконтролисана репликација дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) знак малигних болести, добра антитуморска активност ових једињења може се објаснити њиховом способношћу да интерагују са ДНК и успоре или спрече неконтролисану ћелијску деобу. Хетероатоми тиадиазолског прстена имају способност да учествују у интеракцијама, као што је грађење водоничних веза, са биолошким метама попут киназа које имају кључну улогу у туморогенези. Осим тога, различите врсте супституената који су везани за C2 или C5 атом тиадиазолског прстена, попут $-\text{NH}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$ и других, могу у великој мери допринети антитуморској активности ових једињења.

Карбоанхидразе (CA), металоензими присутни у већини живих организама, катализују реверзибилну интерконверзију CO_2 и HCO_3^- , што им даје важну улогу у

процесу дисања, регулације рН и хомеостази. Многи изозими карбоанхидраза представљају терапеутске мете у третирању низа поремећаја као што су едем, глауком, гојазност, епилепсија, остеопороза и канцер. На пример, СА IX је увек прекомерно експримирана у ћелијама канцера услед чега долази до хипоксије (стања смањене количине кисеоника у ћелијама), што СА IX чини погодном метом у третману бројних карцинома.⁹³ Сулфонамидна група слична је по својој природи карбонатном ањону и може извршити компетативну инхибицију ензима карбоанхидразе. Једињења која у својој структури садрже тиадиазолски прстен, бензенски биоизостери, такође показују високу инхибиторну активност када поседују везану сулфонамидну групу. Познати инхибитори карбоанхидраза, као што су ацетазоламид (AZA), бензоламид (BZA), хлорзоламид (CHL) и метазоламид (MZA) (Слика 5), представљају сулфонамиде 1,3,4-тиадиазола и показују инхибиторну активност према СА IX, али без високе селективности у односу на СА II (основна СА).^{93,94}



Слика 5. Познати инхибитори карбоанхидраза.

Πies и сарадници синтетизовали су неколико сулфонамида и испитали њихову потенцијалну примену као инхибитора СА (Схема 48).⁹⁵ Афинитет синтетизованих једињења према СА се значајно повећава када у својој структури имају присутан 1,3,4-тиадиазолски прстен. Ови резултати су показали да тиадиазолски прстен има предности у односу на бензен у контексту инхибиције карбоанхидразе.

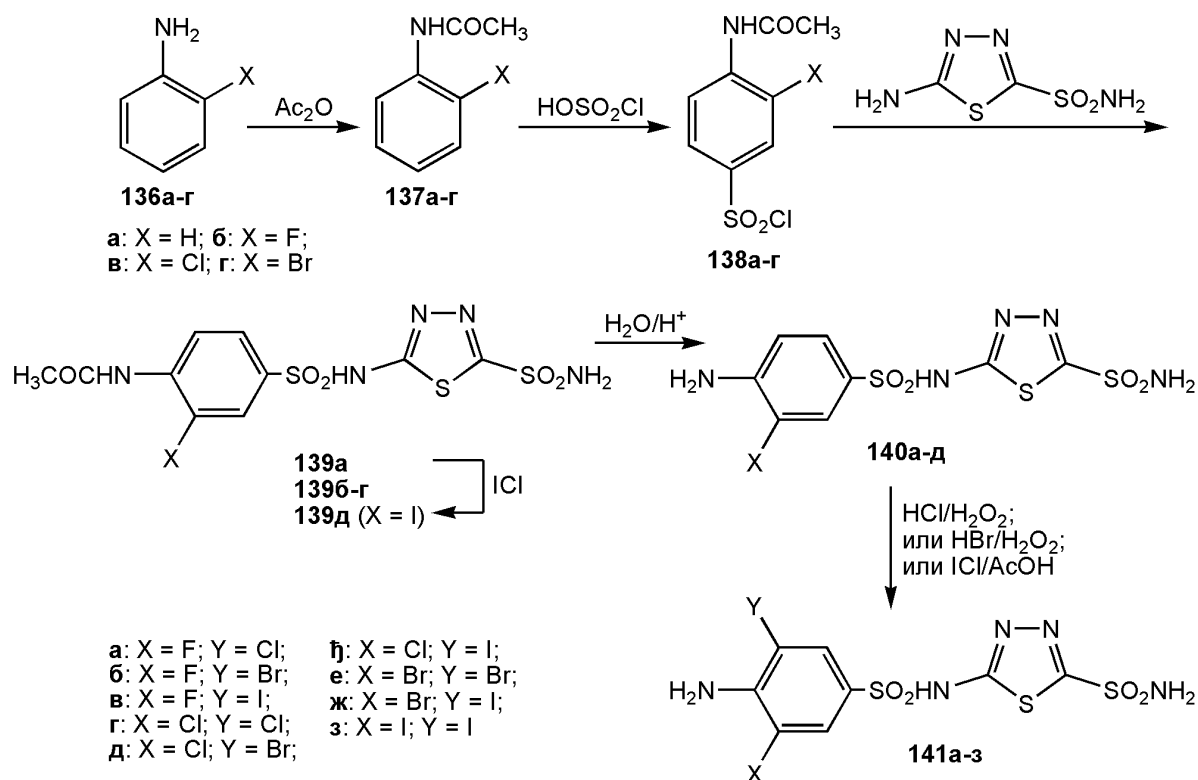


Схема 48. Синтеза халогенсулфидних деривата тиадиазола који показују инхибиторну активност према карбоанхидразама.

Такође, тиадиазолски прстен показује предности у инхибицији СА и у односу на друге хетероцикле. На пример, Алмајан и сарадници су дизајнирали и синтетизовали две серије тиола који садрже тиадиазолски (Схема 49) или триазолски прстен и испитали њихову способност инхибиције СА.⁹⁶ Дошли су до открића да тиадиазоли генерално поседују бољу активност у инхибицији свих испитиваних СА. Једињење **1426** се показало као hCA I селективни инхибитор.

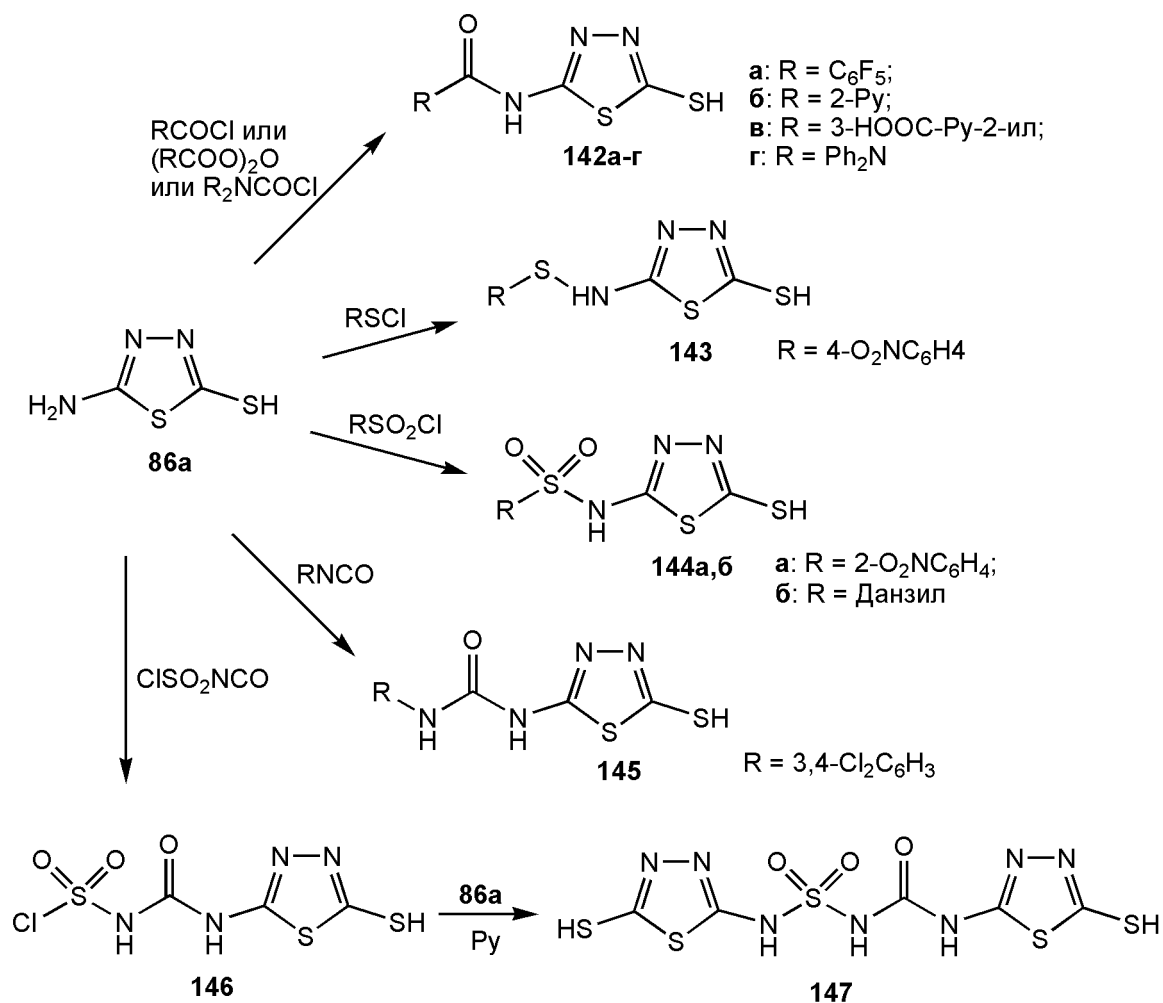
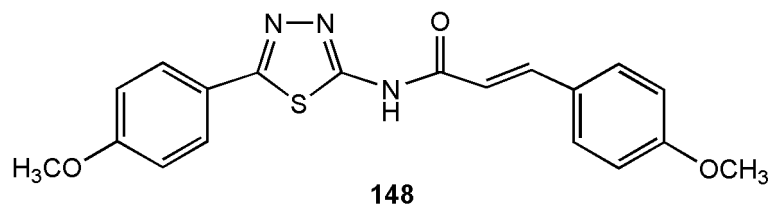


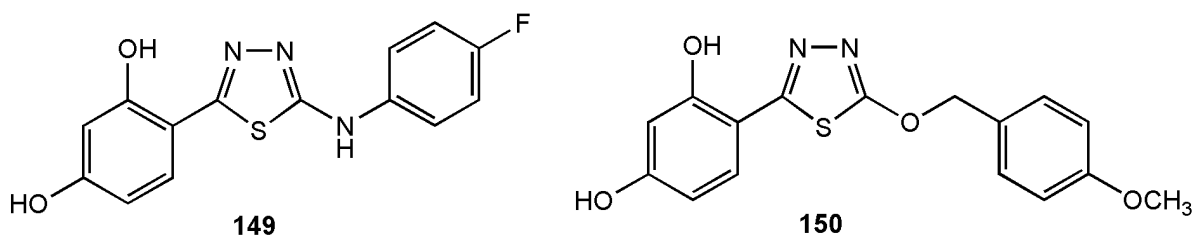
Схема 49. Синтеза тиолских деривата 1,3,4-тиадиазола као потенцијалних СА инхибитора.

Yang и сарадници синтетизовали су и испитали серију једињења, при чему је 1,3,4-тиадиазолски дериват **148** (Слика 6) показао значајну антитуморску активност према ћелијским линијама аденокарцинома дојке (MCF-7) и карцинома плућа (A549) са IC_{50} вредностима од 0,28 $\mu\text{g/ml}$, односно 0,52 $\mu\text{g/ml}$.⁹⁷ Детаљније биолошко испитивање показало је да ово једињење делује као потентни инхибитор полимеризације тубулина, кључног корака у ћелијској деоби, са IC_{50} вредношћу од 1,16 $\mu\text{g/ml}$.



Слика 6. Хемијска структура (E)-3-(4-метоксифенил)-N-(5-(4-метоксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)акриламида.

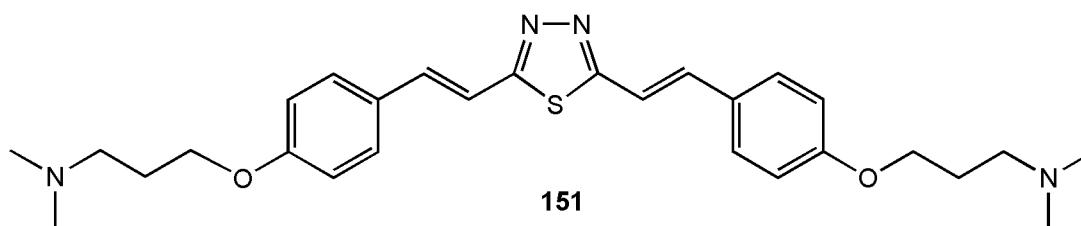
Matysiak и сарадници извршили су синтезу серије деривата 2-амино-5-(2,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазола на начин који је приказан у Схеми 9 и испитали њихову антипролиферативну активност.²⁰ Једињење **149** (Слика 7) показало је добру антипролиферативну активност према ћелијским линијама канцера бешике (HCV29T), ректума (SW707) и дојке (T47D) са IC₅₀ вредностима од 6,2, 3,6, односно 4,2 µg/ml, као и према одређеним ћелијским линијама канцера централног нервног система.⁹ Штавише, утврђено је да ово једињење не показује токсичност према нормалним ћелијама, што указује на његов висок степен селективности.⁹ Matysiak је такође испитивала на који начин структура супституената на C5 положају 2-(2,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазола утиче на антипролиферативну активност ових једињења према различитим хуманим ћелијским линијама канцера.⁹⁸ IC₅₀ вредност од 3,0 µg/ml према ћелијској линији рака дојке (T47D) за једињење **150** (Слика 7), 2-(2,4-дихидроксифенил)-5-(4-метоксибензилокси)-1,3,4-тиадиазол, дуго је нижа од оне коју показује цисплатина (0,7 µg/ml) која је коришћена као референтни цитостатик.⁹⁸



Слика 7. Хемијске структуре 5-супституисаних

2-(2,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазола који показују добру антипролиферативну активност.

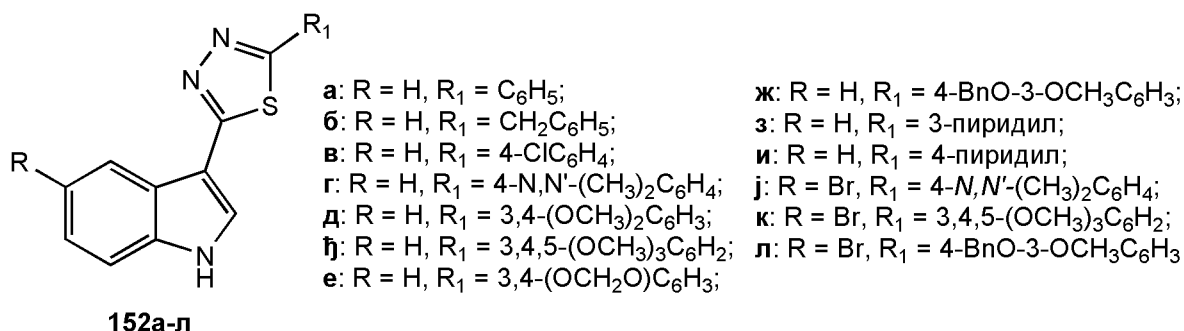
Chou и сарадници синтетизовали су неколико нових једињења и испитали њихов цитотоксични ефекат на хумане ћелије рака плућа (A549), коришћењем МТТ теста (енг. *Microculture Tetrazolium Test*).⁹⁹ Једињење **151** (Слика 8), које у својој структури садржи тиадиазолски прстен, показало се као најефикасније међу синтетизованим једињењима према ћелијским линијама рака плућа (A549), простате (PC3) и јетре (HA22T) са IC₅₀ вредностима од 6,8, 6,3, односно 9,7 µM. Ово једињење индукује апоптозу A549 ћелија у раној фази силазном регулацијом Bcl-XL протеина (енг. *B-cell lymphoma-extra large*) и у касној фази узлазном регулацијом експресије Вах-а (енг. *Bcl-2-associated X protein*), као и инхибицијом активације Akt/PKB-а (протеинске киназе Б).⁹⁹



Слика 8. Хемијска структура

(*E,E*)-2,5-bis[4-(3-диметил-аминопропокси)стирил]-1,3,4-тиадиазола.

Kumar и сарадници извели су синтезу серије деривата 5-(3-индолил)-1,3,4-тиадиазола и испитали њихову цитотоксичну активност према хуманим ћелијским линијама рака простате (PC3, DU145 и LnCaP), рака дојке (MCF7 и MDA-MB-231) и рака панкреаса (PaCa2).¹² Једињења **152б,д,ж** (Слика 9) показала су значајну цитотоксичност према већем броју ћелијских линија рака. Индолил-1,3,4-тиадиазол (**152л**, Слика 9) је међу синтетизованим једињењима био најактивнији према ћелијској линији PaCa2, са IC₅₀ вредношћу од 1,5 μ M. Једињења **152г,ј,к** (Слика 9) показала су високу селективност према ћелијским линијама MCF7 и MDA-MB-231. Резултати испитивања односа између структуре и активности (енг. *Structure-Activity Relationship*, SAR) указују да супституисана фенил група на C2 положају 1,3,4-тиадиазолског прстена у великој мери доприноси цитотоксичној активности једињења, при чему присуство -OMe и -OPh супституената доводи до повећања активности синтетизованих деривата 1,3,4-тиадиазола.¹²



Слика 9. Хемијска структура деривата индолил-1,3,4-тиадиазола као потенцијалних антитуморских агенаса.

Aliabadi и сарадници синтетизовали су серију деривата 1,3,4-тиадиазола (**155а-к**, Схема 50) и утврдили да ова једињења имају бољу цитотоксичну активност према MDA-MB-231 ћелијској линији канцера дојке у односу на друге ћелијске линије канцера.¹⁰⁰ Једињења **155ж** (IC₅₀ = 11 μ M), **155и** (IC₅₀ = 10 μ M), **155ј** (IC₅₀ = 11 μ M) и

155к ($IC_{50} = 8 \mu M$) показују бољу цитотоксичну активност према MDA-MB-231 ћелијској линији у поређењу са референтим стандардом, иматинибом ($IC_{50} = 20 \mu M$), који се примењује у терапији канцера.¹⁰⁰

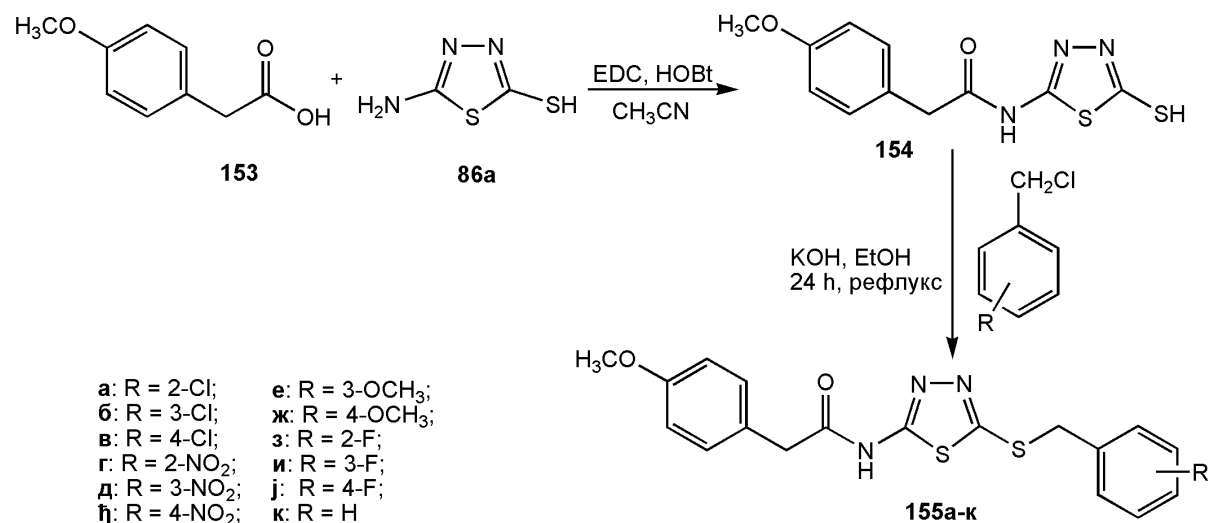


Схема 50. Синтеза ацетамидних деривата 1,3,4-тиадиазола која показују добру цитотоксичну активност.

Резултати испитивања деривата 1,3,4-тиадиазола који у својој структури садрже пиразолски прстен (**161a-j**, Схема 51) указују на обећавајућу антипролиферативну активност свих тестираних једињења према хуманим ћелијским линијама рака: HEPG2 (ћелијска линија рака јетре), SW1116 (ћелијска линија рака дебелог црева), HeLa (ћелијска линија рака грлића материце) и BGC823 (ћелијска линија рака желуца).¹⁰¹ Једињење **161ж** поседује најбољу активност са IC_{50} вредностима од $0,78 \mu M$ за инхибицију раста HEPG2 ћелија, $1,47 \mu M$ за инхибицију раста SW1116 ћелија, док IC_{50} вредност за инхибицију активности теломеразе износи $1,24 \mu M$. На основу резултата испитивања апоптозе може се закључити да је ово једињење потенцијални антитуморски агенс.¹⁰¹

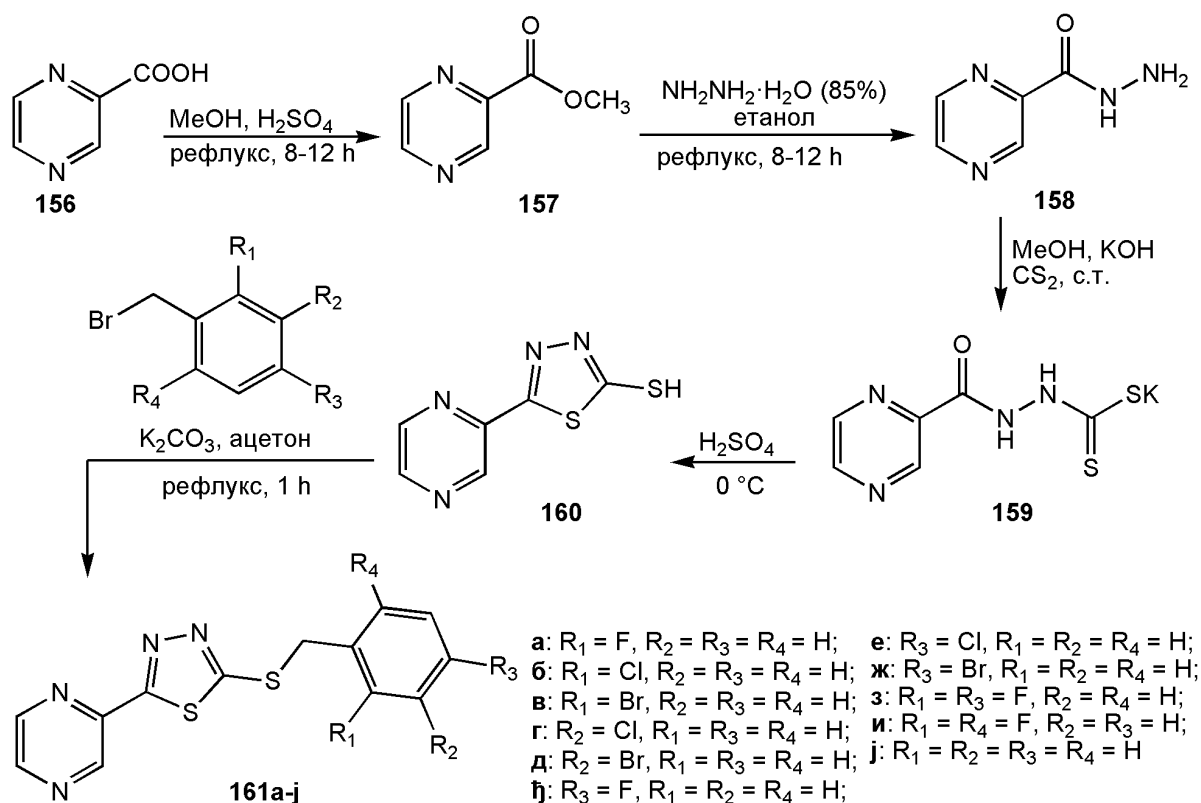


Схема 51. Синтеза деривата 1,3,4-тиадиазола (**161a-j**) који у својој структури садрже пиразолски прстен.

1.8. Фенолне киселине

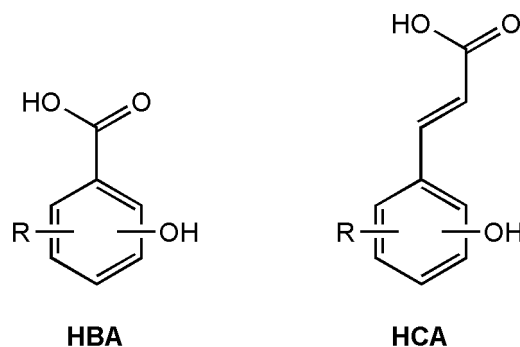
Оксидативни стрес се може дефинисати као нарушавање равнотеже између реактивних врста и способности организма да се супротстави њиховом деловању својим антиоксидативним одбрамбеним системом. Процењује се да је појава оксидативног стреса повезана са више од сто врста болести, било као њихов узрок или последица.^{102,103} Антиоксидативно деловање једињења подразумева његову способност да смањи ниво оксидативног стреса, утичући тиме на ДНК мутације, малигне трансформације, као и друге параметре оштећења ћелија насталих деловањем реактивних врста.

Бројна епидемиолошка истраживања показала су постојање везе између уноса воћа, поврћа и житарица и учесталости коронарних болести срца и одређених типова рака. Улоге воћа и поврћа у превенцији различитих болести приписане су, делимично, антиоксидативним својствима њихових састојака, попут полифенола, витамина Е и Ц и каротеноида. Недавне студије указују на то да су многа прехранбена фенолна

једињења добијена из биљака ефикаснији антиоксиданти од витамина Е и Ц и да могу значајно допринети заштитном ефекту *in vivo*.

Фенолне киселине (PhA) су једињења која садрже најмање један ароматични прстен у коме је бар један атом водоника супституисан хидроксилном групом. Заједно са флавоноидима чине најважнију групу секундарних метаболита и биоактивних једињења у биљкама.¹⁰⁴ Термин „фенолне киселине“ заправо означава феноле који поседују једну карбоксилну групу, а разлог за њихово укључивање у породицу биљних полифенола лежи у чињеници да представљају биопрекурсоре полифенола и, што је још важније, метаболите полифенола. Фенолне киселине су присутне у готово свим биљним намирницама због чега чине значајан део људске исхране. Просечан унос фенолних киселина код људи износи око 200 mg дневно (количина варира у зависности од навика и склоности).¹⁰⁵ Биљке производе фенолна једињења, у која спадају и фенолне киселине, ради заштите од UV зрачења, инсеката, вируса и бактерија. Постоје чак и одређене врсте биљака које стварају фенолна једињења за сузбијање раста паразитних биљних врста (алелопатија). Присуство ових једињења повезано је са сензорним квалитетом (бојом, текстуром, мирисом, укусом) као и са нутритивним и антиоксидативним својствима биљака.¹⁰⁶

У зависности од структуре, фенолне киселине се могу сврстати у две велике групе: хидроксибензојеве (HBA) и хидроксициметне (HCA) киселине (Слика 10). Хидроксициметне киселине проучаване су више него хидроксибензојеве, вероватно јер чине значајан део људске исхране (оне представљају чак трећину нашег укупног уноса фенолних једињења).¹⁰⁷ Са друге стране, концентрација хидроксибензојевих киселина у воћу и поврћу је генерално ниска,^{108,109} изузев у неком црвеном воћу, црној роткви, луку и кори кромпира.^{110,111} Међутим, њихова улога у заштити организма од оксидативног стреса, уклањањем слободних радикала, није мање важна од улоге хидроксициметних киселина.



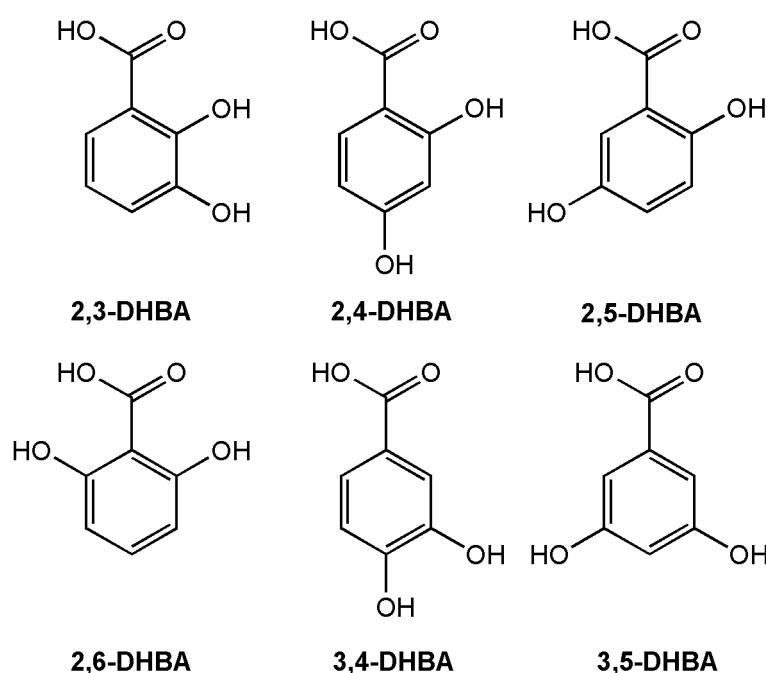
Слика 10. Фенолне киселине: хидроксibenзојеве (HBA) и хидроксциметне киселине (HCA).

Антиоксидативне особине природних производа често су повезане са њиховим укупним садржајем фенола.¹¹²⁻¹¹⁵ Опште је прихваћено да су кључни фактори који доприносе антиоксидативном капацитету фенолних једињења следећи:

1. Релативно ниска енталпија дисоцијације O–H везе (*енг. Bond dissociation energy, BDE*),¹¹⁶⁻¹²¹ која олакшава реакцију апстракције водениковог атома између антиоксиданта и радикала;
2. Релативно висока енергија јонизације (*енг. Ionization potential, IP*),^{120,121} која смањује брзину преноса електрона између антиоксиданта и кисеоника и на тај начин смањује прооксидативну моћ антиоксиданта;
3. Стабилан радикал антиоксиданта настао након апстракције водениковог атома,^{122,123} који смањује токсичност антиоксиданта и
4. Одговарајућа растворљивост,^{124,125} која побољшава мобилност антиоксиданата између мембрана и липопротеина.

Сматра се да су хидроксилне групе на ароматичном прстену највише одговорне за антиоксидативну активност ових једињења.¹²⁶ За одређене фенолне киселине постоје докази да супституенти на прстену утичу на њихову способност уклањања слободних радикала. Различите киселине имају различите способности уклањања радикала, што указује на велики утицај структуре на активност ових једињења. Сматра се да антиоксидативна активност хидроксibenзојевих киселина (по аналогији са другим фенолним једињењима) зависи од броја хидроксилних група у молекулу,¹²⁷ при чему се активност повећава са порастом броја хидроксилних група (монохидрокси < дихидрокси < трихидрокси).¹²⁶ Антиоксидативни капацитет фенола генерално се приписује формирању резонантно стабилованих фенокси радикала,¹²⁸ а активност се повећава присуством друге хидроксилне групе, као у случају кафеинске и

протокатехуинске киселине, где долази до формирања интрамолекулске водоничне везе. Деривати дихидроксибензојеве киселине (DHBA) представљају подгрупу хидроксибензојевих киселина (HBA). Постоји шест главних дихидроксибензојевих киселина које се међусобно разликују у положају хидроксилних група (Слика 11): 2,3-дихидроксибензојева киселина (2-пирокатехуинска киселина или хипогалинска киселина), 2,4-дихидроксибензојева киселина (β -резорцилна киселина), 2,5-дихидроксибензојева киселина (гентисинска киселина), 2,6-дихидроксибензојева киселина (γ -резорцилна киселина), 3,4-дихидроксибензојева киселина (протокатехуинска киселина) и 3,5-дихидроксибензојева киселина (α -резорцилна киселина).



Слика 11. Структурне формуле дихидроксибензојевих киселина.

Иако су врста и број супституената унутар ове подгрупе идентични, активности дихидроксибензојевих киселина се међусобно веома разликују. Претпоставља се да капацитет антиоксидативног деловања дихидроксибензојевих киселина у великој мери зависи од узајамног положаја две хидроксилне групе. Испитивања су показала да дихидроксибензојеве киселине код којих је једна хидроксилна група у *ortho* или *para* положају у односу на другу, имају боља антиоксидативна својства према супероксидном радикалу, у поређењу са дихидроксибензојевим киселинама код којих је једна хидроксила група у *meta* положају у односу на другу.^{129, 130} У складу са тим,

2,5-дихидроксibenзојева киселина показује добру, док 2,6- и 2,4-дихидроксibenзојева киселина показују слабију антиоксидативну активност.

Фенолне киселине, као и већина фенолних једињења, имају бројне корисне ефекте на људско здравље захваљујући њиховим антитуморским,¹³¹⁻¹³⁶ антибактеријским,^{137,138} антиинфламаторним¹³⁹ и антиоксидативним^{126,132,140-146} активностима. Највећи број истраживања фокусиран је на антиоксидативна својства ових једињења, односно њихову способност уклањања слободних радикала.

Kim је испитивао галну киселину и нашао да она показује добру антимеланогену и антиоксидативну активност.¹⁴⁷ Ова киселина такође показује и антитуморску активност према ћелијској линији рака простате,¹⁴⁸ а осим тога индукује смрт ћелија рака грлића материце (HeLa) апоптозом и некрозом.¹⁴⁹ Нађена је још и обећавајућа активност галне киселине као анти-HSV-2 (*енг. Herpes simplex virus*) агенса.¹⁵⁰

За *p*-хидроксibenзојеву киселину нађено је да показује антиоксидативну¹²⁶ као и добру антимикробну активност.¹⁵¹

Протокатехуинска киселина поседује неколико биолошких активности као што су антиоксидативна,^{152,153} антимикробна,^{154,155} цитотоксична,¹⁵⁶ хемиопреентивна,¹⁵⁷ неуропротективна¹⁵⁸ и друге.

Циметна киселина показује добар антиоксидативни потенцијал,^{126,152} антибактеријску активност,^{151,154} као и антитуморску активност према ћелијским линијама рака плућа (NCI-H460),^{135,136} дебелог црева (HCT15) и грлића материце (HeLa).¹³⁶

И *p*-кумаринска киселина се показала као добар антиоксидант,¹²⁶ као антитуморски агенс према ћелијским линијама рака дојке (MCF7), плућа (NCI-H460) и дебелог црева (HCT15),¹³⁶ а такође је показала и добру антибактеријску активност.^{159,160}

За кофеинску и ферулинску киселину је, поред антиоксидативне,^{146, 161} нађено да поседују још и добру антибактеријску активност.¹⁵⁴

У литератури се, поред наведених, могу наћи бројна испитивања различитих биолошких активности фенолних киселина које у већини случајева дају добре до одличне резултате.

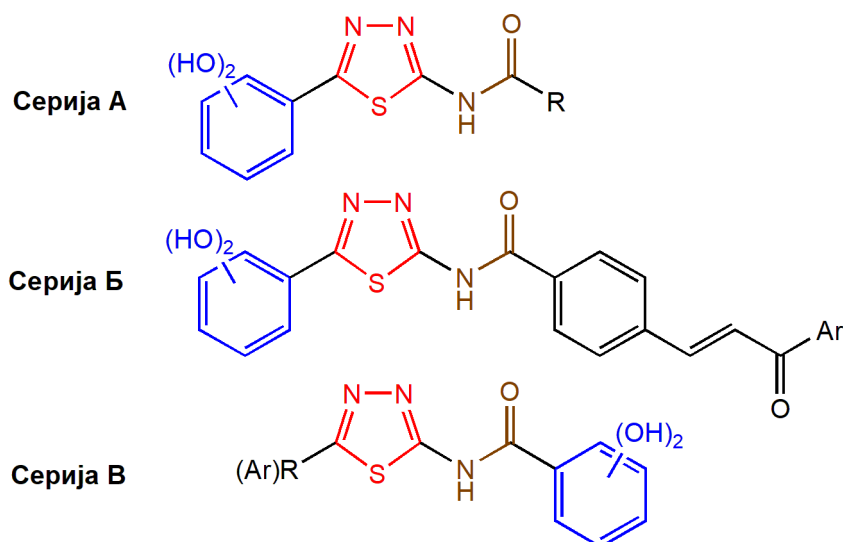
2. НАШИ РАДОВИ

2.1. Увод

Један од кључних аспеката медицинске хемије подразумева примену органских једињења у терапеутске сврхе. Познато је да антиоксиданти спречавају слободне радикале да изазову оштећења биолошких макромолекула који су изложени дејству оксидативног стреса, спречавајући тиме њихову оксидацију, мутације ДНК, као и малигне промене.¹⁶² Фенолне киселине, које се могу наћи у воћу и поврћу, привукле су посебну пажњу захваљујући хидроксилним групама које доприносе њиховом антиоксидативном потенцијалу.¹⁶³ Имајући у виду да оксидативни стрес игра важну улогу у развоју бројних обољења, антиоксиданти показују и превентивни ефекат на спречавање развоја различитих болести.^{130,164} Као што је већ истакнуто у *Општем делу*, 1,3,4-тиадиазолска једињења показују широк спектар биолошких активности,¹⁶⁵ а неки од ових деривата су нашли примену у фармацији и медицини где се користе у терапеутске сврхе.⁸³⁻⁸⁷ Између осталог, једињења која у својој структури садрже 1,3,4-тиадиазолски прстен показују добар антиоксидативни потенцијал, као и антитуморску активност према различитим ћелијским линијама канцера,¹⁶⁶ због чега добијање нових деривата овог хетероцикла заузима важно место у органској синтези.

Имајући у виду поменуте чињенице, идеја при изради ове докторске дисертације била је синтеза нових деривата 1,3,4-тиадиазола, у циљу побољшања биолошке активности ове групе једињења. Иако поседују значајан антитуморски потенцијал, главни недостатак деривата 1,3,4-тиадиазола представља њихова токсичност коју показују према здравим ћелијским линијама.¹⁶⁷ Претпоставка је да молекуларна хибридизација два биолошки активна једињења може довести до повећања активности и/или селективности, при чему би новонастали дериват поседовао повољнији терапеутски потенцијал у поређењу са појединачним биоактивним прекурсорима. Обзиром да са аспекта биолошког потенцијала 1,3,4-тиадиазоли и фенолне киселине представљају важне класе органских једињења, може се очекивати да се њиховим комбиновањем могу добити деривати који ће показати бољу биолошку активност.

У оквиру ове докторске дисертације синтетизоване су три нове серије амидних деривата 1,3,4-тиадиазола који у својој структури садрже фенолне хидроксилне групе (Слика 12).



Слика 12. Серије нових деривата 1,3,4-тиадиазола који у својој структури садрже фенолне хидроксилне групе.

Сви синтетизовани амидни деривати 1,3,4-тиадиазола структурно су окарактерисани применом NMR и IR спектроскопских метода. Као репрезентативни примери дати су ^1H и ^{13}C NMR спектри по једног једињења из сваке серије (**3ђ**, **6а** и **9а**, видети *Прилог*).

Антиоксидативни потенцијал синтетизованих једињења испитан је применом DPPH методе и добијени резултати упоређени су са антиоксидативном активношћу познатих антиоксиданата, као референтних једињења. За одабрана једињења такође је испитана и антиоксидативна активност коришћењем ABTS (2,2'-азино-bis(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)) методе, при чему су добијени резултати упоређени како са антиоксидативном активношћу стандардних антиоксиданта, тако и са резултатима добијеним применом DPPH методе. Осим тога, за једињења серије А и Б која су показала најбољу антиоксидативну активност испитан је и њихов потенцијални ефекат на стварање реактивних кисеоничних врста (енг. *Reactive oxygen species*, ROS) у малигним ћелијама, услед дејства водоник-пероксида. Изузев антиоксидативне активности, одређена је и антитуморска активност синтетизованих једињења серија А и Б испитивањем њихове цитотоксичности *in vitro* према ћелијским линијама аденокарцинома цервикса (HeLa), карцинома плућа (A549) и акутне промијелоцитне леукемије (HL-60). У циљу одређивања селективности и терапеутског потенцијала ових једињења испитана је и њихова токсичност према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). Антитуморска активност

синтетизованих једињења упоређена је са активношћу цисплатине која представља један од најчешће коришћених хемиотерапеутских лекова. Најактивнија једињења из обе серије одабрана су за детаљније испитивање механизма њиховог антитуморског деловања, применом различитих метода.

2.2. Серија А

У поглављу 1.8. истакнуто је да дихидроксибензојеве киселине код којих се једна хидроксилна група налази у *орто*- или *пара*- положају у односу на другу, показују најбоља антиоксидативна својства. Из тог разлога су 2-амино-1,3,4-тиадиазоли, супстрати за добијање деривата серије А, изведени из 2,3-дихидроксибензојеве, односно 3,4-дихидроксибензојеве киселине. Њиховим комбиновањем са различитим хлоридима карбоксилних киселина добијено је шеснаест нових амидних деривата 1,3,4-тиадиазола. За сва синтетизована једињења ове серије извршено је испитивање њиховог антиоксидативног и антитуморског потенцијала.

2.2.1. Синтеза амидних деривата 1,3,4-тиадиазола серије А

Синтеза нових 1,3,4-тиадиазолских деривата изведена је у два корака, као што је приказано у Схеми 52. У првом кораку добијени су 2-амино-1,3,4-тиадиазолски прекурсори (**2** и **2'**) реакцијом 3,4-дихидроксибензојеве, односно 2,3-дихидроксибензојеве киселине са тиосемикарбазидом у присуству фосфорил хлорида.¹⁶⁸ Следећи корак у синтези представља реакција купловања добијених 5-супституисаних-1,3,4-тиадиазол-2-амина (**2** и **2'**) и различитих хлорида карбоксилних киселина у тетраhydroфурану или диоксану, при чему се добијају финални амидни деривати 1,3,4-тиадиазола **3а-ж** и **3'а-ж** (Схема 52). Ради неутрализације хлороводоника ослобођеног током ове реакције коришћен је чврст NaHCO_3 . За добијање деривата **3г**, **3е**, **3'б**, **3'г** и **3'е**, реакција тиадиазолских прекурсора **2** и **2'** са хлоридима карбоксилних киселина захтевала је дуже реакционо време, чак и при рефлуксу, док је за потпуну конверзију супстрата било потребно додати хлорид карбоксилне киселине у вишку.

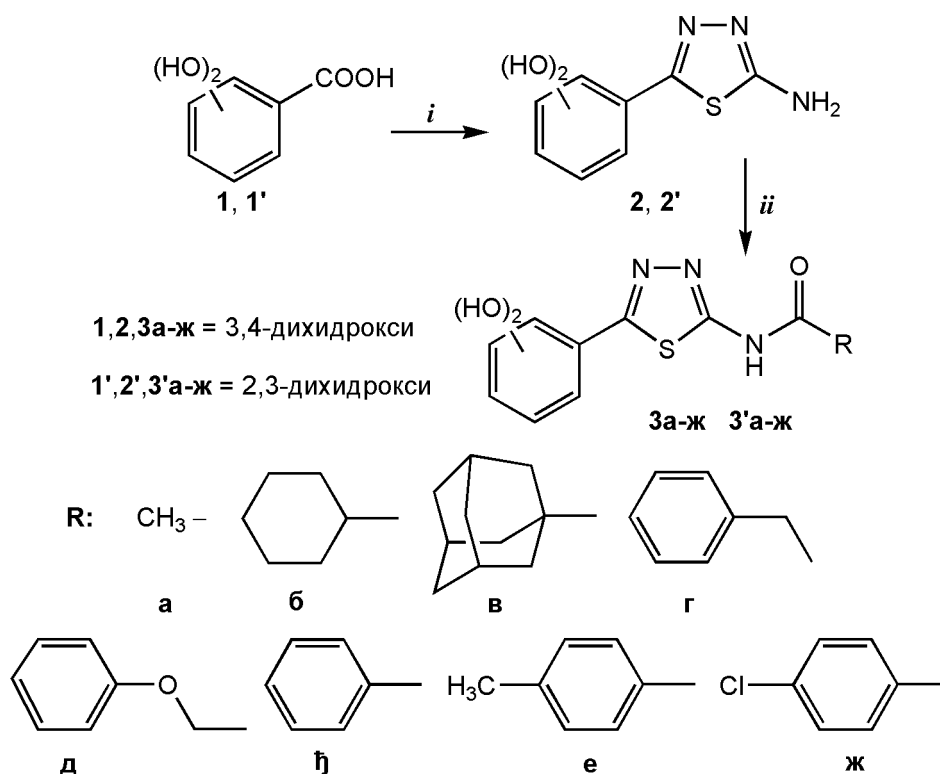


Схема 52. Реагенси и услови: i) POCl_3 , тиосемикарбазид, 1 h, рефлукс; ii) RCOCl , THF, 24 h, с.т. или диоксан, 12 h, рефлукс.

