



Univerzitet u Novom Sadu
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine



SINTEZA I DETALJNA BIOLOŠKA ISPITIVANJA TIAZOLNIH C-NUKLEOZIDA

Doktorska disertacija

Mentor:

Dr Mirjana Popsavin

Kandidat:

Mr Vesna V. Kojić

Novi Sad, 2012.

Predgovor

Hemijski deo ove doktorske disertacije je urađen na Departmana za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, pod mentorstvom prof. dr Mirjane Popsavin, redovnog profesora PMF-a u Novom Sadu, a u okviru projekata «Sinteza potencijalnih citotoksičnih agenasa, antihormona, enzimskih inhibitora i stimulatora rasta» i «Sinteza biološki aktivnih molekula i analoga od potencijalnog interesa za biomedicinu i agronomiju», finansiranih od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.

Profesorka Mirjana Popsavin je predložila temu, rukovodila radom, snimala i tumačila NMR-spektre, često i sama uzimala učešća u eksperimentalnom radu, pomažući mi u komplikovanijim laboratorijskim operacijama, ili pak postavljajući i obrađujući neke moje reakcije, čuvajući me tako od praznog hoda u stalnom nedostatku vremena. Zbog svega napred rečenog kao i zbog ogromne pomoći pružene u toku pisanja rada neizmerno sam joj zahvalna.

Biološki i biohemijski deo ove doktorske disertacije je urađen u Institutu za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica a najveće zasluge za realizaciju ovog dela disertacije ima dr Gordana Bogdanović.

Ovom prilikom se iskreno zahvaljujem:

- dr Gordani Bogdanović (Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica) čijom predusretljivošću i trudom su urađeni testovi biološke aktivnosti sintetizovanih jedinjenja, kao i na podršci i savetima tokom izrade i pisanja ovog rada,*
- prof. dr Velimiru Popsavinu (Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad), na nesebičnoj stručnoj pomoći,*
- dr Svetlani Trivić, red. prof. i dr Kseniji Kuhajdi, red. prof. Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu na interesovanju za ovaj rad.*
- Dimitru Jakimov, specijalisti medicinske genetike (Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica) koji mi je uvek spremno i rado pomagao pri eksperimentalnom radu, tako i prilikom tekstualne, grafičke i idejne obrade podataka na računaru,*
- Lidiji Aleksić, specijalisti medicinske genetike (Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica) koja mi je pomogla u izvođenju bioloških testova na citometru,*

- dr Tatjani Srdić Rajić (Institut za onkologiju i radiologiju Srbije, Beograd), koja mi je svojim nesebičnim savetima i sugestijama pomogla u tumačenju i kvantifikaciji rezultata dobijenih Western blot testom,
- mr Milki Jadranin za snimanje masenih spektara visoke rezolucije (IHTM-Centar za hemiju, Beograd),
- mr Snežani Trifunović za urađene elementarne mikroanalize (Laboratorija za mikroanalizu, IHTM-Centar za hemiju, Beograd, pod rukovodstvom prof. dr Vlatke Vajs),
- dr Branislavu Joviću za snimanje IR-spektara (Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad),
- mr Milošu Svirčevu, dipl. hem. Bojani Srećo, ms Jovani Francuz, ms Ivani Kovačević i dr Goranu Benedekoviću, na korisnim savetima i sugestijama, koji su pomogli da se ostvari sinteza novih nukleozida,
- gospođi Ružici Marušić (Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, PMF, Novi Sad) za pripremu reagenasa i dugogodišnju prijatnu saradnju,
- Sabine Alispahić, profesoru književnosti i srpskog jezika, (Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica) na doprinosu da ovaj rad bude u duhu srpskog jezika,
- za svesrdno zalaganje i saradnju laborantu, Ljiljani Savić,
- mojim roditeljima i prijateljima za ljubav i razumevanje kao i pomoć koju su mi pružili tokom rada.

Novi Sad, 2012. godine

Mr Vesna Kojić

SADRŽAJ

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 6 |
| 2. OPŠTI DEO | 8 |
| 2.1. Sinteza i in vitro biološka ispitivanja potencijalnih agonista i derivata tiazofurina | 8 |
| 2.2. Tiazofurin i izosterni analog, selenazofurin – struktura i biološka aktivnost | 8 |
| 2.3. Programirana ćelijska smrt | 10 |
| 2.3.1 Regulacija apoptoze..... | 12 |
| 2.3.1.1. Spoljašnji put apoptoze..... | 13 |
| 2.3.1.2. Unutrašnji put apoptoze..... | 14 |
| 2.3.2. Apoptoza u tumorima | 17 |
| 3. NAŠI RADOVI | 19 |
| 3.1. Strategija sinteze..... | 19 |
| 3.2. Rezultati i diskusija | 19 |
| 3.2.1. Sinteza (<i>E</i>),(<i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksamida i (<i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksi-butil)tiazol-4-karboksamida | 19 |
| 3.2.2. Analizi koji nisu sintetizovani u okviru ovog rada a detaljno su biološki i biohemijski ispitivani | 25 |
| 3.3. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti..... | 30 |
| 3.4 Korelacioni odnosi (SAR) | 54 |
| 3.5. Ćelijski ciklus | 59 |
| 3.5.1. Uticaj analoga tiazofurina na distribuciju faza ćelijskog ciklusa | 59 |
| 3.5.2. Apoptoza..... | 64 |
| 3.5.2.1. Apoptoza kao dominantan tip ćelijske smrti | 64 |
| 3.5.3. Ispitivanje uticaja novosintetisanih analoga tiazofurna na ćelijske signalne molekule koji su uključeni u apoptotsku kaskadu | 66 |
| 3.5.3.1. Uticaj analoga na rane događaje u apoptozi | 66 |
| 3.5.3.2. Uticaj analoga na ekspresiju kaspaze 3 | 67 |
| 3.6. Diskusija rezultata bioloških ispitivanja | 74 |
| 4. EKSPERIMENTALNI DEO | 77 |
| 4.1. Hemijski deo..... | 77 |

| | |
|--|------------|
| 4.1.1. Dietilditioacetal D-arabinoze (2) | 77 |
| 4.1.2. Dietilditioacetal 2,3,4,5-tetra- <i>O</i> -benzoil-D-arabinoze (3) | 78 |
| 4.1.3. Tetra- <i>O</i> -benzoil- <i>aldehido</i> -D-arabinoza (4) | 78 |
| 4.1.4. (<i>E,Z</i>)- 2,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -benzoil-D-arabinozaoksim (5) | 78 |
| 4.1.5. 2,3,4,5-Tetra- <i>O</i> -benzoil-D-arabinonitril (6)..... | 79 |
| 4.1.6. (<i>E</i>),(<i>S</i>)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-but-1-enil)tiazolin-4-karboksilat (7) | 79 |
| 4.1.7. (<i>E</i>),(<i>S</i>)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksilat (8)..... | 79 |
| 4.1.8. (<i>E</i>),(<i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksamida (9)..... | 80 |
| 4.1.9. (<i>S</i>)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-butil)tiazol-4-karboksilat (10) i etil-2- (butil)tiazol-4-karboksilat (11)..... | 80 |
| 4.1.10. (<i>S</i>)-2-(3,4-dihidroksi-butil)tiazol-4-karboksamid (12)..... | 80 |
| 4.2. Biomedicinski deo | 81 |
| 4.2.1. Održavanje ćelijskih kultura | 81 |
| 4.2.2. Određivanje broja ćelija i vijabilnosti | 82 |
| 4.2.3. Kolorimetrijski MTT test | 83 |
| 4.2.4. Analiza podataka | 84 |
| 4.2.5. Annexin-V-FLUOS | 84 |
| 4.2.5.1. Protočna citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa | 85 |
| 4.2.5.2. Test za određivanje procenta apoptotskih ćelija..... | 86 |
| 4.2.6. Western blot..... | 87 |
| 4.2.6.1. Pripremanje ćelijskog lizata za Western blot analizu | 87 |
| 4.2.6.2. Određivanje koncentracije proteina u ćelijskom lizatu mikro Bradford metodom | 88 |
| Osnovni podaci o ćelijskim linijama | 90 |
| 5. PRILOG | 92 |
| NMR-Spektri nosintetizovanih jedinjenja | 92 |
| Rezultati ispitivanja na floucitometru | 113 |
| 6. ZAKLJUČAK | 134 |
| 7. LITERATURA | 137 |
| 8. BIOGRAFIJA | 143 |
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | 144 |

1. UVOD

U drugoj polovini 20 veka farmaceutska industrija je povećala interesovanje za nukleozidnim i nukleotidnim analogima. Obe komponente nukleozida, šećerna ili bazna mogu podleći modifikacijama.

Sinteza izosternih analoga nukleozida sa hemijski izmenjenim bazama i/ili strukturno modifikovanim šećernim komponentama predstavlja veoma aktuelnu problematiku zbog činjenice da pojedini predstavnici pokazuju interesantnu biološku aktivnost.

Promene u šećernoj komponenti nukleozida uključuju promene šećernog substituenta ili zamenu kiseonika iz šećernog prstena sa drugim heteroatomom. Aciklični nukleozidi, sa druge strane, se razlikuju od konvencionalnih nukleozida pošto kod njih je šećerni prsten zamenjen sa acikličnim fragmentom. Aciklični nukleozidni analozi imaju veći stepen konformacione pokretljivosti i stoga mogu zauzeti optimalnu geometriju za čvršće vezivanje za aktivno mesto enzima.

Nukleozidi su klasifikovani u dve velike grupe-*N*-nukleozidi i *C*-nukleozidi.

C-nukleozidi su posebna klasa nukleozida koji, umesto *C-N*, sadrže *C-C* vezu između šećernog i heterocikličnog segmenta. Kao posledica toga, *C*-nukleozidi su stabilni prema dejstvu intracelularnih hidrolitičkih enzima, što predstavlja dodatnu atraktivnu osobinu ovih analoga.

Postoje četiri pristupa u sintezi *C*-nukleozida:

- a) metoda formiranja *C*-glikozidne veze jonskim ili slobodno-radikalnim mehanizmom ili katalitičkim procesima u prisustvu teških metala,
- b) višefazna izgradnja heterocikličnog prstena na pogodno funkcionalizovanoj *C*-glikozidnoj podjedinici,
- c) hemijska transformacija lako pristupačnog *C*-nukleozida u manje pristupačni analog
- d) totalna sinteza iz neugljenohidratnog polaznog materijala.

Pojedini prirodni, kao i neki sintetički *C*-nukleozidi, sve više nalaze primenu u hemioterapiji - kao antitumorski, antivirusni i antibakterijski agensi, a takođe i kao imunomodulatori i regulatori ekspresije gena.^{1,2} Tiazofurin (2- β -D-ribofuranoziltiazol-4-karboksamid) je sintetički *C*-nukleozid sa značajnom onkolitičkom aktivnošću,³ koji je registrovan kao "orphan drug" za terapiju hronične mijeloidne leukemije (CML) u blastnoj krizi.

Danas se zna da je biološka aktivnost tiazofurina posledica njegove intracelularne konverzije u aktivni metabolit tiazol-4-karboksamid adenin dinukleotid (TAD) koji inhibira aktivnost inozin 5'-monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), ključnog enzima u *de novo* sintezi guaninskih

nukleotida.⁴ S obzirom na to da je aktivnost IMPDH povećana kod mnogih tipova malignih tumora, ovaj enzim je značajan cilj u hemioterapiji kancera. Inhibicija aktivnosti IMPDH dovodi do redukcije sinteze^{5,6} guanilata, a otuda i do inhibicije sinteze RNK i DNK i proliferacije malignih ćelija. Takođe dolazi i do indukcije diferencijacije, smanjenja onkogene aktivnosti i indukcije apoptoze kod nekih^{7,8,9,10} ćelijskih linija i tkiva.

Znajući da inhibicija¹¹ aktivnosti IMPDH izaziva, pored antitumorske, antivirusnu, imunosupresivnu, antibakterijsku i antiparazitsku aktivnost, potpuno je razumljivo interesovanje koje tiazofurin pobuđuje već više od dvadeset godina.

Dobijanje novih tipova C-nukleozida i identifikacija strukturnih karakteristika neophodnih za njihovu biološku aktivnost, mogu biti od značaja za dizajn novih hemioterapeutika, povećane aktivnosti, selektivnosti i stabilnosti.

Do sada je sintetizovan veliki broj hemijski modifikovanih analoga tiazofurina radi identifikacije osnovnih strukturnih karakteristika koje su neophodne za njihovu biološku aktivnost.⁹⁻¹⁶ Sintezom specifičnijih i efikasnijih inhibitora IMPDH od tiazofurina mogao bi se učiniti napredak u terapiji malignih bolesti, ali i drugih patoloških stanja u kojima se registruje povišena aktivnost enzima IMPDH.

Iz tih razloga, istraživanja u okviru ove doktorske disertacije usmerena su na sintezu (*E*),(*S*)-2-(3,4-dihidroksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksamida i (*S*)-2-(3,4-dihidroksi-butil)tiazol-4-karboksamida, novih acikličnih tiazolnih C-nukleozida sa dvostrukom vezom i 2',3'-dideoksi funkcijom u acikličnoj šećernoj komponenti. Testiranje novosintetizovanih jedinjenja, kako na njihovu *in vitro* citotoksičnost prema nekoliko ćelijskih linija humanih leukemija i čvrstih tumora, tako i proveru ćelijskih mehanizama koji su u osnovi uočenih citotoksičnih efekata sintetizovanih analoga u odnosu na tiazofurin kao referentno jedinjenje, takođe predstavlja jedan od važnih zadataka ove doktorske disertacije. Višefazna sinteza pomenutih acikličnih analoga tiazofurina zasnovana je na D-arabinozi kao hiralnom prekursoru.

2. OPŠTI DEO

2.1. Sinteza i in vitro biološka ispitivanja potencijalnih agonista i derivata tiazofurina

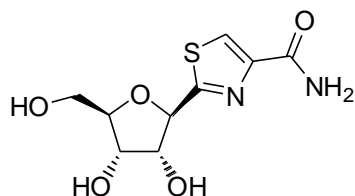
Jedan od važnih zadataka savremene medicinske hemije predstavlja razvoj novih hemioterapeutika, analoga prirodnih i sintetičkih biološki aktivnih molekula sa agonističkim dejstvom. Rukovodeći se ovom strategijom, sintetisan^{16,17} je tiazofurin, prvi sintetički C-nukleozid sa značajnom antitumorskom aktivnošću. Istovremeno, strukturne modifikacije tiazofurina, koje bi dovele do potentnijeg, a manje toksičnog terapeutika postaju predmet istraživanja.

U tom smislu razvijeni su i unapređeni različiti sintetski postupci čiji je pregled dat u poglavljima koja slede. Takođe, ukratko su diskutovani podaci o biološkoj aktivnosti dobijenih jedinjenja.