Изузев деривата **3h** и **3'h**, сва остала једињења синтетизована су по први пут, а њихове претпостављене структуре потврђене су спектралним подацима (IR, ^1H и ^{13}C NMR) и елементарном анализом.

2.2.2. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А

Као што је речено у *Општем делу*, досадашња истраживања указују на добру антиоксидативну активност 1,3,4-тиадиазола, фенолних киселина и још бољу активност деривата фенолних киселина. Резултати испитивања антиоксидативне активности серије естара¹⁶⁸ и амида¹⁶⁹ сугеришу да је спорије неутралисање DPPH радикала полазном протокаатеуинском киселином у односу на њене деривате последица дисоцијације електрон-привлачне карбоксилне групе, која води до формирања електрон-донорског карбоксилатног аниона. Услед дисоцијације карбоксилне групе долази до смањења електрофилности формираног хинона, због чега он постаје мање подложен нуклеофилном нападу молекула растварача.¹⁷⁰ Поред тога,

боља антиоксидативна активност деривата фенолне киселине који садрже 1,2,4-триазолски¹⁷¹ и 1,3,4-оксадиазолски¹⁷² прстен у поређењу са полазном киселином приписује се учешћу хетероцикличног скелета у резонантој стабилизацији радикала формираног хомолитичким цепањем О-Н и N-Н веза DPPH радикалом, што је потврђено и DFT (eng. *Density functional theory*) прорачунима за деривате 1,2,4-триазола.¹⁷¹ По аналогији са наведеним чињеницама, антиоксидативни капацитет 1,3,4-тиадиазола изведених из фенолних киселина може се повезати са њиховом способношћу да отпусте атом водоника, било са атома азота или кисеоника, као и могућношћу резонантне стабилизације добијеног радикала. Добијени феноксилни или азотни радикал је високо стабилизован резонанцијом, будући да се настали неспарени електрон може додатно делокализовати преко 1,3,4-тиадиазолског прстена, као што је приказано у Схеми 53.

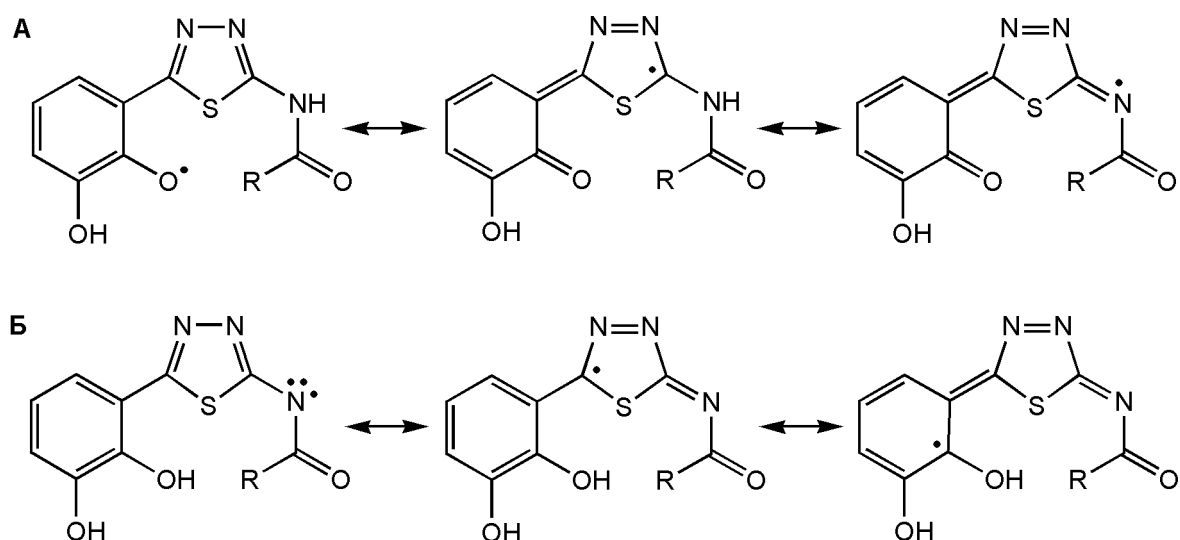


Схема 53. Резонантна стабилизација радикала насталог након апстракције атома водоника са (А) атома кисеоника и (Б) атома азота 1,3,4-тиадиазолског деривата серије А.

Новосинтетизовани амидни деривати 1,3,4-тиадиазола серије А подвргнути су DPPH тесту ради утврђивања њихове способности неутрализације слободних радикала. Генерално, сви деривати показују умерену до веома високу антиоксидативну активност (Табела 1), са IC₅₀ вредностима у опсегу од 17,85-52,97 μM за деривате 3,4-дихидроксибензојеве киселине (**3а-ж**) и 14,21-111,32 μM за деривате 2,3-дихидроксибензојеве киселине (**3'а-ж**).

Табела 1. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А.*

Једињење	IC ₅₀ ± SD (μM)	Једињење	IC ₅₀ ± SD (μM)
3а	23,36 ± 0,71	3'а	111,32 ± 2,22
3б	37,28 ± 0,92	3'б	19,88 ± 0,52
3в	17,85 ± 0,46	3'в	14,21 ± 0,34
3г	21,29 ± 0,64	3'г	20,89 ± 0,56
3д	36,05 ± 0,88	3'д	16,6 ± 0,39
3ђ	23,39 ± 0,74	3'ђ	22,28 ± 0,68
3е	33,97 ± 0,81	3'е	27,09 ± 0,77
3ж	52,97 ± 1,43	3'ж	30,17 ± 0,78
Аскорбинска киселина	38,02 ± 0,62		
NDGA	20,75 ± 0,48		

* Резултати представљају средњу вредност ± SD за три мерења.

Резултати DPPH теста указују на снажан утицај природе R-супституената на капацитет уклањања DPPH радикала, а који су изабрани тако да поседују различите електрон-донорске, електрон-привлачне и стерне особине. На основу резултата приказаних у Табели 1 може се приметити да су за обе групе деривата тиадиазола, једињења **3в** и **3'в**, која у својој структури имају електрон-донорску адамантанску групу, показала најбољу антиоксидативну активност, са IC₅₀ вредностима значајно нижим од IC₅₀ вредности референтних стандарда, аскорбинске и нордихидрогвајаретинске киселине (NDGA). Резултати антиоксидативне активности за деривате 2,3-дихидроксибензојеве киселине (**3'а-ж**) су у сагласности са ефектима супституената на резонанту стабилизацију, са изузетком једињења **3'а**, које је показало нижу антиоксидативну активност од очекиване. Такође, редослед активности једињења **3'ђ** и **3'е** је супротан од претпостављеног, јер једињење **3'е** у својој структури има електрон-донорску метил групу која повећава електронску густину на радикалском центру и тиме утиче на резонантну стабилизацију, због чега се очекује његова боља активност од деривата **3'ђ**. Резултати DPPH теста за деривате тиадиазола изведених из 3,4-дихидроксибензојеве киселине не показују најбоље слагање са ефектима супституената на резонантну стабилизацију. Ово је највероватније последица постојања других фактора који могу довести до промена у антиоксидативном потенцијалу једињења, попут утицаја растварача или интермолекуларних водоничних веза.¹⁷⁰

2.2.3. Цитотоксична активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А

Цитотоксична активност новосинтетизованих деривата серије А испитана је према хуманим малигним ћелијским линијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60), аденокарцинома цервикса (HeLa) и карцинома плућа (A549). У циљу одређивања селективности и терапеутског потенцијала ових једињења испитана је и њихова цитотоксичност према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5). За одређивање интензитета цитотоксичне активности коришћен је МТТ тест (енг. *Microculture Tetrazolium Test*), а добијени резултати упоређени су са активношћу цисплатине. Добијене IC₅₀ вредности приказане су у Табели 2.

Табела 2. *In vitro* цитотоксична активност једињења **3а-ж** и **3'а-ж**.*

Једињење	IC ₅₀ ±SD (μM)			
	HL-60	HeLa	A549	MRC-5
3а	42,5 ± 0,2	124,7 ± 14,2	132,6 ± 19,4	58,6 ± 5,9
3б	8,8 ± 1,1	34,5 ± 2,2	16,3 ± 3,3	24,0 ± 0,3
3в	7,4 ± 0,3	16,1 ± 1,1	13,0 ± 3,0	20,1 ± 1,7
3г	12,0 ± 1,3	88,6 ± 9,7	15,4 ± 3,3	30,7 ± 4,4
3д	17,4 ± 2,4	51,3 ± 6,4	21,2 ± 1,3	30,9 ± 2,0
3ђ	17,6 ± 2,5	23,3 ± 3,0	13,0 ± 2,3	27,4 ± 4,0
3е	10,5 ± 1,1	67,1 ± 1,7	11,8 ± 0,5	27,1 ± 3,5
3ж	14,7 ± 2,2	47,3 ± 3,4	14,6 ± 3,1	30,6 ± 4,0
3'а	49,0 ± 4,3	176,7 ± 21,3	200,0 ± 0,0	155,6 ± 13,5
3'б	7,9 ± 0,4	91,6 ± 7,0	11,0 ± 0,8	70,3 ± 14,2
3'в	7,3 ± 0,5	21,4 ± 4,2	12,8 ± 1,3	27,7 ± 4,3
3'г	13,9 ± 1,1	120,0 ± 18,9	11,8 ± 1,0	45,3 ± 4,1
3'д	11,2 ± 1,2	117,0 ± 14,5	10,5 ± 0,3	33,9 ± 6,1
3'ђ	20,7 ± 0,7	21,8 ± 2,3	12,3 ± 1,0	23,2 ± 2,3
3'е	10,6 ± 1,4	13,4 ± 2,5	11,3 ± 0,5	33,2 ± 3,0
3'ж	9,6 ± 0,4	13,0 ± 2,2	9,5 ± 0,5	18,7 ± 1,9
Цисплатина	3,4 ± 0,1	2,2 ± 0,5	14,4 ± 0,7	9,2 ± 0,2

* Резултати представљају средњу вредност ± SD за три мерења.

Из резултата приказаних у Табели 2 може се закључити да обе серије деривата тиадиазола (изведених из 3,4- и 2,3-дихидроксибензојеве киселине) имају најизраженију активност према ћелијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60). Поред антиоксидативне активности, једињења са адамантанским супституентом, **3в** и **3'в**, показала су и најбољу цитотоксичну активност према овој ћелијској линији

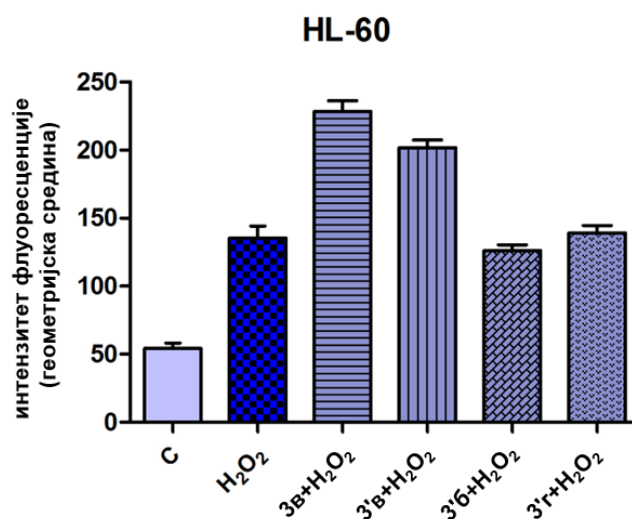
канцера. Ипак, не постоји значајна разлика између утицаја електрон-привлачних и електрон-донорских супституената код једињења **3e** и **3ж**, а посебно у случају једињења **3'e** и **3'ж**, на цитотоксичну активност према HL-60 и A549 ћелијским линијама. Деривати који садрже циклохексил групу, **3б** и **3'б**, показали су такође високу цитотоксичну активност према HL-60 ћелијама, док су једињења са фенил групом супституисаном у *p*-положају, **3e**, **3'e** и **3'ж**, најактивнија међу једињењима са ароматичним прстеном у својој структури. Сви испитивани деривати 1,3,4-тиадиазола серије А, изузев једињења **3a** и **3'a**, поседују добар цитотоксични потенцијал према малигним ћелијама карцинома плућа A549. Једињења **3в**, **3ђ** и **3е**, као и сви деривати 1,3,4-тиадиазола изведени из 2,3-дихидроксibenзојеве киселине, осим једињења **3'a**, показали су сличну или нешто бољу цитотоксичност у поређењу са цисплатином као референтним хемиотерапеутиком. Најбоља активност у овом случају примећена је за једињење **3'ж**, које у својој структури садржи *p*-хлорофенил групу. Ово једињење је такође показало и добру активност према ћелијској линији аденокарцинома грлића материце (HeLa). Може се закључити да најбољи цитотоксични потенцијал према HL-60 ћелијској линији поседују једињења која садрже волуминозне адамантил и циклохексил супституенте, док су HeLa ћелије најосетљивије на деривате тиадиазола изведене из 2,3-дихидроксibenзојеве киселине који у својој структури имају планарне ароматичне прстенове. Ипак, из приказаних резултата се може видети да је ова ћелијска линија показала најмању осетљивост на цитотоксичну активност испитиваних тиадиазола. Цитотоксичност према нормалним ћелијама фибробласта плућа (MRC-5) значајно је нижа за сва тестирана једињења у поређењу са цисплатином. Сви испитивани 1,3,4-тиадиазоли, изузев једињења **3a** и **3'a**, показали су већу цитотоксичну активност према малигним ћелијским линијама A549 и HL-60 него према нормалним MRC-5 ћелијама, што указује на добру селективност ових једињења.

2.2.4. Цитопротективни ефекти деривата 1,3,4-тиадиазола серије А

Обзиром да су једињења **3в**, **3'в**, **3'б** и **3'г** показала најбољу антиоксидативну активност, одабрана су за испитивање њиховог могућег цитопротективног ефекта на стварање ROS-а у HL-60 ћелијама услед дејства водоник-пероксида. Малигне ћелије акутне промијелоцитне леукемије третиране су нетоксичним концентрацијама

одабраних једињења (6,5 μM за **3в**, 6 μM за **3'в** и 6,25 μM за **3'б** и **3'г**) током 24 h, након чега је сакупљеним и испраним ћелијама додат 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетат. Затим су ћелије изложене раствору водоник-пероксида концентрације 5 mM, током 30 минута. Стварање реактивних врста кисеоника у ћелијама индуковано водоник-пероксидом одређено је помоћу нефлуоресцентног, мембрански пропусног 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетата, који се у присуству интрацелуларног ROS-а оксидује до флуоресцентног 2',7'-дихлорофлуоресцеина.¹⁷² Интезитет флуоресценције насталог дихлорофлуоресцеина одређен је методом проточне цитометрије.

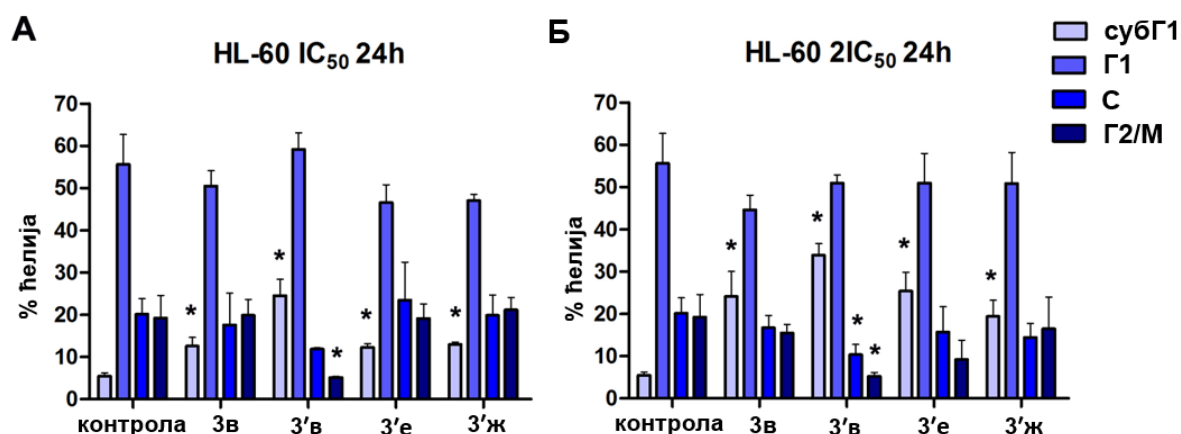
Као што се може видети на Слици 13, третирање ћелија једињењем **3'б** довело је до незнатног смањења нивоа ROS-а, чије је стварање изазвано дејством водоник-пероксида, у поређењу са нивоом ROS-а у HL-60 ћелијама које су расле у хранљивом медијуму током 24 h и затим изложеним дејству водоник-пероксида. Ниво ROS-а у ћелијама третираним једињењем **3'г** приближно је једнак нивоима ROS-а мереним у ћелијама изложеним само водоник-пероксиду, док је инкубација ћелија са једињењима **3в** и **3'в** довела до значајног повећања нивоа интрацелуларног ROS-а.



Слика 13. Ефекат двадесетчетворочасовног третирања HL-60 ћелија IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'б** и **3'г** на продукцију ROS-а индуковану 5 mM-ним раствором H₂O₂. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ SD два независна експеримента.

2.2.5. Утицај на дистрибуцију ћелијског циклуса

Најактивнији деривати тиадиазола, **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж**, изабрани су за даље испитивање механизма њиховог антитуморског деловања. Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом показала је да свако од четири испитивана једињења, примењено у IC_{50} и $2IC_{50}$ концентрацијама, доводи до значајног повећања броја HL-60 ћелија промијелоцитне леукемије у субГ1 фази ћелијског циклуса, у поређењу са узорком контролних ћелија (Слика 14). Поред значајног повећања процента ћелија у субГ1 фази, третирање једињењем **3'в** изазвало је смањење процента HL-60 ћелија у С ($2IC_{50}$ концентрација) и Г2/М фазама ћелијског циклуса (IC_{50} и $2IC_{50}$ концентрације). Међу тестираним једињењима највеће повећање процента HL-60 ћелија у субГ1 фази ћелијског циклуса изазвало је једињење **3'в**.



Слика 14. Промене у фазној расподели ћелијског циклуса HL-60 ћелија третираних (А) IC_{50} и (Б) $2IC_{50}$ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 24 h.

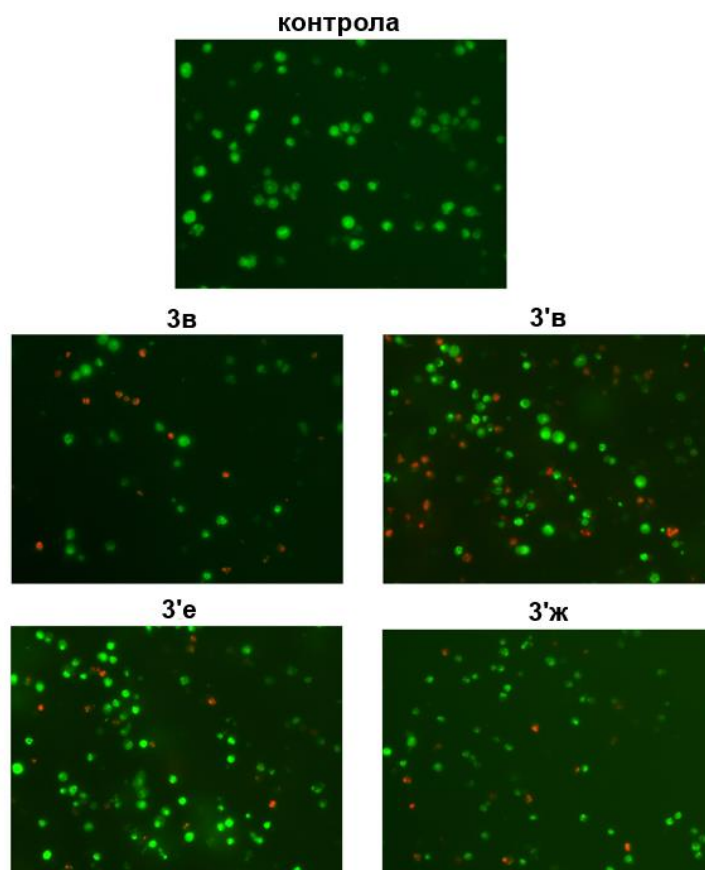
Резултати представљају средњу вредност $\pm$ SD три независна експеримента.

Статистички значајне разлике између контролних и третираних ћелија означене су са * ($p < 0.05$).

2.2.6. Морфолошка анализа типа ћелијске смрти

Морфолошка анализа врсте ћелијске смрти индуковане деловањем четири одабрана 1,3,4-тиадиазола серије А на HL-60 ћелије вршена је флуоресцентном микроскопијом, коришћењем акридин-оранж/етидијум бромида за бојење ћелија. Сва испитивана једињења, примењена у $2IC_{50}$ концентрацијама током 24 h, показала су

способност да индукују апоптозе у HL-60 ћелијама (Слика 15). У третираним ћелијама примећене су уобичајене морфолошке карактеристике апоптотске ћелијске смрти, попут кондензације хроматина, фрагментације једра, као и присуства наранџасто-црвено обојених ћелија у касним фазама апоптозе или секундарне некрозе.

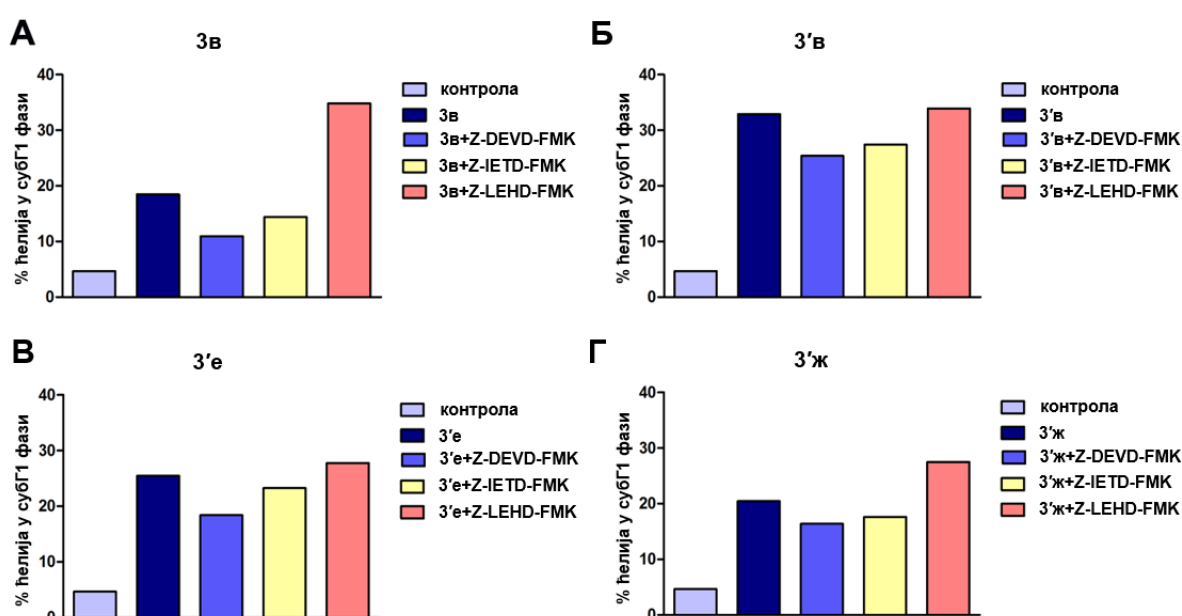


Слика 15. Фотомикрографије акридин-оранж/етидијум-бромидом обојених контролних HL-60 ћелија и HL-60 ћелија изложених 2IC50 концентрацијама једињења 3в, 3'в, 3'е и 3'ж током 24 h (20x увећање).

2.2.7. Одређивање механизма ћелијске смрти

У циљу разјашњења механизма ћелијске смрти коју су тестирана једињења изазвала у HL-60 ћелијама, испитани су ефекти третирања ћелија специфичним инхибиторима каспазе. У ту сврху примењени су Z-DEVD-FMK, инхибитор каспазе 3, Z-IETD-FMK, инхибитор каспазе 8 и Z-LEHD-FMK, инхибитор каспазе 9, у концентрацијама од 40 μM .¹⁷³ У случају када су HL-60 ћелије прво третиране инхибитором каспазе 3, а потом изложене једињењима 3в, 3'в, 3'е и 3'ж, дошло је до

смањења процента ћелија у субГ1 фази, у односу на проценат ћелија у истој фази за узорке који нису претходно инкубирани са овим инхибитором (Слика 16). Поред тога, показало се да предтретман инхибитором каспазе 8 смањује проценат ћелија у субГ1 фази код узорака изложених сваком од тестираних једињења. Са друге стране, претходно третирање инхибитором каспазе 9 није имало ефекта, нити је довело до повећања процента ћелија у субГ1 фази. Добијени резултати указују на чињеницу да апоптоза у ћелијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60), изазвана испитиваним тиадиазолима, бар делимично зависи од активирања каспазе 3 и каспазе 8. Осим тога, остаје могућност да ова једињења могу изазвати апоптозу која не зависи од активности каспазе, али и друге типове ћелијске смрти у HL-60 ћелијама.

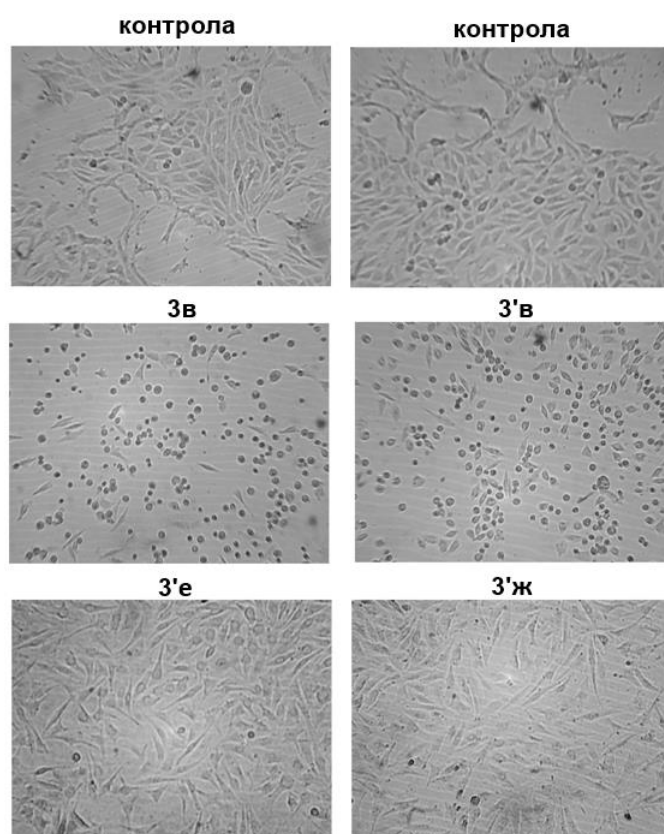


Слика 16. Утицај специфичних инхибитора каспаза (Z-DEVD-FMK – инхибитор каспазе 3, Z-IETD-FMK - инхибитор каспазе 8, Z-LEHD-FMK - инхибитор каспазе 9) на проценат HL-60 ћелија у субГ1 фази третираних $2IC_{50}$ концентрацијама једињења (А) 3в, (Б) 3'в, (В) 3'е и (Г) 3'ж.

2.2.8. Антиангиогенетска својства деривата 1,3,4-тиадиазола серије А

Могућа антиангиогенетска својства одабраних деривата тиадиазола испитана су применом експеримента формирања тубула – *Tube formation assay*.^{174,175} Као што се може видети на Слици 17, једињења 3в и 3'в, примењена у субтоксичним IC_{20} концентрацијама (30 μM), показала су снажне антиангиогенетске ефекте *in vitro*.

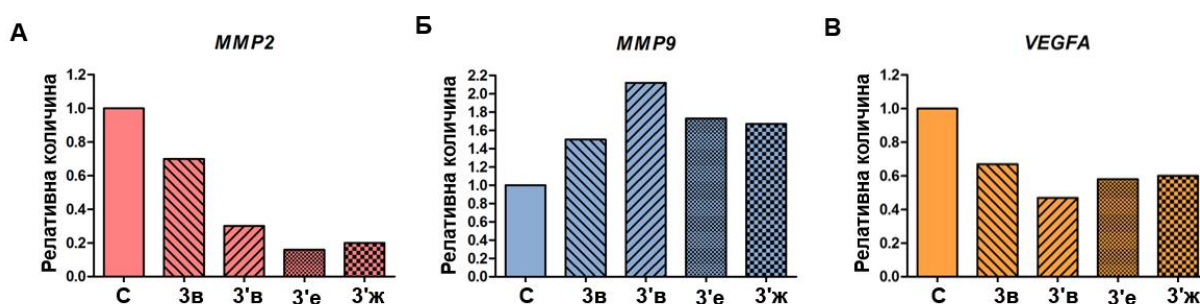
Инкубација ендотелијалних EA.hy926 ћелија, које су расле на површини матричног матригела, са једињењима **Зв** и **З'в**, ефикасно инхибира издуживање EA.hy926 ћелија, њихово спајање и трансформацију у капиларне тубуларне структуре, које се може приметити у узорцима контролних ћелија. Једињења **З'е** и **З'ж**, примењена у субтоксичним IC₂₀ концентрацијама (50 µM), имају прилично слаб антиангиогенетски ефекат, али показују способност инхибиције стварања мреже капиларно-тубуларних структура. *In vitro* антиангиогенетска ефикасност нових деривата 1,3,4-тиадиазола **Зв** и **З'в** указује на њихов значајан хемиопревентивни и канцер-терапијски потенцијал, имајући у виду чињеницу да инхибитори ангиогенезе представљају важну терапијску стратегију за сузбијање раста, ширења и метастазирања малигних тумора.



Слика 17. Фотомикрографије контролних EA.hy926 ћелија и EA.hy926 ћелија изложених субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **Зв**, **З'в**, **З'е** и **З'ж** током 20 h.

2.2.9. Утицај деривата 1,3,4-тиадиазола серије А на нивое експресије гена у HL-60 ћелијама

Такође, испитани су и ефекти одабраних деривата тиадиазола на нивое експресије гена матриксних металопротеиназа 2 и 9 (*MMP2* и *MMP9*) и васкуларног ендотелијалног фактора раста А (*VEGFA*) у ћелијама акутне промијелоцитне леукемије HL-60. Познато је да малигне ћелије излучују *MMP2*, *MMP9* и *VEGFA* који су укључени у расту ћелија, миграцији, инвазији, метастазирању и ангиогенези.^{177,178} Ћелије акутне промијелоцитне леукемије третиране су субтоксичним концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 24 h, а мерење нивоа експресије гена вршено је применом квантитативног RT-PCR-а у реалном времену (квантитативна полимеразна ланчана реакција) и TaqMan® тестовима експресије гена.¹⁷⁹ Нивои експресије гена у третираним HL-60 ћелијама упоређени су са нивоима у контролним, нетретираним HL-60 ћелијама, што се може видети на Слици 18. Сва тестирана једињења, а посебно једињења **3'в**, **3'е** и **3'ж**, показала су способност да смање нивое експресије гена *MMP2* у третираним HL-60 ћелијама, у поређењу са узорцима контролних ћелија, што указује на њихова антиметастатска својства *in vitro*.



Слика 18. Промене у нивоима експресије гена (А) *MMP2*, (Б) *MMP9* и (В) *VEGFA* у HL-60 ћелијама третираним субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** током 24 h.

2.3. Серија Б

Као што је раније истакнуто, хибридни молекули карактеристични су по томе што садрже две или више различитих, ковалентно повезаних фармакофора, чијим комбиновањем често долази до побољшања терапеутског потенцијала формираног једињења у поређењу са појединачним биоактивним прекурсорима. Молекуларна хибридизација може бити добар начин да се побољша активност или селективност, али и превазиђу нуспојаве повезане са неким од једињења који у њој учествују. Халкони се често бирају као једна од структура за хибридизацију због значајног антитуморског потенцијала и релативно лаке синтезе.^{180,181} Антиоксидативна и цитотоксична активност 1,3,4-тиадиазолских деривата серије А, који су изведени из фенолних киселина, навеле су нас да извршимо комбиновање 1,3,4-тиадиазола са халконском јединицом у циљу добијања новог хибридног молекула погодног за истовремено циљање више патогених механизма. Ковалентна веза успостављена је формирањем амида у реакцији амино групе хетероцикла и карбоксилне групе халконског аналога која је претходно трансформисана у киселински хлорид. 2-Амино-1,3,4-тиадиазоли који су коришћени као супстрати за ову серију једињења изведени су из протокатехуинске киселине. Као што је речено у *Општем делу* и у поглављу 2.2., ова дихидроксибензојева киселина, код које су хидроксилне групе у међусобном *ortho* положају, као и њени деривати, показују добре антиоксидативне особине, због чега је управо она одабрана за синтезу нових хибридних деривата 1,3,4-тиадиазола.

2.3.1. Синтеза амидних деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б

Тринаест нових хибридних 1,3,4-тиадиазолских деривата који у својој структури садрже халконску јединицу, синтетизовани су у три корака, као што је приказано у Схеми 54. У првом кораку синтетизовани су халконски аналози **5a-l** применом реакције Claisen-Schmidt-ове кондензације 4-формилбензојеве киселине **4** са изабраним, супституисаним ацетофенонима у присуству NaOH, према делимично измењеној, познатој процедури.¹⁸² Добијени халкони **5a-l** су дејством SOCl₂ преведени у ацил хлориде, који су, без претходног изоловања, укључени у реакцију са 4-(5-амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензен-1,2-диолом **2** у диоксану, дајући при томе

финална хибридна једињења (**6a-л**) у умереним до добрим приносима (53-87%). Тиадиазолски дериват **2** синтетизован је према поступку описаном у поглављу 2.2.1. Иако су киселински хлориди врло реактивна једињења, за формирање амида било је потребно дуго реакционо време и висока температура услед слабе нуклеофилности амино групе 1,3,4-тиадиазола, што је био случај и код добијања неких амидних деривата серије А. Скоро сва добијена једињења су након завршетка реакције и изоловања још увек садржала значајну количину диоксана. Његово уклањање извршено је растварањем сировог производа у DMF-у или DMSO-у и његовим накнадним таложењем додатком воде, или растварањем у THF-у и његовим потпуним упаравањем.

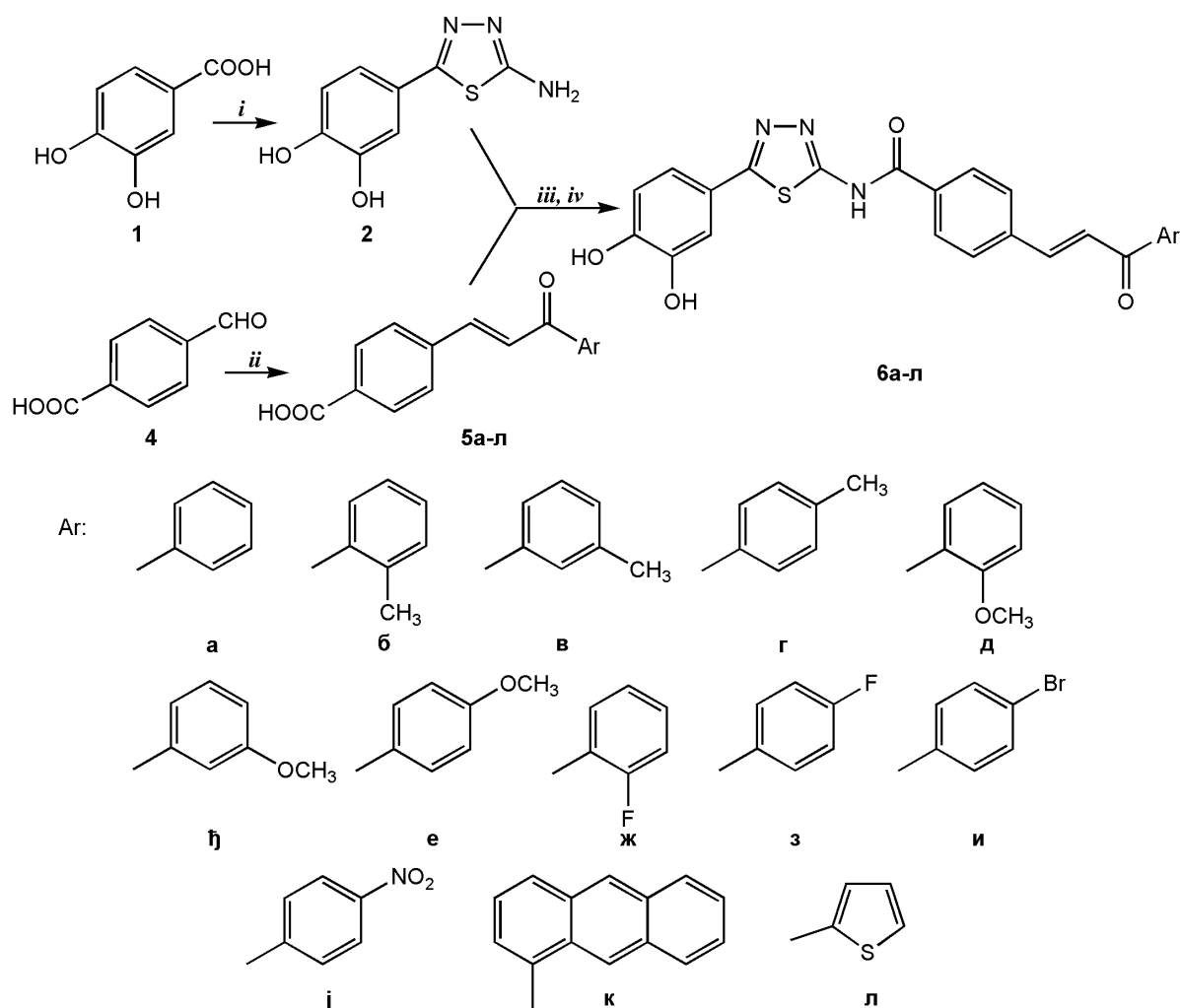


Схема 54. Реагенси и услови: i) POCl_3 , *с.т.*, $\text{H}_2\text{NNHC}(=\text{S})\text{NH}_2$, 1 h, рефлукс; ii) супституисани ацетофенони, NaOH, MeOH, 2 h, рефлукс, HCl; iii) SOCl_2 , DMF, CH_2Cl_2 , 2 h, *с.т.*; iv) **2**, диоксан, 12 h, рефлукс.

Структуре свих једињења потврђене су применом IR, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије и елементарном анализом. Олефински протони халконске двоструке везе у хибридама **6a-l**, као и њиховим одговарајућим прекурсорима **5a-l**, у ^1H NMR спектрима су били присутни у облику АВ система. На основу вредности константи купловања ($J = 15,6\text{-}16,0\text{ Hz}$), једињења **6a**, **6b**, **6g**, **6h**, **6e** и **6z-l** су изолована и окарактерисана у облику *E*-изомера. Међутим, једињења **6b**, **6g** и **6ж**, као и њихови халконски прекурсор (**5b**, **5g** и **5ж**), код којих је вредност константе купловања у опсегу од 7,0 до 8,2 Hz, одговарају мање стабилној, *Z*-конфигурацији.¹⁸³ Ова врста геометрије халконске двоструке везе није честа и будући да сви наведени деривати садрже *ortho*-супституисане ацетофенонске групе у својој структури, највероватније је *Z*-конфигурација фаворизована стерним факторима. Ароматични протони који припадају фенолној групи јављају се у опсегу од 6,86-7,44 ppm-а, дајући дублет за H-5, дублет дублета за H-6 и други дублет за H-2. Протони који припадају делу молекула који потиче од бензојеве киселине су добро резолуисани у облику АВ система за већину деривата тиадиазола серије Б.

2.3.2. Антиоксидативна активност 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида серије Б

Резултати антиоксидативне активности деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б, изражени IC_{50} вредностима, приказани су у Табели 3. На основу резултата се може закључити да сви синтетизовани хибридни молекули показују бољу способност неутрализације DPPH радикала у односу на референтну аскорбинску киселину.

Табела 3. Антиоксидативна активност 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида серије Б.*

Једињење	IC ₅₀ ± SD (μM)
ба	12,03 ± 0,50
бб	11,66 ± 0,41
бв	17,17 ± 0,38
бг	11,81 ± 0,31
бд	9,76 ± 0,75
бђ	10,33 ± 0,30
бе	17,86 ± 0,03
бж	13,91 ± 0,32
бз	17,82 ± 0,65
би	18,04 ± 0,23
бј	14,01 ± 0,34
бк	13,45 ± 0,09
бл	11,06 ± 0,24
Аскорбинска киселина	20,23 ± 0,14

* Резултати представљају средњу вредност ± SD за три мерења.

Као и код претходне серије деривата тиадиазола, антирадикалски потенцијал синтетизованих 1,3,4-тиадиазолских хибрида серије Б директно је повезан са способношћу апстракције водониковог атома DPPH радикалом, било са атома кисеоника или атома азота.¹⁷¹ Формирани радикал се и у овом случају може стабилизovati делокализацијом неспареног електрона преко 1,3,4-тиадиазолског прстена (Схема 55).

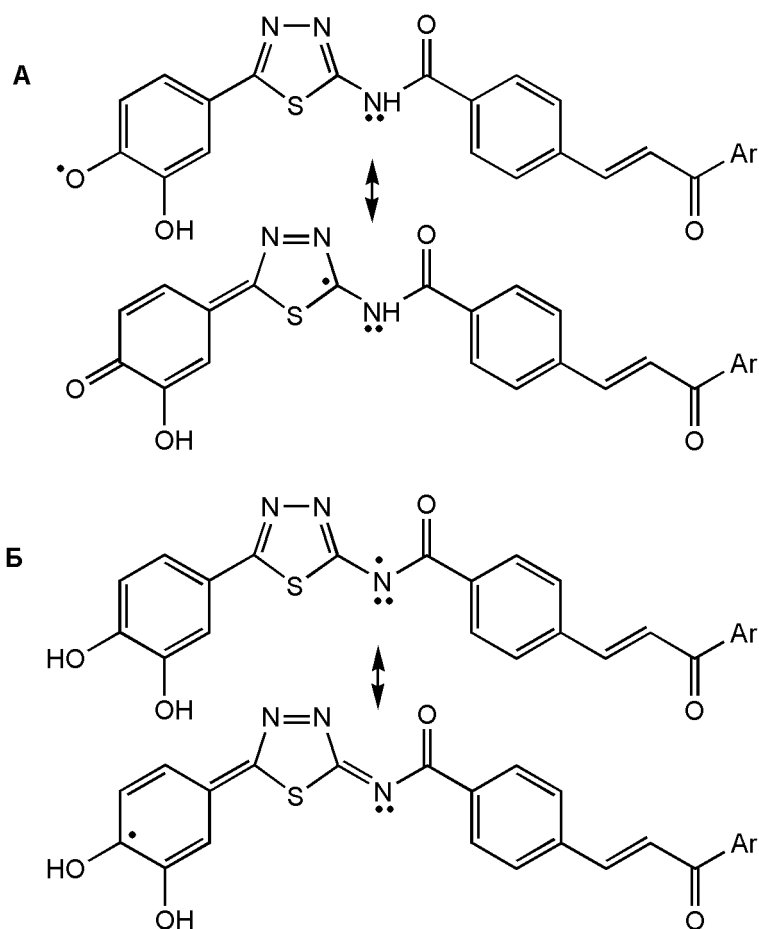


Схема 55. Резонантна стабилизација радикала насталог након апстракције атома водоника са (А) атома кисеоника и (Б) атома азота 1,3,4-тиадиазолског деривата серије Б.

Нажалост, пошто су сва једињења из серије Б готово нерастворна у метанолу, уобичајеном растварачу за извођење DPPH теста, њихова активност у неутрализацији радикала одређена је у разблаженом раствору диметил сулфоксида. Међутим, откривено је да употреба DMSO-а као растварача доводи до значајног смањења антирадикалског капацитета аскорбинске киселине услед грађења интермолекулских водоничних веза и формирања молекулског комплекса са DMSO-ом.¹⁸⁴ Такође, утврђени су драстични ефекти растварача на брзину апсорпције водониковог атома из фенолних једињења.¹⁸⁵ У складу са овим чињеницама, у одвојеним експериментима уочена је значајно нижа активност неутрализације радикала при вишим концентрацијама DMSO-а, што указује на формирање молекулског комплекса између DMSO-а и испитиваног једињења. Из тог разлога није било могуће одредити утицај халконске групе са различитим електрон-донорским и електрон-привлачним

супституентима и направити поређење са другим 1,3,4-тиадиазолским једињењима која садрже фенолне хидроксилне групе.