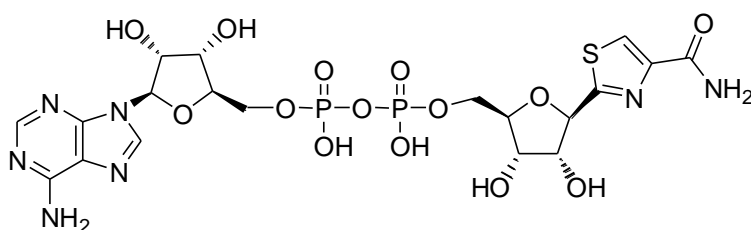
2.2. Tiazofurin i izosterni analog, selenazofurin – struktura i biološka aktivnost

Tiazofurin (**2.1**; *Shema 2.1.*) je tiazolni C-nukleozid koji pokazuje snažnu citotoksičnu aktivnost prema izvesnom broju malignih ćelija.¹⁸ Tiazofurin je u fazi II/III kliničkih ispitivanja, ali je nedavno odobrena njegova upotreba kao “orphan drug” za tretman hronične mijeloidne leukemije. Biološka aktivnost tiazofurina je rezultat njegove sposobnosti da smanji intracelularni depo guaninskih nukleotida inhibicijom inozin monofosfat dehidrogenaze.¹⁵ Aktivni metabolit tiazofurina je tiazol-4-karboksamid-adenine-dinukleotid (TAD, **2.2**; *Shema 2.1.*), analog nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) – kofaktora IMPDH, koji se usled strukturne sličnosti vezuje za kofaktor-vezujuće mesto na enzimu.¹⁹ Tiazofurin je pokazao uspeh u tretmanu CML-BC (mijeloblastna kriza hronične mijeloidne leukemije). Takođe je aktivan protiv multiplog mijeloma i karcinoma jajnika, što mogu biti korisne indikacije za njegovu kliničku upotrebu u budućnosti. U toku kliničkih ispitivanja uočeni su i mnogi sporedni efekti, uključujući mučninu, povraćanje, povišenje serumskih transaminaza, glavobolju, neutropeniju (smanjenje broja neutrofilnih leukocita), kao i toksičnost prema centralnom nervnom sistemu. Međutim, komplikacije bi mogle biti prevaziđene upotrebom odgovarajućih doza zajedno sa dodatnom terapijom. Uočeno je sinergističko delovanje tiazofurina sa drugim antitumorskim agensima, kao

što su taksol (Bristol-Myers Squibb CO), retinska kiselina, gemcitabin (Eli Lilly & Co), metotreksat, genistein i trimidoks (Molecules for Health). Za očekivati je da ovaj sinergizam ima implikacije na klinički tretman humanih solidnih tumora, s posebnim značajem za karcinome dojke, jajnika, pankreasa, pluća i jetre.¹⁸



2.1; Tiazofurin

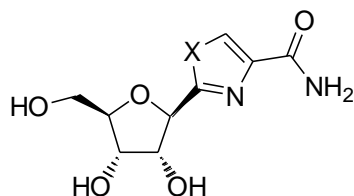


2.2; TAD

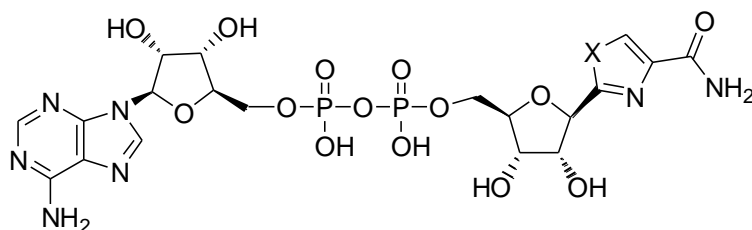
Shema 2.1.

Srivastava i Robins¹⁷ su prvi sintetizovali izosterni analog tiazofurina, selenazofurin (**2.23**, *Shema 2.10.*), i njegov 5'-fosfat koji su prilikom ispitivanja na životinjama pokazali antitumorsku aktivnost, kao i širok spektar *in vitro* antivirusnu aktivnost.²¹ Tiazofurin (**2.1**; *Shema 2.1.*) se u osjetljivim ćelijama metabolički transformiše do analoga NAD⁺, nakon čega ispoljava citotoksično delovanje. Biohemijska istraživanja su pokazala da ovo jedinjenje u ćeliji fosforiluje neke od ćelijskih kinaza, nakon čega se nastali 5'-fosfat u reakciji katalizovanoj NAD-pirofosforilazom vezuje sa AMP, gradeći tiazofurin adenin dinukleotid (TAD, tiazol-4-karboksamid adenin dinukleotid, **2.2**, *Shema 2.1.* i *Shema 2.10.*). TAD se vezuje na mesto koje kod aktivnog enzima zauzima NAD⁺, ali zbog svoje strukture ne može da izvrši funkciju koenzima. Selenazofurin [2-(β-D-ribofuranozil)selenazol-4-karboksamid, **2.23**, *Shema 2.10.*], kao i tiazofurin, svoju biološku aktivnost ispoljava nakon intracelularne konverzije u

odgovarajući dinukleotid (SAD, **2.4**, *Shema 2.2.*). Biohemijska istraživanja^{21,23} su pokazala da se biološka aktivnost selenazofurina bazira na istom mehanizmu kao kod tiazofurina, s tim da je selenazofurin od 5 do 10 puta efikasniji inhibitor proliferacije ćelija leukemije P388 i L1210 od samog tiazofurina.



2.1; X=S Tiazofurin
2.3; X=Se Selenazofurin



2.2; X=S TAD
2.4; X=Se SAD

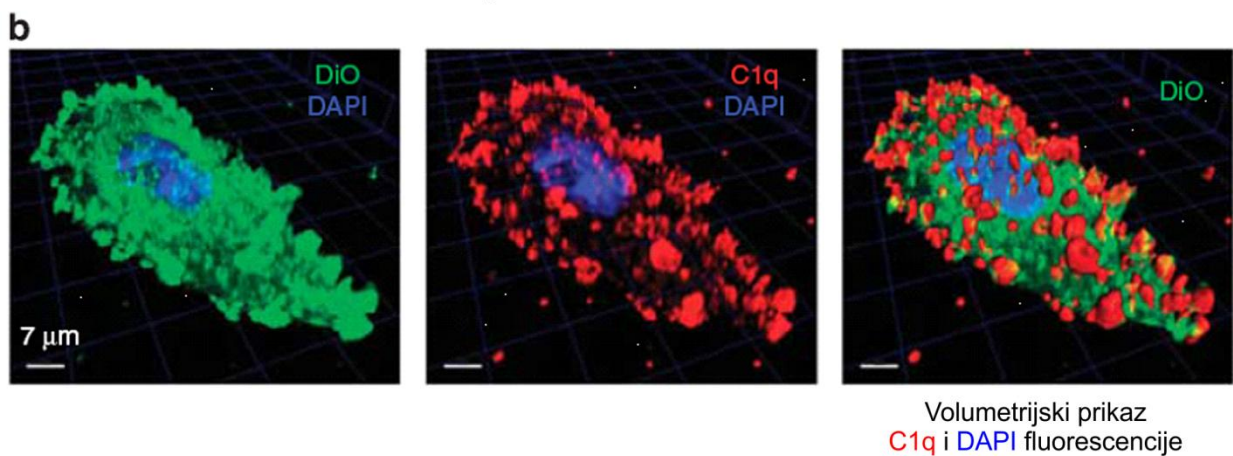
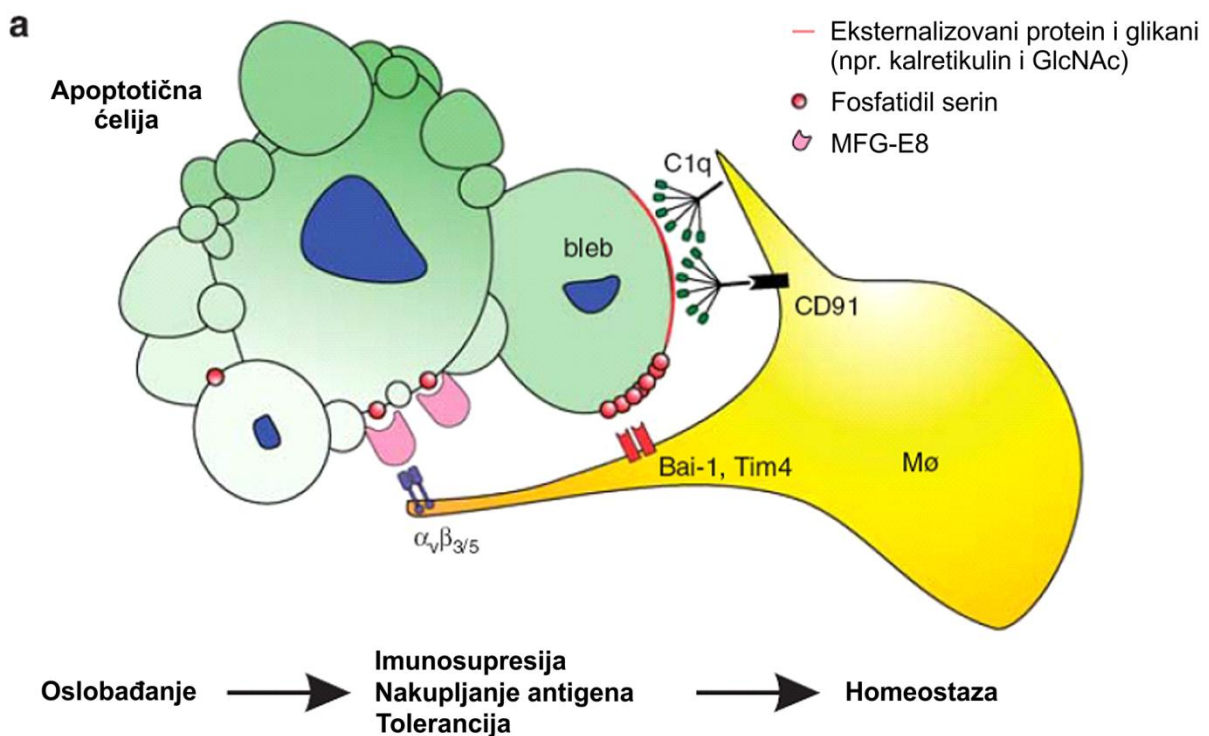
Shema 2.2.

2.3. Programirana ćelijska smrt

Otkriće programirane ćelijske smrti je jedan od ključnih događaja koji su doprineli boljem razumevanju biologije ćelije i značajno je uticao na istraživanja u oblasti biomedicinskih nauka, posebno u domenu eksperimentalne onkologije.

Apoptoza je oblik ćelijske smrti i bitno se razlikuje od duže poznate nekroze. Ćelija aktivno učestvuje u autodestrukciji, njeno samouništenje je programirano. Radi se o fiziološkom procesu koji se normalno javlja u toku embriogeneze i ima ključnu ulogu u razvoju multicelularnih organizama i održavanju homeostaze tkiva.²⁴⁻²⁸ Apoptoza predstavlja aktivan i visokoređen proces u kojem ćelija prolazi kroz niz morfoloških promena. Tipični događaji u procesu

apoptoze su "penušanje" ćelijske membrane, premeštanje molekula fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, unakrsno povezivanje proteina i smanjenje zapremine ćelija, kondenzacija hromatina, cepanje jedarne DNK prvo u veće segmente, a zatim u nukleozomalne fragmente, i na kraju formiranje velikih citoplazmatičnih vezikula (apoptotskih tela),²⁹⁻³¹ koja se otkidaju od ćelijske površine (Slika 2.1.). Nastala apoptotska tela uklanjaju fagociti pri čemu nema pojave inflamatorne reakcije u okolnom tkivu. Poremećaj regulacije ovog složenog procesa vodi ka pojavi različitih oboljenja kao što su maligne, autoimune i degenerativne bolesti.



Slika 2.1. Uklanjanje apoptotske ćelije fagocitozom³²

Povećano interesovanje za proučavanje ćelijske smrti pojavilo se, pre svega, zahvaljujući radovima u kojima je pokazano da u određenim situacijama smrt ćelije predstavlja fiziološki proces i da ćelija u njemu aktivno učestvuje. Činjenica da neke ćelije umiru prostorno i vremenski precizno određeno dovela je do uvođenja termina programirana smrt ćelija, a s obzirom na posebne morfološke karakteristike Ker, Vili i Kari su ovakvu smrt ćelija nazvali *apoptoza*. Na taj način, ćelijska smrt se deli na apoptozu i nekrozu.³³⁻³⁶ Međutim, poslednjih godina sve više se uviđa da pored ova dva suštinski različita tipa ćelijske smrti postoje i drugi načini umiranja ćelija i danas je prihvaćeno da postoje tri osnovna tipa ćelijske smrti:³⁷⁻⁴⁰ apoptoza, autofagna smrt ćelije i nekroza. Dok prva dva tipa predstavljaju regulisan i aktivan način umiranja ćelija, dotle je nekroza najčešće neuređen i pasivan tip ćelijske smrti koji nastaje usled kolapsa ćelijskih homeostatskih mehanizama. Pored toga, postojeća klasifikacija ćelijske smrti, ne može uvek lako da se primeni, jer u mnogim slučajevima postoje preklapanja između tipova ćelijske smrti. Načelno jasne razlike između navedenih tipova ćelijske smrti nisu uvek dovoljno primetne, pa se često zapažaju mešoviti oblici, kao i preklapanje više različitih tipova ćelijske smrti. Pored toga postoje morfološki oblici koji se ne mogu podvesti ni pod jedan od ovih tipova, a koji imaju specifična imena kao što su anoikaza, entoza, partanatos, piroptoza, netoza i kornifikacija.^{41,43} Zbog toga je važno dobro poznavati metode za identifikaciju smrti ćelije.^{42,43} Dok se za nekrozu i autofagnu smrt ćelija pre svega koriste morfološke, za identifikaciju apoptoze - pored morfoloških - koristi se čitav niz različitih biohemijskih i molekulskih metoda.

Biohemijske metode imaju značajne prednosti nad morfološkim jer se mogu kvantifikovati. Međutim, i ove metode imaju nedostatke, pa se dobijeni rezultati moraju tumačiti pažljivo, pogotovo kada se ispituju pojedinačno. Naime, pojedinačni tip biohemijskog odgovora ne mora uvek biti nesumnjiv pokazatelj određenog modaliteta ćelijske smrti (npr. apoptoza ne mora uvek biti praćena aktivacijom kaspaza).⁴⁴⁻⁴⁷