2.3.3. Цитотоксична активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б

Цитотоксична активност и ове серије деривата 1,3,4-тиадиазола испитана је према малигним ћелијским линијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60), аденокарцинома цервикса (HeLa) и карцинома плућа (A549), као и према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) ради утврђивања селективности испитиваних једињења. За одређивање интензитета цитотоксичне активности коришћен је МТТ тест, а добијени резултати упоређени су са активношћу цисплатине. Добијене IC₅₀ вредности приказане су у Табели 4.

Табела 4. *In vitro* цитотоксична активност једињења **6a-l**.*

Једињење	IC ₅₀ ±SD (μM)			
	HL-60	HeLa	A549	MRC-5
6a	8,40±1,44	9,37±0,86	42,75±2,77	36,00±1,10
6б	7,62±1,40	9,12±1,19	21,80±2,55	18,56±2,25
6в	8,39±1,39	9,63±1,26	27,87±4,05	34,25±4,88
6г	8,44±1,52	11,20±2,32	26,35±1,90	33,72±3,35
6д	11,97±1,27	10,22±0,73	50,23±5,35	48,01±6,43
6ђ	9,92±0,50	9,98±0,99	92,14±6,64	42,54±3,88
6е	16,35±0,87	57,55±7,58	89,10±9,35	81,33±9,25
6ж	8,88±1,32	11,08±2,10	46,89±1,71	39,58±4,82
6з	10,63±0,96	17,75±0,17	89,33±2,99	45,81±3,38
6и	9,74±1,54	40,22±3,64	87,74±6,82	38,24±4,95
6ј	11,17±0,52	54,76±2,77	127,75±8,37	39,44±3,49
6к	6,92±0,53	11,04±2,41	23,23±1,37	21,17±1,23
6л	15,72±1,66	12,72±3,24	47,85±1,92	68,52±7,69
Цисплатина	2,88±0,34	4,91±0,74	13,21±0,89	9,35±1,29

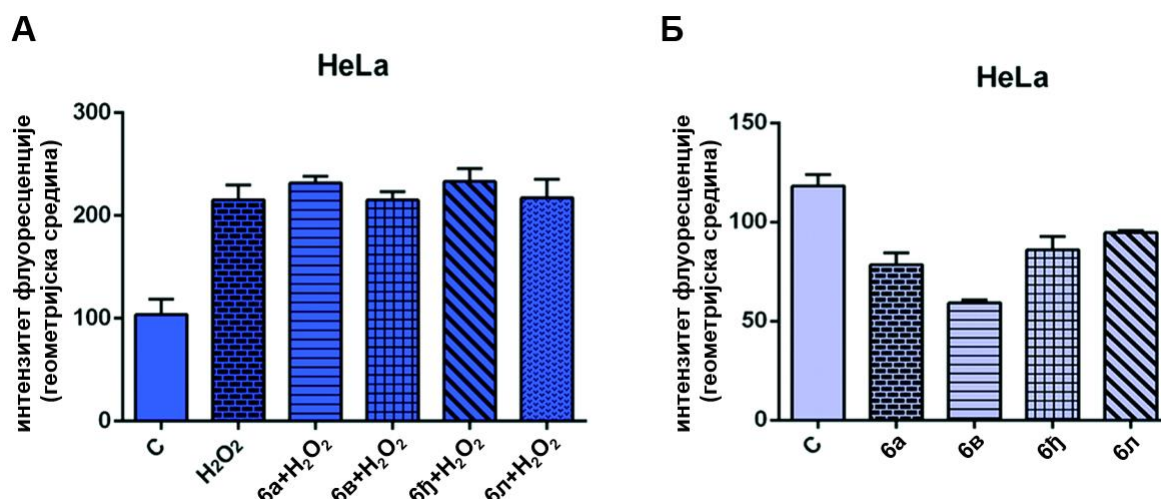
* Резултати представљају средњу вредност ± SD за три мерења.

Сва тестирана једињења показала су најбољу цитотоксичну активност према ћелијској линији акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) са IC₅₀ вредностима у опсегу од 6,92 до 16,35 μM. Једињења **6a**, **6ђ**, **6ж**, **6к** и **6л** такође су показала и добру цитотоксичност према HeLa ћелијама, са IC₅₀ вредностима од 9,12 до 12,72 μM. Ћелије карцинома плућа (A549) биле су најмање осетљиве на цитотоксичну активност ових хибридних једињења, која су показала умерену или ниску активност цитотоксичног

деловања према овој ћелијској линији. Из резултата приказаних у Табели 4 може се закључити да нема значајне разлике између утицаја електрон-привлачних и електрон-донорских супституената ацетофенонске групе на цитотоксично деловање према ћелијским линијама канцера. Из овога следи да тиадиазол-халконска фармакофора, присутна у структурама свих тестираних једињења, има пресудну улогу у њиховом цитотоксичном деловању. Сва једињења из ове серије показала су два до четири пута већу цитотоксичност према HeLa и HL-60 ћелијским линијама канцера у односу на активност према нормалним MRC-5 ћелијама, са изузетком једињења **6е**, **6и** и **6ј** према HeLa ћелијској линији. Поред тога, сви испитивани деривати мање су токсични према нормалним MRC-5 ћелијама него цисплатина, која је узета као референтни хемиотерапеутик.

2.3.4. Цитопротективни ефекти деривата 1,3,4-тиадиазола серије Б

Обзиром да су тиадиазолски деривати и ове серије једињења показали добар антиоксидативни потенцијал, извршено је испитивање њиховог утицаја на ниво ROS-а у хуманим ћелијама аденокарцинома грлића материце (HeLa). Једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** одабрана су за све даље анализе због изразите цитотоксичне активности и добре селективности у цитотоксичном деловању (Табела 4). Резултати испитивања утицаја тестираних једињења на ниво ROS-а изазваног водоник-пероксидом, као и на ендogene нивое ROS-а у HeLa ћелијама, приказани су на Слици 19.



Слика 19. Ефекти двадесетчетворочасовног третирања HeLa ћелија IC₂₀ концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида **6a**, **6b**, **6h** и **6l** (10 μ M за свако једињење) на (А) продукцију ROS-а индуковану 10 mM-ним раствором H₂O₂ и (Б) нивое ендогенос ROS-а. Резултати су представљени као средња вредност $\pm$ SD два независна експеримента.

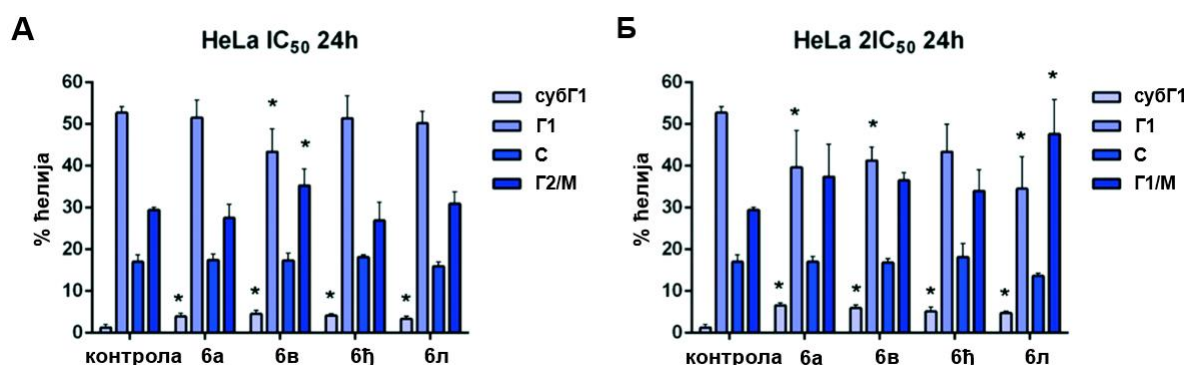
На Слици 19А може се уочити да постоји значајна акумулација ROS-а у ћелијама третираним водоник-пероксидом, што указује на чињеницу да додатком водоник-пероксида долази до активирања ендогене продукције ROS-а. Претходно третирање HeLa ћелија субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **6a** и **6h** (10 μ M за свако једињење) довело је до благог повећања нивоа ROS-а чије је стварање изазвано водоник-пероксидом, док претходно третирање једињењима **6b** и **6l** на њега није имало утицај. Радикалске врсте (попут феноксилног радикала), настале оксидацијом једињења **6a** и **6h** водоник-пероксидом, веома су реактивне и могу подлећи даљој оксидацији при чему долази до настанка хинонских једињења. Настали хинони су и даље реактивни и могу се стабилизovati интеракцијом са нуклеинским киселинама.¹⁸⁶ Ова реакција је одговорна за токсични прооксидативни ефекат једињења **6a** и **6h** услед ког може доћи до оштећења ћелијских конституената, попут ДНК, индуковањем оксидативног цитотоксичног стреса, који активира програмирану ћелијску смрт – апоптозу.

У HeLa ћелијама којима није додаван H₂O₂, двадесетчетворочасовни третман једињењима **6a**, **6b**, **6h** и **6l** је изазвао смањење нивоа интрацелуларног ROS-а у односу на ниво ROS-а у контролним ћелијама. Овакво понашање тестираних једињења, а посебно деривата **6b**, резултат је њиховог антирадикалског потенцијала за

неутрализацију основног ROS-а у HeLa ћелијама (Слика 19Б). Неке ћелије рака се у напредном стадијуму болести прилагоде оксидативном стресу захваљујући својим антиоксидативним одбрамбеним способностима. То је разлог резистенције неких малигних ћелија на лекове који индукују стварање интрацелуларног ROS-а, попут паклитаксела и доксорубицина.¹⁸⁷ Према томе, способност лека да смањи антиоксидативни потенцијал у комбинацији са оксидационим агенсима, може бити корисна у антитуморским терапијама. Продукција довољне количине ROS-а која може да изазове апоптозу, као и смањивање нивоа антиоксиданата, могу бити добри начини за убијање ћелија рака које су осетљивије на егзогени оксидативни стрес у односу на нормалне ћелије.

2.3.5. Утицај на дистрибуцију ћелијског циклуса

У циљу испитивања механизма цитотоксичне активности четири одабрана 1,3,4-тиадиазол-халконска хибрида, **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**, разматране су промене у појединим фазама ћелијског циклуса малигних HeLa ћелија, третираних IC_{50} и $2IC_{50}$ концентрацијама ових једињења током 24 h.



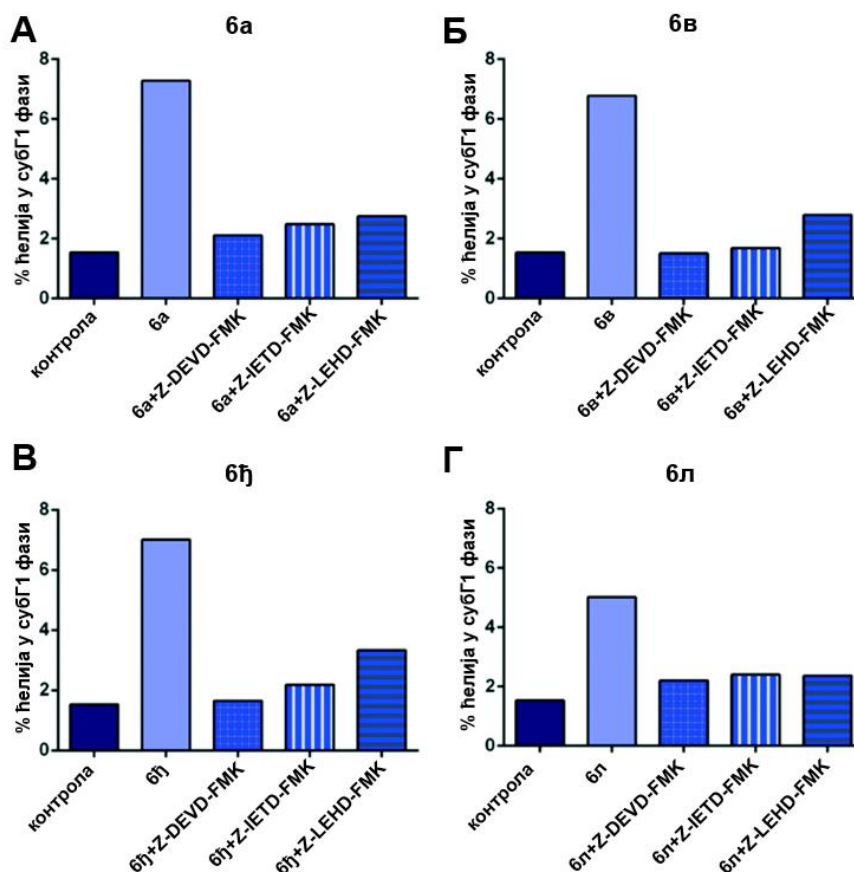
Слика 20. Промене у расподели фаза ћелијског циклуса HeLa ћелија након 24 h третмана (А) IC_{50} и (Б) $2IC_{50}$ концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**. Резултати представљају средњу вредност $\pm$ SD три независна експеримента. Статистички значајне разлике између контролних и третираних ћелија означене су са * ($p < 0,05$).

Инкубација са обе тестиране концентрације једињења изазвала је значајно повећање процента HeLa ћелија у субГ1 фази, у поређењу са нетретираним,

контролним узорцима ћелија (Слика 20). Ови резултати указују на способност испитиваних једињења да изазову ћелијску смрт HeLa ћелија. Осим тога, једињење **бв**, примењено у IC_{50} концентрацији, као и једињење **бл**, примењено у $2IC_{50}$ концентрацији, узроковали су значајно повећање процента ћелија у G2/M фази ћелијског циклуса у односу на овај проценат у контролним ћелијама. Инкубација HeLa ћелија са двоструким IC_{50} концентрацијама једињења **ба**, **бв** и **бђ** такође је довела до акумулације ћелија у G2/M фази, мада те разлике нису биле статистички значајне. Добијени резултати указују да у HeLa ћелијама тестирана једињења изазивају заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази, чиме је спречен улазак ћелије у митозу, што на крају доводи до апоптозе. Двострука IC_{50} концентрација једињења **ба** и **бл**, као и IC_{50} и $2IC_{50}$ концентрације једињења **бв**, изазвале су значајно смањење процента третираних HeLa ћелија у G1 фази ћелијског циклуса у поређењу са процентом истих у контролним узорцима ћелија, што указује на повећану осетљивост ћелија у G1 фази на цитотоксично деловање испитиваних једињења. Ови резултати су у сагласности са литературним подацима, према којима једињења која у својој структури садрже биоактивну халконску структуру изазивају заустављање ћелијског циклуса у G2/M фази и апоптозу у ћелијама канцера.¹⁸⁸

2.3.6. Одређивање механизма ћелијске смрти

У циљу испитивања механизма ћелијске смрти коју тестирана једињења могу изазвати у HeLa ћелијама, оне су 2 h пре додавања једињења третиране специфичним пептидним инхибиторима каспазе 3, каспазе 8 или каспазе 9. Ефекти специфичних инхибитора каспаза на активност третираних једињења одређени су анализом ћелијског циклуса (Слика 21).



Слика 21. Утицај $2IC_{50}$ концентрација испитиваних једињења (А) **6a**, (Б) **6в**, (В) **6ђ** и (Г) **6л** без и у присуству специфичних инхибитора каспазе 3 (Z-DEVD-FMK), каспазе 8 (Z-IETD-FMK) и каспазе 9 (Z-LEHD-FMK) на проценат HeLa ћелија у субГ1 фази ћелијског циклуса.

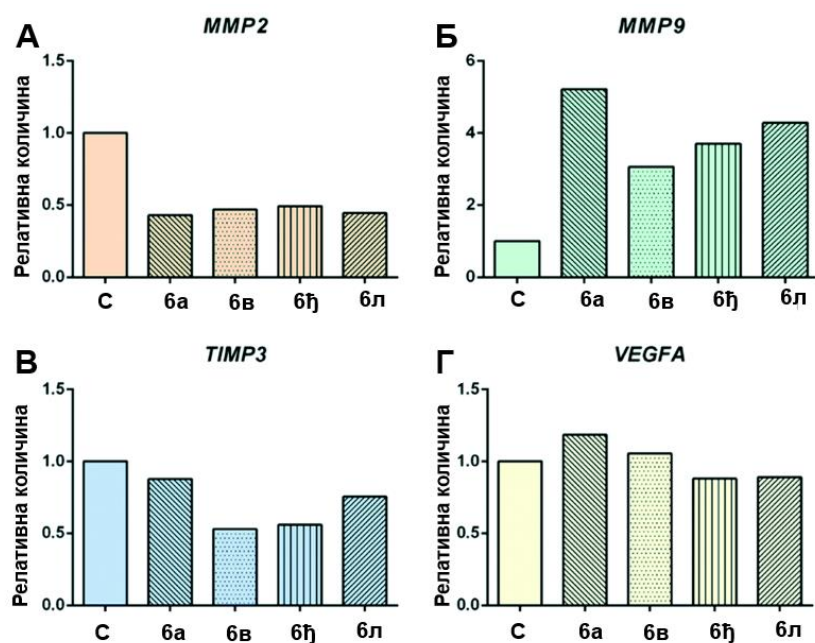
На Слици 21 се може уочити значајан пад процента HeLa ћелија у субГ1 фази ћелијског циклуса у узорцима ћелија које су претходно третиране инхибитором каспазе 3, каспазе 8 или каспазе 9, а затим изложене једињењима **6a**, **6в**, **6ђ** и **6л**, у поређењу са узорцима HeLa ћелија које нису третиране инхибиторима пре додавања једињења. Из добијених резултата се може закључити да испитивани 1,3,4-тиадиазол-халконски хибриди покрећу апоптозу активацијом каспазе 8, која је укључена у спољашњи пут апоптозе и каспазе 9, укључене у унутрашњи пут апоптозе. Сва четири тестирана једињења активирала су каспазу 3, која је главна ефекторска каспаза.

2.3.7. Утицај 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида серије Б на нивое експресије гена и микроРНК у HeLa ћелијама

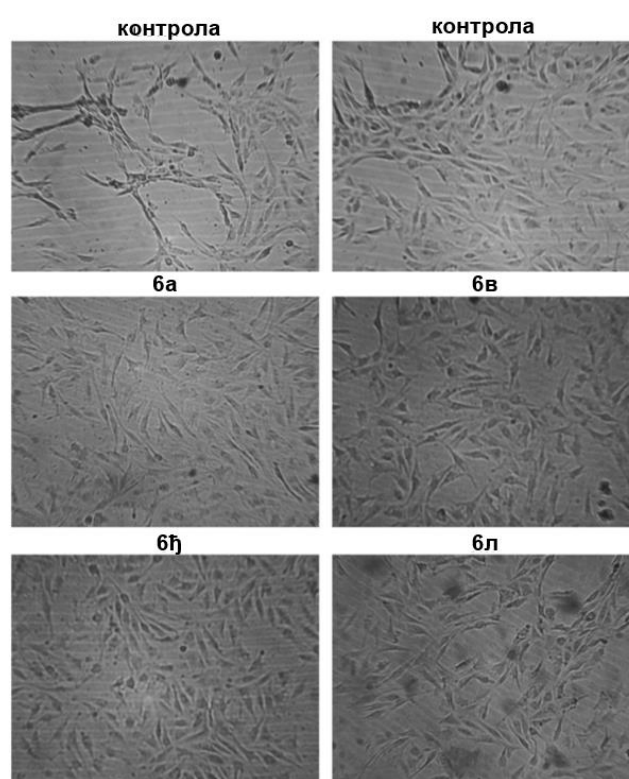
Поред матриксних металопротеиназа *MMP2*, *MMP9* и васкуларног ендотелијалног фактора раста А (*VEGFA*), поменутих у поглављу 2.2.9, повећани нивои типичних онкогених микроРНК (енг. *miRNA*) (*miR-21* и *miR-155*), које су прекомерно експримиране у различитим типовима канцера,¹⁸⁹ као и смањени нивои инхибитора матриксне металопротеиназе 3 (*TIMP3*),¹⁹⁰ повезани су са растом ћелија, миграцијом, епително-мезенхимском транзицијом, инвазијом, метастазирањем и ангиогенезом.¹⁹¹ Познато је да се у случају канцера простате ниво *miR-133b* смањује, док код канцера грлића материце ова микроРНК показује протуморску активност.¹⁹² Такође је познато да је ниво *miR-206* нижи код канцера грлића материце¹⁹³ и да њена прекомерна експресија индукује апоптозу.¹⁹⁴

Ради детаљнијег увида у молекуларне механизме цитотоксичне активности тиадиазолских деривата серије Б, испитане су и промене у нивоима експресије металопротеиназа *MMP2* и *MMP9*, које имају способност деградације екстраћелијског матрикса, *TIMP3* који инхибира матриксну металопротеиназу и регулише протеолизу екстраћелијског матрикса, као и промене у нивоима експресије покретача ангиогенезе *VEGFA* и неколико микроРНК, *miR-21/133b/155/206* у хуманим ћелијама аденокарцинома грлића материце, третираним субтоксичним IC₂₀ концентрацијама испитиваних једињења.

Сва испитивана једињења (**6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**) доводе до смањења нивоа експресије *MMP2* и *TIMP3* гена, али и до повећања нивоа *MMP9* гена у односу на нивое експресије ових гена у нетретираним, контролним HeLa ћелијама. Поред тога, једињење **6а** незнатно повећава ниво експресије *VEGFA*, док једињења **6ђ** и **6л** благо смањују експресију овог гена у HeLa ћелијама (Слика 22). Ниски нивои експресије гена *VEGFA* у HeLa ћелијама и инхибиција формирања тубуларних структура у EA.hy926 ћелијама, као последице деловања једињења **6ђ** и **6л**, указују на умерену антиангиогенетску активност ових једињења (Слика 23).



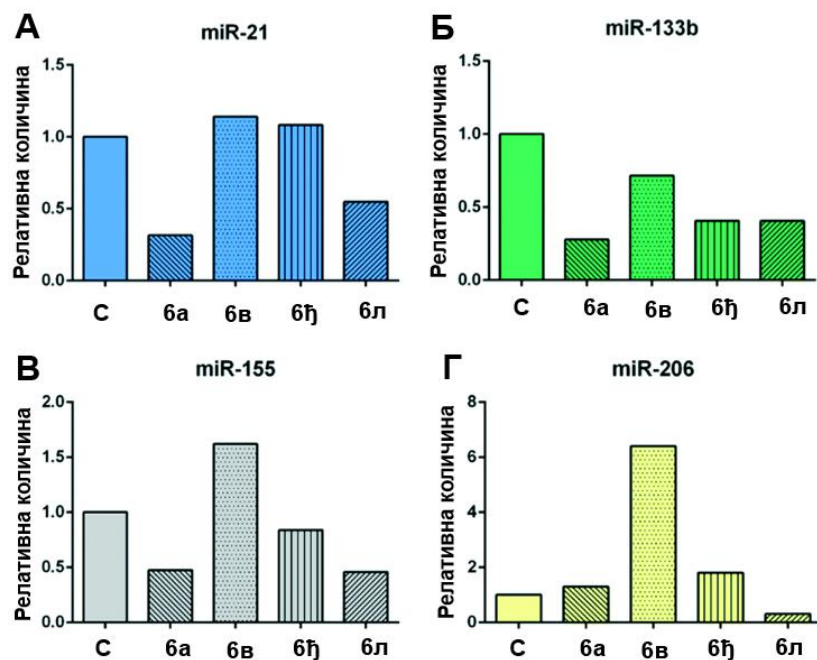
Слика 22. Промене нивоа експресије (А) *MMP2*, (Б) *MMP9*, (В) *TIMP3* и (Г) *VEGFA* гена у *HeLa* ћелијама изложеним IC_{20} концентрацијама једињења **6a**, **6b**, **6c** и **6d** ($10 \mu M$ за свако једињење) током 24 h.



Слика 23. Фотомикрографије контролних *EA.hy926* ћелија и *EA.hy926* ћелија изложених субтоксичним IC_{20} концентрацијама једињења **6a**, **6b**, **6c** ($6,5 \mu M$ за свако једињење) и **6d** ($8 \mu M$) током 20 h.

Способност испитиваних 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида да одржавају низак ниво експресије *MMP2* гена у HeLa ћелијама може указивати на њихово супресивно дејство на инвазивност малигних ћелија и настанак метастаза. Истраживање које су спровели Kato и сарадници сугерише да постоји блиска повезаност између експресије *MMP2* гена и инвазивне способности ћелија рака грлића материце.¹⁹⁵ Приметно је да сва тестирана једињења доводе до значајног повећања нивоа експресије *MMP9* гена у HeLa ћелијама. *MMP9* ген је повезан са повећаном инвазивношћу и метастазирањем, али поред ове протуморске улоге, постоје експериментални докази да *MMP9* може имати, поред антиангиогенетског и заштитно дејство на прогресију канцера и појаву метастаза.^{196,197} Истраживање вишестепене карциногенезе коже, изазване HPV16 онкогеном, на моделу миша, показало је да трансгени мишеви са недостатком гена *MMP9* имају смањену стопу пролиферације кератиноцита и показују мању учесталост развоја инвазивних тумора који имају агресивнији фенотип, док мишеви код којих долази до експресије гена *MMP9* развијају већи број тумора, који имају мање агресиван фенотип.¹⁹⁷ Поред тога, *MMP9* може сузбити даље напредовање малигних тумора стварањем различитих антиангиогенетских пептида, попут ангиостатина и тумстатина.¹⁹⁶ Из свих наведених истраживања може се претпоставити да повећање нивоа експресије *MMP9* гена у туморској строми, које испитивана једињења могу изазвати, може допринети сузбијању раста и прогресије тумора.

На Слици 24 може се видети да једињење **6a** изазива смањење нивоа експресије три кључна онкогена, микроРНК, miR-21/155 и протуморског miR-133b, у ћелијама рака грлића материце, али доводи до благог повећања нивоа експресије тумор-супресивне miR-206 у односу на нивое ове микроРНК у контролним ћелијама. Једињење **6b** значајно је повећало нивое експресије miR-206 и miR-155 у поређењу са контролним HeLa ћелијама и смањило експресију протуморске miR-133b. Третман једињењима **6b** и **6h** довео је до благог повећања експресије miR-21 у HeLa ћелијама. Изложеност једињењу **6h** узроковала је смањење експресије miR-133b и miR-155, уз повећање нивоа експресије miR-206. Једињење **6l** снизило је нивое експресије све четири испитиване микроРНК у односу на контролне ћелије. Наше истраживање показало је да једињења **6a** и **6l** изазивају значајно смањење нивоа експресије онкогене miR-21, што може резултирати смањеном пролиферацијом, миграцијом и инвазијом ћелија карцинома грлића материце.



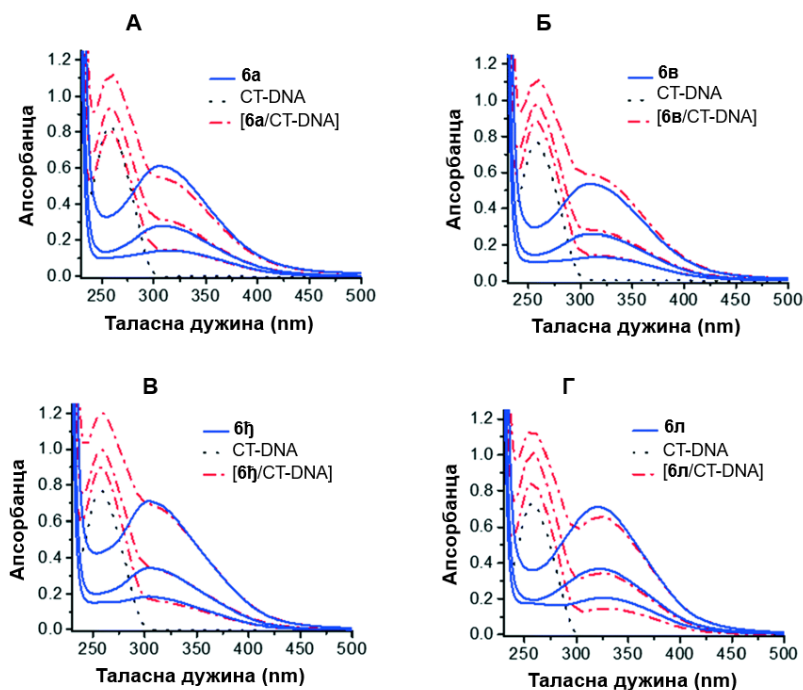
Слика 24. Промене у нивоима експресије (А) miR-21, (Б) miR-133b, (В) miR-155 и (Г) miR-206 у HeLa ћелијама изложеним IC₂₀ концентрацијама једињења **6a**, **6b**, **6c** и **6d** (10 μ M за свако једињење) током 24 h.

Истраживања су показала да су ови тумор-супресорски ефекти регулисани помоћу фосфатаза и тензин хомолога (енг. *Phosphatase and tensin homolog*, PTEN).¹⁹⁸ Антипролиферативни потенцијал испитиваних 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида додатно је потврђен њиховом способношћу да смање ниво онкогене miR-133b, за коју је нађено да је укључена у појачану пролиферацију и формирање колонија ћелија канцера грлића материце, као и у даљој прогресији карцинома грлића материце и настанку метастаза, утичући на AKT1 (енг. *Serine-threonine kinase 1*) и ERK (енг. *Extracellular-signal-Regulated Kinase*) сигналне путеве.¹⁹⁹ Штавише, једињења **6a**, **6c** и **6d** снижавају нивое експресије miR-155, која је у ткиву карцинома цервикса прекомерно изражена, подстиче пролиферацију ћелија и има онкогено дејство, чиме се потврђују њихова тумор-супресорска својства.²⁰⁰ Проапоптотски ефекти једињења **6a**, **6b** и **6c** могу се, бар делимично, приписати повећаној експресији тумор-супресора miR-206 у третираним HeLa ћелијама. За miR-206 је нађено да изазива апоптозу HeLa ћелија, која је повезана са инхибицијом хомолога протеина 3 неуролошког локуса (енг. *Neurogenic locus notch homolog protein 3*, Notch 3).¹⁹⁴

Тестирана једињења и микроРНК променили су нивое експресије испитиваних гена. *TIMP3* је потврђена мета за miR-21, *MMP9* је мета за miR-133b, док је *VEGF* mRNA мета за miR-206, према *TargetScan Human 7.0*.²⁰¹

2.3.8. Интеракције са ДНК

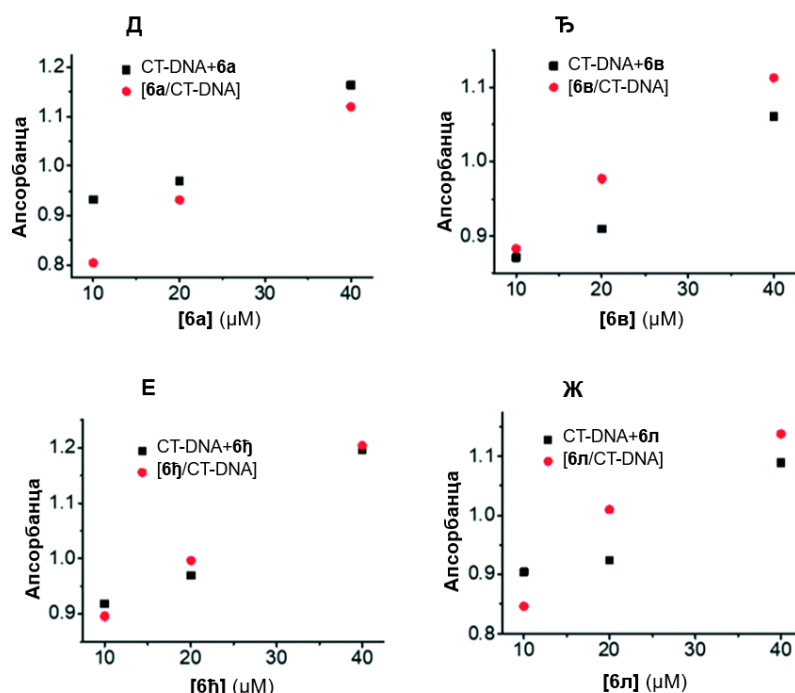
Добро је познато да интеракције ДНК са малим молекулима могу довести до промена у вредности апсорбанци и положају пикова у апсорпционом спектру. Хиперхромизам и хипохромизам сматрају се спектралним доказима структурне промене двоструког хеликса ДНК при интеракцији са другим молекулима. Хиперхромизам настаје услед дестабилизације секундарне структуре двоструког хеликса ДНК,²⁰² док хипохромизам потиче од стабилизације ДНК хеликса, било интеркалацијом или електростатичким ефектима малих молекула.^{203,204} Електронски апсорпциони спектри биолошки најактивнијих 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида снимљени при различитим концентрацијама, са или без константне концентрације ДНК изоловане из говеђег тимуса (енг. *calf thymus DNA*, CT-DNA), приказани су на Слици 25А. UV–Vis спектри свих једињења показали су слична померања апсорпционих трака. Апсорпциони максимуми за једињења **6a**, **6b**, **6j** и **6l** налазе се на 309 nm, 310 nm, 305 nm, односно 323 nm. Формирање система једињење-CT-DNA, услед интеракције тестираног једињења са CT-DNA, одвија се без померања апсорпционог максимума на 259 nm. Детаљне апсорпционе промене индуковане везивањем једињења за CT-DNA израчунате су из експерименталних података (Слика 25Б). Вредност збира апсорбанци на 259 nm слободног једињења и слободне CT-DNA разликује се од вредности апсорбанце за једињење-CT-DNA систем.



Слика 25А. Промене у UV-Vis апсорпционом спектру CT-DNA (95 μM) након интеракције са различитим концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида. Панели А-Г: UV-Vis апсорпциони спектри једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (концентрације 10 μM , 20 μM и 40 μM са свако једињење), респективно, пре и после интеракције са CT-DNA.

Хипохромизам у вредности од око 13% примећен је при нижим концентрацијама једињења **6а** (Слика 25Б, Панел Д), док је пад интензитета апсорпције на 259 nm био мање изражен при вишим концентрацијама. У случају једињења **6в** (Слика 25Б, Панел Ђ), примећена је појава хиперхромизма (-13,7%, -7,36% и -4,9% при концентрацијама од 10 μM , 20 μM и 40 μM , респективно). Хиперхромизам је такође примећен и у случају једињења **6л** (Слика 25Б, Панел Ж), при чему је вероватно израженији при нижим концентрацијама. Најмање промене примећене су при интеракцији ДНК са једињењем **6ђ** (Слика 25Б, Панел Е) (слаби хипохромизам износио је 2,4% при најнижој концентрацији једињења). Претходна истраживања су показала да је значајан хипохромни ефекат праћен црвеним померањем услед везивања лиганда за ДНК, типична карактеристика у случају интеркалације.^{205,206} Хипохромни ефекти у случају једињења **6а** и **6ђ** и хиперхромни ефекти у случају једињења **6в** и **6л**, без црвеног померања, највероватније одражавају промене у конформацији и структури CT-DNA након везивања једињења у малој бразди хеликса, формирањем водоничних

веза између хидроксилних група 1,3,4-тиадиазол-халконског једињења и доступних АТ базних парова.

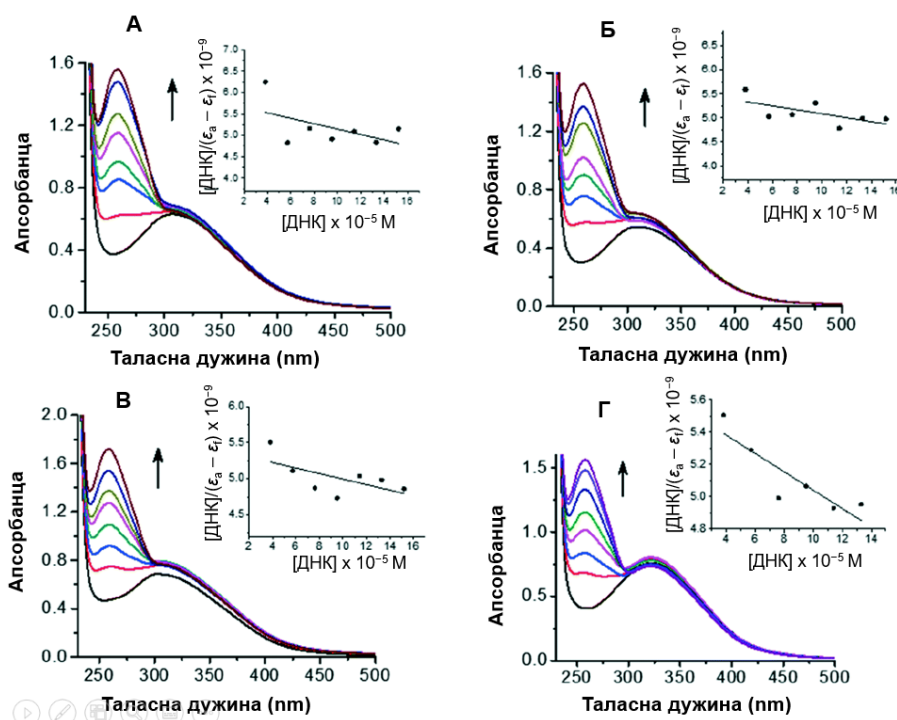


Слика 25Б. Промене у UV-Vis апсорпционом спектру CT-DNA ($95 \mu\text{M}$) након интеракције са различитим концентрацијама 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида.

Панели Д-Ж: поређење апсорпције на 259 nm између

CT-DNA-1,3,4-тиадиазол-халконских једињења и збирних вредности CT-DNA и 1,3,4-тиадиазол-халконских једињења.

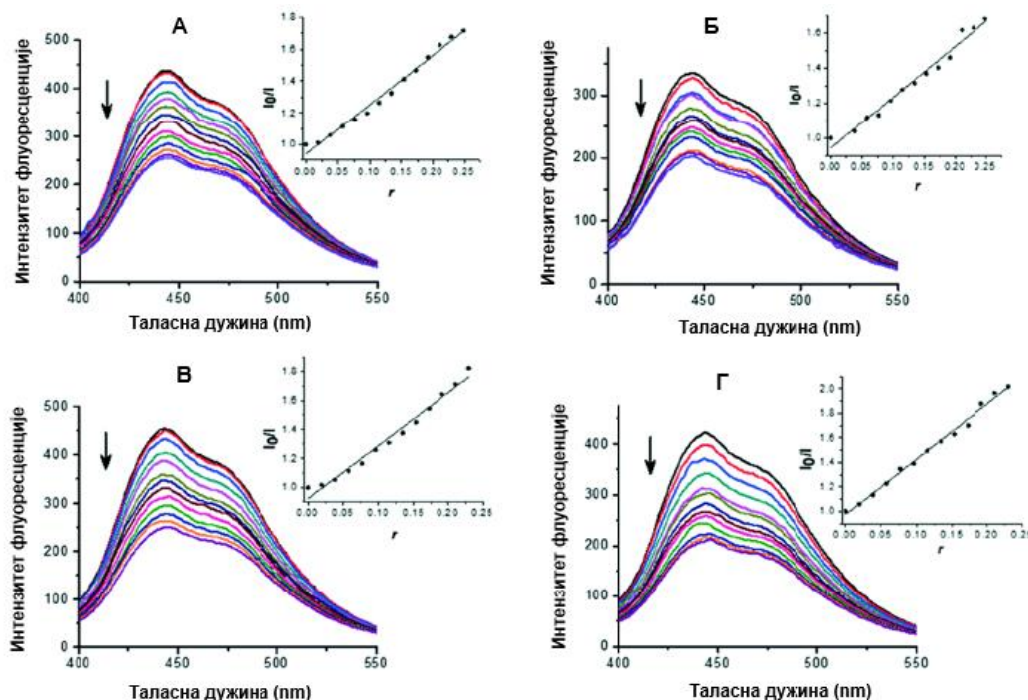
Стабилност система насталог везивањем CT-DNA и 1,3,4-тиадиазол-халконских једињења одређена је спектроскопском титрацијом. Апсорпциони спектри једињења **6a**, **6b**, **6h** и **6l**, без и са CT-DNA, при различитим концентрацијама, приказани су на Слици 26 (Панели А-Г). Апсорбанца на 259 nm праћена је за сваку концентрацију ДНК (додатни графици у оквиру Сlike 26 добијени су након линеаризације). Константе везивања K_b за једињења **6a**, **6b**, **6h** и **6l** израчунате су коришћењем једначине (2) (Експериментални део) при чему су добијене вредности од $1,09 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $0,74 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $0,71 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ и $1,01 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, респективно. Ове вредности за константе везивања су упоредиве са раније објављеним вредностима за антрахинон-халконске хибриде²⁰⁷ и друга структурно различита једињења.^{208,209} Међутим, релативно ниски коефицијенти корелације указују на слабу јачину везивања при интеракцији 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида са хеликсом CT-DNA.



Слика 26. Криве апсорпционе титрације једињења (А) **6а**, (Б) **6в**, (В) **6ђ** и (Г) **6л** константне концентрације ($40 \mu\text{M}$) са растућим концентрацијама *CT-DNA* ($2, 2, 4, 4, 6, 6, 8, 8, 11$ и $13 \times 10^{-5} \text{ M}$); Додатни графици: одређивање константе везивања (K_b) на основу графика зависности $[\text{ДНК}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ од $[\text{ДНК}]$; Стрелица показује промене апсорбанце при повећању количине *CT-DNA*.

Ради добијања бољег увида у интеракције између ДНК и 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида, урађено је испитивање коришћењем Hoechst 33258 боје која се везује у малој бразди дволанчаног хеликса. Hoechst 33258 (H) се везује снажно и селективно са високим афинитетом према *B-DNA* дволанчаној структури и попут других једињења која се везују у малој бразди, препознаје најмање четири пара АТ база. Начин везивања ове боје представља комбинацију грађења водоничне везе, van der Waals-ових интеракција са зидовима мале бразде и електростатичких интеракција између њене катјонске структуре и ДНК.²¹⁰ Ова интеракција праћена је екситацијом на 350 nm, са максимумом флуоресценције на 444 nm. Интензитет флуоресценције Hoechst-*CT-DNA* система на 444 nm се знатно смањује са повећањем концентрације испитиваних једињења (Слика 27), док је интензитет флуоресценције система H-*CT-DNA*-једињење, при максималној примењеној концентрацији једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**, износио 58%, 60%, 55%, односно 51% од интензитета апсорпције H-*CT-DNA* система. Примећено смањење флуоресценције

указује на склоност 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида да се везују у малој бразди ДНК. Додатни графици на Слици 27 представљају графике квенчовања који показују да је квенчовање Hoechst боје везане за CT-DNA тестираним једињењима у сагласности са линеарном Stern-Volmer-овом једначином (3) (Експериментални део) за испитиване опсеге концентрација једињења. Одговарајуће константе квенчовања Н-CT-DNA система за **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** израчунате су линеарном регресијом графика зависности I_0/I од $[једињење]/[CT-DNA]$ и износиле су 3,30, 2,95, 3,95 и 4,66, респективно.



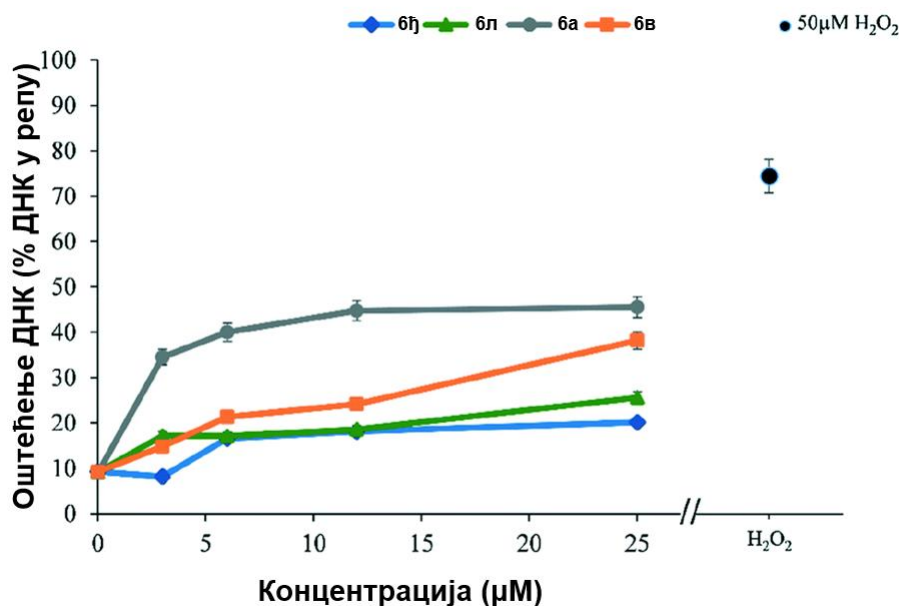
Слика 27. Истискивање Hoechst 33258 везане за ДНК једињењима (А) **6а**, (Б) **6в**, (В) **6ђ** и (Г) **6л**. Емисиони спектри ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$) Hoechst 33258 боје ($2,8 \times 10^{-5} \text{ M}$) везане за CT-DNA ($1 \times 10^{-4} \text{ M}$, горња линија) и квенчовање Н-CT-DNA система једињењима растућих концентрација ($0 - 2,2 \times 10^{-5} \text{ M}$, криве од врха ка наниже). Додатни графици: Криве зависности флуоресценције од степена квенчовања Hoechst 33258 везане за CT-DNA на $\lambda_{max} = 444 \text{ nm}$ 1,3,4-тиадиазол-халконским једињењима; $r = [једињење]/[CT-DNA]$. Стрелица показује да се интензитет флуоресценције смањује са повећањем концентрације комплекса.

Упоређивањем вредности константи квенчовања (K) добијених експериментима истискивања, може се закључити да се једињење **6л**, са тиофенским прстеном у својој структури, ефикасније везује у малој бразди од осталих испитиваних 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида, који у својој структури садрже бензенове

прстенове. Међутим, узимајући у обзир степен интеракције једињења са *CT-DNA*, може се закључити да се испитивана једињења везују за ДНК преко мале бразде са слабом јачином везивања. Такође, резултати сугеришу да разлике у супституисаној фенил групи утичу на везивање, као и да се везивање у малој бразди највероватније одиграва формирањем водоничних веза између хидроксилних група 1,3,4-тиадиазол-халконских једињења и доступних АТ парова база.

2.3.9. Комет тест

Комет тест (гел електрофореза појединачних ћелија)²¹¹ је погодна и осетљива метода за детекцију и мерење степена оштећења ДНК у смислу једноланчаних и дволанчаних прекида низова плазмида у молекулу ДНК. У циљу процене степена оштећења ДНК које је изазвано одабраним једињењима, комет тестом су анализирани MRC-5 ћелије које су биле третиране различитим концентрацијама једињења **6a**, **6b**, **6j** и **6l**, током 24 h. Из резултата приказаних на Слици 28 може се видети да су једињења изазвала оштећења ДНК, о чему сведочи пораст процента ДНК у „репу“ комете. Испитивања су показала да свако од тестираних једињења у MRC-5 ћелијама изазива оштећење ДНК које зависи од примењене концентрације. При највишој тестираној концентрацији једињења **6a** (25 μ M) детектовано је оштећење ДНК од 45%, док је у случају једињења **6b** оштећење ДНК износило 38%. Нижи степен оштећења ДНК примећен је у случају једињења **6l** и **6j** и износио је 25%, односно 20%.

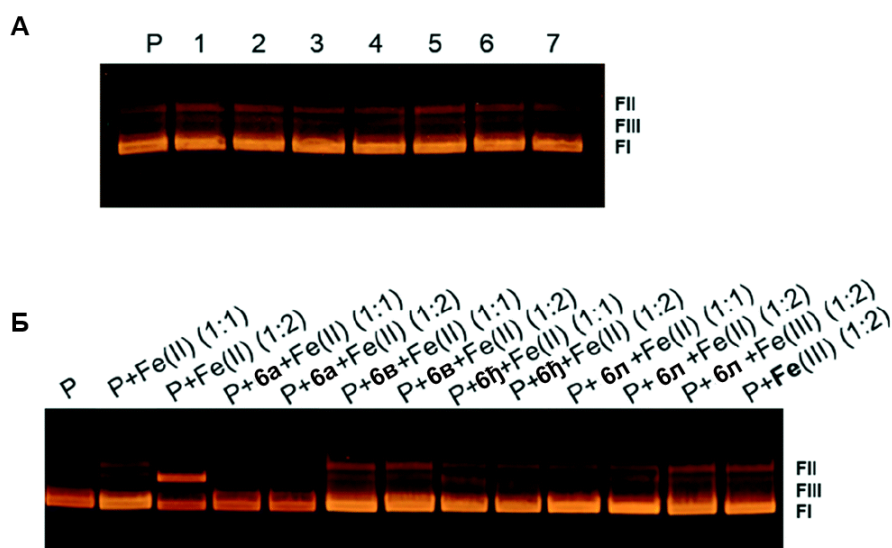


Слика 28. Процена оштећења ДНК (% ДНК у репу) применом Комет теста на MRC-5 ћелијама третираним једињењима **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** током 24 h (3,125 – 25 µM). Као негативна контрола коришћен је фосфатни пуфер, док је H₂O₂ (50 µM, излагање током 5 минута) коришћен као позитивна контрола. На у-оси налазе се средње вредности ± SD оштећења ДНК добијене на основу интензитета „репа“ комете.

2.3.10. Интеракције са плазмидом pUC19

Пошто је у ћелијској култури детектовано слабо оштећење ДНК, у даљем току истраживања извршено је испитивање способности најактивнијих 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида да изазивају прекиде низова нуклеинске киселине. Интеракције су праћене електрофорезом на агарозном гелу и коришћењем DMSO-а као растварача за једињења у примењеном опсегу концентрација (од 0,5-20%), што није утицало на конформацију ДНК (резултати нису приказани). Контролни плазмид pUC19 (Слика 29А, трака 1) састоји се од суперувирене форме FI и отворене циркуларне форме FII, са малим уделом линеарног облика FIII. Сва једињења су тестирана и резултати су показали да нема значајних трансформација на плазмиду pUC19, у примењеном распону концентрација. На Слици 29А приказани су резултати добијени испитивањем једињења **6а**. Веома слични резултати добијени су и испитивањем једињења **6в**, **6ђ** и **6л**. Следећи корак је представљао испитивање цепања ланаца у редукујућим условима, односно у присуству гвожђа(II). Гвожђе(II) је само по себи

укључено у оштећење ДНК,²¹² а резултати оштећења *pUC19* његовим деловањем приказани су на Слици 29Б, као траке $P+Fe(II)$ (1:1) и $P+Fe(II)$ (1:2). Када су једињење и гвожђе примењени у молском односу 1:1 (Слика 29Б, траке $P+6a+Fe(II)$ (1:1), $P+6b+Fe(II)$ (1:1), $P+6h+Fe(II)$ (1:1) и $P+6l+Fe(II)$ (1:1)) и у молском односу 1:2 (Слика 29Б, траке $P+6a+Fe(II)$ (1:2), $P+6b+Fe(II)$ (1:2), $P+6h+Fe(II)$ (1:2) и $P+6l+Fe(II)$ (1:2)), 1,3,4-тиадиазол-халконски хибриди анулирали су ефекте гвожђа, највероватније формирањем комплекса и/или антиоксидативним деловањем катехолне групе. Гвожђе(III) није имало никакав утицај ни под којим условима, што се може видети на Слици 29Б, траке $P+6l+Fe(III)$ (1:2) и $P+Fe(III)$ (1:2). Приказани резултати показују да цепање ДНК не може бити узрок цитотоксичности испитиваних једињења. Добијени резултати који указују да 1,3,4-тиадиазол-халконски хибриди имају протективну активност, могу се упоредити са раније објављеним резултатима добијеним за антрахинон-халконске хибриде.²⁰⁷



Слика 29. Електрофоретски приказ плаزمида *pUC19* третираног 1,3,4-тиадиазол-халконским хибридама: (А) плазмид *pUC19* (12 nM) без (трака P) и са једињењем **6a** концентрација 0,05 mM, 0,1 mM, 0,15 mM, 0,2 mM, 0,25 mM, 0,3 mM и 0,4 mM (траке 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7, респективно); (Б) ефекти једињења **6a**, **6b**, **6h** и **6l** на оштећење плазмида *pUC19* изазвано гвожђем (II), при молским односима испитиваних једињења и гвожђа 1:1 и 1:2.

2.4. Серија В

Амидни деривати 1,3,4-тиадиазола обе претходно приказане серије (Серија А и Серија Б) добијени су у реакцији амино групе хетероцикла и различитих киселинских хлорида, који у случају серије Б садрже халконску јединицу. Као што се може видети на Слици 12, сви деривати серија А и Б у аминском делу молекула садрже хидроксилне групе које потичу из фенолних киселина. Може се рећи да су у оба случаја 1,3,4-тиадиазолски амини изведени из фенолних киселина, а затим дериватизовани реакцијом на амино групи. Обзиром да су добијени 1,3,4-тиадиазолски деривати показали снажан антиоксидативни потенцијал, извршили смо синтезу нове серије амидних 1,3,4-тиадиазолских деривата и испитали њихову антиоксидативну активност коришћењем DPPH методе, као и код претходних серија, али такође и ABTS методе. За разлику од претходно поменутих серија, деривати серије В добијени су реакцијом различитих 5-супституисаних 2-амино-1,3,4-тиадиазола и хлорида 3,4-дихидроксибензојеве киселине, због чега финални амиди садрже фенолне хидроксилне групе у киселинском делу молекула.

2.4.1. Синтеза амидних деривата 1,3,4-тиадиазола серије В

Петнаест нових 1,3,4-тиадиазолских амида серије В (**9a-m**) добијено је у два корака, као што је приказано у Схеми 56. Најпре су, методом која је коришћена и при добијању претходне две серије деривата, синтетизовани 1,3,4-тиадиазолски прекурсори (**8a-m**), у реакцији одговарајуће карбоксилне киселине (**7a-m**) са тиосемикарбазидом уз употребу фосфорил хлорида као реагенса и растварача. У следећем кораку, добијени 5-супституисани-1,3,4-тиадиазол-2-амини (**8a-m**) ступили су у реакцију са 3,4-дихидроксибензоил хлоридима (хлоридима протокатехуинске киселине) у анхидрованом диоксану као растварачу, дајући при томе крајње амидне деривате **9a-m** у умереним до добрим приносима (51-75%). Реакција купловања изведена је у присуству NaHCO_3 , ради неутрализације хлороводоника који се том приликом ослобађа. Као и код претходно описаних синтеза деривата 1,3,4-тиадиазола, за добијање амида било је потребно дуго реакционо време и висока температура, услед слабе нуклеофилности амино групе 1,3,4-тиадиазола. Поред тога, био је потребан и

вишак хлорида протокаатеуинске киселине како би се реакција комплетираола. Финална једињења добијена су са задовољавајућом чистоћом, али ради добијања једињења високе чистоће, извршено је њихово пречишћавање рекристализацијом из врућег воденог раствора ЕтОН. Сва једињења серије В синтетизована су по први пут и њихове структуре потврђене су помоћу IR, ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије, као и елементарном анализом. Спектрални подаци добијени из ^1H NMR спектра показали су да се ароматични протони који одговарају фенолној групи појављују у очекиваном опсегу ppm скале (6,82-7,97 ppm), дајући за већину једињења синглет за Н-2 и два дублета која одговарају Н-5 и Н-6 протонима. Протон који припада амидној функционалној групи се очекивано појавио као синглет на највишим δ -вредностима (12,12-12,88 ppm) за сва једињења, осим за дериват **9д**, где је дошло до формирања широког, развученог синглета услед комбиновања сигнала који потичу од протона две ОН и једне NH групе.

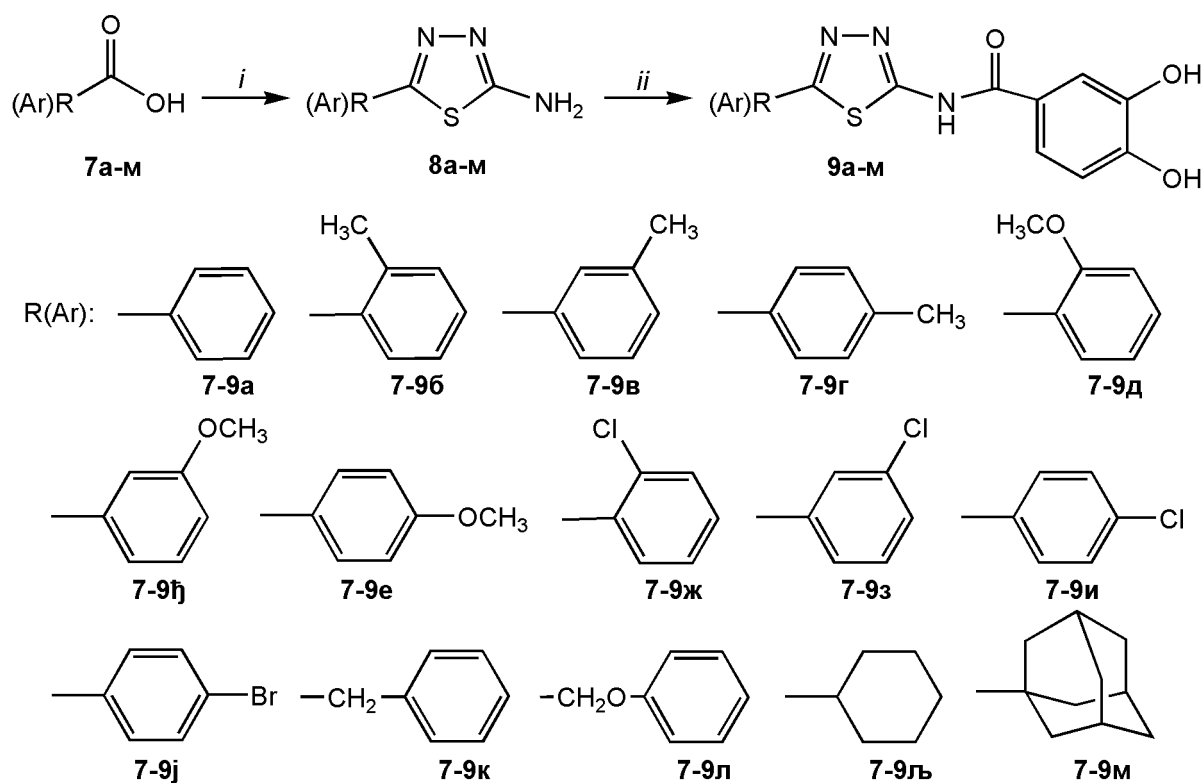


Схема 56. Реагенси и услови: i) POCl_3 , *с.т.*, тиосемикарбазид, 1 h, рефлукс; ii) 3,4-дихидроксibenзоил хлорид, диоксан, 24 h, рефлукс.

Имајући за циљ одређивање доприноса амидне функционалне групе антиоксидативној активности синтетизованих деривата, извршили смо синтезу одговарајућег имино (**10**) и амина (**11**) аналога 1,3,4-тиадиазолског амида **9а** (Схема 57). У првом кораку је жељени дериват 1,3,4-тиадиазола који садржи имински

фрагмент **(10)** добијен кондензацијом 3,4-дихидроксibenзалдехида (протокатехуалдехид) и 5-фенил-1,3,4-тиадиазол-2-амина **8a**, у присуству каталитичке количине глацијалне сирћетне киселине. Због смањене реактивности амино групе 1,3,4-тиадиазолског деривата, за комплетирање реакције били су неопходни вишак алдехида и продужено реакционо време. Амински аналог **11** добијен је једноставном редукцијом иминског деривата 1,3,4-тиадиазола **10**, коришћењем NaBH_4 као редукционог средства, у метанолу на собној температури. Финални производи, **10** и **11**, такође су синтетизовани по први пут и њихове структуре потврђене су коришћењем претходно поменутих метода (IR, ^1H и ^{13}C NMR и елементарна анализа). Присуство синглета на 8,79 ppm-а, који одговара протону из $\text{CH}=\text{N}$ групе, у ^1H NMR спектру деривата **10**, потврдило је предложену структуру иминског деривата. Са друге стране, ^1H NMR спектар једињења **11** показао је дублет на 4,35 ppm-а, што одговара протонима метиленске групе, који се куплују са суседним NH протоном, присутним у облику триплета на 8,34 ppm-а.

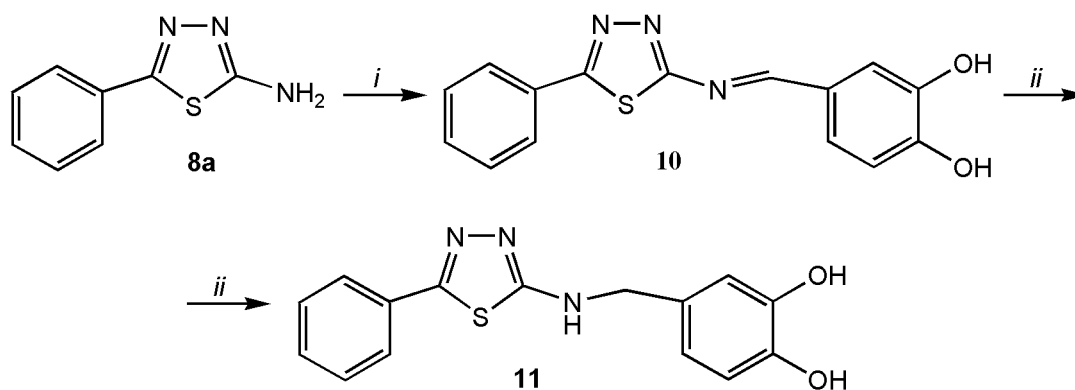


Схема 57. Реагенси и услови: i) 3,4-дихидроксibenзалдехид, AcOH , EtOH , 18 h, рефлукс; ii) NaBH_4 , MeOH , 1 h, c.t.

2.4.2. Антиоксидативна активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије В

Одређивање антиоксидативног потенцијала синтетизованих једињења серије В, извршено је помоћу две најчешће примењиване методе – DPPH и ABTS. Резултати способности неутрализације DPPH радикала и ABTS радикал катјона, изражени у концентрацији тестираног једињења која смањује 50% (IC_{50}) DPPH и ABTS врста, приказани су у Табели 5. Као што се може закључити из добијених резултата, сви испитивани деривати показали су висок потенцијал за неутралисање DPPH радикала и

ABTS радикал катјона, у поређењу са познатим антиоксидантима, аскорбинском и нордихидрогвајаретинском киселином (NDGA). Због веома слабе растворљивости већине деривата у метанолу, одређивање антиоксидативне активности амида вршено је у разблаженом DMSO-у. Међутим, растворљивост једињења **9а**, **10** и **11** била је довољна да омогући извођење DPPH теста и у метанолу. Пошто су ова три једињења одабрана за испитивање и поређење утицаја амидо, имино и аминоксидне фрагмената молекула на антиоксидативну активност, на овај начин смо желели да избегнемо могуће ефекте растварања на брзину апстраховања Н атома из фенолних једињења.¹⁸⁵

DPPH тест је показао да сва испитивана једињења поседују значајно бољу антиоксидативну активност од референтне аскорбинске киселине и полазне 3,4-дихидроксибензојеве киселине, док је NDGA показала већи или приближно једнак потенцијал за неутрализацију DPPH радикала у односу на синтетизована једињења. Р супституенти у амидној серији изабрани су тако да поседују различите електрон-донорске, електрон-привлачне и стерне особине. Нађено је да електрон-донорске групе повећавају електронску густину на радикалском центру формираном након апстракције водониковог атома са атома кисеоника или азота, услед чега долази до стабилизације слободно-радикалских интермедијера. У Табели 5 се може видети да, у складу са овом чињеницом, највећи потенцијал за неутрализацију DPPH радикала показују деривати који у својој структури садрже електрон-донорске алкил групе везане за фенилни прстен (**9в**, **9г**, **9к** и **9љ**). Међу њима, једињење **9в**, са IC₅₀ вредношћу од 3,53 μ M, показало је нешто бољу антиоксидативну активност у односу на стандардни антиоксидант NDGA (IC₅₀ = 3,57 μ M). Деривати који садрже електрон-привлачне хлоро-супституенте (**9ж-и**) показали су слабију антиоксидативну активност од референтног стандарда NDGA. Једињења **9д-е** са метокси групом у структури, која се у *orto*- и *para*- положају понаша као електрон-донор, док у *meta* положају изражава електрон-привлачни ефекат, такође показују нижу активност услед негативног индуктивног ефекта кисеоника. На основу резултата приказаних у Табели 5 може се закључити да је и положај супституената на фенилном прстену такође утицао на измерену активност молекула, при чему *meta*-супституисани деривати поседују највећи потенцијал неутралисања DPPH радикала. Као што је речено изнад, једињења **10** и **11** синтетизована су ради испитивања утицаја амидо групе на антиоксидативну активност тестиране серије. Оба једињења поседују нижу активност наутрализације DPPH радикала у односу на амидни аналог, али ипак већу у односу на полазну 3,4-дихидроксибензојеву и референтну аскорбинску киселину.

Табела 5. Резултати DPPH и ABTS тестова за одређивање антиоксидативне активности 1,3,4-тиадиазола **9а-м**, **10** и **11**.^а

Једињење	IC ₅₀ ±SD (μM)	
	DPPH [*]	ABTS ⁺⁺
9а	4,34 ± 0,33 4,48 ± 0,06 ^б	31,22 ± 0,72
9б	4,31 ± 0,24	27,67 ± 0,05
9в	3,53 ± 0,25	30,31 ± 0,27
9г	3,82 ± 0,11	27,21 ± 2,08
9д	5,44 ± 0,22	-
9ђ	4,93 ± 0,01	-
9е	5,08 ± 0,35	-
9ж	4,57 ± 0,21	27,73 ± 0,03
9з	3,97 ± 0,13	27,13 ± 0,46
9и	4,54 ± 0,16	33,00 ± 0,56
9ј	4,50 ± 0,47	-
9к	3,73 ± 0,04	27,86 ± 0,02
9л	4,05 ± 0,03	-
9љ	3,85 ± 0,04	-
9м	4,15 ± 0,08	-
10	5,20 ± 0,17 ^б	25,90 ± 0,11
11	6,08 ± 0,07 ^б	21,69 ± 0,20
РСА^в	7,81 ± 0,29	99,72 ± 0,88
Аскорбинска киселина	14,26 ± 0,36	125,44 ± 1,86
NDGA	3,57 ± 0,04	45,78 ± 0,11

^а Резултати представљају средњу вредност ± SD за три мерења.

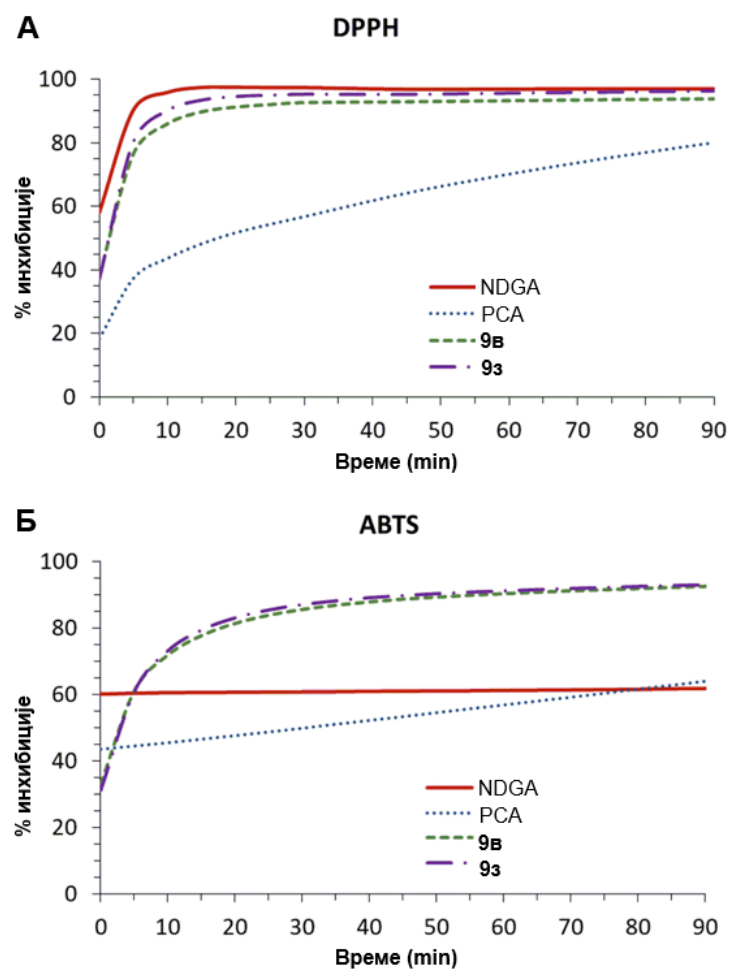
^б Тестирана једињења растворена у метанолу

^в РСА – протокатехуинска киселина (3,4-дихидроксибензојева киселина)

За даље испитивање антиоксидативног потенцијала изабрано је десет једињења (**9а-г**, **9ж-и**, **9к**, **10** и **11**) на основу резултата антиоксидативне активности добијених помоћу DPPH теста. ABTS тест је показао да сва испитивана једињења имају бољу способност неутралисања ABTS радикал-катјона у односу на аскорбинску киселину, NDGA и 3,4-дихидроксибензојеву киселину. Применом ове методе, супротно резултатима добијеним у DPPH тесту, највећа активност примећена је за једињења **10** и **11**, са IC₅₀ вредностима од 25,90 и 21,69 μM, респективно. Ово је приближно 2 до 5 пута снажнија активност у односу на активности референтних антиоксидативних једињења. Упоредивањем резултата може се закључити да су једињења амидне серије мање ефикасна приликом неутрализације ABTS-а, са IC₅₀ вредностима између 27 и 33 μM, али ипак активнија од најснажнијег испитиваног референтног антиоксиданта NDGA (IC₅₀ = 45,78 μM). Добијене IC₅₀ вредности показују да једињења **10** и **11**, са најбољим

потенцијалом за уклањање ABTS-а, поседују најслабију способност неутралисања DPPH радикала међу синтетизованим једињењима серије В. Ове разлике се могу приписати различитим могућностима стерног приступа антиоксиданата радикалском центру молекула DPPH и ABTS-а.²¹³

Антиоксидативна активност једињења **9в** и **9з**, која су показала висок антиоксидативни потенцијал у обе примењене методе, праћена је током 90 min и резултати су упоређени са активностима 3,4-дихидроксибензојеве киселине и NDGA. Промене у проценту инхибиције DPPH и ABTS врста при концентрацији испитиваних једињења од 100 μ M приказане су на Слици 30. У обе примењене методе, референтни антиоксидант NDGA показао је највећи проценат инхибиције (око 60%) на почетку реакције. Проценат инхибиције ABTS-а за једињења **9в** и **9з** био је приближно 60% након 5 min инкубације, док су у DPPH методи проценти инхибиције за ова једињења након истог времена били 76,45, односно 80,36. NDGA је показала максималну активност у неутрализацији DPPH радикала после 15 min реакције, док су деривати **9в** и **9з** своју максималну активност показали 25 min након почетка реакције. Што се тиче активности неутралисања ABTS радикал-катојна, проценат инхибиције за **9в** и **9з** је нагло растао до 20 min, уз благи пораст инхибиције до краја инкубације. Проценат инхибиције који показује NDGA у ABTS методи био је готово исти од 0 до 90 min. 3,4-Дихидроксибензојева киселина показала је различито понашање у инхибицији DPPH и ABTS-а у поређењу са једињењима **9в**, **9з** и NDGA. У реакцијама са DPPH и ABTS-ом, 3,4-дихидроксибензојева киселина је показала скоро линеарно повећање процента инхибиције ових радикала од 0 до 90 min реакције. Ово сугерише да 3,4-дихидроксибензојева киселина реагује много спорије са испитиваним радикалима него референтни антиоксидант NDGA и једињења **9в** и **9з**, што указује на знатно боља антиоксидативна својства новосинтетизованих амидних деривата у односу на полазну 3,4-дихидроксибензојеву киселину.



Слика 30. Проценат инхибиције (А) DPPH и (Б) ABTS-а праћен током 90 минута реакције за једињења 9B и 9Z, протокатехуинску киселину (PCA) и NDGA.

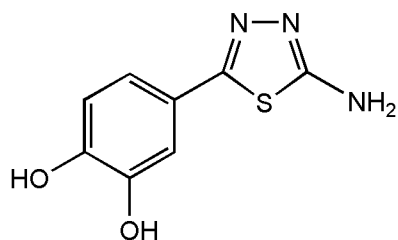
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

3.1. Физичка мерења

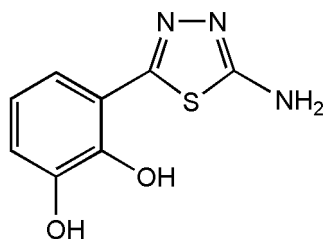
Тачке топљења свих синтетизованих деривата 1,3,4-тиадиазола одређене су на Mel-Temp апарату, модел 1001 и нису кориговане. Елементарна анализа (C, H, N, S) једињења урађена је на инструменту Vario EL III (CHNS-O; Elementar Analysensysteme GmbH). Ултраљубичасти спектри снимљени су коришћењем Agilent Technologies UV-Vis спектрофотометра серије Cary 300. Инфрацрвени спектри снимљени су на Perkin Elmer Spectrum One FT-IR спектрофотометру са KBr диском. Сви ^1H спектри нуклеарне магнетне резонанце снимани су на инструменту Varian Gemini на 200 MHz, док су ^{13}C NMR спектри снимљени на истом апарату на 50 MHz у деутерисаном диметил сулфоксиду уз тетраметил силан као интерни стандард.

3.2. Поступак за синтезу једињења 2 и 2'

Смеса 3,4-дихидроксибензојеве киселине **1**, или 2,3-дихидроксибензојеве киселине **1'**, (0,308 g, 2,00 mmol) и POCl_3 (0,8 mL, 8,56 mmol) мешана је на собној температури током 20 минута. Затим је додат тиосемикарбазид (0,228 g, 2,50 mmol) и добијена суспензија је рефлугована 1 сат. Након тога што је балон охлађен у леденом купатилу, додато је 3,0 mL дејонизоване воде и рефлуковање је настављено још 1 сат. Охлађеној смеси је затим додаван засићен водени раствор NaOH док није постигнута рН вредност од 8,5, након чега је суспензија мешана током 1 сата на собној температури. Формирани талог одговарајућег 1,3,4-тиадиазолског деривата (**2** и **2'**) је процеђен и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 . Производи високе чистоће добијени су рекристализацијом из 50%-ног воденог раствора EtOH.

3.2.1. 4-(5-Амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол × H₂O (2):

Беж прашкаста супстанца; принос: 0,31 g (68%); Т.Т. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,77 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H); 6,98 (dd, 1H, *J* = 8,2 и 2,0 Hz, Ar-H); 7,18 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H); 7,20 (s, 2H, NH₂); 9,30 (s, 1H, OH); 9,38 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 113,36, 116,03, 118,47, 122,56, 145,69, 147,25, 157,04, 167,49; IR (KBr, cm⁻¹): 3430, 3318, 2926, 1625, 1605, 1509, 1444, 1297, 1260, 764; Израчунато за C₈H₇N₃O₂S×H₂O (227,24 g/mol): C, 42,28; H, 3,99; N, 18,49; S, 14,11; Нађено: C, 42,35; H, 3,98; N, 18,55; S, 14,06.

3.2.2. 3-(5-Амино-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензен-1,2-диол × H₂O (2'):

Светлобраон прашкаста супстанца; принос: 0,29 g (64%); Т.Т. 228-229 °C (разлагање); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,72 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ar-H); 6,83 (dd, 1H, *J* = 7,8 и 1,4 Hz, Ar-H); 7,20 (dd, 1H, *J* = 7,8 и 1,4 Hz, Ar-H); 7,33 (s, 2H, NH₂); 9,52 (s, 1H, OH); 10,37 (s, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 116,32, 117,08, 117,87, 119,63, 143,57, 146,02, 155,78, 168,55; IR (KBr, cm⁻¹): 3392, 3330, 3222, 3075, 1642, 1538, 1501, 1274, 1260, 774; Израчунато за C₈H₇N₃O₂S×H₂O (227,24 g/mol): C, 42,28; H, 3,99; N, 18,49; S, 14,11; Нађено: C, 42,25; H, 4,00; N, 18,47; S, 14,13.

3.3. Поступак за синтезу једињења 3а-ж и 3'а-ж

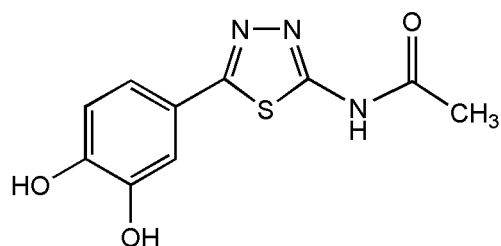
Хлориди киселина потребни за реакцију добијени су *in situ*, према литературној процедури.¹⁷² Раствору одговарајуће киселине (1,00 mmol) у анхидрованом дихлорметану (4,0 mL) полако је додаван SOCl₂ (0,3 mL, 4,00 mmol), а затим и две капи *N,N*-диметилформаида и добијена смеша мешана је на собној температури током 2 сата. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, а вишак SOCl₂ је уклоњен азеотропном дестилацијом са толуеном. Формирани киселински хлориди коришћени су даље у реакцији без претходног изоловања.

Метода А. Поступак за синтезу 3а-в, 3д, 3ђ, 3ж, 3'а, 3'в, 3'д, 3'ђ и 3'ж. Раствору одговарајућег киселинског хлорида (1,00 mmol) у анхидрованом тетраhydroфурану (10,0 mL) додати су 1,3,4-тиадиазол 2 или 2' (0,209 g, 1,00 mmol) и

NaHCO_3 (0,336 g, 4,00 mmol) и добијена смеша је мешана на собној температури током 24 сата. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, а остатку је додато 15,0 mL воде. Формирана суспензија мешана је 1 сат на собној температури, након чега је талог процеђен и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 . Финални производи добијени су са задовољавајућом чистоћом, али да би се добила једињења високе чистоће, подвргнути су даљем пречишћавању рекристализацијом из 50%-ног воденог раствора EtOH, за једињења **3а**, **3б**, **3в** и **3ђ**, 70%-ног EtOH, за **3д**, **3ж**, **3'д**, **3'ђ** и **3'ж** и 96%-ног EtOH, за **3'а** и **3'в**.

Метода Б. Поступак за синтезу 3г, 3е, 3'б, 3'г и 3'е. Раствору одговарајућег киселинског хлорида (2,00 mmol) у анхидрованом диоксану (10,0 mL), додати су 1,3,4-тиадиазол **2** или **2'** (0,209 g, 1,00 mmol) и NaHCO_3 (0,336 g, 4,00 mmol) и добијена смеша је рефлугована током 12 сати. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, а остатку је додато 15,0 mL воде, као и чврсти Na_2CO_3 до постизања рН од 9,5. Формирана суспензија је затим мешана на собној температури током 30 минута, након чега је талог процеђен и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 . Одговарајућа карбоксилна киселина, која је коришћена у вишку, може се добити из филтрата за кисељавањем помоћу хлороводоничне киселине. Као и у *Методи А*, финални производи су добијени са задовољавајућом чистоћом, а једињења високе чистоће могу се добити рекристализацијом из 50%-ног воденог раствора EtOH, за **3г**, 70%-ног EtOH, за **3е**, **3'б** и **3'г** и 96%-ног EtOH, за **3'е**.

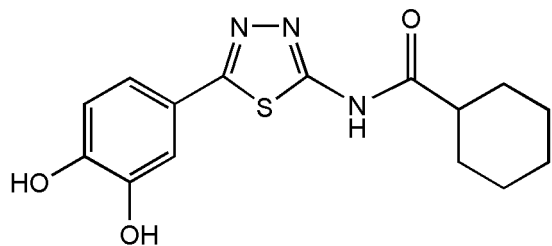
3.3.1. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)ацетамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (**3а**):



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,15 g (56%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 2,19 (s, 3H, CH_3); 6,83 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H); 7,18 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H); 7,33 (s, 1H, Ar-H); 9,49 (s, 2H, OH); 12,49 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 22,56, 113,82, 116,33, 119,18, 121,68, 145,97, 148,22, 157,43, 162,22, 168,62;

IR (KBr, cm^{-1}): 3412, 3244, 2921, 2774, 1670, 1571, 1532, 1321, 1290, 779; Израчунато за $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ (269,28 g/mol): C, 44,60; H, 4,12; N, 15,60; S, 11,91; Нађено: C, 44,72; H, 4,11; N, 15,55; S, 11,95.

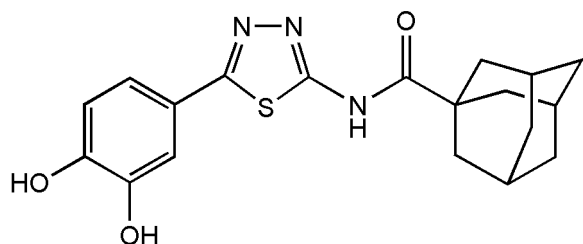
3.3.2. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)циклохексанкарбоксамид × 2H₂O (3б):



Светлосива прашкаста супстанца; принос: 0,17 g (48%); T.T. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 1,19-1,49 (m, 5H, CyHx); 1,66-1,86 (m, 6H, CyHx); 6,84, (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,18 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,32

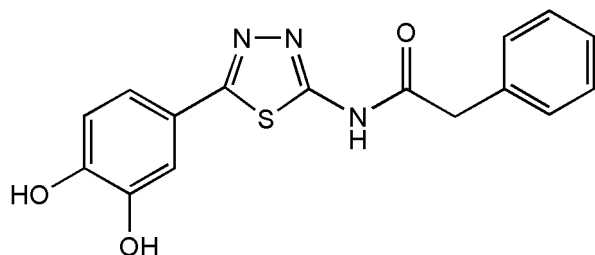
(s, 1H, Ar-H); 9,42 (s, 1H, OH); 9,55 (s, 1H, OH); 12,42 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 25,10 (2C), 25,35, 28,84 (2C), 43,48, 113,78, 116,26, 119,06, 121,67, 145,92, 148,14, 157,44, 162,14, 174,29; IR (KBr, cm⁻¹): 3258, 3157, 2924, 2853, 1702, 1556, 1529, 1447, 1291, 992, 776; Израчунато за C₁₅H₁₇N₃O₃S×2H₂O (355,41 g/mol): C, 50,69; H, 5,96; N, 11,82; S, 9,02; Нађено: C, 50,72; H, 5,95; N, 11,85; S, 9,04.

3.3.3. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)адамантан-1-карбоксамид (3в):



Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,20 g (54%); T.T. 242-243 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 1,69 (s, 6H, Ad); 1,95 (s, 6H, Ad); 2,01 (s, 3H, Ad); 6,84 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H); 7,18 (dd, 1H, *J* = 8,2 и 2,0 Hz, Ar-H); 7,32 (d, 1H, *J* = 2,0 Hz, Ar-H); 9,41 (s, 1H, OH); 9,55 (s, 1H, OH); 12,12 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 27,68 (3C), 35,95 (3C), 37,74 (3C), 40,89, 113,90, 116,33, 119,10, 121,84, 145,98, 148,18, 158,20, 162,28, 176,07; IR (KBr, cm⁻¹): 3430, 3242, 2909, 2852, 1660, 1641, 1526, 1456, 1294, 816; Израчунато за C₁₉H₂₁N₃O₃S (371,46 g/mol): C, 61,44; H, 5,70; N, 11,31; S, 8,63; Нађено: C, 61,37; H, 5,71; N, 11,29; S, 8,66.

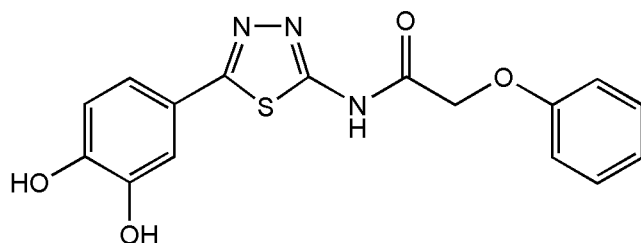
3.3.4. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-фенилацетамид (3г):



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,17 g (52%); T.T. 249-250 °C (разлагање); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,83 (s, 2H, CH₂); 6,83 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H); 7,18 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H); 7,26-7,33 (m, 6H, Ar-H); 9,51 (bs, 2H, OH); 12,77 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 41,77, 113,84, 116,35, 119,20, 121,61, 127,09, 128,62 (2C), 129,47 (2C), 134,79, 146,01, 148,32,

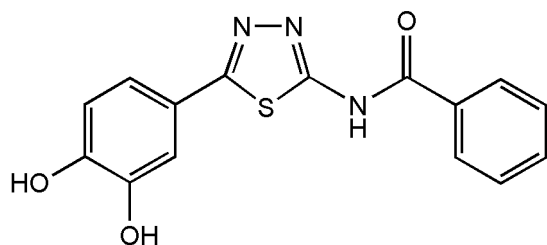
157,48, 162,59, 169,55; IR (KBr, cm^{-1}): 3524, 3475, 3382, 2872, 2764, 1667, 1561, 1444, 1317, 1298, 727; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (327,36 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,75; H, 3,99; N, 12,80; S, 9,82.

3.3.5. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-феноксиацетамид (3d):

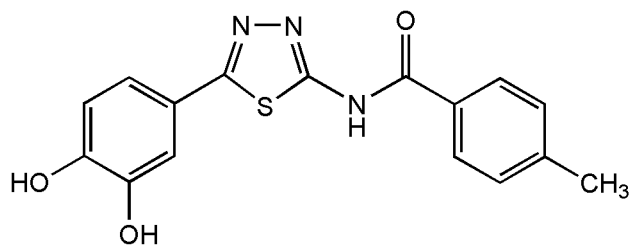


Светлобеж прашкаста супстанца; принос: 0,20 g (58%); Т.Т. $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 4,92 (s, 2H, CH_2); 6,84 (d, 1H, $J = 8,2\text{ Hz}$, Ar-H); 6,95-7,01 (m, 3H, Ar-H); 7,19 (dd, 1H, $J = 8,2$ и $2,0\text{ Hz}$, Ar-H); 7,28-7,35 (m, 3H, Ar-H); 9,50 (bs, 2H, OH); 12,76 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 66,33, 113,83, 114,73 (2C), 116,30, 119,19, 121,41, 121,48, 129,63 (2C), 145,96, 148,31, 157,02, 157,83, 162,57, 167,32; IR (KBr, cm^{-1}): 3520, 3424, 2852, 2726, 1714, 1594, 1440, 1317, 1291, 758; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (343,36 g/mol): C, 55,97; H, 3,82; N, 12,24; S, 9,34; Нађено: C, 55,79; H, 3,81; N, 12,22; S, 9,33.

3.3.6. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (3ђ):

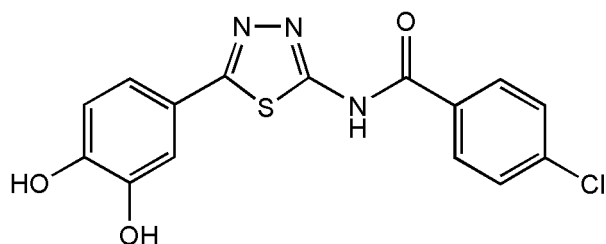


Бела прашкаста супстанца; принос: 0,27 g (81%); Т.Т. $>250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,86 (d, 1H, $J = 8,2\text{ Hz}$, Ar-H); 7,24 (dd, 1H, $J = 8,2$ и $2,0\text{ Hz}$, Ar-H); 7,38 (d, 1H, $J = 2,0\text{ Hz}$, Ar-H); 7,52-7,69 (m, 3H, Ar-H); 8,13 (dd, 2H, $J = 8,2$ и $2,0\text{ Hz}$, Ar-H); 9,44 (s, 1H, OH); 9,59 (s, 1H, OH); 13,04 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 113,96, 116,43, 119,31, 121,71, 128,57 (2C), 128,79 (2C), 131,91, 133,07, 146,07, 148,38, 158,62, 162,62, 165,44; IR (KBr, cm^{-1}): 3406, 3242, 2924, 1650, 1603, 1535, 1462, 1303, 708; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ (331,35 g/mol): C, 54,37; H, 3,95; N, 12,68; S, 9,68; Нађено: C, 54,32; H, 3,96; N, 12,70; S, 9,65.

3.3.7. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-метилбензамид (3e):

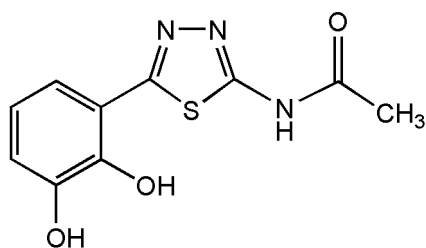
Светлобраон прашкаста супстанца;
принос: 0,19 g (57%); Т.Т. >250 °C; ^1H
NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 2,39 (s, 3H,
CH₃); 6,86 (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H); 7,23
(dd, 1H, J = 8,0 и 2,0 Hz, Ar-H); 7,36 (d,

2H, J_{AB} = 8,0 Hz, Ar-H); 7,38 (d, 1H, J = 2,0 Hz, Ar-H); 8,03 (d, 2H, J_{BA} = 8,0 Hz, Ar-H);
9,52 (bs, 2H, OH); 12,92 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 21,02, 113,64,
116,12, 118,94, 121,50, 128,33 (2C), 128,94, 129,08 (2C), 143,11, 145,78, 148,03, 158,50,
162,16, 165,01; IR (KBr, cm^{-1}): 3431, 3407, 2921, 1649, 1612, 1544, 1533, 1323, 1301, 742;
Израчунато за C₁₆H₁₃N₃O₃S (327,36 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено:
C, 58,75; H, 4,01; N, 12,80; S, 9,82.