2.3.1 Regulacija apoptoze

Veliki broj stimulusa i stanja u organizmu, bilo fizioloških ili patoloških, mogu dovesti do apoptotske ćelijske smrti. Apoptozu može uzrokovati i nedostatak međućelijskih signala. Većini ćelija potrebna je stalna stimulacija ili kontakt s površinom na kojoj rastu, a naročito je važna uloga citokina, faktora rasta i pojedinih hormona.⁴⁸ Oštećenja DNK pokreću apoptozu, stoga se faktori koji ova oštećenja prouzrokuju, kao što je jonizujuće zračenje, hemioterapeutici ili lekovi poput analoga nukleozida, ubrajaju u "pokretače apoptoze".⁴⁹ Reaktivne kiseonične vrste, koje

nastaju kao proizvodi aerobnog metabolizma u humanim ćelijama, mogu aktivirati apoptozu delujući na propustljivost mitohondrijske membrane i na otpuštanje citohroma c (Cyt C).^{50,51} Posebno mesto zauzimaju ligandi koji se vezuju za ćelijske površinske receptore ("receptori smrti"). Najpoznatiji ligandi su: Fas ligand (FasL ili CD95 ligand), faktor tumorske nekroze α (TNF α), limfotoksin (TNF β) i TRAIL (engl. *TNF-related apoptosis inducing ligand*).^{41,52} Proces apoptoze se može pokrenut i raznim signalima od kojih jedni deluju intracelularno, a drugi ekstracelularno, kao što je aktivacija receptora smrti. Oba puta se sprovode aktiviranjem enzima cistein aspartat proteaza, koji su poznati pod nazivom kaspaze. Kaspaze su proteolitički enzimi (citoplazmatične cistein-aspartat specifične endoproteaze) koji podstiču apoptozu.^{53,54} U ćelijskoj citoplazmi nalaze se u obliku proenzima, a mogu se aktivirati autokatalitički ili drugom kaspazom. Svoju potpunu proteolitičku aktivnost postižu kao tetrameri koji nastaju nakon dvostrukog cepanja. Stepenasta razgradnja u kojoj jedna kaspaza može aktivirati druge kaspaze, ali i samu sebe, pojačava apoptotski signalni put i dovodi do vrlo brze smrti ćelije.⁵⁵ Inhibitori kaspaza zaustavljaju apoptozu.^{53,56} Centralnu ulogu u ovom procesu ima kaspaza 3. Tokom apoptoze kaspaza 3 je odgovorna, ili delom ili u potpunosti, za postepenu razgradnju velikog broja ćelijskih proteina, fragmentaciju DNK i kondenzaciju hromatina.⁵⁷ Aktivacijom kaspaze dolazi do izvršenja apoptotskog programa. Postoje dva osnovna puta aktivacije kaspaza, spoljašnji i unutrašnji.

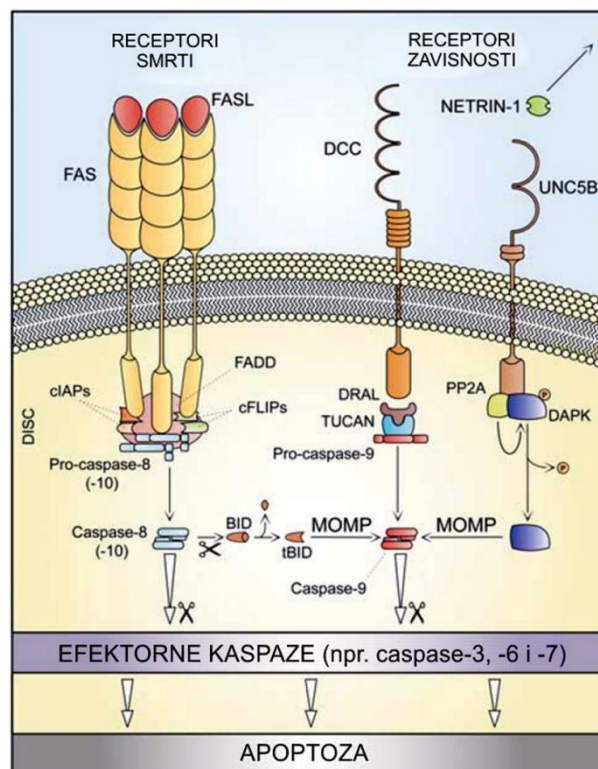
2.3.1.1. Spoljašnji put apoptoze

Spoljašnji put (*Slika 2.2.*) uključuje tzv. receptore smrti iz TNF/Fas porodice, koja se proteže od spoljašnje do unutrašnje površine ćelijske membrane.⁵⁸⁻⁶⁰ Citoplazmatični delovi ovih receptora nazivaju se domeni smrti DD (engl. *Death Domain*, DD). Vezivanjem Fas Liganda (FasL) za Fas-receptor dolazi do receptorske trimerizacije, što rezultira unutarćelijskim nakupljanjem DD delova Fas receptora uz pomoć kompleksa proteina poznatih kao DISC (engl. *Death-Inducing-Signalling-Complex*). Preko adaptorskih molekula FADD (engl. *Fas-Associated-Death-Domain-Protein*) koji imaju dva domena, signal aktivira prokaspazu 8.^{41,61} Domen DD molekula FADD veže se za DD domen Fas receptora, a domen DED (*Death-Effector-Domain*) molekula FADD za prokaspazu 8 (ili -10). Time dolazi do njenog cepanja i prelaska u aktivnu formu.^{33,62-66} Takođe, vezivanjem TNF-liganda za TNFR1 receptor pokreće se sličan put, osim što su u ovom slučaju adaptorski molekuli TRADD (*TNFR-Associated Death Domain*), koji imaju sposobnost vezivanja različitih proteina na aktiviranom delu receptora.^{33,67}

Apoptozu pokrenutu aktivacijom Fas i TNFR1 receptora inhibira familija proteina FLIP (engl. *FasL Inhibitor Protein*), v-FLIP i c-FLIP, koji se kao homolozi kaspaze 8 vežu za Fas-FADD kompleks, čime inhibiraju aktivaciju prokaspaze 8.⁶⁸⁻⁷⁷

Vezivanje liganda za odgovarajuće receptore dovodi do aktivacije „uzvodnih“ kaspaza, kao što su kaspaza 8 ili 10, koje proteolizom dovode do aktivacije „efektorskih“ kaspaza, kaspaze 3, 6 i 7.^{33,78} Jednom aktivirane efektorske kaspaze razgrađuju čitav niz proteina neophodnih za život ćelije i dovode do većine morfoloških promena koje nastaju tokom apoptotskog procesa.

Efektorske kaspaze razlažu i lamine (proteine koji održavaju integritet nukleusne ovojnice) dovodeći do razgradnje nukleusne ovojnice, zatim PARP (polimeraze poli-ADP riboze), enzima ključnog za reparaciju DNK, kao i proteine citoskeleta. Na taj način, efektorske kaspaze dovode do karakterističnih morfoloških promena ćelijske smrti.



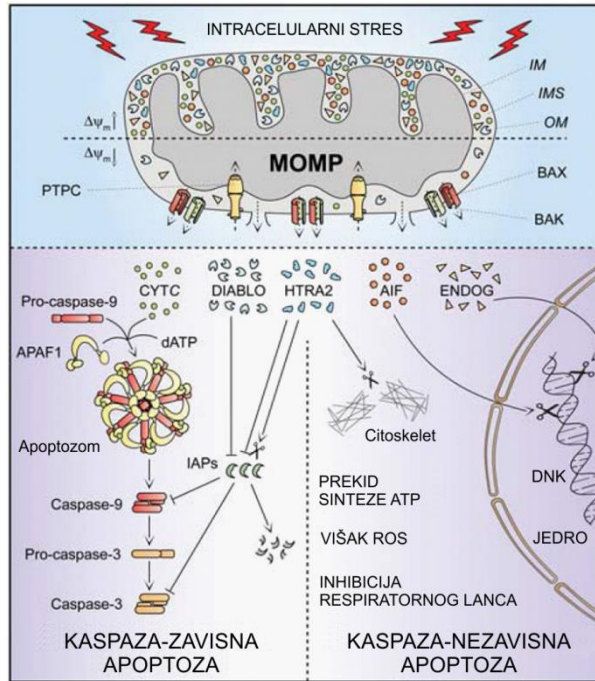
Slika 2.2. Spoljašnji put apoptoze³³

2.3.1.2. Unutrašnji put apoptoze

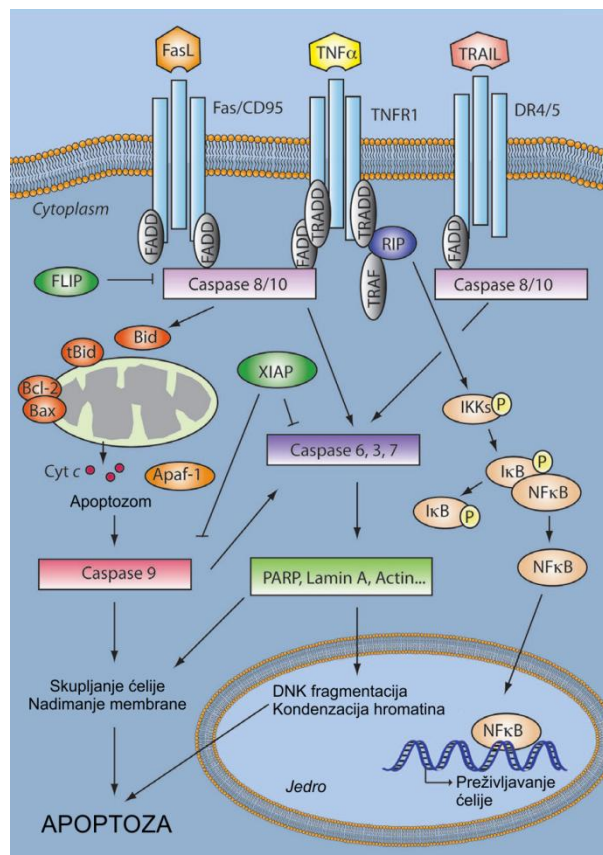
Drugi, unutrašnji put (*Slika 2.3.*), uključuje signale koji potiču iz unutrašnjosti ćelije, a koji nastaju usled različitih oštećenja, odnosno stresa u pojedinim organelama, kao što su jedro, endoplazmin retikulum ili Goldžijev aparat. Centralno mesto u ovom putu imaju mitohondrije

kod kojih dolazi do tranzitorne promene potencijala membrane, odnosno povećane propustljivosti za male molekule. Jedan od molekula koji napušta mitohondrije je i citohrom c (Cyt C), koji se vezuje za jedan citoplazmatski protein APAF-1 (engl. *apoptosis protease activating factor-1*) dovodeći do njegove konformacione promene, te omogućavajući aktivaciju kaspaze 9.³³ Ovo ima za posledicu dalje aktiviranje efektorske kaspaze 3, što konačno vodi ćeliju u smrt.

Pored kaspaza, važnu ulogu u moduliranju apoptotskog procesa imaju proteini iz porodice Bcl-2. Ako je uzrok smrti ćelije oštećenje DNK, ključna je uloga proteina p53 koji je u ćelijama prisutan u inaktivnom obliku. Oštećenja DNK podstiču nakupljanje proteina p53 u ćeliji, zbog čega dolazi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G1 fazi i popravljanja oštećene DNK, ili do pokretanja apoptoze, ako su ta oštećenja nepopravljiva.^{79,80} Protein p53 može pokrenuti apoptozu tako da poremeti odnos proapoptotskih i antiapoptotskih mitohondrijskih proteina Bcl-2 porodice ili da indukuje gene koji povećavaju produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta, koji su snažni aktivatori apoptoze. Proteini Bcl-2 porodice dele se na proapoptotske (Bad, Bax, Bak i dr.) i antiapoptotske proteine (Bcl-2, Bcl-x1, Bcl-w)⁸¹ Proapoptotski proteini prisutni su u citosolu kao senzori ćelijskog oštećenja ili stresa, dok se antiapoptotski proteini nalaze u intermembranskom prostoru mitohondrija. Odnos proapoptotskih i antiapoptotskih faktora određuje osetljivost ćelija na apoptozu.⁸² Važno je naglasiti da taj odnos bitno određuje odgovor tumorskih ćelija na zračenje i hemoterapiju.⁸³ Članovi Bcl-2 familije regulišu broj i tip jonskih kanala u unutrašnjoj membrani mitohondrija, pri čemu Bad i Bax dovode do stvaranja većih jonskih kanala kroz koje izlaze Citohrom C (Cyt C) i drugi proapoptotski molekuli. Otpušteni Cyt C veže se uz medijatorski molekul Apaf-1 koji aktivira kaspazu 9.^{84,85} Cyt C, Apaf-1, kaspaza 9 i ATP zajedno učestvuju u indukciji apoptoze.⁸⁶ Osim Cyt C, mitohondrije sadrže i druge apoptotske faktore kao što su AIF (engl. *Apoptosis-Inducing Factor*) i endonukleaza G. AIF iz mitohondrija prelazi u jedro ćelije, nezavisno od kaspaza dovodi do fragmentacije DNK na fragmente veličine od 50-300 kb i time dovodi do kondenzacije hromatina uz jedarnu membranu.⁸⁷ Endonukleaza G izlazi iz mitohondrija tokom apoptoze i delimično je odgovorna za internukleozomalno cepanje DNK, koje je takođe nezavisno od kaspaza.^{88,89} U ranoj fazi apoptoze spoljašnja membrana mitohondrija postaje propustljiva za proteine, što dovodi do otpuštanja rastvorljivih intermembranskih mitohondrijskih proteina, dok na unutrašnjoj membrani dolazi do slabljenja transmembranskog potencijala što može poslužiti kao pokazatelj ranih apoptotskih promena u *in vivo* uslovima.⁹⁰ Takođe ulogu u modulaciji apoptotskog procesa imaju i inhibitorni proteini apoptoze (IAP), koji sprečavaju apoptozu direktnim blokiranjem kaspaza.^{91,92}



Slika 2.3. Unutrašnji put apoptoze³³



Slika 2.4. Regulacija apoptoze⁹²

2.3.2. Apoptoza u tumorima

Danas se smatra da su poremećaji u apoptotskim putevima značajni u patogenezi mnogih bolesti, od neurodegenerativnih poremećaja do malignih tumora.⁹³ Jedna od najvažnijih karakteristika malignih ćelija jeste preživljavanje ćelije s oštećenjem DNK i nakupljanje novonastalih genskih mutacija. Zdrave ćelije imaju sposobnost prepoznavanja i brzog popravljanja oštećenih mesta na DNK, a aktivacijom apoptoze sprečavaju deobu ćelije i umnožavanje mutiranih ćerki ćelija. Nakupljanje tumorskih ćelija može biti posledica aktivacije onkogeni, inaktivacije tumor-supresor gena, mutacije gena koji regulišu apoptozu ili poremećaja u procesu popravljanja DNK.⁹⁴ Važna uloga apoptoze u kancerogenezi prvi put je uočena zahvaljujući istraživanjima *Bcl-2* (engl. *B cell lymphoma*) gena, čija mutacija je otkrivena u ćelijama folikularnog limfoma. U normalnim ćelijama protein Bcl-2 inhibira apoptozu, a njegovo nakupljanje u citoplazmi tumorskih ćelija sprečava odumiranje malignog kloni.⁹⁴ Gen p53 prvi je tumor-supresorski gen koji se dovodi u vezu sa apoptozom.^{94,95} Mutacija gena p53 prisutna je i u korelaciji sa uznapredovalim stadijumom tumora i lošijom prognozom pacijenata. Gubitak funkcije gena p53 povećava hromozomsku nestabilnost i dovodi do nakupljanja različitih oštećenja u ćeliji, što može dovesti do prelaska u transformisani fenotip.^{94,96} Protein p53 podstiče ekspresiju proapoptotskih gena kao što je gen za Bax i time aktivira apoptozu u cilju odstranjivanja tumorskih ćelija. Zračenje i hemioterapija uzrokuju oštećenje DNK što aktivira apoptozu preko proteina p53 u ćelijama tumora, pa su tumori s mutacijom gena p53 rezistentniji na hemioterapiju i zračenje.⁵⁵