3.3.8. 4-Хлоро-*N*-(5-(3,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид × 2H₂O (3ж):

Светлобраон прашкаста супстанца;
принос: 0,20 g (52%); Т.Т. >250 °C; ^1H
NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,86 (d, 1H, J
= 8,0 Hz, Ar-H); 7,23 (d, 1H, J = 8,0,
Ar-H); 7,38 (s, 1H, Ar-H); 7,64 (d, 2H, J_{AB}

= 8,2 Hz, Ar-H); 8,13 (d, 2H, J_{BA} = 8,2 Hz, Ar-H); 9,46 (s, 1H, OH); 9,60 (s, 1H, OH); 13,13
(s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 113,81, 116,30, 119,16, 121,51, 128,82 (2C),
130,41 (2C), 130,84, 137,88, 145,97, 148,31, 158,74, 162,40, 164,65; IR (KBr, cm^{-1}): 3511,
3435, 3133, 2928, 1660, 1595, 1536, 1316, 1278, 744; Израчунато за C₁₅H₁₀ClN₃O₃S×2H₂O
(383,81 g/mol): C, 46,94; H, 3,68; N, 10,95; S, 8,35; Нађено: C, 46,90; H, 3,67; N, 10,93; S,
8,37.

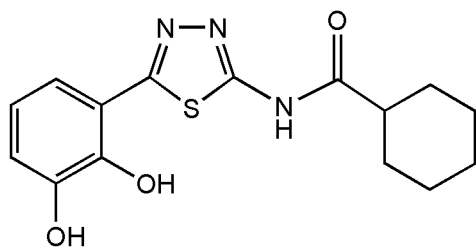
3.3.9. *N*-(5-(2,3-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)ацетамид (3'а):

Светлобраон прашкаста супстанца; принос: 0,14 g
(56%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6):
2,20 (s, 3H, CH₃); 6,77 (t, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H); 6,90 (d,
1H, J = 7,6 Hz, Ar-H); 7,58 (d, 1H, J = 7,6 Hz, Ar-H);
9,84 (s, 1H, OH); 10,18 (s, 1H, OH); 12,43 (s, 1H, NH);

^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 22,61, 116,69, 117,56, 117,75, 119,78, 143,61, 146,16,

158,44, 159,76, 168,68; IR (KBr, cm^{-1}): 3432, 3388, 2918, 2800, 1692, 1561, 1474, 1318, 1291, 788; Израчунато за $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (251,27 g/mol): C, 47,80; H, 3,61; N, 16,72; S, 12,76; Нађено: C, 47,72; H, 3,60; N, 16,78; S, 12,73.

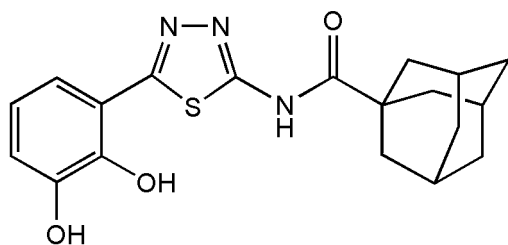
3.3.10. *N*-(5-(2,3-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)циклохексанкарбоксамид (3'б):



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,21 g (66%); Т.Т. 235-236 °C (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 1,24-1,50 (m, 5H, C_6H_5); 1,66-1,87 (m, 6H, C_6H_5); 6,77 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 6,90 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 7,57 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H);

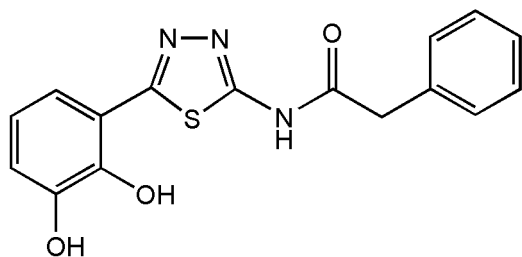
10,02 (bs, 2H, OH); 12,24 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 25,10 (2C), 25,36, 28,88 (2C), 43,45, 116,70, 117,62, 117,66, 119,69, 143,67, 146,14, 158,68, 159,67, 174,37; IR (KBr, cm^{-1}): 3434, 3157, 2932, 2858, 1695, 1541, 1446, 1269, 1167, 726; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (319,38 g/mol): C, 56,41; H, 5,37; N, 13,16; S, 10,04; Нађено: C, 56,47; H, 5,35; N, 13,15; S, 10,06.

3.3.11. *N*-(5-(2,3-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)адамантан-1-карбоксамид (3'в):



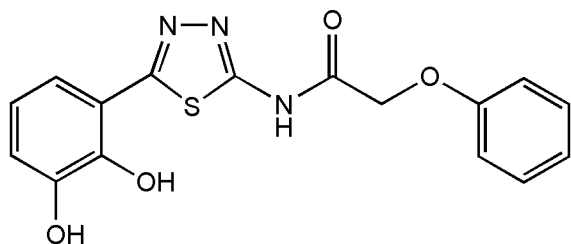
Бела прашкаста супстанца; принос: 0,19 g (51%); Т.Т. >250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 1,70 (s, 6H, Ad); 1,96 (s, 6H, Ad); 2,02 (s, 3H, Ad); 6,77 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 6,90 (dd, 1H, $J = 7,8$ и 1,4 Hz, Ar-H); 7,57 (dd, 1H, $J =$

7,8 и 1,4 Hz, Ar-H); 9,85 (bs, 1H, OH); 10,12 (bs, 1H, OH); 12,06 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 27,60 (3C), 35,90 (3C), 37,70 (3C), 40,80, 116,67, 117,61, 117,71, 119,68, 143,64, 146,12, 158,78, 160,28, 176,08; IR (KBr, cm^{-1}): 3431, 3407, 3336, 2910, 2852, 1685, 1525, 1475, 1305, 1292, 726; Израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (371,46 g/mol): C, 61,44; H, 5,70; N, 11,31; S, 8,63; Нађено: C, 61,37; H, 5,71; N, 11,29; S, 8,67.

3.3.12. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-фенилацетамид (3'г):

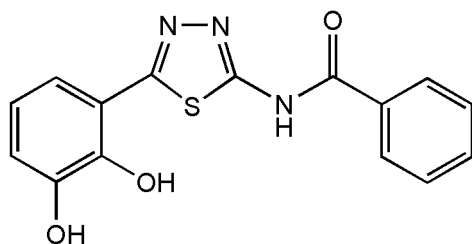
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,23 g (70%); Т.Т. >250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 3,84 (s, 2H, CH_2); 6,77 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 6,90 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 7,26-7,35 (m, 5H, Ar-H); 7,59 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H);

10,15 (bs, 2H, OH); 12,44 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 41,70, 116,74, 117,55, 117,69, 119,72, 126,96, 128,52 (2C), 129,35 (2C), 134,82, 143,63, 146,14, 158,64, 159,70, 169,49; IR (KBr, cm^{-1}): 3451, 3436, 2910, 2853, 1701, 1553, 1474, 1306, 1270, 728; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (327,36 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,67; H, 4,01; N, 12,82; S, 9,77.

3.3.13. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-2-феноксиацетамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (3'д):

Беж прашкаста супстанца; принос: 0,25 g (69%); Т.Т. 210-211 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 4,92 (s, 2H, CH_2); 6,78 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 6,91 (dd, 1H, $J = 7,8$ и 1,6 Hz, Ar-H); 6,96-7,00 (m, 3H, Ar-H); 7,32 (t, 2H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H);

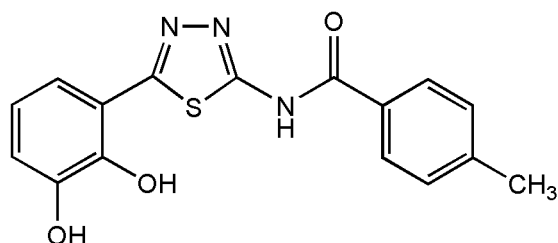
7,61 (dd, 1H, $J = 7,8$ и 1,6 Hz, Ar-H); 9,86 (s, 1H, OH); 10,20 (s, 1H, OH); 12,72 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 66,30, 114,73 (2C), 116,76, 117,48, 117,67, 119,72, 121,39, 129,61 (2C), 143,56, 146,12, 157,83, 158,63, 159,22, 167,20; IR (KBr, cm^{-1}): 3434, 3407, 3303, 3248, 1697, 1560, 1547, 1486, 1242, 728; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ (361,38 g/mol): C, 53,18; H, 4,18; N, 11,63; S, 8,87; Нађено: C, 53,14; H, 4,17; N, 11,65; S, 8,89.

3.3.14. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид (3'ђ):

Светлобеж прашкаста супстанца; принос: 0,19 g (61%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,80 (t, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 6,93 (d, 1H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 7,53-7,71 (m, 4H, Ar-H); 8,14 (d, 2H, $J = 7,8$ Hz, Ar-H); 9,87 (s, 1H, OH); 10,24 (s, 1H, OH); 12,96 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 116,90, 117,75 (2C), 119,84, 128,53 (2C), 128,74 (2C), 131,93, 132,96, 143,82, 146,23, 159,10, 160,62, 165,33; IR (KBr,

cm⁻¹): 3407, 3294, 3153, 2941, 1648, 1536, 1315, 1270, 1249, 710; Израчунато за C₁₅H₁₁N₃O₃S (313,34 g/mol): C, 57,50; H, 3,54; N, 13,41; S, 10,23; Нађено: C, 57,46; H, 3,55; N, 13,43; S, 10,21.

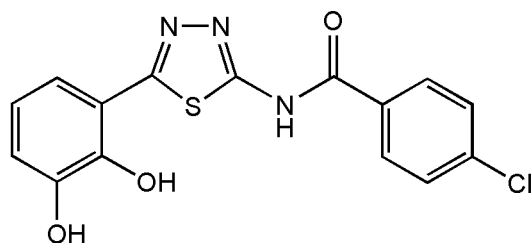
3.3.15. *N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-метилбензамид (3'е):



Светлобраон прашкаста супстанца; принос: 0,26 g (79%); Т.Т. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 2,40 (s, 3H, CH₃); 6,80 (t, 1H, *J* = 7,6 Hz, Ar-H); 6,92 (d, 1H, *J* = 7,6 Hz, Ar-H); 7,37 (d, 2H, *J*_{AB} = 8,0 Hz, Ar-H); 7,63

(d, 1H, *J* = 7,6 Hz, Ar-H); 8,05 (d, 2H, *J*_{BA} = 8,0 Hz, Ar-H); 10,06 (bs, 2H, OH); 12,87 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 21,20, 116,74, 117,60, 117,74, 119,74, 128,52 (2C), 129,04, 129,27 (2C), 143,28, 143,70, 146,15, 158,88, 160,63, 165,06; IR (KBr, cm⁻¹): 3405, 3152, 3025, 2923, 1672, 1649, 1534, 1305, 1267, 724; Израчунато за C₁₆H₁₃N₃O₃S (327,36 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,67; H, 4,01; N, 12,87; S, 9,77.

3.3.16. 4-Хлоро-*N*-(5-(3,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид × 2H₂O (3'ж):



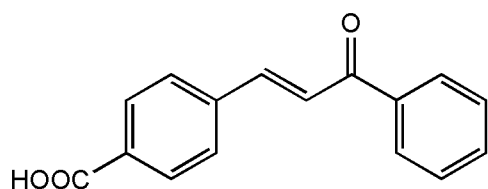
Браон прашкаста супстанца; принос: 0,23 g (60%); Т.Т. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,80 (t, 1H, *J* = 7,8 Hz, Ar-H); 6,93 (dd, 1H, *J* = 7,8 и 1,2 Hz, Ar-H); 7,63-7,67 (m, 3H, Ar-H); 8,14 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, Ar-H); 9,88

(s, 1H, OH); 10,24 (s, 1H, OH); 13,05 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 116,80, 117,56, 117,73, 119,76, 128,82 (2C), 130,41 (2C), 130,80, 137,86, 143,69, 146,16, 158,83, 160,66, 164,42; IR (KBr, cm⁻¹): 3419, 3150, 3027, 2927, 1670, 1594, 1540, 1492, 1314, 1296, 729; Израчунато за C₁₅H₁₀ClN₃O₃S×2H₂O (383,81 g/mol): C, 46,94; H, 3,68; N, 10,95; S, 8,35; Нађено: C, 46,97; H, 3,67; N, 10,96; S, 8,33.

3.4. Поступак за синтезу једињења 5а-л

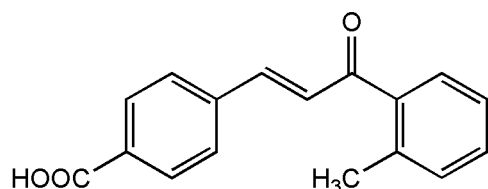
Смеса 4-формилбензојеве киселине (0,345 g, 2,30 mmol), одговарајућег супституисаног ацетофенона (2,00 mmol) и чврстог NaOH (0,184 g, 4,60 mmol) у анхидрованом метанолу (10,0 mL) рефлугована је током 2 сата. Након хлађења до собне температуре, смеси је додато 5,0 mL дестиловане воде и рН раствора је подешен на 4,5 додавањем воденог раствора HCl-а (2 M), при чему је дошло до формирања талоба жељених једињења **5а-л**. Суспензија је затим мешана током 30 минута, након чега је талог процеђен, осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl₂ и рекристалисан из MeOH.

3.4.1. (E)-4-(3-Оксо-3-фенилпроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5а):



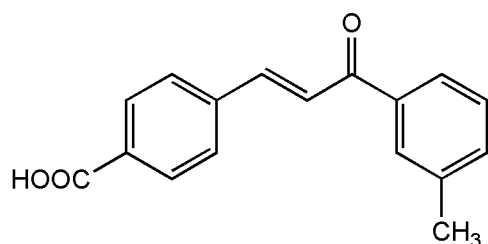
¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 7,55-7,69 (m, 3H, Ar-H); 7,78 (d, 1H, $J_{AB} = 15,8$ Hz, CH=); 8,00 (s, 4H, Ar-H); 8,06 (d, 1H, $J_{BA} = 15,8$ Hz, CH=); 8,18 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, Ar-H); 13,16 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 124,44, 128,71 (2C), 128,95 (4C), 129,83 (2C), 132,26, 133,40, 137,51, 138,88, 142,63, 166,93, 189,32.

3.4.2. (Z)-4-(3-Оксо-3-(o-толил)проп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5б):



¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 2,39 (s, 3H, CH₃); 7,31-7,38 (m, 2H, Ar-H); 7,44 (d, 1H, $J_{AB} = 7,0$ Hz, CH=); 7,53 (s, 1H, Ar-H); 7,68 (d, 1H, $J_{BA} = 7,0$ Hz, CH=); 7,90 (d, 2H, $J_{AB} = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,97 (d, 2H, $J_{BA} = 8,2$ Hz, Ar-H); 13,13 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 20,13, 125,88, 128,35, 128,60, 128,85 (2C), 129,84 (2C), 131,03, 131,41, 132,32, 136,76, 138,55, 138,62, 143,24, 166,89, 194,77.

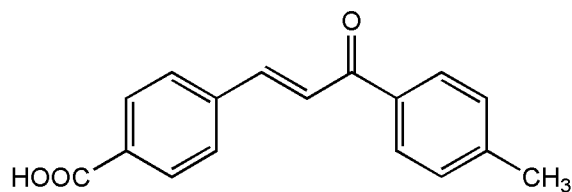
3.4.3. (E)-4-(3-Оксо-3-(m-толил)проп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5в):



¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 2,42 (s, 3H, CH₃); 7,42-7,51 (m, 2H, Ar-H); 7,77 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 7,96-8,04 (m, 6H, Ar-H); 8,05 (d, 1H, $J_{BA} = 7,0$ Hz, CH=); 13,81 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (50

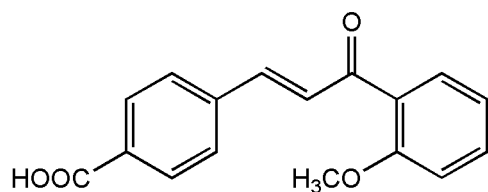
MHz, DMSO-d₆): 20,99, 124,50, 125,92, 128,79, 128,95 (2C), 129,11, 129,81 (2C), 132,22, 134,01, 137,55, 138,37, 138,91, 142,45, 166,93, 189,30.

3.4.4. (E)-4-(3-Оксо-3-(*p*-толил)проп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5g):



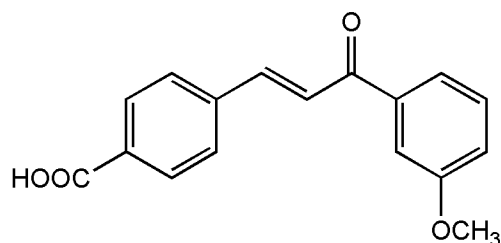
¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 2,40 (s, 3H, CH₃); 7,38 (d, 2H, *J*_{AB} = 7,8 Hz, Ar-H); 7,78 (d, 1H, *J*_{AB} = 15,6 Hz, CH=); 7,99 (s, 4H, Ar-H); 8,03 (d, 1H, *J*_{BA} = 15,6 Hz, CH=); 8,09 (d, 2H, *J*_{BA} = 7,8 Hz, Ar-H); 13,09 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 21,36, 124,42, 128,92 (2C), 128,98 (2C), 129,55 (2C), 129,88 (2C), 132,21, 135,04, 139,00, 142,32, 143,96, 167,02, 188,70.

3.4.5. (Z)-4-(3-(2-Метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5d):

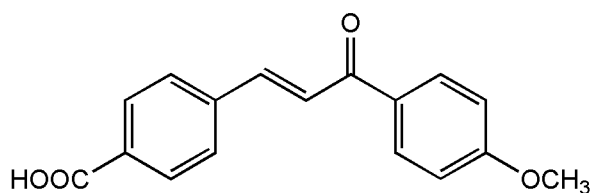


¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,88 (s, 3H, OCH₃); 7,07 (t, 1H, *J* = 7,2 Hz, Ar-H); 7,20 (d, 1H, *J*_{AB} = 8,2 Hz, CH=); 7,46-7,63 (m, 3H, Ar-H); 7,53 (d, 1H, *J*_{BA} = 8,2 Hz, CH=); 7,85 (d, 2H, *J*_{AB} = 8,2 Hz, Ar-H); 7,97 (d, 2H, *J*_{BA} = 8,2 Hz, Ar-H); 13,09 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 56,07, 112,60, 120,79, 128,70 (3C), 129,14, 129,85, 130,00 (2C), 132,18, 133,52, 138,94, 141,05, 158,11, 167,00, 192,05.

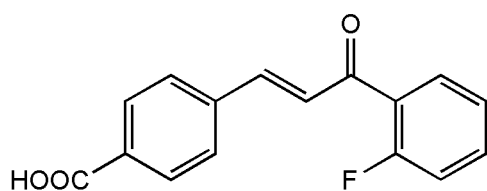
3.4.6. (E)-4-(3-(3-Метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5h):



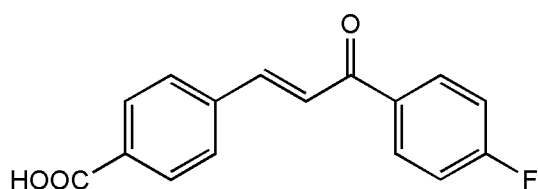
¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,85 (s, 3H, OCH₃); 7,25 (dd, 1H, *J* = 8,0 и 2,2 Hz, Ar-H); 7,50 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,63 (s, 1H, Ar-H); 7,77 (d, 1H, *J*_{AB} = 15,6 Hz, CH=); 7,79 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,98 (d, 2H, *J*_{AB} = 8,6 Hz, Ar-H); 8,02 (d, 2H, *J*_{BA} = 8,6 Hz, Ar-H); 8,04 (d, 1H, *J*_{BA} = 15,6 Hz, CH=); 13,09 (bs, 1H, OH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 55,56, 113,29, 119,53, 121,33, 124,43, 129,09 (2C), 129,89 (2C), 130,12, 132,31, 138,92, 138,97, 142,78, 159,78, 167,03, 189,04.

3.4.7. (E)-4-(3-(4-Метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5e):

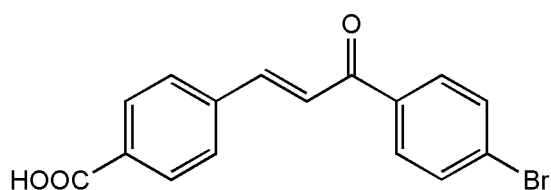
^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 3,87 (s, 3H, OCH₃); 7,09 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, Ar-H); 7,74 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 7,99 (s, 4H, Ar-H); 8,06 (d, 1H, $J_{BA} = 15,6$ Hz, CH=); 8,19 (d, 2H, $J_{BA} = 9,0$ Hz, Ar-H); 13,11 (bs, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,75, 114,25 (2C), 124,43, 128,93 (2C), 129,87 (2C), 130,45, 131,21 (2C), 132,10, 139,12, 141,85, 163,56, 167,03, 187,46.

3.4.8. (Z)-4-(3-(2-Флуорофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5ж):

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,36 (d, 1H, $J_{AB} = 7,6$ Hz, CH=); 7,38-7,44 (m, 1H, Ar-H); 7,52-7,74 (m, 2H, Ar-H); 7,68 (d, 1H, $J_{BA} = 7,6$ Hz, CH=); 7,81 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,91 (d, 2H, $J_{AB} = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,99 (d, 2H, $J_{BA} = 8,2$ Hz, Ar-H); 13,07 (bs, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 116,85 ($J_{CF} = 22,2$ Hz), 125,05 ($J_{CF} = 3,3$ Hz), 126,79 ($J_{CF} = 12,9$ Hz), 127,70 ($J_{CF} = 3,7$ Hz), 128,99 (2C), 129,98 (2C), 130,74, 132,53, 134,67 ($J_{CF} = 8,8$ Hz), 138,50, 143,20, 160,50 ($J_{CF} = 250,6$ Hz), 166,94, 188,91.

3.4.9. (E)-4-(3-(4-Флуорофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5з):

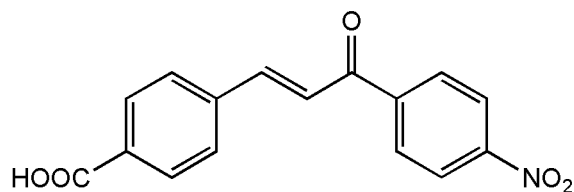
^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,42 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H); 7,78 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 7,96-8,01 (m, 4H, Ar-H); 8,08 (d, 1H, $J_{BA} = 15,6$ Hz, CH=); 8,28 (m, 2H, Ar-H); 13,15 (bs, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 115,99 (2C, $J_{CF} = 21,8$ Hz), 124,16, 129,08 (2C), 129,87 (2C), 131,80 (2C, $J_{CF} = 9,3$ Hz), 132,33, 134,21 ($J_{CF} = 2,4$ Hz), 138,88, 142,83, 165,33 ($J_{CF} = 250,8$ Hz), 167,00, 187,80.

3.4.10. (E)-4-(3-(4-Бромфенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5и):

^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,79 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 7,80 (d, 2H, $J_{AB} = 8,4$ Hz, Ar-H); 7,96-8,05 (m, 4H, Ar-H); 8,05 (d, 1H, $J_{BA} = 15,6$ Hz, CH=); 8,12 (d, 2H, $J_{BA} = 8,4$ Hz,

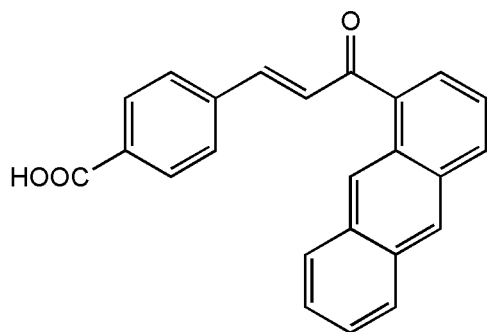
Ar-H); 13,17 (bs, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 124,01, 127,67, 129,10 (2C), 129,84 (2C), 130,77 (2C), 132,02 (2C), 132,45, 136,47, 138,77, 143,15, 166,97, 188,40.

3.4.11. (E)-4-(3-(4-Нитрофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5j):



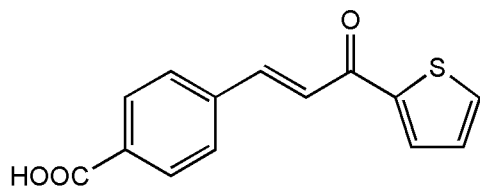
^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,82 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 8,00 (s, 4H, Ar-H); 8,06 (d, 1H, $J_{BA} = 15,6$ Hz, CH=); 8,37 (s, 4H, Ar-H); 13,18 (bs, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 123,97 (3C), 129,22 (2C), 129,85 (2C), 130,09 (2C), 132,64, 138,54, 142,17, 144,09, 150,04, 166,93, 188,39.

3.4.12. 4-(3-(Антрацен-1-ил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5к):



^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,54-7,68 (m, 3H, Ar- $\text{H}_{\text{антрацен}}$); 7,74 (d, 1H, $J_{AB} = 16,0$ Hz, CH=); 7,86 (d, 1H, $J_{BA} = 16,0$ Hz, CH=); 7,96 (d, 2H, $J_{AB} = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,00 (d, 2H, $J_{BA} = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,10-8,18 (m, 3H, Ar- $\text{H}_{\text{антрацен}}$); 8,35 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar- $\text{H}_{\text{антрацен}}$); 8,71 (s, 1H, Ar- $\text{H}_{\text{антрацен}}$); 9,13 (s, 1H, Ar- $\text{H}_{\text{антрацен}}$); 13,17 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 124,32, 124,76, 126,43 (2C), 127,25, 127,76, 128,03, 128,54, 128,79, 128,98 (2C), 129,30, 129,92 (2C), 131,31, 131,61, 132,22, 132,35, 133,10, 135,62, 138,80, 143,30, 166,99, 193,52.

3.4.13. (E)-4-(3-Оксо-3-(тиофен-2-ил)проп-1-ен-1-ил)бензојева киселина (5л):

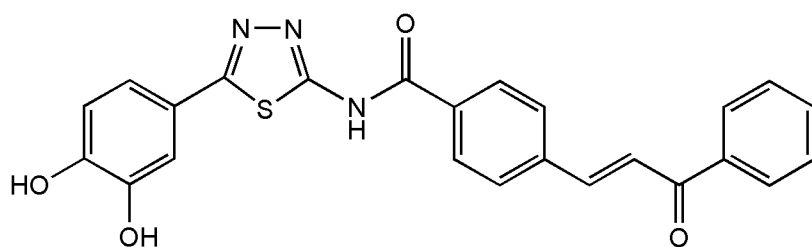


^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 7,33 (t, 1H, $J = 4,4$ Hz, Ar- $\text{H}_{\text{тиофен}}$); 7,76 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 8,00 (s, 4H, Ar-H); 8,01 (d, 1H, $J_{BA} = 15,6$ Hz, CH=); 8,09 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, Ar- $\text{H}_{\text{тиофен}}$); 8,38 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, Ar- $\text{H}_{\text{тиофен}}$); 13,15 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 124,24, 129,06 (3C), 129,88 (2C), 132,31, 134,20, 136,02, 138,77, 141,87, 145,44, 166,99, 181,66.

3.5. Поступак за синтезу једињења ба-л

Раствору одговарајућег халкона **5** (1,00 mmol) у анхидрованом дихлорметану (4,0 mL) полако је додаван SOCl_2 (0,3 mL, 4,00 mmol), а затим и две капи *N,N*-диметилформамида и добијена смеша мешана је на собној температури током 2 сата. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, а вишак SOCl_2 је уклоњен азеотропном дестилацијом са толуеном. Формираном киселинском хлориду су, без претходног изоловања, додати 2-амино-1,3,4-тиадиазол, **2** (0,227 g, 1,00 mmol) и анхидровани диоксан (20,0 mL) и смеша је затим рефлуктована током 12 сати. Затим је охлађеном раствору лагано додавано 20,0 mL дејонизоване воде уз снажно мешање на собној температури, током чега долази до формирања талоба жељених једињења (**ба-л**). Мешање је настављено током 1 сата, након чега је талог процеђен, испран водом и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 . Сва једињења (осим **бд**) садржала су мању количину диоксана који није уклоњен чак ни након сушења на 110 °C током 12 сати. Да би се диоксан у потпуности уклонио, финална једињења **би** и **бк** растворена су у *N,N'*-диметилформамиду, а једињење **бј** у диметил сулфоксиду, након чега је раствору додавана дејонизована вода, при чему долази до формирања талоба који је затим филтриран, испран водом и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 . Сва остала једињења (**ба-г**, **бђ-з** и **бл**) су, ради уклањања диоксана, растворена у тетрахидрофурану и растварач је потом упарен до сува под сниженим притиском.

3.5.1. (*E*)-*N*-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-оксо-3-фенилпроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (**ба**):

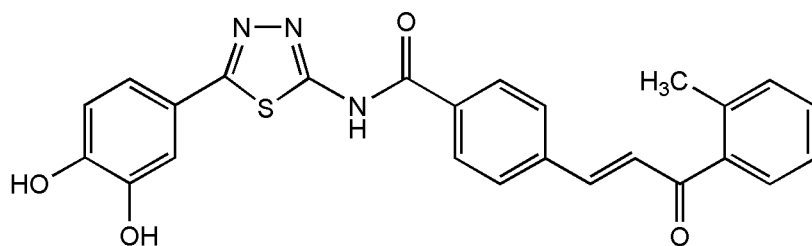


Беж прашкаста супстанца;
принос: 0,31 g (68%); Т.Т.
> 250 °C; ^1H NMR (200
MHz, DMSO-d_6): 6,87 (d,
1H, $J = 8,2$ Hz, H-5_{фенолни});

7,24 (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,6 Hz, H-6_{фенолни}); 7,39 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-2_{фенолни}); 7,55-7,73 (m, 3H, Ar-H); 7,80 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 15,6$ Hz, CH=); 8,09 (d, 2H, $J = 7,4$ Hz, Ar-H); 8,12 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 15,6$ Hz, CH=); 8,18-8,22 (m, 4H, Ar-H); 9,45 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,13 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 113,86, 116,34, 119,21, 121,58, 124,57, 128,74 (2C), 128,93 (2C), 129,00 (4C), 133,05, 133,41, 137,50, 138,94, 142,48, 146,00, 148,33,

158,58, 162,53, 164,76, 189,26; IR (KBr, cm^{-1}): 3435; 2925; 1666; 1655; 1601; 1533; 1309; 1296; 1219, 747; Израчунао за $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (461,50 g/mol): C, 62,46; H, 4,15; N, 9,10; S, 6,95; Нађено: C, 62,54; H, 4,14; N, 9,07; S, 6,97.

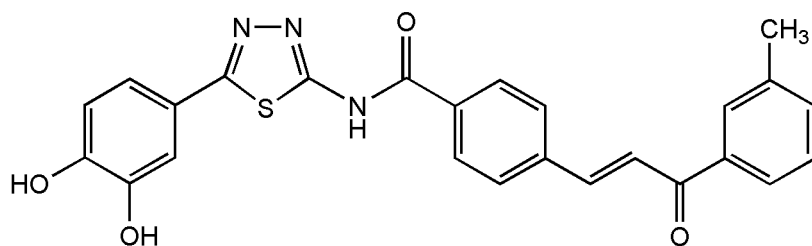
3.5.2. (Z)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-оксо-3-(o-толил)проп-1-ен-1-ил)бензамид $\times 1,5\text{H}_2\text{O}$ (66):



Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,41 g (85%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 2,41 (s, 3H,

CH_3); 6,86 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-5_{фенолни}); 7,24 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-6_{фенолни}); 7,33-7,38 (m, 2H, Ar-H и 1H, H-2_{фенолни}); 7,45 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 7,0$ Hz, CH=); 7,58 (s, 2H, Ar-H); 7,72 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 7,0$ Hz, CH=); 7,98 (d, 2H, $J_{\text{AB}} = 8,0$ Hz, Ar-H); 8,17 (d, 2H, $J_{\text{BA}} = 8,0$ Hz, Ar-H); 9,45 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,11 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 20,18, 113,87, 116,34, 119,21, 121,58, 125,87, 128,47, 128,68, 128,88 (2C), 129,04 (2C), 131,06, 131,43, 133,14, 136,83, 138,52, 138,69, 143,04, 146,00, 148,33, 158,60, 162,54, 164,81, 194,68; IR (KBr, cm^{-1}): 3466; 3173; 1667; 1630; 1606; 1532; 1450; 1301; 1275; 807; Израчунао за $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ (484,53 g/mol): C, 61,97; H, 4,58; N, 8,67; S, 6,62; Нађено: C, 61,99; H, 4,59; N, 8,65; S, 6,63.

3.5.3. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-оксо-3-(m-толил)проп-1-ен-1-ил)бензамид (66):

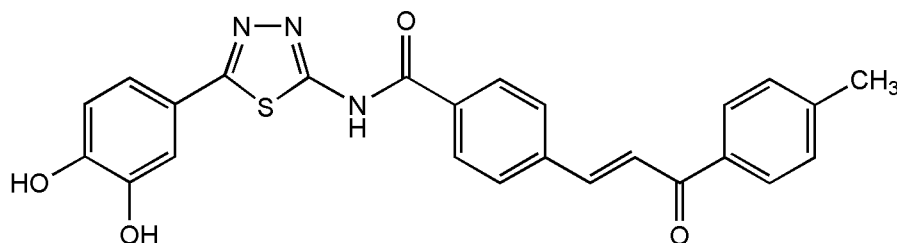


Жута прашкаста супстанца; принос: 0,38 g (82%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 2,44 (s, 3H, CH_3); 6,88 (d, 1H, $J =$

8,0 Hz, H-5_{фенолни}); 7,26 (dd, 1H, $J = 8,0$ и 2,0 Hz, H-6_{фенолни}); 7,40 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-2_{фенолни}); 7,44-7,53 (m, 2H, Ar-H); 7,81 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 15,6$ Hz, CH=); 7,96-8,24 (m, 6H, Ar-H); 8,12 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 15,6$ Hz, CH=), 9,46 (s, 1H, OH); 9,62 (s, 1H, OH); 13,14 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 20,98, 113,84, 116,31, 119,17, 121,54, 124,67, 125,94, 128,79, 128,97 (4C), 129,12, 133,01, 134,03, 137,52, 138,37, 138,97, 142,29, 145,97, 148,30, 158,52, 162,50, 164,74, 189,26; IR (KBr, cm^{-1}): 3426; 3169; 1644; 1653; 1607; 1532; 1309;

1297; 1254; 758; Израчунато за $C_{25}H_{19}N_3O_4S$ (457,51 g/mol): C, 65,63; H, 4,19; N, 9,18; S, 7,01; Нађено: C, 65,61; H, 4,18; N, 9,20; S, 7,02.

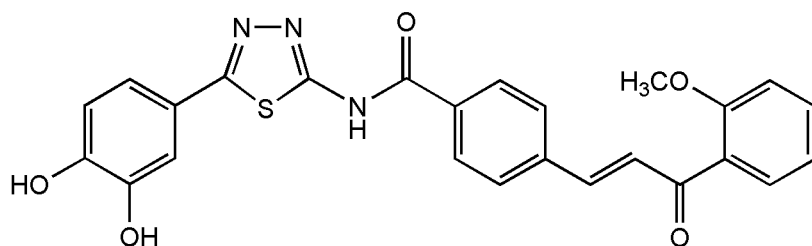
3.5.4. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-оксо-3-(p-толил)проп-1-ен-1-ил)бензамид (6g):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,38 g (84%); Т.Т. > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6):

2,71 (s, 3H, CH_3); 6,87 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5_{фенолни}); 7,24 (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,8 Hz, H-6_{фенолни}); 7,39 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-2_{фенолни}); 7,39 (d, 2H, $J_{AB} = 7,8$ Hz, Ar-H); 7,78 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 8,06-8,13 (m, 4H, Ar-H); 8,11 (d, 1H, $J_{BA} = 15,6$ Hz, CH=); 8,20 (d, 2H, $J_{BA} = 7,8$ Hz, Ar-H); 9,46 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,13 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 21,31, 113,88, 116,34, 119,20, 121,59, 124,61, 128,96 (6C), 129,49 (2C), 132,97, 135,01, 139,02, 142,09, 143,92, 146,00, 148,33, 158,59, 162,53, 164,78, 188,67; IR (KBr, cm^{-1}): 3434; 3192; 2920; 1668; 1654; 1609; 1533; 1308; 1296; 1210; 759; Израчунато за $C_{25}H_{19}N_3O_4S$ (457,51 g/mol): C, 65,63; H, 4,19; N, 9,18; S, 7,01; Нађено: C, 65,60; H, 4,20; N, 9,17; S, 7,00.

3.5.5. (Z)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(2-метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times 2H_2O$ (6d):

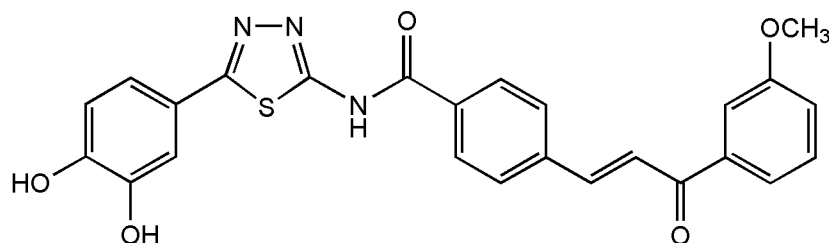


Жуто-зелена прашкаста супстанца; принос: 0,36 g (70%); Т.Т. > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 3,89 (s, 3H, OCH_3); 6,86

(d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5_{фенолни}); 7,08 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, Ar-H); 7,22 (d, 1H, $J_{AB} = 8,2$ Hz, CH=); 7,23 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-6_{фенолни}); 7,38 (s, 1H, H-2_{фенолни}); 7,54 (d, 1H, $J_{BA} = 8,2$ Hz, CH=); 7,58 (s, 3H, Ar-H); 7,93 (d, 2H, $J_{AB} = 8,2$ Hz, Ar-H); 8,17 (d, 2H, $J_{BA} = 8,2$ Hz, Ar-H); 9,45 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,11 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 56,03, 112,56, 113,87, 116,34, 119,22, 120,72, 121,60, 128,62 (2C), 128,73, 129,10 (2C), 129,28, 129,76, 132,99, 133,41, 138,95, 140,84, 146,00, 148,33, 158,06, 158,59, 162,51, 164,81, 192,00; IR (KBr, cm^{-1}): 3434; 3236; 2934; 1661; 1607; 1536; 1448; 1315;

1295; 1245; 747; Израчунато за $C_{25}H_{19}N_3O_5S \times 2H_2O$ (509,54 g/mol): C, 58,93; H, 4,55; N, 8,25; S, 6,29; Нађено: C, 58,95; H, 4,57; N, 8,26; S, 6,27.

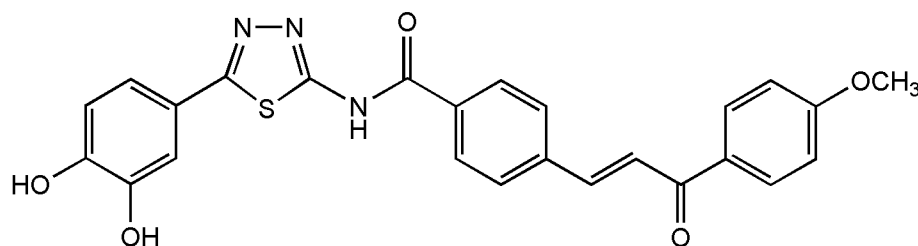
3.5.6. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(3-метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times H_2O$ (6h):



Тамножута прашкаста супстанца; принос: 0,38 g (78%); Т.Т. > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 3,86 (s, 3H, OCH₃); 6,87

(d, 1H, J = 8,0 Hz, H-5_{фенолни}); 7,23-7,27 (m, 1H, Ar-H и 1H, H-6_{фенолни}); 7,39 (s, 1H, H-2_{фенолни}); 7,51 (t, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H); 7,65 (s, 1H, Ar-H); 7,80 (d, 1H, J_{AB} = 15,6 Hz, CH=); 7,82 (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H); 8,09 (d, 2H, J_{AB} = 8,6 Hz, Ar-H); 8,10 (d, 1H, J_{BA} = 15,6 Hz, CH=); 8,20 (d, 2H, J_{BA} = 8,6 Hz, Ar-H); 9,45 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,13 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,54, 113,32, 113,88, 116,35, 119,23, 119,46, 121,30, 121,61, 124,59, 129,04 (4C), 130,06, 133,06, 138,94 (2C), 142,56, 146,01, 148,34, 158,63, 159,74, 162,55, 164,78, 189,00; IR (KBr, cm⁻¹): 3434; 2937; 1663; 1607; 1538; 1448; 1317; 1293; 1259; 759; Израчунато за $C_{25}H_{19}N_3O_5S \times H_2O$ (491,52 g/mol): C, 61,09; H, 4,31; N, 8,55; S, 6,52; Нађено: C, 61,11; H, 4,29; N, 8,57; S, 6,53.

3.5.7. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(4-метоксифенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times 0,5H_2O$ (6e):

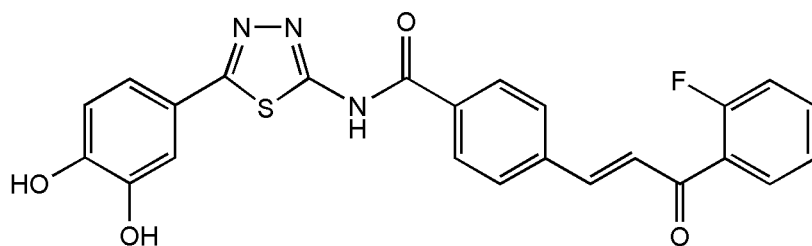


Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,34 g (70%); Т.Т. > 250

°C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 3,88 (s, 3H, OCH₃); 6,87 (d, 1H, J = 8,2 Hz, H-5_{фенолни}); 7,10 (d, 2H, J_{AB} = 9,0 Hz Ar-H); 7,24 (dd, 1H, J = 8,2 и 2,0 Hz, H-6_{фенолни}); 7,39 (d, 1H, J = 2,0 Hz, H-2_{фенолни}); 7,76 (d, 1H, J_{AB} = 15,6 Hz, CH=); 8,08 (d, 2H, J_{AB} = 8,4 Hz, Ar-H); 8,13 (d, 1H, J_{BA} = 15,6 Hz, CH=); 8,20 (d, 2H, J_{BA} = 8,4 Hz, Ar-H); 8,21 (d, 2H, J_{BA} = 9,0 Hz, Ar-H); 9,46 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,12 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,71, 113,84, 114,20 (2C), 116,32, 119,18, 121,56, 124,62, 128,46, 128,89 (2C), 128,98 (2C), 130,42, 131,17 (2C), 139,14, 141,61, 145,98, 148,31, 158,48, 162,52, 163,53,

164,78, 187,40; IR (KBr, cm^{-1}): 3406; 3173; 2940; 1670; 1654; 1605; 1593; 1533; 1307; 1263; 1172; 765; Израчунато за $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S} \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (482,52 g/mol): C, 62,23; H, 4,18; N, 8,71; S, 6,64; Нађено: C, 62,25; H, 4,19; N, 8,72; S, 6,65.

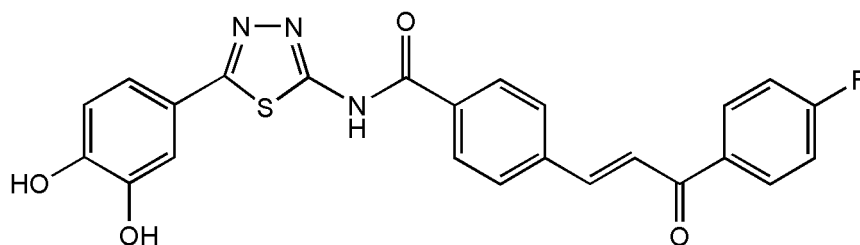
3.5.8. (Z)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(2-флуорофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (6ж):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,26 g (54%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,86 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz,

H-5_{фенолни}); 7,24 (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,6 Hz, H-6_{фенолни}); 7,37 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 7,6$ Hz, CH=); 7,39-7,44 (m, 1H, Ar-H и 1H, H-2_{фенолни}); 7,58-7,80 (m, 2H, Ar-H и 1H, CH=), 7,83 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,99 (d, 2H, $J_{\text{AB}} = 8,2$ Hz, Ar-H); 8,18 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 8,2$ Hz, Ar-H); 9,46 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,14 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 113,86, 116,33, 116,78 ($J_{\text{CF}} = 22,2$ Hz), 119,21, 121,57, 124,97 ($J_{\text{CF}} = 3,3$ Hz), 126,76 ($J_{\text{CF}} = 12,8$ Hz), 127,81 ($J_{\text{CF}} = 3,7$ Hz), 128,92 (2C), 129,10 (2C), 130,70 ($J_{\text{CF}} = 2,1$ Hz), 133,34, 134,59 ($J_{\text{CF}} = 8,8$ Hz), 138,51, 142,97, 146,00, 148,33, 158,64, 160,46 ($J_{\text{CF}} = 250,8$ Hz), 162,51, 164,79, 188,84; IR (KBr, cm^{-1}): 3405; 2928; 1671; 1662; 1611; 1539; 1451; 1317; 1293; 1268; 755; Израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4\text{SF} \times \text{H}_2\text{O}$ (479,49 g/mol): C, 60,11; H, 3,96; N, 8,76; S, 6,69; Нађено: C, 60,13; H, 3,95; N, 8,78; S, 6,70.

3.5.9.(E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(4-флуорофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times 2\text{H}_2\text{O}$ (6з):

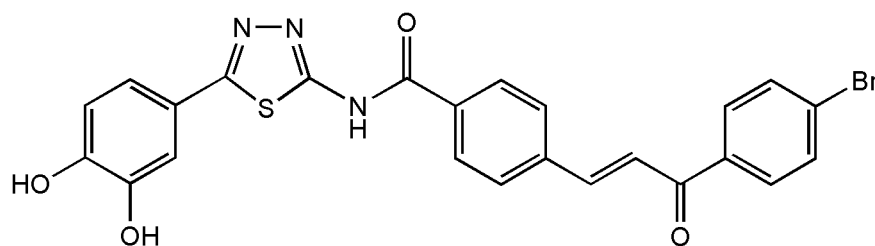


Жута прашкаста супстанца; принос: 0,31 g (63%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,87

(d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5_{фенолни}); 7,24 (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,6 Hz, H-6_{фенолни}); 7,38 (d, 1H, $J = 1,6$ Hz, H-2_{фенолни}); 7,42 (t, 2H, $J = 8,8$ Hz, Ar-H); 7,81 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 15,6$ Hz, CH=); 8,09 (d, 2H, $J_{\text{AB}} = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,14 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 15,6$ Hz, CH=); 8,20 (d, 2H, $J_{\text{BA}} = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,31 (m, 2H, Ar-H); 9,45 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,13 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50

MHz, DMSO- d_6): 113,84, 115,93 (2C, $J_{CF} = 21,6$ Hz), 116,31, 119,18, 121,55, 124,32, 128,99 (2C), 129,02 (2C), 131,76 (2C, $J_{CF} = 9,4$ Hz), 133,06, 134,17 ($J_{CF} = 2,6$ Hz), 138,88, 142,61, 145,98, 148,31, 158,50 ($J_{CF} = 6,7$ Hz), 162,51, 164,73, 165,28 ($J_{CF} = 250,8$ Hz), 187,75; IR (KBr, cm^{-1}): 3225; 3071; 2951; 1668; 1654; 1603; 1538; 1508; 1308; 1220; 831; Израчунао за $C_{24}H_{16}N_3O_4SF \times 2H_2O$ (497,50 g/mol): C, 57,94; H, 4,05; N, 8,45; S, 6,44; Нађено: C, 57,92; H, 4,06; N, 8,43; S, 6,45.

3.5.10. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(4-бромофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times 2H_2O$ (6и):



Жуто-зелена

прашката супстанца;

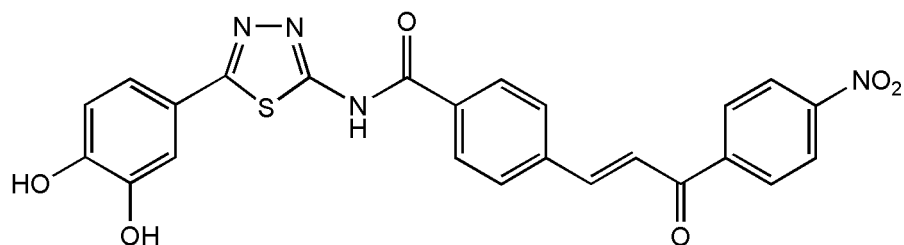
принос: 0,49 g (87%);

T.T. > 250 °C; 1H

NMR (200 MHz,

DMSO- d_6): 6,87 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-5_{фенолни}); 7,24 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, H-6_{фенолни}); 7,39 (s, 1H, H-2_{фенолни}); 7,79 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H); 7,80 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 8,05-8,21 (m, 6H, Ar-H и 1H, CH=); 9,46 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,13 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 113,85, 116,32, 119,19, 121,55, 124,20, 127,63, 129,00 (2C), 129,08 (2C), 130,75 (2C), 131,99 (2C), 133,14, 136,46, 138,83, 142,95, 145,99, 148,32, 158,59, 162,53, 164,69, 188,37; IR (KBr, cm^{-1}): 3406; 3033; 2923; 1662; 1655; 1600; 1584; 1534; 1305; 1214; 759; Израчунао за $C_{24}H_{16}N_3O_4SBr \times 2H_2O$ (558,41 g/mol): C, 51,62; H, 3,61; N, 7,52; S, 5,74; Нађено: C, 51,64; H, 3,60; N, 7,54; S, 5,75.

3.5.11. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-(4-нитрофенил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)бензамид $\times 4H_2O$ (6j):



Браон прашката

супстанца; принос:

0,30 g (53%); T.T. >

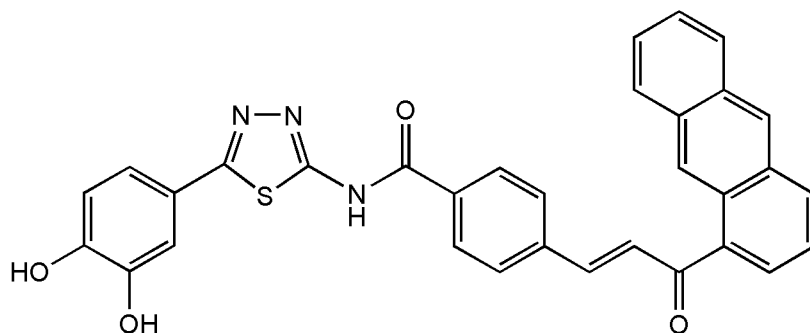
250 °C; 1H NMR

(200 MHz, DMSO- d_6):

6,86 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-5_{фенолни}); 7,24 (d, 1H, $J = 6,4$ Hz, H-6_{фенолни}); 7,38 (s, 1H, H-2_{фенолни}); 7,86 (d, 1H, $J_{AB} = 15,6$ Hz, CH=); 8,09-8,19 (m, 4H, Ar-H и 1H, CH=); 8,40 (s, 4H, Ar-H); 9,45 (s, 1H, OH); 9,61 (s, 1H, OH); 13,16 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 113,84, 116,31, 119,18, 121,54, 123,95 (2C), 124,22, 129,02 (2C), 129,23 (2C),

130,09 (2C), 133,36, 138,61, 142,18, 143,91, 145,98, 148,33, 150,07, 158,59, 162,51, 164,71, 188,42; IR (KBr, cm^{-1}): 3404; 3165; 2930; 1664; 1655; 1607; 1590; 1523; 1306; 1298; 1212; 747; Израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_6\text{S} \times 4\text{H}_2\text{O}$ (560,54 g/mol): C, 51,43; H, 4,32; N, 10,00; S, 5,72; Нађено: C, 51,45; H, 4,31; N, 9,98; S, 5,73.

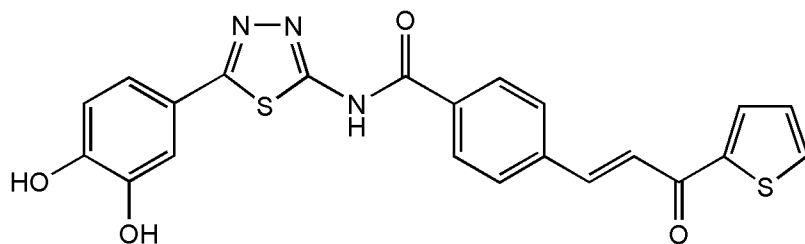
3.5.12. (E)-4-(3-(Антрацен-1-ил)-3-оксопроп-1-ен-1-ил)-N-(5-(3,4-дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (6к):



Тамнонаранцаста
прашката супстанца;
принос: 0,43 g (76%);
Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR
(200 MHz, DMSO-d_6): 6,87
(d, 1H, $J = 8,2$ Hz, H-5
фенолни); 7,25 (d, 1H, $J = 8,2$

Hz, H-6_{фенолни}); 7,39 (s, 1H, H-2_{фенолни}); 7,55-7,70 (m, 3H, Ar-H_{антрацен}), 7,78 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 15,8$ Hz, CH=); 7,92 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 15,8$ Hz, CH=); 7,98-8,22 (m, 4H, Ar-H и 3H, Ar-H_{антрацен}); 8,37 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, Ar-H_{антрацен}); 8,73 (s, 1H, Ar-H_{антрацен}); 9,16 (s, 1H, Ar-H_{антрацен}); 9,46 (s, 1H, OH); 9,62 (s, 1H, OH); 13,14 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 113,90, 116,36, 119,24, 121,62, 124,27, 124,72, 126,38 (2C), 127,21, 127,72, 127,99, 128,65, 128,74 (2C), 128,93 (2C), 129,05, 131,28, 131,58, 132,19, 133,10, 135,57, 138,82, 143,06, 146,02, 148,35, 158,63, 162,54, 164,80, 193,43; IR (KBr, cm^{-1}): 3405; 3047; 2930; 1655; 1607; 1538; 1510; 1302; 1290; 1255; 1201; 749; Израчунато за $\text{C}_{32}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_4\text{S} \times \text{H}_2\text{O}$ (561,62 g/mol): C, 68,43; H, 4,13; N, 7,48; S, 5,71; Нађено: C, 68,40; H, 4,14; N, 7,50; S, 5,73.

3.5.13. (E)-N-(5-(3,4-Дихидроксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-4-(3-оксо-3-(тиофен-2-ил)проп-1-ен-1-ил)бензамид (6л):



Жута прашката супстанца;
принос: 0,28 g (62%); Т.Т.
> 250 °C; ^1H NMR (200
MHz, DMSO-d_6): 6,87 (d,
1H, $J = 8,2$ Hz, H-5_{фенолни});

7,24 (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,8 Hz, H-6_{фенолни}); 7,34 (t, 1H, $J = 4,4$ Hz, Ar-H_{тиофен}); 7,39 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, H-2_{фенолни}); 7,79 (d, 1H, $J_{\text{AB}} = 15,6$ Hz, CH=); 8,06 (d, 1H, $J_{\text{BA}} = 15,6$ Hz, CH=);

8,08 (d, 2H, $J_{AB} = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,10 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, Ar-H_{тиофен}); 8,20 (d, 2H, $J_{BA} = 8,4$ Hz, Ar-H); 8,41 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz, Ar-H_{тиофен}); 9,47 (s, 1H, OH); 9,62 (s, 1H, OH); 13,13 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 113,85, 116,33, 119,20, 121,55, 124,44, 129,01 (5C), 133,07, 134,18, 135,99, 138,80, 141,66, 145,39, 145,99, 148,32, 158,55, 162,53, 164,81, 181,63; IR (KBr, cm^{-1}): 3406; 2927; 1671; 1654; 1595; 1540; 1413; 1317; 1292; 1189; 760; Израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$ (449,51 g/mol): C, 58,78; H, 3,36; N, 9,35; S, 14,26; Нађено: C, 58,80; H, 3,34; N, 9,36; S, 14,21.

3.6. Поступак за синтезу једињења 9a-м, 10 и 11

Поступак за синтезу једињења 8a-м. Смеса одговарајуће киселине (2,00 mmol) и POCl_3 (0,8 mL) мешана је на собној температури током 20 минута. Затим је додат тиосемикарбазид (0,182 g, 2,00 mmol) и резултујућа суспензија је рефлугована 1 сат. Након што је балон охлађен у леденом купатилу, пажљиво је додато 2,4 mL дејонизоване воде и рефлуковање је настављено још 1 сат. Смеса је затим охлађена до собне температуре, додаван је водени раствор NaOH до pH 8,5, након чега је суспензија мешана на собној температури током 1 сата. Формирани талог одговарајућих деривата 2-амино-1,3,4-тиадиазола (**8a-м**) је процеђен, осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 и производ је рекристалисан из 50%-ног раствора EtOH.

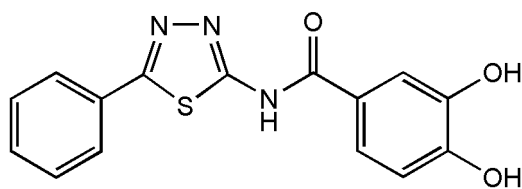
Поступак за синтезу једињења 9a-м. Смеси 3,4-дихидроксibenзојеве киселине (0,308 g, 2,00 mmol) у анхидрованом дихлорметану (8,0 mL) полако је додаван SOCl_2 (1,5 mL, 20,00 mmol), а затим и две капи *N,N*-диметилформамида и добијена смеша мешана је на собној температури током 2 сата. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, а вишак SOCl_2 је уклоњен азеотропном дестилацијом са толуеном. Формираном киселинском хлориду су, без претходног изоловања, додати одговарајући супституисани 2-амино-1,3,4-тиадиазол, **8a-м** (1,00 mmol), NaHCO_3 (0,168g, 2,00 mmol) и анхидровани диоксан (12,0 mL) и смеша је затим рефлугована током 24 сата. Након тога, растварач је упарен под сниженим притиском, остатку је додато 15,0 mL воде, као и чврсти Na_2CO_3 како би се постигао pH 9. Формирана суспензија мешана је током 30 минута на собној температури, а затим је талог процеђен, испран водом и осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl_2 . Финални

производи добијени су са задовољавајућом чистоћом, али да би се добила једињења високе чистоће, могу се подвргнути даљем пречишћавању рекристализацијом из 50%-ног воденог раствора EtOH, за **9к**, 65%-ног EtOH, за **9б** и **9м**, 70%-ног EtOH, за **9а**, **9в**, **9ђ** и **9љ**, 75%-ног EtOH, за **9л**, 80%-ног EtOH, за **9ј**, 85%-ног EtOH, за **9г** и **9д**, 90%-ног EtOH, за **9и** и **9е** и 96%-ног EtOH, за **9ж** и **9з**.

Поступак за синтезу једињења 10. Смеса 3,4-дихидроксибензалдехида (0,259 g, 1,87 mmol) и 2-амино-5-фенил-1,3,4-тиадиазола (0,266 g, 1,50 mmol) у апсолутном етанолу (5,0 mL) је након додатка три капи глацијалне сирћетне киселине рефлугована током 18 сати. После хлађења балона, додато је 10,0 mL дестиловане воде, након чега је суспензија мешана 30 минута на собној температури. Талог је затим процеђен, осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl₂ и рекристалисан из ацетона.

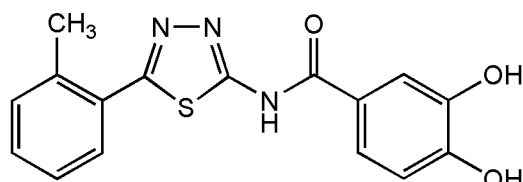
Поступак за синтезу једињења 11. Чврсти NaBH₄ (0,593 g, 15,67 mmol) је уз мешање полако додаван суспензији формираног имида **10** (0,297 g, 1,00 mmol) у метанолу (10,0 mL), након чега је мешање добијене смесе на собној температури настављено још 1 сат. Затим је додато 20,0 mL дестиловане воде, као и 2М HCl до постизања pH 2. Формирани талог је мешан на собној температури још 30 минута. Након хлађења балона у фрижидеру током 1,5 сата, талог је процеђен, осушен у ексикатору изнад анхидрованог CaCl₂ и рекристалисан из 50% воденог раствора EtOH.

3.6.1. 3,4-Дихидрокси-N-(5-фенил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид × H₂O (**9а**):

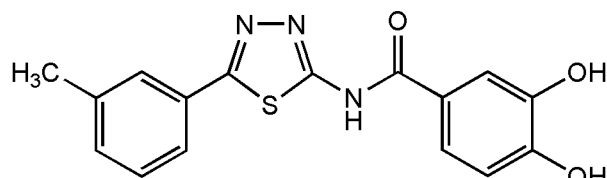


Беж прашкаста супстанца; принос: 0,20 g (64%); T.T. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 6,86 (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H); 7,53-7,62 (m, 5H, Ar-H); 7,97 (s, 1H, Ar-H); 7,97

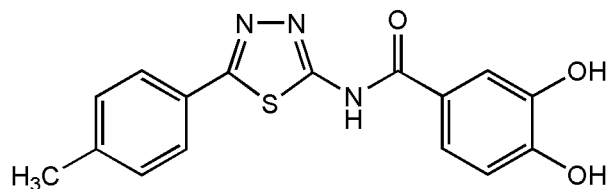
(d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H); 9,44 (s, 1H, OH); 9,93 (s, 1H, OH); 12,81 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 115,22, 116,09, 120,94, 122,37, 126,89 (2C), 129,33 (2C), 130,39, 130,47, 145,26, 150,48, 159,56, 161,75, 164,73; IR (KBr, cm⁻¹): 3524, 3414, 3107, 1632, 1614, 1592, 1520, 1291, 754; Израчунато за C₁₅H₁₁N₃O₃S×H₂O (331,35 g/mol): C, 57,50; H, 3,54; N, 13,41; S, 10,23; Нађено: C, 57,48; H, 3,55; N, 13,39; S, 10,25.

3.6.2. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(*o*-толил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид (9б):

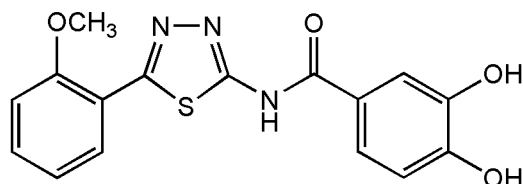
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,20 g (61%); Т.Т. 246-247 °C (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 2,53 (s, 3H, CH_3); 6,86 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H); 7,31-7,42 (m, 3H, Ar-H); 7,55-7,62 (m, 2H, Ar-H); 7,70 (d, 1H, $J = 7,0$ Hz, Ar-H); 9,77 (bs, 2H, OH); 12,43 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 21,27, 115,28, 116,11, 121,01, 122,46, 126,47, 129,57, 129,93, 130,12, 131,52, 136,41, 145,34, 150,55, 160,06, 161,31, 164,85; IR (KBr, cm^{-1}): 3404, 3154, 2955, 1685, 1604, 1527, 1300, 1204, 753; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (327,36 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,72; H, 4,01; N, 12,82; S, 9,82.

3.6.3. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(*m*-толил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид $\times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (9в):

Беж прашкаста супстанца; принос: 0,24 g (74%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 2,39 (s, 3H, CH_3); 6,86 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,32 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,41 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,56 (s, 1H, Ar-H); 7,61 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,73-7,79 (m, 2H, Ar-H); 9,72 (bs, 2H, OH); 12,60 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 21,05, 115,29, 116,14, 121,02, 122,45, 124,12, 127,41, 129,26, 130,38, 131,19, 138,80, 145,35, 150,56, 159,59, 161,92, 164,78; IR (KBr, cm^{-1}): 3407, 3281, 3187, 1685, 1608, 1542, 1521, 1320, 1298, 1107, 749; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (354,39 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,71; H, 3,99; N, 12,87; S, 9,79.

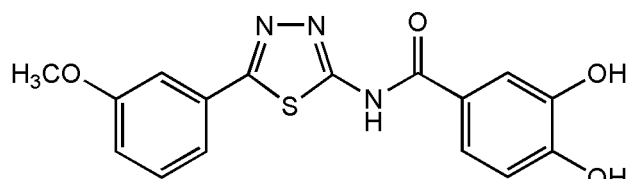
3.6.4. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(*p*-толил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид $\times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (9г):

Бела прашкаста супстанца; принос: 0,23 g (70%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 2,36 (s, 3H, CH_3); 6,86 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,34 (d, 2H, $J_{AB} = 8,0$ Hz, Ar-H); 7,55 (s, 1H, Ar-H); 7,59 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,85 (d, 2H, $J_{BA} = 8,0$ Hz, Ar-H); 9,54 (bs, 1H, OH); 9,74 (bs, 1H, OH); 12,75 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 19,04, 113,17, 114,03, 118,89, 120,34, 124,76 (2C), 125,63, 127,84 (2C), 138,31, 143,23, 148,42, 157,22, 159,77, 162,61; IR (KBr, cm^{-1}): 3397, 3168, 2956, 1682, 1609, 1532, 1459, 1309, 1298, 1206, 810; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S} \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (336,37 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,74; H, 4,02; N, 12,85; S, 9,81.

3.6.5. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(2-метоксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид**× 0,5H₂O (9d):**

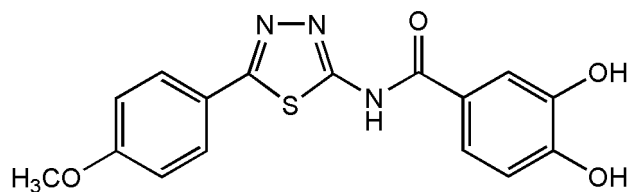
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,23 g (68%); Т.Т. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 4,03 (s, 3H, OCH₃); 6,86 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,13 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,27

(d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,50 (dd, 1H, *J* = 8,0 и 1,4 Hz, Ar-H); 7,55 (s, 1H, Ar-H); 7,70 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 8,30 (dd, 1H, *J* = 8,0 и 1,4 Hz, Ar-H); 10,41 (bs, 2H, OH and 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 54,14, 110,37, 113,16, 113,99, 117,09, 118,85, 19,14, 120,46, 125,32, 129,60, 143,26, 148,41, 153,32, 154,45, 159,27, 162,60; IR (KBr, cm⁻¹): 3398, 3153, 2944, 1681, 1601, 1545, 1526, 1314, 1299, 1260, 1018, 747; Израчунато за C₁₆H₁₃N₃O₄S×0,5H₂O (352,37 g/mol): C, 55,97; H, 3,82; N, 12,24; S, 9,34; Нађено: C, 55,99; H, 3,81; N, 12,26; S, 9,35.

3.6.6. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(3-метоксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид × 0,5H₂O (9h):

Светлобраон прашкаста супстанца; принос: 0,24 g (70%); Т.Т. > 250 °C (разлагање,); ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,85 (s, 3H, OCH₃); 6,86 (d,

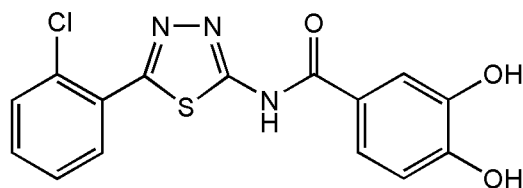
1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,09 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz, Ar-H); 7,40-7,62 (m, 5H, Ar-H); 9,68 (bs, 2H, OH); 12,72 (bs, 1H, NH); ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-d₆): 55,49, 111,47, 115,27, 116,12, 116,65, 119,55, 121,00, 122,40, 130,60, 131,69, 145,33, 150,55, 159,78 (2C), 161,62, 164,79; IR (KBr, cm⁻¹): 3386, 3169, 2940, 1676, 1605, 1526, 1457, 1304, 1217, 1217, 1112, 745; Израчунато за C₁₆H₁₃N₃O₄S×0,5H₂O (352,37 g/mol): C, 55,97; H, 3,82; N, 12,24; S, 9,34; Нађено: C, 55,94; H, 3,83; N, 12,23; S, 9,31.

3.6.7. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(4-метоксифенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид × H₂O (9e):

Беж прашкаста супстанца; принос: 0,18 g (51%); Т.Т. > 250 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆): 3,83 (s, 3H, OCH₃); 6,85 (d, 1H, *J* = 8,4 Hz, Ar-H); 7,08 (d, 2H, *J*_{AB} = 8,8 Hz, Ar-H); 7,54 (s, 1H, Ar-H); 7,59 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, Ar-H); 7,90 (d, 2H, *J*_{BA}

= 8,8 Hz, Ar-H); 9,66 (bs, 2H, OH); 12,65 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,56, 114,84 (2C), 115,27, 116,11, 120,96, 122,49, 123,00, 128,51 (2C), 145,33, 150,51, 159,04, 161,06, 161,61, 164,72; IR (KBr, cm^{-1}): 3397, 3181, 2937, 1663, 1607, 1521, 1462, 1305, 1258, 1178, 829; Израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}\times\text{H}_2\text{O}$ (361,38 g/mol): C, 55,97; H, 3,82; N, 12,24; S, 9,34; Нађено: C, 55,98; H, 3,80; N, 12,27; S, 9,36.

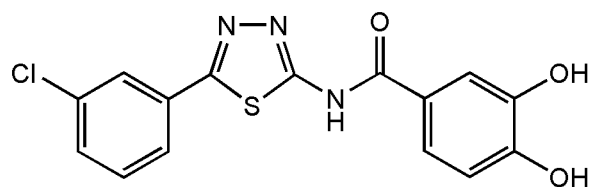
3.6.8. *N*-(5-(2-Хлорофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид $\times \text{H}_2\text{O}$ (9ж):



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,21 g (61%); T.T. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,86 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,49-7,62 (m, 4H, Ar-H); 7,65-7,72 (m, 1H, Ar-H);

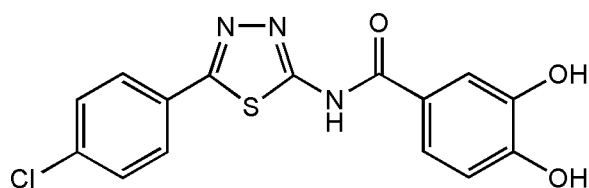
8,12-8,17 (m, 1H, Ar-H); 9,59 (bs, 1H, OH); 9,80 (bs, 1H, OH); 12,85 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 115,28, 116,14, 121,05, 122,27, 127,90, 129,25, 130,64, 130,93, 131,16, 131,75, 145,34, 150,60, 157,86, 161,25, 164,84; IR (KBr, cm^{-1}): 3420, 3160, 2969, 1684, 1606, 1527, 1451, 1300, 1203, 753; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}\times\text{H}_2\text{O}$ (365,80 g/mol): C, 51,80; H, 2,90; N, 12,08; S, 9,22; Нађено: C, 51,82; H, 2,91; N, 12,10; S, 9,20.

3.6.9. *N*-(5-(3-Хлорофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид (9з):

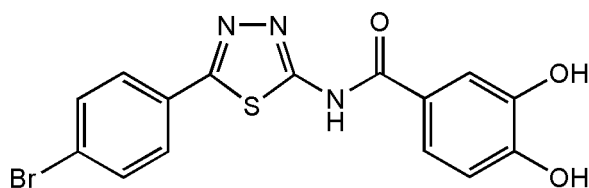


Бела прашкаста супстанца; принос: 0,19 g (54%); T.T. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,86 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,53-7,63 (m, 4H, Ar-H); 7,87-7,95 (m, 1H, Ar-H);

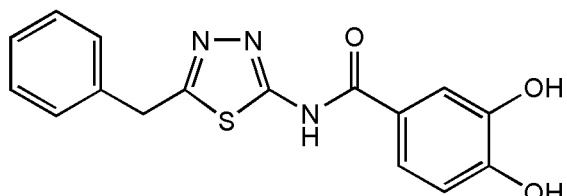
8,02 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, Ar-H); 9,42 (s, 1H, OH); 9,95 (s, 1H, OH); 12,88 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 115,26, 116,11, 121,01, 122,22, 125,78, 126,16, 130,24, 131,30, 132,35, 134,08, 145,32, 150,59, 160,08, 160,33, 164,74; IR (KBr, cm^{-1}): 3421, 3365, 3114, 1659, 1617, 1601, 1518, 1300, 1256, 1115, 753; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ (347,78 g/mol): C, 51,80; H, 2,90; N, 12,08; S, 9,22; Нађено: C, 51,78; H, 2,89; N, 12,09; S, 9,23.

3.6.10. *N*-(5-(4-Хлорофенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид (9и):

Бела прашкаста супстанца; принос: 0,22 g (64%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,86 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,55-7,62 (m, 2H, Ar-H); 7,60 (d, 2H, $J_{\text{AB}} = 8,4$ Hz, Ar-H); 7,99 (d, 2H, $J_{\text{BA}} = 8,4$ Hz, Ar-H); 9,47 (bs, 1H, OH); 9,91 (bs, 1H, OH); 12,84 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 115,19, 116,06, 120,96, 122,22, 128,50 (2C), 129,21, 129,35 (2C), 135,04, 145,25, 150,50, 159,80, 160,58, 164,66; IR (KBr, cm^{-1}): 3426, 3182, 1681, 1657, 1614, 1603, 1523, 1455, 1298, 1234, 829; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}_3\text{S}$ (347,78 g/mol): C, 51,80; H, 2,90; N, 12,08; S, 9,22; Нађено: C, 51,84; H, 2,90; N, 12,06; S, 9,19.

3.6.11. *N*-(5-(4-Бромфенил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид $\times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (9ј):

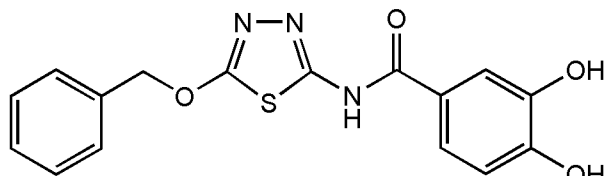
Светложута прашкаста супстанца; принос: 0,21 g (54%); Т.Т. > 250 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 6,85 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,54-7,61 (m, 2H, Ar-H); 7,73 (d, 2H, $J_{\text{AB}} = 8,4$ Hz, Ar-H); 7,92 (d, 2H, $J_{\text{BA}} = 8,4$ Hz, Ar-H); 9,48 (bs, 1H, OH); 9,89 (bs, 1H, OH); 12,84 (bs, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 115,26, 116,12, 121,01, 122,29, 123,83, 128,78 (2C), 129,63, 132,34 (2C), 145,32, 150,57, 159,90, 160,72, 164,76; IR (KBr, cm^{-1}): 3391, 3199, 1675, 1605, 1521, 1455, 1299, 1209, 1071, 749; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{BrN}_3\text{O}_3\text{S} \times 0,5\text{H}_2\text{O}$ (401,24 g/mol): C, 45,93; H, 2,57; N, 10,71; S, 8,18; Нађено: C, 45,92; H, 2,58; N, 10,73; S, 8,19.

3.6.12. *N*-(5-Бензил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид (9к):

Сива прашкаста супстанца; принос: 0,19 g (57%); Т.Т. > 250 °C (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 4,36 (s, 2H, CH_2); 6,82 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,24-7,37 (m, 5H, Ar-H); 7,48 (s, 1H, Ar-H); 7,52 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 9,38 (s, 1H, OH); 9,88 (s, 1H, OH); 12,57 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 35,20, 115,23, 116,04, 120,85, 122,48, 127,06, 128,84 (2C), 128,91 (2C), 137,92, 145,27, 150,40, 159,90, 163,53, 164,67; IR (KBr, cm^{-1}): 3433, 3347, 3063, 1673, 1612, 1527, 1454, 1304, 1218, 750; Израчунато за

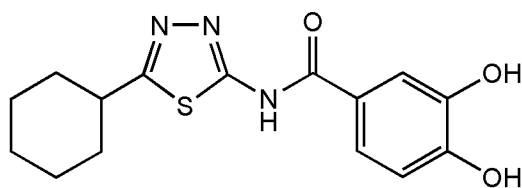
$C_{16}H_{13}N_3O_3S$ (327,36 g/mol): C, 58,70; H, 4,00; N, 12,84; S, 9,80; Нађено: C, 58,65; H, 3,98; N, 12,80; S, 9,83.

3.6.13. 3,4-Дихидрокси-N-(5-(феноксиметил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)бензамид (9л):



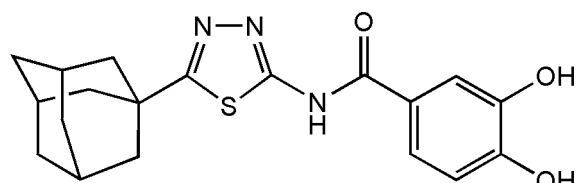
Беж прашкаста супстанца; принос: 0,26 g (75%); T.T. > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 5,51 (s, 2H, CH_2); 6,84 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,00 (t, 1H, $J = 7,4$ Hz, Ar-H); 7,08 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,33 (t, 2H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,51 (s, 1H, Ar-H); 7,56 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 9,43 (bs, 1H, OH); 9,89 (s, 1H, OH); 12,73 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 64,22, 115,08 (2C), 115,26, 116,09, 120,97, 121,65, 122,31, 129,72 (2C), 145,32, 150,54, 157,48, 160,42, 160,73, 164,82; IR (KBr, cm^{-1}): 3391, 3178, 1684, 1601, 1531, 1497, 1455, 1299, 1231, 746; Израчунато за $C_{16}H_{13}N_3O_4S$ (343,36 g/mol): C, 55,97; H, 3,82; N, 12,24; S, 9,34; Нађено: C, 55,99; H, 3,83; N, 12,21; S, 9,35.

3.6.14. N-(5-Циклохексил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид (9љ):



Беж прашкаста супстанца; принос: 0,20 g (64%); T.T. > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 1,17-1,55 (m, 5H, CH_2 циклохексил); 1,62-1,79 (m, 3H, CH_2 циклохексил); 2,01-2,07 (m, 2H, CH_2 циклохексил); 2,97-3,10 (m, 1H, CH_2 циклохексил); 6,83 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,50 (s, 1H, Ar-H); 7,54 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 9,59 (bs, 2H, OH); 12,52 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 25,49 (2C), 25,58, 33,15 (2C), 38,84, 115,20, 116,05, 120,82, 122,65, 145,25, 150,32, 158,92, 164,66, 169,01; IR (KBr, cm^{-1}): 3391, 3294, 2932, 2855, 1686, 1614, 1552, 1524, 1312, 1293, 1193, 656; Израчунато за $C_{15}H_{17}N_3O_3S$ (319,38 g/mol): C, 56,41; H, 5,37; N, 13,16; S, 10,04; Нађено: C, 56,37; H, 5,38; N, 13,15; S, 10,05.

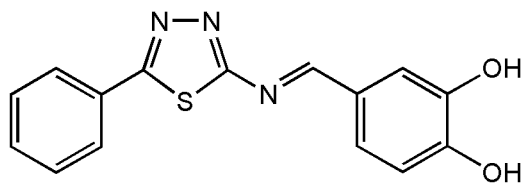
3.6.15. N-(5-(Адамантан-1-ил)-1,3,4-тиадиазол-2-ил)-3,4-дихидроксибензамид (9м):



Бела прашкаста супстанца; принос: 0,25 g (67%); T.T. > 250 °C; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): 1,75 (s, 6H, $H_{адамантил}$); 2,02 (s, 9H, $H_{адамантил}$); 6,82 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,50 (s, 1H, Ar-H); 7,54 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 9,74 (bs, 2H, OH); 12,12 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 28,09 (3C), 36,07 (3C), 37,37, 42,90 (3C), 115,19, 116,03,

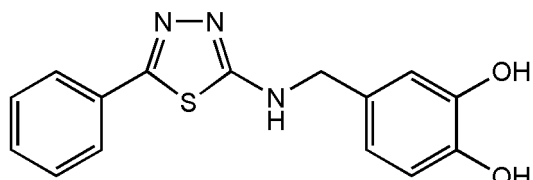
120,80, 122,65, 145,26, 150,35, 158,84, 164,68, 173,44; IR (KBr, cm^{-1}): 3381, 3220, 2906, 2851, 1637, 1607, 1525, 1448, 1296, 1226, 744; Израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ (371,45 g/mol): C, 61,44; H, 5,70; N, 11,31; S, 8,63; Нађено: C, 61,47; H, 5,69; N, 11,33; S, 8,65.

3.6.16. 4-(((5-Фенил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)имино)метил)бензен-1,2-диол (10):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,24 g (53%); Т.Т. 228-229 °C (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 6,92 (d, 1H, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,39 (dd, 1H, $J = 8,2$ и 1,8 Hz, Ar-H); 7,51 (d, 1H, $J = 1,8$ Hz, Ar-H); 7,54-7,58 (m, 3H, Ar-H); 7,93-7,98 (m, 2H, Ar-H); 8,79 (s, 1H, N=CH); 9,65 (s, 1H, OH); 10,18 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 115,02, 115,84, 125,44, 126,23, 127,20 (2C), 129,38 (2C), 130,14, 131,11, 146,01, 151,96, 165,02, 168,56, 174,15; IR (KBr, cm^{-1}): 3533, 2924, 1603, 1585, 1516, 1297, 1291, 1192, 762; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (297,33 g/mol): C, 60,59; H, 3,73; N, 14,13; S, 10,78; Нађено: C, 60,56; H, 3,74; N, 14,12; S, 10,76.

3.6.17. 4-(((5-Фенил-1,3,4-тиадиазол-2-ил)амино)метил)бензен-1,2-диол (11):



Жута прашкаста супстанца; принос: 0,24 g (80%); Т.Т. 217-218 °C (разлагање); ^1H NMR (200 MHz, DMSO-d_6): 4,35 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, CH_2); 6,64 (dd, 1H, $J = 8,0$ и 1,6 Hz, Ar-H); 6,69 (t, 1H, $J = 8,0$ Hz, Ar-H); 6,79 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, Ar-H); 7,44-7,52 (m, 3H, Ar-H); 7,73-7,77 (m, 2H, Ar-H); 8,34 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, NH); 8,85 (s, 1H, OH); 8,94 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO-d_6): 48,21, 115,33, 115,52, 118,84, 126,38 (2C), 129,21 (2C), 129,28, 129,67, 130,99, 144,65, 145,28, 156,00, 168,56; IR (KBr, cm^{-1}): 3431, 3205, 3108, 2955, 1607, 1580, 1573, 1516, 1425, 1362, 1289, 1195, 761; Израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ (299,35 g/mol): C, 60,19; H, 4,38; N, 14,04; S, 10,72; Нађено: C, 60,17; H, 4,39; N, 14,05; S, 10,71.

3.7. Испитивање антиоксидативне активности DPPH тестом

Антиоксидативна активност синтетизованих деривата 1,3,4-тиадиазола одређена је применом методе уклањања слободних DPPH радикала коју су описали Kumarasamy и сарадници.²¹⁴ За одређивање активности уклањања DPPH радикала, 1,0 mL раствора DPPH у метанолу (0,2 mM за **3a-ж** и **3'a-ж**, 0,05 mM за **6a-л**, **9a-м**, **10** и **11**) помешано је са истом запремином тестираних једињења (једињења **3a-ж** и **3'a-ж**, **9a**, **10** и **11** растворена су у метанолу, а једињења **6a-л**, **9a-м** у 1 %-ном (v/v) раствору DMSO-а у метанолу). После инкубације у мраку током 30 минута, мерена је апсорбанца смесе на 517 nm. Активност уклањања DPPH радикала израчуната је као:

$$\text{Активност уклањања DPPH радикала (\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100,$$

где је A_c апсорбанца контроле (DPPH у метанолу) и A_s апсорбанца узорка. Резултати су изражени у облику IC_{50} вредности, односно концентрације једињења која смањује количину почетног DPPH радикала за 50%. Као позитивна контрола коришћене су аскорбинска киселина или нордихидрогвајаретинска киселина. Резултати, представљени као средња вредност $\pm$ SD три независна експеримента, израчунати су коришћењем Microsoft Excel или OriginPro8 статистичког софтвера.

3.8. Испитивање антиоксидативне активности ABTS тестом

Активност уклањања ABTS радикал-катјона једињења **9a-г**, **9ж-и**, **9к**, **10** и **11** одређена је по незнатно измењеној методи коју су описали Re и сарадници.²¹⁵ Формирање $ABTS^{*+}$ постигнуто је додатком $Na_2S_2O_8$ (2,45 mM) 7 mM-арном раствору ABTS-а и инкубацијом у мраку током 16 сати. За потребе експеримента, добијени раствор разблажен је метанолом, како би се постигла апсорбанца од $0,70 \pm 0,02$ на 734 nm. Тестирана једињења растворена су у DMSO-у тако да се добије концентрација од 10 mM, а затим су разблажена метанолом ради добијања концентрација у опсегу од 20 до 40 μ M. Одређивање активности уклањања $ABTS^{*+}$ извршено је мешањем 100,0 μ L раствора испитиваних једињења, припремљених у различитим концентрацијама, са 900,0 μ L раствора $ABTS^{*+}$ -а. Након инкубације у мраку на собној температури током 30 минута, мерена је апсорбанца на таласној дужини од 734 nm. Проценат активности неутралисања ABTS радикал-катјона израчунат је као:

$$\text{Активност уклањања ABTS}^{*+} (\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100,$$

где је A_c апсорбанца ABTS^{*+} раствора без узорка тестираног једињења (контрола), а A_s апсорбанца иситиваног узорка. Концентрација тестираног једињења која смањује почетну количину слободних радикала за 50% (IC_{50}), израчуната је коришћењем једначине добијене линеарном регресионом анализом у Microsoft Excel статистичком софтверу.

3.9. Испитивање цитотоксичне активности

Цитотоксичност једињења **3a-ж**, **3'a-ж** и **6a-л** испитана је према на три хумане малигне ћелијске линије: HeLa (аденокарцином цервикса), HL-60 (акутна промијелоцитна леукемија) и A549 (карцином плућа), као и према MRC-5 нормалним хуманим фибробластима плућа користећи методу коју су детаљнио описали Крстић и сарадници.¹⁷³ Све тестиране ћелијске линије су поручене из компаније ATCC (енг. *American Type Culture Collection*, Manassas, VA, Сједињене Америчке Државе). HeLa (2000 ћелија по бунарчићу), A549 (5000 ћелија по бунарчићу) и MRC-5 ћелије (5000 ћелија по бунарчићу) засејане су у бунарчиће микротитарских плоча са 96 бунарчића којима је након 20 сати додато пет различитих концентрација једињења (у опсегу од 12,5-200 μM или од 6,25-100 μM за једињења **3a-ж** и **3'a-ж** и у опсегу од 6,25-100 μM или 3,125-50 μM за једињења **6a-л**). Узорци контролних ћелија инкубирани су само у хранљивој подлози. HL-60 ћелије (7000 ћелија по бунарчићу) засејане су 2 сата пре додавања раствора једињења. Основни раствор једињења направљен је у DMSO-у у концентрацији од 10 mM за једињења **3a-ж** и **3'a-ж** и у концентрацији од 5 mM за једињења **6a-л**. Ниво преживљавања ћелија одређен је помоћу МТТ теста у складу са претходно успостављеном Mosmann-овом методом,²¹⁶ коју су модификовали Ohno и Abe.²¹⁷ Као позитивна контрола у свим експериментима коришћен је хемиотерапеутски лек - цисплатина.

3.10. Одређивање нивоа интрацелуларног ROS-а

Хумане малигне HL-60 ћелије инкубиране су са субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'б**, **3'в** и **3'д** (6,5 μ M за **3в**, 6 μ M за **3'в** и 6,25 μ M за **3'б** и **3'д**), док су хумане HeLa ћелије инкубиране са субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (10 μ M за свако једињење) током 24 сата. Након тога, ћелије су сакупљене, испране фосфатним пуфером (PBS) и инкубиране у 30 μ M-арном раствору 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетата (Sigma Aldrich) у PBS-у током 45 минута на 37°C, према стандардној експерименталној процедури коју су раније описали Mihailović и сарадници.¹⁷² Ћелије су затим испране PBS-ом. Део узорака ћелија третираних једињењима **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** анализиран је одмах, док је други део узорака третираних овим једињењима, као и узорци третирани једињењима **3в**, **3'б**, **3'в** и **3'д**, изложен раствору водоник-пероксида (5 mM за ћелије третиране једињењима **3в**, **3'б**, **3'в** и **3'д** и 10 mM за ћелије третиране једињењима **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**) током 30 минута на 37°C како би се индуковало стварање ROS-а. Након инкубације са H₂O₂, ћелије су сакупљене и испране PBS-ом, а интензитет зелене флуоресценције коју емитује генерисани дихлорофлуоресцеин измерен је на FACSCalibur проточном цитометру (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, Сједињене Америчке Државе). Подаци су анализирани коришћењем CELLQuest компјутерског софтвера (BD Biosciences).