U poslednjih 10 godina otkriveno je da neki hemioterapeutici kao što je doksorubicin, podstiču apoptozu, a da su poremećaji u signalnim putevima apoptoze u tumorskim ćelijama povezani s rezistencijom na lekove.⁹⁸ Apoptoza je prisutna u spontanoj regresiji tumora i u tumorima pacijenata koji su lečeni hemoterapijom.⁹⁹

Takođe, sve više se istražuje put apoptoze nezavisni od kaspaza.¹⁰⁰ Naime, ugrožena ćelija može aktivirati različite puteve apoptotske smrti kako bi osigurala samouništenje. Kaspaza-nezavisna smrt ćelije odvija se znatno sporije od kaspaza-zavisne apoptoze. Kaspaza-zavisna apoptoza je najefikasnija i najbrža, ali ukoliko je zbog mutacija, genetskih manipulacija i inhibicija poremećena, ćelija može pokrenuti apoptotsku smrt nezavisnu od kaspaza.¹⁰¹

Tako, eventualna primena lekova koji bi ometali kasne efektorske mehanzme apoptoze,¹⁰² kao na primer primena inhibitora kaspaza, u mnogim slučajevima ne bi bila uspešna, zbog oslobađanja različitih molekula iz mitohondrija koji mogu dovesti do ćelijske smrti nezavisne od kaspaza. S

druge strane, mnogo veću perspektivu bi imali lekovi koji bi modulirali mehanizme pre uključivanja u sam proces.

Pored krupnih koraka učinjenih na otkriću novih bioloških agenasa, do danas nema odgovora vezanih za nove terapijske procedure u lečenju malignih bolesti: kojim mehanizmom se može postići selektivnost u dejstvu novih antitumorskih agenasa? Poremećaji u signalnim putevima apoptoze u tumorskim ćelijama povezani su sa rezistencijom na lekove.¹⁰³ Lekovi koji aktiviraju apoptozu preko „receptora smrti“ kao što je Fas receptor, aktiviraju apoptozu isključivo putem aktivacije kaspaza.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Međutim, uključujući hemoterapeutike i određene proapoptotske proteine kao što su Bax i Bak, mogu aktivirati apoptozu kaspaza zavisnim i nezavisnim putem. To znači da se selektivnost odnosi na blokadu aktivnosti antiapoptotskih članova Bcl-2 familije proteina odnosno na aktivaciji procesa apoptoze samo tumorskih, a ne i normalnih/zdravih ćelija jednog tkiva.⁹⁷

3. NAŠI RADOVI

3.1. Strategija sinteze

Poslednjih nekoliko decenija C-nukleozidi su intenzivno proučavani radi dobijanja selektivnih hemioterapeutika. Najvažniji sintetički C-nukleozidi su tiazofurin (**2.1**) i njegov izosterni analog selenazofurin (**2.2**; *Shema 2.2.*). Pri tome je utvrđeno da oba pomenuta C-nukleozida inhibiraju inozinmonofosfat-dehidrogenazu, jer nakon fosforilovanja 5'-hidroksilne grupe formiraju **NAD** slične derivate kao što su tiazofurin-, odnosno selenazofurin-adenin-dinukleotidi (**TAD** odnosno **SAD**; *Shema 2.2.*). S druge strane, interesantne biološke osobine acikličnih nukleozida podstakle su istraživanja u pravcu sinteze velikog broja analoga poznatih nukleozida sa izmenjenom šećernom komponentom.

Kao što je u uvodnom delu navedeno, osnovni zadatak naših radova obuhvata sintezu novog C-nukleozida sa tiazolnom heterocikličnom bazom i acikličnim butendiolnim fragmentom. Iz tih razloga najpre je planirana trofazna hemijska transformacija D-arabinoze, u pogodno funkcionalizovani aciklični derivat sa reaktivnom aldehidnom funkcijom. Planirani proces dobijanja acikličnog C-nukleozida predstavlja višefaznu izgradnju heterocikličnog aglikona na odabranim acikličnim šećernim derivatima sa reaktivnim supstituentom na C-1. Oksiminovanje aldehida vodi ka formiranju izomernih *E* i *Z*-oksima koji dehidratacijom daju nitrilni derivat iz kojeg je formiranje 1,3-tiazolnog sistema ostvareno preko tiazolinskih izomera.

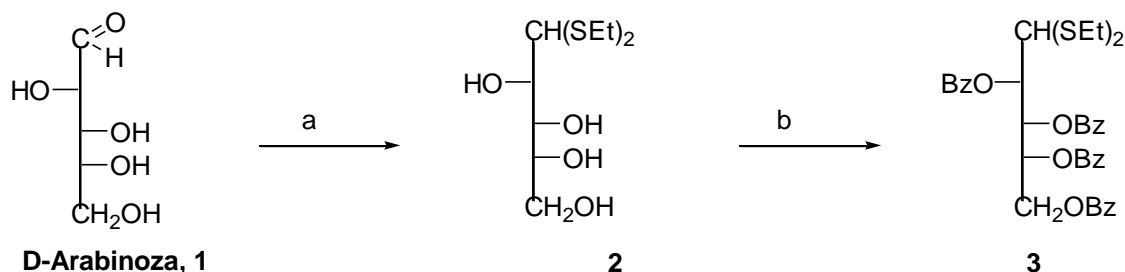
3.2. Rezultati i diskusija

3.2.1. Sinteza (*E*),(*S*)-2-(3,4-dihidroksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksamida i (*S*)-2-(3,4-dihidroksi-butil)tiazol-4-karboksamida

Kao polazno jedinjenje za naša istraživanja poslužio nam je dietilditioacetal D-arabinoze (**2**, *Shema 3.1.*) koji je dobijen iz D-arabinoze po literaturnom postupku.¹⁰⁷ Acetalizacija D-arabinoze izvedena je dejstvom etantiola u koncentrovanoj hlorovodoničnoj kiselini, prvo na 0°C, a zatim na sobnoj temperaturi, pri čemu je dobijen proizvod **2** u prinosu od 40.31%. Primenom standardnih reakcionih uslova benzoilovanja (BzCl/Py, sobna temperatura), tioacetal **2** je preveden u tetrabenzoatni derivat **3** (*Shema 3.1.*), čija je struktura potvrđena na osnovu

odgovarajućih NMR spektara. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **3** potvrđuje da molekul sadrži četiri benzoatne grupe (165.23, 165.32, 165.43 i 166.12 ppm, $4\text{C}=\text{O}$), kao i po dve CH_3 i CH_2 grupe iz etilditioacetalne funkcije [14.11, 14.25 (2CH_3) i 25.19, 25.31 ppm (2CH_2)].

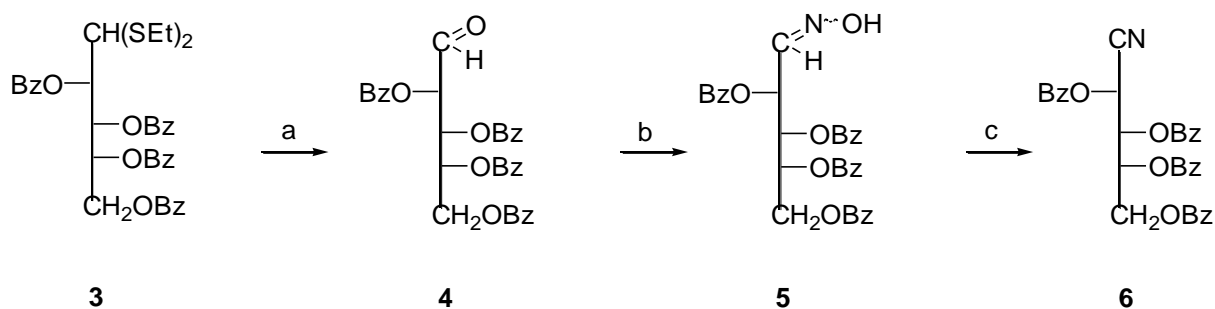
U cilju dobijanja acikličnog nitrila **6** planirano je uklanjanje tioacetalne funkcije jedinjenja **3**, praćeno sukcesivnim transformacijama aldehida **4**, preko oksima **5**, u ključni intermedijer **6** (Shema 3.2.). Uklanjanje dietilditioacetalne grupe jedinjenja **3** ostvareno je dejstvom smese HgO i HgCl_2 u acetonu i vodi na sobnoj temperaturi u toku 3.5 sata. Nakon obrade reakcione smese i kristalizacije dobija se visokokristalni aldehyd **4** u prinosu od 60.73%. Protonski NMR spektar jedinjenja **4** potvrđuje prisustvo aldehydne grupe signalom na 9.72 ppm kao i četiri benzoatne grupe signalima u intervalu od 7.33-8.15 ppm.