3.11. Анализа фаза ћелијског циклуса

Хумане малигне HL-60 ћелије третиране су IC₅₀ и 2IC₅₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж**, док су хумане HeLa ћелије третиране IC₅₀ и 2IC₅₀ концентрацијама једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** током 24 сата. Након третмана, ћелије су сакупљене, испране PBS-ом и фиксирани у 70%-тном етанолу, према стандардној процедури.²¹⁸ Узорци ћелија чувани су на -20 °C најмање недељу дана пре бојења. Након тога, ћелије су сакупљене центрифугирањем, испране, ресуспендоване у PBS-у који садржи рибонуклеазу А и инкубиране на 37°C током 30 минута. Ћелијама је затим додат раствор пропидијум јодида, који служи за бојење ДНК. Проценци малигних ћелија унутар специфичних фаза ћелијског циклуса одређени су коришћењем BD FACSCalibur проточног цитометра. Анализе добијених података изведене су помоћу

CELLQuest компјутерског софтвера. Подаци о дистрибуцији ћелија по фазама ћелијског циклуса представљени су као средња вредност $\pm$ SD за три независна експеримента. Статистички значајна разлика између контролних и ћелијских узорака одређена је коришћењем једносмерног ANOVA и Dunnett-овог теста. За статистички значајне сматране су р вредности испод 0,05.

3.12. Морфолошка анализа типа ћелијске смрти

Морфолошка процена врсте ћелијске смрти изазване једињењима **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** извршена је флуоресцентном микроскопијом HL-60 ћелија обојених акридин оранж/етидијум бромидом, према процедури коју су описали Крстић и сарадници.¹⁷³ За визуализацију је коришћен Carl Zeiss PALM MicroBeam микроскоп са Axio Observer.Z1 и AxioCam MRm камером (филтери: Alexa 488 и Alexa 568).

3.13. Одређивање циљних каспаза

У циљу испитивања механизма ћелијске смрти, односно идентификације каспаза укључених у апоптозу HL-60 ћелија изазвану једињењима **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** и апоптозу HeLa ћелија изазвану једињењима **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**, одређен је проценат ових ћелија у субG1 фази ћелијског циклуса, након инкубације са инхибиторима каспаза, према познатој процедури.¹⁷³ Малигне ћелије су првобитно инкубиране током 2 сата у присуству специфичног инхибитора каспазе: Z-DEVD-FMK, инхибитор каспазе 3, Z-IETD-FMK, инхибитор каспазе 8 и Z-LEHD-FMK, инхибитор каспазе 9, (R&D Systems, Minneapolis, Сједињене Америчке Државе), чија је финална концентрација износила 40 μ M.

3.14. *In vitro* експеримент ангиогенезе – "*endothelial cell tube formation*"

Могућа антиангиогенетска својства једињења испитивана су на EA.hy926 ћелијској линији која је успостављена хибридизацијом примарних хуманих ћелија умбиликалне вене и тиогуанин-резистентног клона хуманих ћелија карцинома плућа A549.^{174,175,219} Ћелије EA.hy926 засејане су на матриксном матригелу (Corning® Matrigel®, Corning: каталогски број 356234) и инкубиране са субтоксичним IC₂₀ концентрацијама испитиваних једињења (30 µM за **3в** и **3'в**, 50 µM за **3'е** и **3'ж**, 6,5 µM за **6а**, **6в** и **6ђ** и 8 µM за **6л**). После 20 сати инкубације, ћелије EA.hy926 су посматране на инвертном фазно-контрастном микроскопу и фотографисане.

3.15. Анализа експресије гена и микроРНК

Малигне хумане ћелије HL-60 и HeLa засејане су у фласковима за ћелијске културе површине 75 cm² (5×10⁶ HL-60 ћелија по боци и 4×10⁶ HeLa ћелија по фласку). Након 2 сата, HL-60 ћелије третиране су субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **3в**, **3'в**, **3'е** и **3'ж** (6,5 µM за **3в**, 6 µM за **3'в**, **3'е** и **3'ж**), док су HeLa ћелије третиране IC₂₀ концентрацијама једињења **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (10 µM за свако једињење) након 24 сата. Контролне ћелије су расле само у хранљивом медијуму. После двадесетчетворочасовне инкубације, ћелије су сакупљене, испране и узорци су затим чувани на -80°C до даљих анализа. За потребе квантитативне PCR анализе у реалном времену (RT-qPCR), укупна РНК је изолована из HL-60, односно HeLa ћелија, коришћењем TRI Reagent®-а (Sigma) према упутствима произвођача. RNA RIN (RNA Integrity Number) одређен је применом Agilent RNA 6000 Nano Kit-а (Agilent Technologies) на апарату 2100 Bionalyzer, а концентрација РНК одређена је спектрофотометријски на апарату BioSpec Nano (Shimadzu). Експресија гена квантификована је двостепеном реакцијом реверзне транскрипције након које је уследила метода квантитативног PCR-а у реалном времену (RT-qPCR). High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Литванија) коришћен је за добијање примарне комплеметарне ДНК (cDNA) са случајним прајмерима помоћу RT-PCR-а. Као узорак за MultiScribe™ реверзну транскриптазу коришћено је 2µg укупне РНК.

Реакција амплификације комплеметарне ДНК изведена је применом експеримента за гене *MMP2* (Hs01548727_m1), *MMP9* (Hs00957562_m1), *VEGFA* (Hs00900055_m1) експериментима, као и *TIMP3* (Hs00165949_m1) експериментом у случају HeLa ћелија третираних једињењима **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**, коришћењем TaqMan технологије. Нивои експресије микроРНК у HeLa ћелијама мерени су применом Stem-loop реверзне транскрипције и RT-qPCR, применом Taqman експеримента miR-21 (ID 000397), miR-133b (ID 002247), miR-155 (ID 002623) и miR-206 (ID 000510). Одређивање експресије гена заснива се на 20X мешавини неозначених PCR прајмера и TaqMan® MGB проби. Као ендogene контроле коришћени су нивои експресије глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназе (GAPDH), за коју су подаци добијени применом TaqMan-овог теста (Applied Biosystems - Hs02758991_g1), као и мали нуклеарни RNA-RNU6 B (ID001093). Вредности експресије израчунате су компаративном $\Delta\Delta C_t$ методом коришћењем 7500 System SDS софтвера (Applied Biosystems, Foster City, Калифорнија, Сједињене Америчке Државе). Ове експерименте који укључују и PCR реакције детаљније су описали Зес и сарадници.¹⁷⁹

3.16. Интеракције са ДНК

3.16.1. Снимање UV/Vis апсорпционих спектра

За експерименте је коришћена дезоксирибонуклеинска киселина изолована из говеђег тимуса (липолизована, полимеризована, набављена од Serva, Heidelberg) (*CT-DNA*). Основни раствор добијен је растварањем ДНК у Tris пуферу (10 mM Tris-HCl pH 7,9) преко ноћи на 4 °C. Овај стандардни раствор чуван је на 4 °C и стабилан је неколико дана. Однос UV апсорбанци на 260 и 280 nm, A_{260}/A_{280} , раствора *CT-DNA* је од 1,89-2,01, што сугерише да је ДНК у довољној мери ослобођена од протеина. Концентрација ДНК (3,16 mg/mL) одређена је на основу UV апсорбанце на 260 nm коришћењем екстинкционог коефицијента $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.²²⁰ Халконски деривати 1,3,4-тиадиазола, **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л**, растворени су у диметил сулфоксиду, чиме су добијени основни раствори ових једињења, чија је концентрација 2 mM.

За UV-Vis мерења, раствору ДНК (10,0 μL *CT-DNA*) додата је мала запремина основног раствора једињења (20,0 μL) а затим и 40 mM-арни раствор бикарбонатног

пуфера, pH 8,4. Реакциона смеша је инкубирана на 37 °C током 90 минута са повременим интезивним мешањем. UV-Vis спектар сниман је на UV-1800 Shimadzu UV/Visible спектрофотометру са опсегом од 200 до 800 nm, у кварцним киветама дужине 1,0 cm. Снимани су такође и спектри једињења истих концентрација, као и спектри *CT-DNA*.

Проценат хиперхромизма или хипохромизма одређен је из једначине (1):

$$\{[(\epsilon_{\text{DNA}} + \epsilon_{\text{јед}}) - \epsilon_{\text{B}}]/(\epsilon_{\text{DNA}} + \epsilon_{\text{јед}})\} \times 100 \quad (1)$$

где су ϵ_{DNA} екстинкциони коефицијент *CT-DNA*, $\epsilon_{\text{јед}}$ екстинкциони коефицијент слободног једињења и ϵ_{B} екстинкциони коефицијент насталог комплекса *CT-DNA* са једињењем.

Титрација током које се мери апсорбанца је изведена при константној концентрацији испитиваног једињења уз постепен пораст концентрације дволанчане *CT-DNA*. За сваку концентрацију ДНК праћена је апсорбанца на 259 nm. Константа везивања K_b одређена је коришћењем једначине (2).²²¹

$$[\text{DNA}] \times (\epsilon_a + \epsilon_f)^{-1} = [\text{DNA}] \times (\epsilon_b - \epsilon_f)^{-1} + K_b^{-1} \times (\epsilon_b - \epsilon_f)^{-1} \quad (2)$$

где је ϵ_a једнако односу апсорбанца/[једињење], ϵ_f је екстинкциони коефицијент слободног једињења и ϵ_b екстинкциони коефицијент везаног једињења. График зависности $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ према $[\text{DNA}]$ дао је нагиб и пресек праве једнак $1/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ и $(1/K_b)(1/(\epsilon_b - \epsilon_f))$, респективно. Константа везивања K_b израчунава се из односа нагиба и пресека праве.

3.16.2. Снимање флуоресцентних спектра

Компетитивне интеракције 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида **6a**, **6b**, **6f** и **6l** и флуоресцентног Hoechst-a 33258 (H), са *CT-DNA* проучаване су праћењем промена у интензитету флуоресценције раствора H-ДНК након додатка једињења. Реакционе смесе које садрже 100 μM *CT-DNA* (израчунато према фосфату) у 1,0 mL 40 mM-арног раствора бикарбоната (pH 8,4) најпре су третиране са 1,5 μL 1%-ног раствора H (финална концентрација је 28 μM) током 20 минута и смеша је анализирана мерењем флуоресценције. Затим су сукцесивно додаване растуће концентрације једињења, а промене у интензитету флуоресценције мерене су коришћењем Thermo Scientific Lumina Fluorescence спектрометра (Финска) опремљеног ксенонском лампом јачине

150 W. Прорези за ексцитациони и емисиони зрак фиксирани су на 10 nm. Сва мерења изведена су ексцитовањем на 350 nm и снимањем емисионих спектра у опсегу од 390-550 nm. Раствор Н-CT-DNA коришћен је као контрола. Раствори самих једињења **6a**, **6b**, **6h** и **6l** нису показали способност флуоресценције при примењеним условима. Сви добијени подаци анализирани су према Stern–Volmer-овој једначини (3):²²²

$$I_0/I = 1 + K_r \quad (3)$$

где I_0 и I представљају интензитете флуоресценције Н-CT-DNA у одсуству, односно у присуству једињења, K је константа квенчовања, док је r однос концентрације везаног једињења и концентрације везане ДНК ($r = [\text{једињење}]/[\text{CT-DNA}]$). Вредност константе K израчуната је из односа нагиба и пресека праве у графику односа I_0/I према r .

Примарни спектри свих спектрометријских мерења обрађени су помоћу OriginPro 9.0 софтверског пакета.

3.16.3. Експерименти са плазмидном ДНК

Плазмид pUC19 (дужине 2686 bp, купљен од Sigma-Aldrich-a, Сједињене Америчке Државе) добијен је трансформацијом у хемијски компетентним ћелијама *Escherichia coli* сој XL1 blue. Амплификација клона изведена је према протоколу за узгој *Escherichia coli* културе преко ноћи у LB (енг. *Lysogeny broth*) медијуму на 37 °C,²²³ а за пречишћавање је коришћен кит Qiagen Plasmid plus Maxi. На крају, ДНК је растворена у 10 mM-арном Tris-HCl пуферу и складиштена на -20 °C. Концентрација плазмидне ДНК (0,460 µg/µL) одређена је мерењем апсорбанце раствора ДНК на таласној дужини од 260 nm. Једна оптичка јединица одговара концентрацији од 50 µg/mL дволанчане ДНК.

Плазмидна ДНК (1,0 µL, 460 ng/µL) инкубирана је са различитим запреминама 2 mM-арног стандардног раствора једињења (0,5, 1,0 1,5, 2,0 2,5, 3,0 и 4,0 µL) у 20,0 µL реакционе смесе у 40 mM-арном бикарбонатном пуферу (pH 8,4) на 37 °C, током 90 минута, уз повремено мешање. Реакција је прекинута кратким центрифугирањем на 10000 обртаја по минути и додатком 5,0 µL пуфера за наношење узорака (0,25 % бромфенил плаво, 0,25 % ксилен цијанол и 30% глицерол у ТАЕ пуферу, pH 8,24 (40 mM Tris-ацетат, 1 mM EDTA)) и анализирана електрофорезом.

Интеракције тестираних једињења са плазмидом pUC19 у присуству Fe(II) и Fe(III) јона изведене су на следећи начин: раствори запремине 20,0 μL који садрже 1,0 μL или 2,0 μL FeSO₄ (8 mM, свеже направљен раствор у стерилној води), односно 1,0 μL или 2,0 μL FeCl₃ (8 mM, свеже направљен раствор у стерилној води) инкубирани су на 37 °C са 4,0 μL 2 mM-арног раствора 1,3,4-тиадиазол-халконских хибрида **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** у бикарбонатном пуферу, током 60 минута. Након тога је реакционој смеси додат 1,0 μL pUC19 и инкубација је настављена још 90 минута. Реакциона смеша је повремено мешана и реакција је прекинута центрифугирањем при 10000 обртаја по минути и додавањем 5,0 μL пуфера за наношење узорака, након чега је анализирана електрофорезом.

3.16.4. Електрофореза на агарозном гелу

Узорци су анализирани помоћу електрофорезе на 1%-ном агарозном гелу (Amersham Pharmacia-Biotech, Inc) припремљеном у TAE пуферу pH 8,24. Електрофореза је изведена при константном напону (80 V) све док бромфенол плаво није прешло преко 75% гела. Коришћена је Submarine Mini-gel Electrophoresis Unit (Hoeffer HE 33) са EPS 300 напајањем. Након електрофорезе, гел је бојен током 30 минута потапањем у водени раствор етидијум бромид (0,5 $\mu\text{g/mL}$). Обојени гел осветљен је помоћу UV transilluminator Vilber-Lourmat (Француска) на 312 nm и фотографисан Nikon Coolpix P340 дигиталном камером кроз DEEP YELLOW 15 филтер (TIFFEN, Сједињене Америчке Државе).

3.16.5. Испитивање генотоксичности комет тестом

Нормалне хумане MRC-5 ћелије третиране су са четири различите концентрације одабраних једињења, **6а**, **6в**, **6ђ** и **6л** (25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM и 3,125 μM за свако једињење), током 24 сата. Субтоксична IC₂₀ концентрација, одређена МТТ тестом након двадесетчетворочасовног третмана, била је 25 μM за сва четири једињења. Након инкубације, ћелије су сакупљене, испране фосфатним пуфером (PBS),

суспендоване у медијуму за замрзавање (RPMI са 10% DMSO-а и 20% FCS-а), а затим су узорци ћелија залеђени на -80°C .

За процену оштећења молекула ДНК коришћена је гел електрофореза појединачних ћелија,²²⁴ са извесним модификацијама. Залеђене MRC-5 ћелије одмрзнуте су додатком 1,0 mL PBS-а замрзнутом аликвоту од 0,5 mL и одмах након одмрзавања суспендоване ћелије су центрифугиране 10 минута при 2000 обртаја по минути на 4°C . Пелет је суспендован у PBS-у и испирање је поновљено. Концентрација ћелија подешена је PBS-ом на $2,5 \times 10^5/\text{mL}$ и 30,0 μL суспензије ћелија помешано је са 140,0 μL 1%-тне агарозе ниске тачке топљења на 37°C . Дванаест капи (10,0 μL) суспензије агарозе и ћелија нанешено је на плочицу обложену агарозом. Ћелије су лизирани потапањем плочица у раствор који садржи 2,5 M NaCl, 0,1 M Na_2EDTA , 10 mM Tris са 1% Triton X-100 (pH 10) током 1 сата на 4°C . Узорци су денатурирани потапањем у раствор за електрофорезу (0,3 M NaOH, 0,001 M Na_2EDTA) у хоризонталној кадици за електрофорезу, током 20 минута. Електрофореза је трајала 30 минута при волтажном градијенту од 1V/cm на температури од 4°C . Узорци су затим фиксирани потапањем у 70%-тни етанол током 10 минута, а затим и десетоминутним потапањем у апсолутни етанол. ДНК је обојена потапањем плочица у раствор боје SYBR Gold (Invitrogen) током 30 минута у мраку. Раствор за бојење припремљен је према упутству произвођача у 10 mM-арном Tris-у, 1 mM-арном EDTA пуферу, pH 8. Обојене плочице су након 30 минута два пута испране водом и остављене у мраку да се осуше. Анализирање комета извршено је коришћењем полуаутоматизованог система за анализу слике (Comet Assay IV, Perceptive Instruments). На сваком гелу анализирано је 50 нуклеоида, а резултати су изражени као проценат интезитета репа (% ДНК у репу комете). Сви експерименти поновљени су три пута, а средња вредност за 50 комета израчуната је за сваки дупликат гела у експерименту, након чега је израчуната средња вредност две средње вредности. Просечни проценат ДНК у репу израчунат је из независних троструких експеримената коришћењем Microsoft Excel софтвера.

4. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата приказаних у поглављу „*Наши радови*“, могу се извести следећи закључци.

Кондензацијом претходно припремљених 5-супституисаних 2-амино-1,3,4-тиадиазола и хлорида киселина синтетизоване су три серије амидних деривата 1,3,4-тиадиазола који у својој структури садрже фенолне хидроксилне групе. Такође је синтетизован имино аналог (**10**) амидног 1,3,4-тиадиазолског деривата **9a**, а његовом редукцијом и одговарајући аминокиселински аналог (**11**). Структуре нових једињења потврђене су помоћу NMR и IR спектроскопских техника, као и елементарном анализом.

Новосинтетизовани амидни деривати 1,3,4-тиадиазола показали су умерен до одличан капацитет за неутрализацију DPPH радикала у поређењу са неким од коришћених референтних стандарда. Такође, амидни деривати треће серије показали су бољу активност неутралисања ABTS радикал катјона од полазне фенолне киселине, као и стандардних антиоксиданата, аскорбинске киселине и нордихидрогвајаретинске киселине.

Испитана је цитотоксична активност деривата 1,3,4-тиадиазола серије А и Б према три малигне ћелијске линије и према нормалној ћелијској линији фибробласта плућа, а резултати су упоређени са цитотоксичном активношћу цисплатине. Деривати серије А показали су најснажнију активност према ћелијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60) и ћелијама карцинома плућа (A549), док су деривати серије Б показали умерену до добру цитотоксичну активност према ћелијама аденокарцинома грлића материце (HeLa), а такође и према ћелијама акутне промијелоцитне леукемије (HL-60). Цитотоксичност свих деривата серије А и већине серије Б према ћелијској линији фибробласта плућа (MRC-5) значајно је нижа у односу на малигне ћелије, што указује на добру селективност ових једињења. Осим тога, сва испитивана једињења показују нижу цитотоксичну активност према MRC-5 ћелијској линији од референтног хемотерапеутика, цисплатине.

Третирање HL-60 ћелија једињењима **3v** и **3'v** серије А довело је до значајног повећања нивоа интрацелуларног ROS-а, чије је стварање изазвано дејством водоник-пероксида, у поређењу са нивоом ROS-а у контролним HL-60 ћелијама које су расле у хранљивом медијуму током 24 h и затим изложеним дејству водоник-пероксида. Претходно третирање HeLa ћелија субтоксичним IC₂₀ концентрацијама једињења **6a** и **6h** серије Б довело је до благог повећања нивоа ROS-а

чије је стварање изазвано водоник-пероксидом, док је двадестчетворочасовни третман овим једињењима, без додавања водоник-пероксида, изазвао смањење нивоа интрацелуларног ROS-а у односу на ниво ROS-а у контролним ћелијама.

Третман HL-60 ћелија одабраним једињењима серије А и HeLa ћелија одабраним једињењима серије Б доводи до повећања процента малигних ћелија у субG1 фази ћелијског циклуса у поређењу са контролним ћелијама, указујући тиме на способност испитиваних једињења да изазову ћелијску смрт у њима. Ћелијску смрт у HeLa ћелијама деривати серије Б изазивају активирањем каспазе 3, каспазе 8 и каспазе 9, док индуковање ћелијске смрти у HL-60 ћелијама дериватима серије А бар делимично зависи од активације каспазе 3 и каспазе 8.

Једињења **3в** и **3'в** серије А била су најефектнија у инхибицији ангиогенезе *in vitro*.

Одабрани деривати серије А довели су до смањења нивоа експресије *MMP2* и *VEGFA* гена у HL-60 ћелијама у поређењу са нивоима ових гена у контролним узорцима, док су сви одабрани деривати серије Б снизили нивое експресије *MMP2* гена у HeLa ћелијама, што указује на њихове супресивне ефекте на инвазивност и метастазирање малигних ћелија *in vitro*.

Испитан је утицај четири амидна деривата серије Б на нивое експресије микроРНК у HeLa ћелијама. Свако од тестираних једињења довело је до снижења нивоа експресије неке од испитиваних онкогених микроРНК, што указује на њихова обећавајућа тумор-супресорска својства.

Резултати испитивања интеракција са ДНК сугеришу да се тиадиазол-халконски хибриди серије Б слабо везују у малој бразди хеликса *CT-DNA*, индукују слабо оштећење ДНК у ћелијској култури и штите плазмидну ДНК од оштећења изазваног гвожђем (II). Ипак, истискивање флуоресценте боје везане за ДНК, активност оштећења ДНК и резултати комет теста указују на потенцијал ових једињења за оштећење ДНК.

5. ЛИТЕРАТУРА

1. Demirbas, A.; Sahin, D.; Demirbas, N.; Karaoglu, S. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2896.
2. Chitra, S.; Paul, N.; Muthusubramanian, S.; Manisankar, P.; Yogeeswari, P.; Sriram, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4897.
3. Cressier, D.; Prouillac, C.; Hernandez, P.; Amourette, C.; Diserbo, M.; Lion, C.; Rima, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 5275.
4. Song, Y.; Connor, D. T.; Sercel, A. D.; Sorenson, R. J.; Doubleday, R.; Unangst, P. C.; Roth, B. D.; Beylin, V. G.; Gilbertson, R. B.; Chan, K.; Schrier, D. J.; Guglietta, A.; Bornemeier, D. A.; Dyer, R. D. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1161.
5. Chapleo, C. B.; Myers, P. L.; Smith, A. C.; Stilling, M. R.; Tulloch, I. F.; Walter, D. S. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 7.
6. Hill, D. L. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1980**, *4*, 215.
7. Camoutsis, C.; Geronikaki, A.; Ciric, A.; Sokovic, M.; Zoumpoulakis, P.; Zervou, M.; *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 160.
8. (a) deStevens, G.; Eager, M.; Tarby, C. *Heterocycles* **1993**, *35*, 763; (b) Newton, C. G.; Ramsden, C. A. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 2965; (c) Remko, M.; Walsh, O. A.; Richards, W. G. *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 336, 156.
9. Rzeski, W.; Matysiak, J.; Szerszen, M. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3201.
10. (a) Kuo, H. M.; Li, S. Y.; Sheu, H. S.; Lai, C. K. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7331; (b) Kaleta, Z.; Makowski, B. T.; Soos, T.; Dembinski, R. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1625; (c) Garfunkle, J.; Ezzili, C.; Rayl, T. J.; Hochstatter, D. G.; Hwang, I.; Boger, D. L. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4392.
11. Augustine, J. K.; Vairaperumal, V.; Narasimhan, S.; Alagarsamy, P.; Radhakrishnan, A. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 9989.
12. Kumar, D.; Kumar, N. M.; Chang, K. H.; Shah, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4664.
13. Freund, M.; Meinecke, C. *Ber. Deut. Chem. Gesell.* **1896**, *29*, 2511.
14. Mullick, P.; Khan, S. A.; Verma, S.; Alam, O. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 1011.
15. Zienty, F. B. *US Patent* **1952**, 2623, 877; *Chem. Abstr.* **1953**, *47*, 9356.
16. Rajak, H.; Agarawal, A.; Parmar, P.; Thakur, B. S.; Veerasamy, R.; Sharma, P. C.; Kharya, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5735.
17. Pulvermacher, G. *Ber. Deut. Chem. Gesell.* **1894**, *27*, 613.
18. Schettelkopf, A. W.; Gros, L.; Blair, D. E.; Frearson, J. A.; van Aalten, D. M. F.; Gilbert, I. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8334.
19. Young, G.; Eyre, W. *J. Chem. Soc.* **1901**, 79, 54.

20. Matysiak, J.; Opolskib, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4483.
21. Guha, P. K.; Roy-Choudhury, S. K. *J. Indian Chem. Soc.* **1928**, *5*, 163; *Chem Abstr* **1929**, *23*, 1397.
22. Sayed, A. R. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4490.
23. Wei, M. X.; Feng, L.; Li, X. Q.; Zhou, X. Z.; Shao, Z. H. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3340.
24. Kadi, A. A.; Al-Abdullah, E. S.; Shehata, I. A.; Habib, E. E.; Ibrahim, T. M.; El-Emam, A. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5006.
25. Wang, T.; Miao, W.; Wu, S.; Bing, G.; Zhang, X.; Qin, Z.; Yu, H.; Qin, X.; Fang, J. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29*, 959.
26. Farrar, J. M.; Patel, M. K.; Kaszynski, P.; Young, V. G. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 931.
27. (a) Hall, M. D.; Salam, N. K.; Hellowell, J. L.; Fales, H. M.; Kensler, C. B.; Ludwig, J. A.; Szakacs, G.; Hibbs, D. E.; Gottesman, M. M. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3191. (b) Yousef, T. A.; El-Gammal, O. A.; Ghazy, S. E.; Abu El-Reash, G. M. *J. Mol. Struct.* **2011**, *1004*, 271.
28. Hassan, A. A.; Mourad, A. F. E.; El-Shaieb, K. M.; Abou-Zied, A. H.; Dopp, D. *Heteroat. Chem.* **2003**, *14*, 535.
29. Fromm, E. L.; Nerz, K. *Liebigs Ann. Chem.* **1923**, 433, 1.
30. (a) Padmavathi, V.; Reddy, S. N.; Reddy, G. D.; Padmaja, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4246; (b) Padmavathi, V.; Reddy, G. D.; Reddy, S. N.; Mahesh, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 1367; (c) Padmavathi, V.; Reddy, S. N.; Mahesh, K. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2009**, *57*, 1376.
31. (a) Padmavathi, V.; Reddy, G. S.; Mohan, A. V. N.; Mahesh, K. *Arkivoc* **2008**, xvii, 48; (b) Linganna, N.; Rai, K. M. L. *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 4611.
32. Joule, J. A.; Mills, K. *Heterocyclic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, **2008**.
33. Kornis, G. I. *1,3,4-Thiadiazoles. Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* **1996**, *4*, 379.
34. Hipler, F.; Fischer, R. A.; Müller, J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 731.
35. (a) Vergne, F.; Bernardelli, P.; Lorthiois, E.; Pham, N.; Proust, E.; Oliveira, C.; Mafroud, A. K.; Royer, F.; Wrigglesworth, R.; Schellhaas, J. K.; Barvian, M. R.; Moreau, F.; Idrissi, M.; Tertre, A.; Bertin, B.; Coupe, M.; Berna, P.; Soulard, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4607; (b) Ohta, H.; Ishizaka, T.; Tatsuzuki, M.; Yoshinaga, M.; Iida, I.; Yamaguchi, T.; Tomishima, Y.; Futaki, N.; Todac, Y.; Saito, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1111; (c) Cho, N. S.; Hwang, H. J.; Kim, J. G.; Suh, I. H.

- Heterocycles* **2001**, 55, 579.
36. Polvonov, K.; Sabirov, Q.; Shakhidoyatov, K. M. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2003**, 39, 228.
 37. (a) Butler, R. N.; Smyth, G. M.; McArdle, P.; Cunningham, D. J. *Chem. Soc., Perkin Trans.* **2002**, 1, 2851; (b) Katritzky, A. R.; Wang, Z. Q.; Offerman, R. J. *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, 27, 139; (c) Pappalardo, S.; Bottino, F.; Tringali, C. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 405.
 38. Nagao, Y.; Iimori, H.; Nam, K. H.; Sano, S.; Shiro, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 1660.
 39. Lachance, N.; Gareau, Y.; Guiral, S.; Huang, Z.; Isabel, E.; Leclerc, J. P.; Leger, S.; Martins, E.; Nadeau, C.; Oballa, R. M.; Ouellet, S. G.; Powell, D. A.; Ramtohul, Y. K.; Tranmer, G. K.; Trinh, T.; Wang, H.; Zhang, L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 980.
 40. Vachhani, D. D.; Sharma, A.; Van der Eycken, E. *J. Org. Chem.* **2012**, 77, 8768.
 41. Bonini, B. F.; Maccagnani, G.; Wagenaar, A.; Thijs L.; Zwanenburg, El. *J. C.S. Perkin I*, **1972**, 2490.
 42. Chauvière, G.; Bouteille, B.; Enanga, B.; de Albuquerque, C.; Croft, L. S.; Dumas, M.; Pèriè, J. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 427.
 43. Hagen, H.; Kohler, R-D.; Fleig, H. *Liebigs Ann. Chem.* **1980**, 1980, 1216.
 44. Firoozi, F.; Javidnia, K.; Kamali, M.; Fooladi, A.; Foroumadi, A.; Shafiee, A. *J. Heterocycl. Chem.* **1995**, 32, 123.
 45. Berg, S. S.; Sharp, B. W. *Eur. J. Med. Chem.*, **1975**, 10, 171.
 46. Foroumadi, A.; Emami, S.; Pournourmohammadi, S.; Kharazmi, A.; Shafiee, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 1346.
 47. Carvalho, A. S.; Da Silva, F. E.; Santa-Rita, M. R.; De Castro, L. S.; Fraga, A. M. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5967.
 48. Saito, T.; Saheki, N.; Hatanaku, M.; Ishimaru, T. *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 73.
 49. Srogl, J.; Liu, W.; Marshall, D.; Liebeskind, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9449.
 50. Spalińska, K.; Foks, H.; Kedzia, A.; Wierzbowska, M.; Kwapisz, E.; Gębska, A.; Zilkółwska-Klinkosz, M. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2006**, 181, 609.
 51. Barrett, G. D.; Catalano, G. J.; Deaton, N. D.; Hassell, M. A.; Long, T. S.; Miller, B. A.; Miller, R. L.; Ray, A. J.; Samano, V.; Shewchuk, M. L.; Wells-Knecht, J. K.; Willard, H. D. Jr.; Wright, L. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1735.
 52. Wu, M. T. *J. Heterocycl. Chem.* **1972**, 9, 31.

53. Warrener, R.N.; Margetić, D.; Tiekink, E. R. T.; Russell, R. A. *Synlett* **1997**, 196.
54. Cousin, P.; Anselme, G.; Courtois, G.; Mesnard, D. *Synth. Commun.* **1999**, 29, 145.
55. Kantlehner, W.; Haug, E.; Kinzy, W.; Scherr, O.; Ivanov, I. C. *Z. Naturforsch., B* **2004**, 59, 366.
56. Kidwai, M.; Kohli, S.; Kumar, P. *J. Chem. Res. (S)* **1998**, 9, 586.
57. Raslan, M. A.; Khalil, M. A. *Heteroatom Chem.* **2003**, 14, 114.
58. Werber, G.; Buccheri, F.; Gentile, M. *J. Heterocycl. Chem.* **1977**, 14, 1263.
59. Young, R. W.; Wood, K. H.; Eichler, J. A.; Vaughan, J. R., Jr.; Anderson, G.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, 78, 4649.
60. Martins Alho, M. A.; DBAccorso, N. B. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, 37, 811.
61. El-Ashry, E. S. H.; Nassr, M. A.; Kilany, Y .E.; Mousaad, A. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, 60, 3405.
62. Hough, T. L.; Jones, G. P. *J. Heterocycl. Chem.* **1984**, 21, 1377.
63. Jacobsen, E. J.; Mitchell, M. A.; Hendges, S. K.; Belonga, K. L.; Skaletzky, L. L.; Stelzer, L. S.; Lindberg, T. J.; Fritzen, E. L.; Schostarez, H. J.; OBSullivan, T. J.; Maggiora, L. L.; Stuchly, C. W.; Laborde, A. L.; Kubicek, M. F.; Poorman, R. A.; Beck, J. M.; Miller, H. R.; Petzold, G. L.; Scott, P. S.; Truesdell, S. E.; Wallace, T. L.; Wilks, J. W.; Fisher, C.; Goodman, L. V.; Kaytes, P. S.; Ledbetter, S. R.; Powers, E. A.; Vogeli, G.; Mott, J. E.; Trepod, C. M.; Staples, D. J.; Baldwin, E. T.; Finzel, B. C. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 1525.
64. Ortega-Luoni, P.; Vera, L.; Astudillo, C.; Guzman, M.; OrtegaLopez, P. *J. Chil. Chem. Soc.* **2007**, 52, 1.
65. Cunico, W.; Gomes, C. R. B.; Ferreira, M. L. G.; Capri, L. R.; Santos, M. R. L.; Sá, P. M.; Boechat, N.; Bastos, M. M.; Maciel L. C.; Mayer, L. M. U. *Lett. Org. Chem.* **2007**, 4, 505.
66. Hartmann, H. Z. *Chem.* **1971**, 11, 460.
67. Coburn, R. A.; Bhoosan, B. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 3868.
68. Santagati, A.; Santagati, M.; Russo, F.; Ronsisvalle, G. *J. Heterocycl. Chem.* **1988**, 25, 949.
69. Pilgram, K.; Skiles, R. D. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 1575.
70. Shafiee, A.; Lalezari, I. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, 12, 675.
71. Tsuji, T. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, 28, 489.
72. Islyaikin, K. M.; Danilova, A. E.; Yagodarova, D. L.; Rodriguez-Morgade, S. M.; Torres, T. *Org. Lett.* **2001**, 3, 2153.

73. Kurzer, F. J. *Chem. Soc. C* **1971**, 2927.
74. Rüfenacht, K. *Helv. Chim. Acta* **1968**, 51, 518.
75. Kristinsson, H.; Winkler, T. *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 2606.
76. Clerici, F.; Pocar, D.; Guido, M.; Loche, A.; Perlino, V.; Brufani, M. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 931.
77. Kramer, J. B.; Boschelli, D. H.; Connor, D. T., *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, 31, 1439.
78. (a) Pernerstorfer, J.; Brands, M.; Schirok, H.; Stelte-Ludwig, B.; Woltering, E. *Tetrahedron* **2004**, 60, 8627. (b) Tian, H.; Yu, Z.; Hagfeldt, A.; Kloo, L.; Sun, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 9413. (c) Hipler, F.; Winter, M.; Fischer, R. A. *J. Mol. Struct.* **2003**, 658, 179.
79. Andreani, A.; Leoni, A.; Locatelli, A.; Morigi, R.; Rambaldi, M.; Simon, A. W.; Senn-Bilfinger, J. *Arzneim.-Forsch. Drug Res.* **2000**, 50, 550.
80. Gupta, K. J.; Yadav, K. R.; Dudhe, R.; Sharma, K. P. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2010**, 2, 1493.
81. Grynberg, N.; Santos, C. A.; Echevarria, A. *Anti Cancer Drugs* **1997**, 8, 88.
82. Senff-Ribeiro, A.; Echevarria, A.; Silva, F. E.; Franco, R. C.; Veiga, S. S.; Oliveira, B. M. *Br. J. Cancer* **2004**, 91, 297.
83. Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 1551.
84. Enanga, B.; Ariyanayagam, M. R.; Stewart, M. L.; Barrett, M. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 3368.
85. Peddie, B. A.; Little, P. J. *J. Antimicrob. Chemother.* **1979**, 5, 195.
86. Schmidt, M.; Bastians, H.; *Drug Resist. Updat.* **2007**, 10, 162.
87. Owens, B. *Nat. Med.* **2013**, 19, 1550.
88. Iizawa, Y.; Okonogi, K.; Hayashi, R.; Iwahi, T.; Yamazaki, T.; Imada, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 100.
89. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, 39, 44.
90. (a) Limon-Pacheco, J.; Gonsebatt, M. E. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2009**, 674, 137; (b) Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. *Clin. Chim. Acta* **2003**, 333, 19.
91. Khan, I.; Ali, S.; Hameed, S.; Rama, N. H.; Hussain, M. T.; Wadood, A.; Uddin, R.; Ul-Haq, Z.; Khan, A.; Ali, S.; Choudhary, M. I. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5200.
92. Chidananda, N.; Poojary, B.; Sumangala, V.; Kumari, N. S.; Shetty, P.; Arulmoli, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 51, 124.

93. Genis, C.; Sippel, K. H.; Case, N.; Cao, W.; Avvaru, B. S.; Tartaglia, L. J.; Govindasamy, L.; Tu, C.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; Rosser, C. J.; McKenna, R. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1322.
94. Özensoy, Ö .; Puccetti, L.; Fasolis, G.; Arslan, O.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4862.
95. Ilies, A. M.; Vullo, D.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Ilies, M.; Caproiu, T. M.; Pastorekova, S.; Supuran, T. C. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2187.
96. Almajan, L. G.; Innocenti, A.; Puccetti, L.; Manole, G.; Barbuceanu, S.; Saramet, I.; Scozzafava, A.; Supuran, T. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2347.
97. Yang, H. X.; Wen, Q.; Zhao, T. T.; Sun, J.; Li, X.; Xing, M.; Lu, X.; Zhu, L. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1181.
98. Matysiak, J.; Nasulewicz, A.; Pełczynska, M.; Switalska, M.; Jaroszewicz, I.; Opolski, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 475.
99. Chou, Y. J.; Lai, Y. S.; Pan, L. S.; Jow, M. G.; Chern, W. J.; Guh, H. J. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *66*, 115.
100. Aliabadi, A.; Eghbalian, E.; Kiani, A.; *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2013**, *16*, 1133.
101. Zhang, Y.; Wang, X.; Liu, W.; Yang, Y.; Tang, J.; Zhu, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 6356.
102. Halliwell, B.; Gutteridge, M. C. J.; Cross, E. C. *J. Lab. Clin. Med.* **1992**, *119*, 598.
103. Gutteridge, M. C. J. *Free Radic. Res. Com.* **1993**, *19*, 141.
104. Kim, D.; Jeond, S.; Lee, C. *Food Chem.* **2003**, *81*, 321.
105. Clifford, M. N.; Scalbert, A. *J. Sci. Food Agric*, **2000**, *80*, 1118.
106. Maga, A. J. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1978**, *10*, 323.
107. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727.
108. Fernandez de Simon, B.; Perz-Ilzarbe, J.; Hernandez, T.; Gomez-Cordoves, C.; Estrella, I. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1531.
109. Tomas-Barberan, A. F.; Clifford, N. M. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1024.
110. Herrmann, K. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, *28*, 315.
111. Torronen, R.; Hakkinen, S.; Karenlampi, S.; Mykkanen, H. *Cancer Lett.*, **1997**, *114*, 191.
112. Dudonne, S.; Vitrac, X.; Coutiere, P.; Woillez, M.; Meerillon, -M. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1768.
113. Firuzi, O.; Javidnia, K.; Gholami, M.; Soltani, M.; Miri, R. *Nat. Prod. Commun.* **2010**,

- 5, 261.
114. Li, F.; Bo-Tao, X.; Xiang-Rong, X.; Xin-Sheng, Q.; Ren-You, G.; Hua-Bin, L. *Molecules*, **2010**, *15*, 8602.
115. Li, F.; Bo-Tao, X.; Ren-You, G.; Yuan, Z.; Xiang-Rong, X.; En-Qin, X.; Hua-Bin, L. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 2112.
116. Tanaka, K.; Sakai, S.; Tomiyama, S.; Nishiyama, T.; Yamada, F. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 2677.
117. Tomiyama, S.; Sakai, S.; Nishiyama, T.; Yamada, F. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 299.
118. van Acker, S. A.; Koymans, M. H. L.; Bast, A. *Free Radical Biol. Med.* **1993**, *15*, 311.
119. Burton, W. G.; Doba, T.; Gabe, J. E.; Hughes, L.; Lee, L. F.; Prasad, L.; Ingold, U. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7053.
120. Wright, S. J.; Johnson, R. E.; DiLabio, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1173.
121. Pratt, A. D.; DiLabio, A. G.; Brigati, G.; Pedulli, F. G.; Valgimigli, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4625.
122. Bowry, W. V.; Ingold, U. K. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 27.
123. Watanabe, A.; Noguchi, N.; Fujisawa, A.; Kodama, T.; Tamura, K.; Cynshi, O.; Niki, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5438.
124. Gotoh, N.; Noguchi, N.; Tsuchiya, J.; Morita, K.; Sakai, H.; Shimasaki, H.; Niki, E. *Free Radical Res.* **1996**, *24*, 123.
125. Noguchi, N.; Okimoto, Y.; Tsuchiya, J.; Cynshi, O.; Kodama, T.; Niki, E. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *347*, 141.
126. Rice-Evans, A. C.; Miller, J. N.; Paganga, G. *Free Radical Biol. Med.* **1996**, *20*, 933.
127. Dziedzic, Z. S.; Hudson, J. F. B.; *Food Chem.* **1983**, *12*, 205.
128. Baum, B. O.; Perun, A. L. *Soc. Plast. Eng. Trans.* **1962**, *2*, 250.
129. Velika, B.; Kron, I. *Free Rad. Antiox.* **2012**, *2*, 62.
130. Sroka, Z.; Cisowski, W. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 753.
131. Huang, Y. W.; Cai, Z. Y.; Zhang, B. Y. *Nutr. Cancer* **2010**, *62*, 1.
132. Ghasemzadeh, A.; Ghasemzadeh, N. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 6697.
133. Tanaka, T.; Tanaka, T.; Tanaka, M. *J. Exp. Clin. Med.* **2011**, *3*, 27.
134. Chia-Jui, W.; Gow-Chin, Y. *Cancer Treat. Rev.* **2012**, *38*, 76.
135. Vaz, J. A.; Almeida, G. M.; Ferreira, I. C. F. R.; Martins, A.; Vasconcelos, M. H. *Food Chem.* **2012**, *132*, 482.
136. Heleno, S. A.; Ferreira, I. C. F. R.; Calhella, R. C.; Esteves, A. P.; Queiroz, M. J. R. P.

- Food Res. Int.* **2014**, 55, 170.
137. Zadernowski, R.; Pierzynowska-Korniak, G.; Ciepielewska, D.; Fornal, L. *Fagopyrum* **1992**, 12, 27.
138. Weston, J. R.; Mitchell, R. K.; Allen, L. K. *Food Chem.* **1999**, 64, 295.
139. Ihantola-Vormisto, A.; Summanen, J.; Kankaanranta, H.; Vuorela, H.; Asmawi, Z.; Moilanen, E. *Planta Med.*, **1997**, 63, 518.
140. Hermann, M.; Kapiotis, S.; Hofbauer, R.; Seelos, C.; Held, I.; Gmeiner, B. *Free Radical Biol. Med.* **1999**, 26, 1253.
141. Exner, M.; Hermann, M.; Hofbauer, R.; Kapiotis, S.; Speiser, W.; Held, I.; Seelos, C.; Gmeiner, M. K. B. *FEBS Lett.* **2000**, 470, 47.
142. Ashidate, K.; Kawamura, M.; Mimura, D.; Tohda, H.; Miyazaki, S.; Teramoto, T.; Yamamoto, Y.; Hirata, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, 513, 173.
143. Wojdyło, A.; Oszmianski, J.; Czemerys, R. *Food Chem.* **2007**, 105, 940.
144. Saxena, M.; Saxena, J.; Pradhan, A. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2012**, 16, 130.
145. Joshi, R.; Gangabhagirathi, R.; Venu, S.; Adhikari, S.; Mukherjee, T. *Free Radical Res.* **2012**, 46, 11.
146. Piazzon, A.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Mattivi, F.; Mandoj, F.; Nardini, M. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 12312.
147. Kim, Y. J. *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, 30, 1052.
148. Kaur, M.; Velmurugan, B.; Rajamanickam, S.; Agarwal, R.; Agarwal, C. *Pharm. Res.* **2009**, 26, 2133.
149. You, B. R.; Moon, H. J.; Han, Y. H.; Park, W. H. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 1334.
150. Kratz, J. M.; Andrighetti-Frohner, C. R.; Leal, P. C.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Trybala, E.; Bergstrom, T.; Barardi, C. R. M.; Simoes, C. M. O. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31, 903.
151. Heleno, S. A.; Ferreira, I. C. F. R.; Esteves, A. P.; Ćirić, A.; Glamočlija, J.; Martins A.; Soković, M.; Queiroz, M. J. R. P. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, 58, 95.
152. Ferreira, I. C. F. R.; Barros, L.; Abreu, R. M. V. *Curr. Med. Chem.* **2009**, 16, 1543.
153. Shi, G. F.; An, L. J.; Jiang, B.; Guan, S.; Bao, Y. M. *Neurosci. Lett.* **2006**, 403, 206.
154. Alves, M. J.; Ferreira, I. C. F. R.; Froufe, H. J. C.; Abreu, R. M. V.; Martins, A.; Pintado, M. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, 115, 346.
155. Liu, W. H.; Hsu, C. C.; Yin, M. C. *Phytother. Res.* **2008**, 22, 53.
156. Yip, E. C. H.; Chan, A. S. L.; Pang, H.; Tam, Y. K.; Wong, Y. H. *Cell Biol. Toxicol.* **2006**, 22, 293.

157. Yin, M. C.; Lin, C. C.; Wu, H. C.; Tsao, S. M.; Hsu, C. K. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6468.
158. An, L. J.; Guan, S.; Shi, G. F.; Bao, Y. M.; Duan, Y. L.; Jiang, B. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 436.
159. Heleno, S. A.; Ferreira, I. C. F. R.; Ćirić, A.; Glamočlija, J.; Martins, A.; Queiroz, M.-J. R. P.; Soković, M. *Food Funct.* **2014**, *5*, 2521.
160. Lou, Z.; Wang, H.; Rao, S.; Sun, J.; Ma, C.; Li, J. *Food control* **2012**, *25*, 550.
161. Villaño, D.; Fernández-Pachón, M. S.; Troncoso, A. M.; García-Parrilla, M. C. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *538*, 391.
162. Halliwell, B.; Gutteridge, M. J. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England, 3rd edn, **1999**.
163. Madhavi, L. D.; Deshpande, S. S.; Salunkhe, K. D. *Food antioxidants—technological, toxicological and health perspectives*, Marcel Dekker Inc., New York, **1996**.
164. González, A. P.; Galano, A.; Alvarez-Idaboy, J. R. *New J. Chem.*, **2014**, *38*, 2639.
165. Dawood, M. K.; Farghaly, A. T. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **2017**, *27*, 477.
166. Aliabadi, A. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2016**, *16*, 1301.
167. Haider, S.; Alam, S. M.; Hamid, H. *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *92*, 156.
168. Reis, B.; Martins, M.; Barreto, B.; Milhazes, N.; Garrido, E.M.; Silva, P.; Garrido, J.; Borges, F. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6986.
169. Lee, Y.-T.; Hsieh, Y.L.; Yeh, Y.-H.; Huang, C.-Y. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 85806.
170. Saito, S.; Kawabata, J. *Helv. Chim. Acta.* **2006**, *89*, 1395.
171. Ivanović, N.; Jovanović, L.; Marković, Z.; Marković, V.; Joksović, M.D.; Milenković, D.; Đurđević, P.T.; Ćirić, A.; Joksović, L. *ChemSelect*, **2016**, *1*, 3870.
172. Mihailović, N.; Marković, V.; Matić, I.Z.; Stanisavljević, N.S.; Jovanović, Ž.S.; Trifunović, S.; Joksović, L. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 8550.
173. Krstić, N. M.; Matić, I. Z.; Juranić, Z. D.; Novaković, I.; Sladić, D. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *143*, 365.
174. Aranda, E.; Owen, G. I. *Biol. Res.* **2009**, *42*, 377.
175. Matić, I. Z.; Aljančić, I.; Vajs, V.; Jadranin, M.; Gligorijević, N.; Milosavljević, S.; Juranić, Z. D. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 1291.
176. Wang, Z.; Dabrosin, C.; Yin, X.; Fuster, M. M.; Arreola, A.; Rathmell, W. K.; Generali, D.; Nagaraju, G. P.; El-Rayes, B.; Ribatti, D.; Chen, Y. C.; Honoki, K.; Fujii, H.; Georgakilas, A. G.; Nowsheen, S.; Amedei, A.; Niccolai, E.; Amin, A.; Ashraf, S. S.; Helferich, B.; Yang, X.; Guha, G.; Bhakta, D.; Ciriolo, M. R.; Aquilano, K.; Chen,

- S.; Halicka, D.; Mohammed, S. I.; Azmi, A.; Bilsland, A.; Keith, N.; Jensen, L. D. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, 35, S224.
177. Klein, G.; Vellenga, E.; Fraaije, M. W.; Kamps, W. A.; de Bont, E. S. J. M. *Crit. Rev. Oncol. Hemtaol.* **2004**, 50, 87.
178. Kampen, K. R.; ter Elst, A.; de Bont, E. S. J. M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2013**, 70, 1307.
179. Zec, M.; Srdić-Rajić, T.; Krivokuća, A.; Janković, R.; Todorović, T.; Andjelković, K.; Radulović, S. *Med.Chem.* **2014**, 10, 759.
180. Mahapatra, D. K.; Bharti, S. K.; Asati, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 98, 69.
181. Kerru, N.; Singh, P.; Koorbanally, N.; Raj, R.; Kumar, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, 142, 179.
182. Ullrich, T.; Ghobrial, M.; Weigand, K.; Marzinzik, A. L. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 1109.
183. Jovanović, B. Ž.; Mišić-Vuković, M.; Marinković, A. D.; Csanádi, J. *J. Mol. Struct.* **1999**, 482–483, 371–374.
184. Markaryan, Sh. A.; Tavadyan, L. A.; Kocharyan, G. G.; Shahinyan, G. A. *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2013**, 62, 1625.
185. Valgimigli, L.; Banks, J. T.; Ingold, K. U.; Luszytk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9966.
186. Procházková, A.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. *Fitoterapia* **2011**, 82, 513.
187. Glorieux, C.; Dejeans, N.; Sid, B.; Beck, R.; Buc Calderon, P.; Verrax, J. *Biochem Pharmacol.* **2011**, 82, 1384.
188. Das, M.; Manna, K. *J. Toxicol.* **2016**, 2016, 7651047.
189. Zhang, B.; Pan, X.; Cobb, G. P.; Anderson, T. A. *Dev. Biol.* **2007**, 302, 1.
190. Song, B.; Wang, C.; Liu, J.; Wang, X.; Lv, L.; Wei, L.; Xie, L.; Zheng, Y.; Song, X. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2010**, 29, 29.
191. Partyka, R.; Gonciarz, M.; Jałowicki, P.; Kokocińska, D.; Byrczek, T.; *Med Sci Monit: Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2012**, 18, BR130.
192. Pashaei, E.; Pashaei, E.; Ahmady, M.; Ozen, M.; Aydin, N. *PLOS ONE* **2017**, 12, e0179543.
193. Chen, A. H.; Qin, Y. E.; Tang, W. F.; Tao, J.; Song, H.; Zuo, M. *Cancer Cell Int.* **2017**, 17, 63.
194. Song, G.; Zhang, Y.; Wang, L. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 31921.
195. Kato, Y.; Yamashita, T.; Ishikawa, M.; *Oncol Rep.* **2002**, 9, 565.
196. Martin, M. D.; Matrisian, L. M. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, 26, 717.

197. Coussens, L. M.; Tinkle, C. L.; Hanahan, D.; Werb, Z. *Cell*. **2000**, *103*, 481.
198. Xu, J.; Zhang, W.; Lv, Q.; Zhu, D. *Oncol Rep*. **2015**, *33*, 3108.
199. Qin, W.; Dong, P.; Ma, C.; Mitchelson, K.; Deng, T.; Zhang, L.; Sun, Y.; Feng, X.; Ding, Y.; Lu, X.; He, J.; Wen, H.; Cheng, J. *Oncogene*. **2012**, *31*, 4067.
200. Park, S.; Eom, K.; Kim, J.; Bang, H.; Wang, H. Y.; Ahn, S.; Kim, G.; Jang, H.; Kim, S.; Lee, D.; Park, K. H.; Lee, H. *BMC Cancer*. **2017**, *17*, 658.
201. Agarwal, V.; Bell, G. W.; Nam, J. W.; Bartel, D. P. *Elife*. **2015**, *4*, e05005.
202. Mei, W.-J.; Liu, J.; Chao, H.; Ji, L.-N.; Li, A.-X.; Liu, J.-Z. *Transit. Metal Chem*. **2003**, *28*, 852.
203. Marković, V.; Janićijević, A.; Stanojković, T.; Kolundžija, B.; Sladić, D.; Vujčić, M.; Janović, B.; Joksović, Lj.; Djurdjević, P. T.; Todorović, N.; Trifunović, S.; Joksović, M. D. *Eur. J. Med. Chem*. **2013**, *64*, 228.
204. Deshpande, M. S.; Kumbhar, A. A.; Kumbhar, A. S.; Kumbhakar, M.; Pal, H.; Sonawane, U. B.; Joshi, R. R. *Bioconjugate Chem*. **2009**, *20*, 447.
205. Pyle, A. M.; Rehmann, J. P.; Meshoyrer, R.; Kumar, C. V.; Turro, N. J.; Barton, J. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3051.
206. Long, E. C.; Barton, J. K. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 271.
207. Marković, V.; Debeljak, N.; Stanojković, T.; Kolundžija, B.; Sladić, D.; Vujčić, M.; Janović, B.; Tanić, N.; Perović, M.; Tešić, V.; Antić, J.; Joksović, M. D. *Eur. J. Med. Chem*. **2015**, *89*, 401.
208. Shi, J. -H.; Zhou, K.-L.; Lou, Y.-Y.; Pan, D.-Q. *Spectrochim. Acta A* **2018**, *193*, 14.
209. Ahmad, A.; Ahmad, M. *Spectrochim. Acta A* **2018**, *188*, 244.
210. Kakkar, R.; Garg, R. Suruchi, *J. Mol. Struct. Theochem*. **2002**, *584*, 37.
211. Azqueta, A.; Collins, A. R. *Arch. Toxicol*. **2013**, *87*, 949.
212. Kim, J. M.; Kim, S. K.; *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 964.
213. Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. *J. Agric. Food. Chem.*, **2005**, *53*, 4290.
214. Kumarasamy, Y.; Byres, M.; Cox, P. J.; Jaspars, M.; Nahar L.; Sarker, S. D. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 615.
215. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, *26*, 1231.
216. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods*. **1983**, *65*, 55.
217. Ohno, M.; Abe, T. *J. Immunol. Methods*. **1991**, *145*, 199.
218. Ormerod, M. G. *Oxford, UK: Oxford University Press*, **2000**.
219. Edgell, C. J.; McDonald, C. C.; Graham, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*,

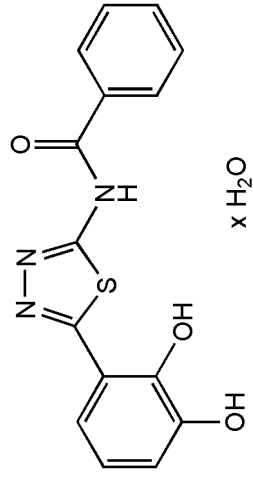
- 3734.
220. Reichmann, M. E.; Rice, S. A.; Thomas, C. A.; Doty, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3047.
221. Vijayalakshmi, R.; Kanthimathi, M.; Subramanian, V.; Nair, B. U. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 271, 731.
222. Lakowicz, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, 12, 4161.
223. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, **1989**.
224. Janović, B. S.; Collins, A. R.; Vujčić, Z. M.; Vujčić, M. T. *J. Hazard. Mater.* **2017**, 321, 576.

6. ПРИЛОГ

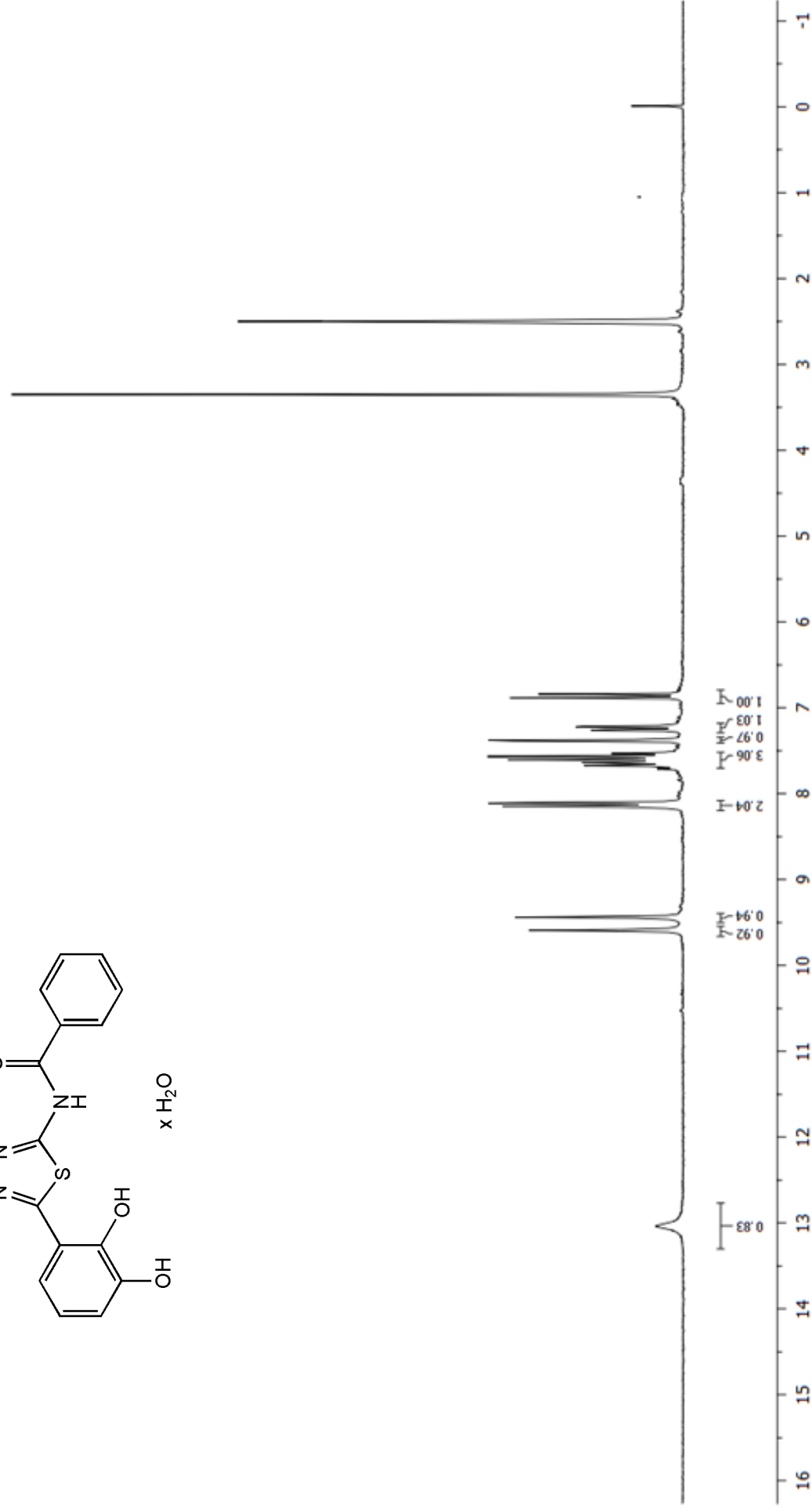
6.1. NMR спектри

— 13.036

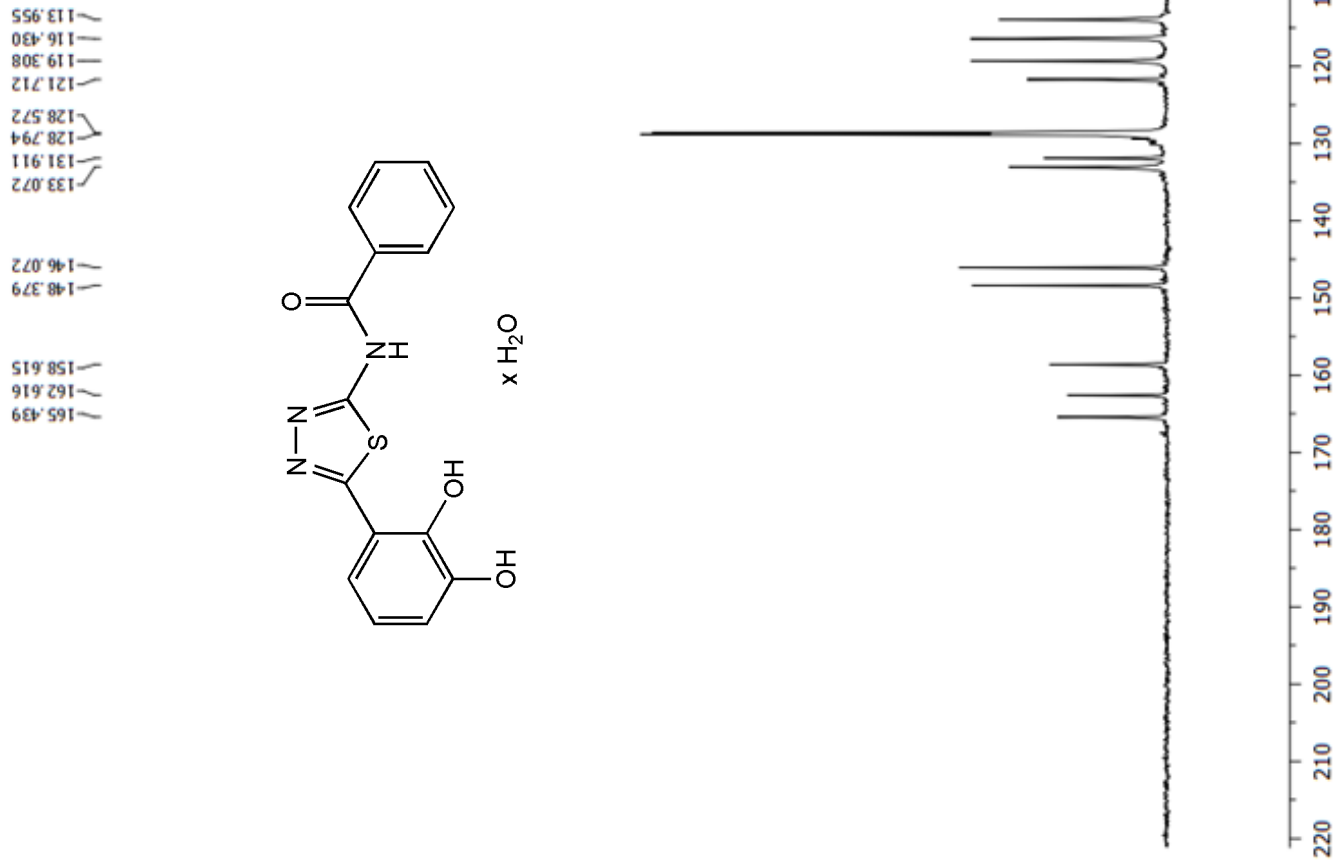
9.591
9.439
8.146
8.111
8.104
7.689
7.674
7.662
7.639
7.604
7.566
7.532
7.524
7.386
7.376
7.264
7.254
7.223
7.213
6.883
6.842



Слика П1. ¹H NMR спектар једињења
3ђ у DMSO-у.



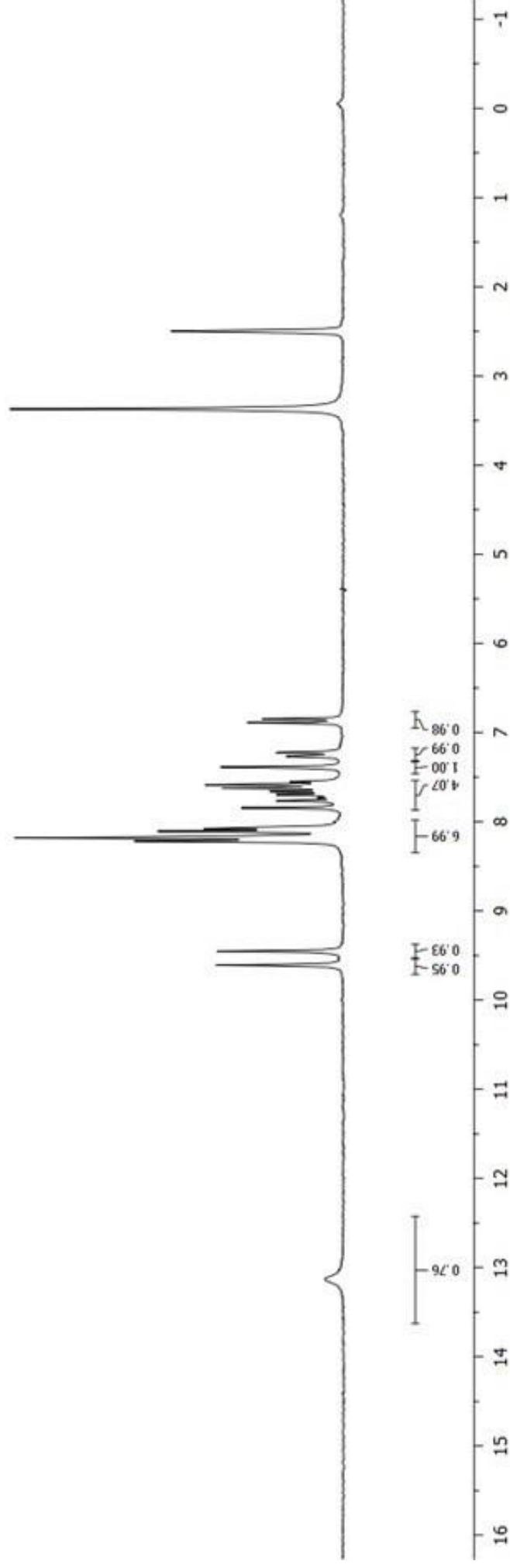
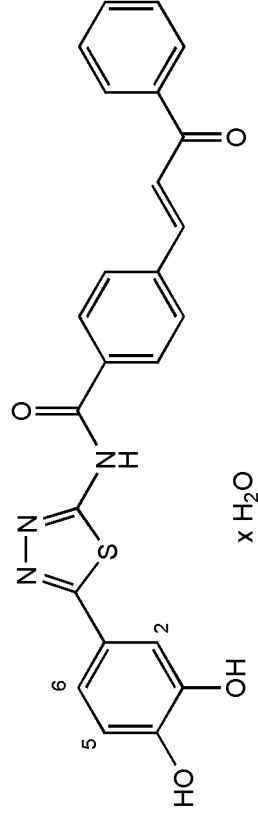
Слика П2. ^{13}C NMR спектар једињења **3ђ** у $\text{DMSO-}d_6$.



— 13.129



Слика ПЗ. ^1H NMR спектар једињења
6а у DMSO-у.

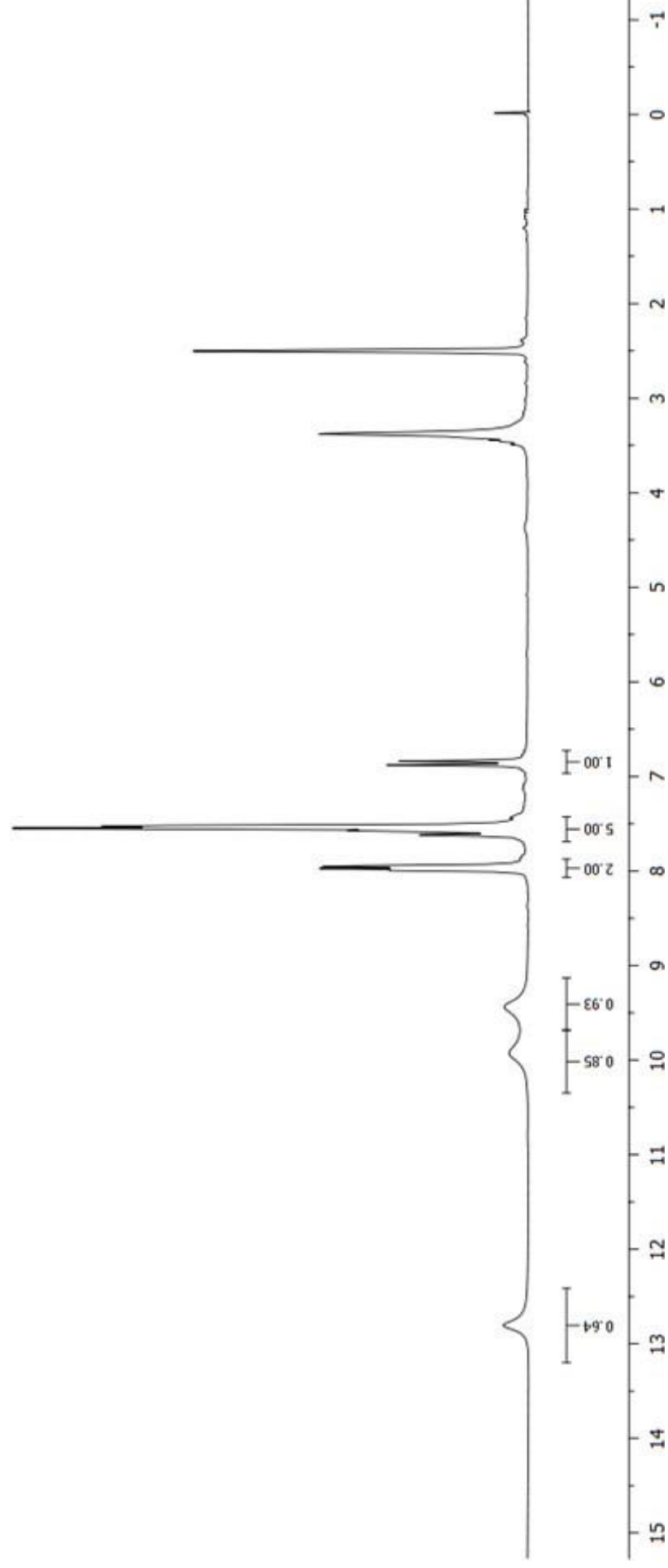


Слика П4. ^{13}C NMR спектар
једињења **6a** у $\text{DMSO}-d_6$.

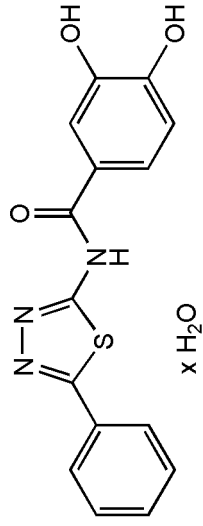




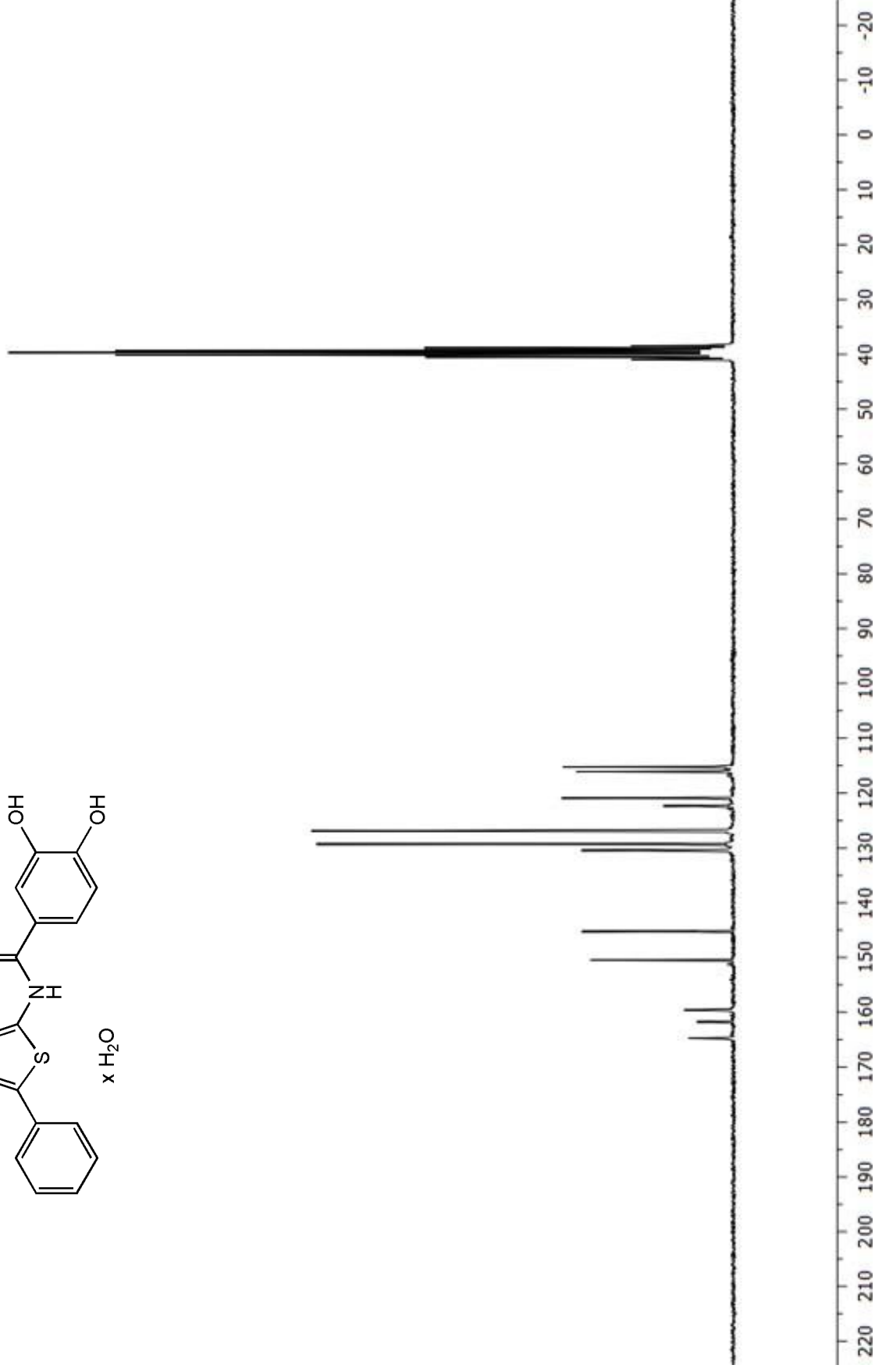
Слика П5. ^1H NMR спектар једињења **9a** у DMSO-у.



164.725
161.748
159.560
150.478
145.259
130.468
130.391
129.330
126.890
122.370
120.945
116.086
115.216



Слика П6. ^{13}C NMR спектар једињења **9a** у DMSO-у.



6.2. Публиковани научни радови у којима су презентовани резултати докторске дисертације



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl

Synthesis, antioxidant and antiproliferative activities of 1,3,4-thiadiazoles derived from phenolic acids



Katarina Jakovljević^a, Ivana Z. Matić^b, Tatjana Stanojković^b, Ana Krivokuća^b, Violeta Marković^a, Milan D. Joksović^a, Nevena Mihailović^a, Marija Nićiforović^a, Ljubinka Joksović^{a,*}

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2017

Revised 30 June 2017

Accepted 1 July 2017

Available online 3 July 2017

Keywords:

1,3,4-thiadiazole

Antioxidant

Cytotoxic activity

Antiangiogenic properties

Metalloproteinases

ABSTRACT

Two 2-amino-1,3,4-thiadiazoles containing phenolic hydroxyl groups were combined with different carboxylic acid chlorides giving sixteen amide derivatives with good antioxidant and antiproliferative potential. The compound **3'c** with an adamantane ring displayed excellent DPPH radical scavenging activity and good cytotoxic activity against human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells, while 1,3,4-thiadiazole **3'h** with 4-chlorophenyl moiety was found to be the most effective in inhibition of survival of lung carcinoma A549 cells. All examined thiadiazoles except **3a** and **3'a** exerted higher cytotoxic activities on A549 and HL-60 cancer cells when compared with normal fibroblasts MRC-5, pointing to selectivity in their antiproliferative action. Some of the most active novel compounds **3c**, **3'c**, **3'g** and **3'h** induced significant increase in the percentage of HL-60 cells in the subG1 cell cycle phase in comparison with the control cells. The induction of cell death in HL-60 cells by these compounds was at least partially dependent on activation of caspase-3 and caspase-8. The compounds **3c** and **3'c** exerted strong antiangiogenic activity. Furthermore, compounds **3c**, **3'c**, **3'g** and **3'h** showed the ability to down-regulate the MMP2 and VEGFA expression levels in the treated HL-60 cells when compared with the control cell samples.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Antioxidants are compounds that, in low concentration, are able to delay or prevent the oxidation of biomolecules (proteins, nucleic acids, lipids, sugars) and inhibit oxidative stress, DNA mutations, malignant changes and other forms of cell damage.¹ Phenolic compounds are a large group of substances that have recently received much attention due to their antioxidant properties. Numerous investigations relating to their radical-scavenging activity include structure-activity-relationship studies, reaction kinetics of polyphenols with radicals, substituent influence, number and arrangement of phenolic hydroxyl groups in the molecule and solvent effects.^{2–5} Among phenolic compounds, the antioxidant activity of phenolic acids has attracted more attention because of their ubiquitous occurrence in nature and as potential models for the synthesis of new primary radical scavengers.⁶ One of the most important phenolic acids, protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid), found in edible plants, vegetables and fruits, is known to exhibit potent antioxidant activity demonstrating the preventive effect on malignant diseases that are associated with radical species.^{4,7–9}

Also, 2,3-dihydroxybenzoic acid, as a potent iron chelator, exerts an important protective effect against the cytotoxic action of H₂O₂ significantly increasing cell survival.¹⁰ Moreover, the stable antioxidant molecules neutralize reactive oxygen species (ROS) by an electron transfer mechanism and diminish their DNA damaging ability and cancer formation. Thus, compounds exhibiting both antioxidant and antiproliferative potential are of great importance in discovery of new anticancer agents.

One of the well-known pharmacophores is 1,3,4-thiadiazole heterocyclic scaffold incorporated in many heterocyclic compounds with various grades of antiproliferative activity.^{11–13} A series of 5-(2,5-dimethoxyphenyl)-1,3,4-thiadiazole-2-amino derivatives has been synthesized and screened for cytotoxic activity against HT-29 and MDA-MB-231 cancer cells.¹⁴ New 2-arylamino-5-aryl-1,3,4-thiadiazoles displayed potent anticancer potential against several cell lines with IC₅₀ values from 4.3 to 9.2 μM.¹⁵ Revelant et al. prepared novel 5-aryl-2-(3-thienylamino)-1,3,4-thiadiazoles and tested them against a panel of six cancer cell lines with IC₅₀ values from <10 μM in some experiments.¹⁶ Finally, X.-H. Yang, et al. presented a series of 1,3,4-thiadiazole-2-amide derivatives as potential anticancer agents with good potential in inhibition of MCF-7 and B16-F10 cell

* Corresponding author.

E-mail address: ljubinka@kg.ac.rs (L. Joksović).

RESEARCH ARTICLE



Cite this: *Med. Chem. Commun.*,
2018, 9, 1679

Novel 1,3,4-thiadiazole–chalcone hybrids containing catechol moiety: synthesis, antioxidant activity, cytotoxicity and DNA interaction studies†

Katarina Jakovljević,^a Milan D. Joksović,^a Ivana Z. Matic,^b Nina Petrović,^{bc}
Tatjana Stanojković,^b Dušan Sladić,^d Miroslava Vujčić,^e Barbara Janović,^e
Ljubinka Joksović,^{id} ^a Snežana Trifunović^d and Violeta Marković ^{id} ^{*a}

Hybrid compounds that combine the 1,3,4-thiadiazole-containing catechol moiety with a chalcone motif were synthesized and examined for their antioxidant activity, cytotoxicity, and DNA-binding activity. A series of thirteen compounds showed strong antioxidant and cytotoxic effects on human acute promyelocytic leukemia HL-60 cells. Several compounds exerted good cytotoxic activities on cervical adenocarcinoma HeLa cells. The treatment of HeLa cells with IC₅₀ and double IC₅₀ concentrations of the compounds **5a**, **5c**, **5f**, and **5m** induced a statistically significant increase in the percentage of cells within a subG1 cell cycle phase. The examined compounds caused G2/M cell cycle arrest in HeLa cells. Each of these compounds triggered apoptosis in HeLa cells through activation of caspase-3, the main effector caspase, caspase-8, which is involved in the extrinsic apoptotic pathway, and caspase-9, which is involved in the intrinsic apoptotic pathway. All of the examined compounds decreased the expression levels of MMP2 in HeLa cells and levels of protumorigenic miR-133b. Compounds **5a** and **5m** lowered the expression level of oncogenic miR-21 in HeLa cells. In addition, compounds **5a**, **5f**, and **5m** decreased the expression levels of oncogenic miR-155 while the treatment of HeLa cells with compounds **5a**, **5c**, and **5f** increased expression of tumor-suppressive miR-206. Observed effects of these compounds on expression levels of four examined miRNAs suggest their prominent cancer-suppressive activity. An investigation by absorption and fluorescence spectroscopy showed more efficient calf thymus DNA binding activity of the compound **5m** in comparison to other tested compounds. Results of a pUC19 plasmid cleavage study and comet assay showed DNA damaging activities of compounds **5a** and **5c**.

Received 26th June 2018,
Accepted 23rd August 2018

DOI: 10.1039/c8md00316e

rsc.li/medchemcomm

1. Introduction

Anticancer hybrid molecules incorporate two or more different covalently linked pharmacophores with ability to modulate multiple biological targets and improve therapeutic potential of designed compounds in comparison to single bioactive precursors. Using molecular hybridization techniques, it is possible to synthesize numerous hybrids based on known anticancer scaffolds leading to a more favorable pharmacological profile than

the sum of each individual compound.¹ Chalcones are frequently selected as one of several privilege structures because of their significant anticancer properties and facile preparation, offering major advancements in the field of hybrid molecules.^{2,3} Such chalcone hybrid analogues with promising anticancer activity have already been synthesized by the coupling of chalcones with various bioactive compounds including coumarin,^{4,5} 1,2,3-triazole,⁶ retinoid,⁷ naphthoquinone,⁸ β -carboline,⁹ artemisinin,¹⁰ *N*-4-piperazinyl-ciprofloxacin,¹¹ anthraquinone,¹² pyrazole-5-carboxamide,¹³ thiazole,¹⁴ and isoxazole.¹⁵

We selected 1,3,4-thiadiazole as a second bioactive compound to combine with a chalcone unit to generate a new hybrid molecule suitable for simultaneously targeting several pathogenic mechanisms. A covalent bond was established by formation of an amide in the reaction of the amine group of the heterocycle and a previously transformed carboxylic function into an acid chloride of the chalcone analogue. 1,3,4-Thiadiazoles exhibited a wide spectrum of anticancer activities owing to high electron-donating ability of nitrogen atoms to form hydrogen bonds or to coordinate metal ions.^{16,17}

^a Faculty of Science, Department of Chemistry, University of Kragujevac, R. Domanovica 12, 34000 Kragujevac, Serbia. E-mail: markovicvioleta@kg.ac.rs

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

^c Laboratory for Radiobiology and Molecular Genetics, “Vinča” Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, 11000 Belgrade, Serbia

^d Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

^e Institute for Chemistry, Technology and Metallurgy, Njegoševa 12, 11000 Belgrade, Serbia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8md00316e



Full paper / Mémoire

Novel 1,3,4-thiadiazole conjugates derived from protocatechuic acid: Synthesis, antioxidant activity, and computational and electrochemical studies



Katarina Jakovljević ^a, Milan D. Joksović ^a, Bruno Botta ^b, Ljiljana S. Jovanović ^c, Edina Avdović ^a, Zoran Marković ^d, Vladimir Mihailović ^a, Marijana Andrić ^a, Snežana Trifunović ^e, Violeta Marković ^{a,*}

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

^b Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma, P.le Aldo Moro 5, 00185 Roma, Italy

^c Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg D. Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

^d Department of Chemical–Technological Sciences, State University of Novi Pazar, Vuka Karadžića bb, 36300 Novi Pazar, Serbia

^e Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 16, 11000 Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 April 2019

Accepted 4 June 2019

Available online 3 July 2019

Keywords:

1,3,4-thiadiazole

Protocatechuic acid

Antioxidant

DFT

Electrochemistry

ABSTRACT

A series of 15 novel 1,3,4-thiadiazole amide derivatives containing a protocatechuic acid moiety were synthesized and structurally characterized. In addition, the corresponding imino (**4**) and amino (**5**) analogues of a phenyl-substituted 1,3,4-thiadiazole amide derivative **3a** were prepared to compare the effects of the structural changes on the radical-scavenging activity. The obtained compounds were examined for their antioxidative potential by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assays. In addition, selected compounds were studied by density functional theory (DFT) and cyclic voltammetry experiments. The tested compounds showed high potential to scavenging DPPH radical and ABTS radical cation compared with the referent antioxidants ascorbic acid and nordihydroguaiaretic acid (NDGA). On the basis of the calculated thermodynamic parameters, it can be concluded that the sequential proton loss electron transfer (SPLET) mechanism represents the most probable reaction path in a polar solvent for DPPH radical-scavenging activity. On the other hand, the single electron transfer followed by proton transfer (SET-PT) can be a likely mechanistic pathway in the case of an ABTS radical cation.

© 2019 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS), as products of cellular metabolism, can have both beneficial and harmful roles [1]. Oxidative stress occurs as a consequence of overproduction of reactive species and may cause significant damage to molecules of high biological importance, thus contributing to various health problems such as cancer [2], aging [3], heart

diseases [4], and neurodegenerative disorders [5]. Antioxidants are substances that, in low concentration, can prevent or slow down damage to cells caused by free radicals and inhibit oxidative stress, DNA mutations, malignant changes, and other forms of cell damage [6]. Among them, phenolic compounds (including phenolic acids) have attracted much attention because of their ubiquitous occurrence in nature and pronounced free radical-scavenging activity attributed to the radical-scavenging function of their phenolic hydroxyl groups [7]. *o*-Dihydroxyl configuration (i.e., catecholic group) is commonly considered to be a substantial characteristic

* Corresponding author.

E-mail address: markovicvioleta@kg.ac.rs (V. Marković).

Биографија са подацима о досадашњем раду



Катарина Јаковљевић је рођена 17. фебруара 1991. године у Крагујевцу. Основну школу „17. октобар“ завршила је у Јагодини 2006. године а исте године се уписала у средњу Медицинску школу у Ћуприји коју је завршила 2010. године као носилац дипломе Вук Караџић. На Природно-математички факултет у Крагујевцу, група Хемија, смер истраживање и развој, уписала се 2010/11. године, где је и дипломирала 2015. са просечном оценом 8,76 и одбранила завршни рад под називом „**Синтеза дисупститутисаних деривата пиразола**“ са оценом 10. Школске 2015/16. године уписала је мастер академске студије хемије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, смер истраживање и развој, које је завршила са просечном оценом 10,00. Одбранила је мастер рад под називом „**Синтеза и цитотоксичност нових 1,2,4-триазолских деривата**” 2016. године, такође са оценом 10.

Докторске академске студије уписала је школске 2016/17. године на Природно-математичком факултету у Крагујевцу, модул органска хемија. Од децембра 2016. године учествује као истраживач-приправник, а од децембра 2019. године као истраживач-сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Синтеза, моделовање, физичко-хемијске и биолошке особине органских једињења и одговарајућих комплекса метала“, (бр. пројекта: 172016), чији је руководилац Проф. др Срећко Трифуновић.

Као истраживач ангажован у настави школске 2016/17. и 2017/18. године учествовала је у раду са студентима хемије у Институту за хемију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу изводећи вежбе из предмета: *Органске синтезе I* - основне студије. Активно је учествовала у промоцији факултета кроз организацију сајмова науке и манифестације „Ноћ истраживача“.

Бави се истраживачким радом у области органске, биоорганске и медицинске хемије. Предмет њеног истраживања су синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности нових хетероцикличних једињења која у прстену садрже азот. До сада има четири објављена научна рада у часописима од међународног значаја (сва четири из категорије M22), два рада саопштена на међународним конференцијама (категорија M34) и три рада која су саопштена на националним конференцијама (категорија M64).

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Катарина Јаковљевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Синтеза и биолошка активност деривата 1,3,4 – тиадиазола изведених из фенолних киселина

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

Овом Изјавом такође потврђујем:

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

У Крагујевцу, 2020. године,

К. Јаковљевић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Катарина Јаковљевић,

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам

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

Синтеза и биолошка активност деривата 1,3,4 – тиадиазола изведених из фенолних киселина

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

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

Овом Изјавом такође

☒

дозвољавам

☐

не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 2020. године,

K. Jacobson

потпис аутора

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