Reagensi i uslovi: (a) EtSH , HCl , 0°C , 40.31%; (b) BzCl , Py , st, 48 h, 95.74%.

Shema 3.1.

Reakcija aldehida **4** sa hidroksilamin-hidrohloridom u prisustvu natrijum-acetata, izvedena je u etanolu, na sobnoj temperaturi u toku 2 časa. Pri tome je dobijena smesa *E* i *Z*-oksima **5**, koji su nakon hromatografskog prečišćavanja dobijeni u prinosu od 35.91%. Dehidratacija smese oksima ostvarena je sa metansulfonil-hloridom u apsolutnom piridinu (-15°C , 0.5h; st, 2h). Na taj način je dobijen željeni nitril **6** u prinosu od 81.76% (Shema 3.2.).



Reagensi i uslovi: (a) HgCl_2 , HgO , Me_2CO , H_2O , st, 3.5 h, 60.73%; (b) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOAc , EtOH , st, 2 h, 35.91%; (c) MsCl , Py , -15°C , 0.5 h, zatim st, 2 h, 81.76%.

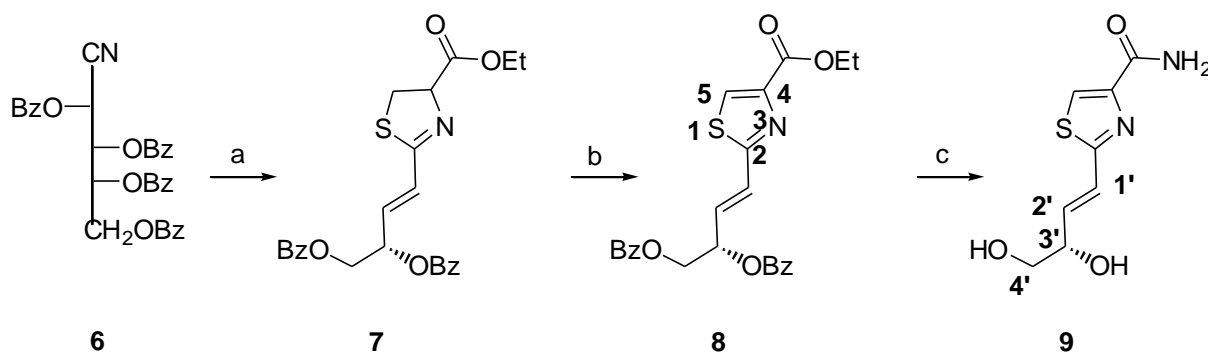
Shema 3.2.

Sintetizovano jedinjenje **6** okarakterisano je IR i NMR spektrima, kao i odgovarajućim TOF M-spektrima. U NMR spektrima jedinjenja **6** nema signala karakterističnih za vodonikove i ugljenikove atome dietilditioacetalne funkcije, dok potvrda prisustva nitrilne funkcije dolazi iz ^{13}C NMR spektra koji pokazuje karakterističan signal na 114.22 ppm.

Konačno, signal koji se u TOF M-spektru visoke rezolucije javlja na m/e 564.16435 ($M+H$)⁺ ukazuje na korektnu bruto formulu (izračunato za $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{NO}_8$: 564.16529), kao i visok stepen čistoće novosintetizovanog molekula **6**.

Naredna etapa naših istraživanja usmerena je na uvođenje heterocikličnog aglikona u molekul **6** koji poseduje odgovarajuću C_5 acikličnu strukturu. Planirano je da tiazolni prsten u nitril **6** uvedemo primenom dve sukcesivne reakcije ciklokondenzacijom sa hidrohloridom etilestra L-cisteina i oksidacijom sa BrCCl_3 u prisustvu DBU. Ova ideja zasniva se na radu Liang et al,¹⁰⁸ koji su uspešno ostvarili sintezu 3'-amino analoga tiazofurina iz D-glukoze.

Reakcijom jedinjenja **6** sa hidrohloridom etilestra L-cisteina u prisustvu trietilamina (apsolutni MeOH; sobna temperatura; 2 časa) dobija se smesa diastereoizomernih tiazolina **7** (smesa je zbog novouvedenog C-4 hiralnog centra; *Shema 3.3.*).

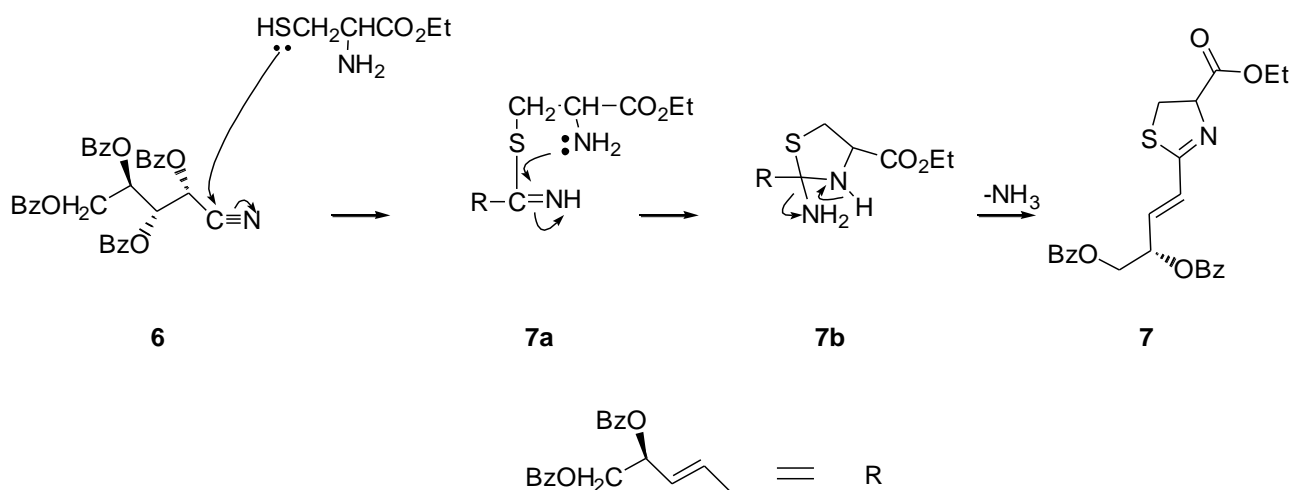


Reagensi i uslovi: (a) Hidrohlorid etilestra L-cisteina, Et_3N , MeOH, st, 2h; (b) DBU, BrCCl_3 , CH_2Cl_2 , $0^\circ\text{C} \rightarrow 4^\circ\text{C}$, 16h, 46.86% iz **6**; (c) NH_3 , MeOH, st, 8 dana, 86.69%

Shema 3.3.

Struktura novosintetizovanog jedinjenja **7** potvrđena je NMR spektrima dobijenih snimanjem sirove reakcione smese. U ^{13}C NMR spektru sirovog proizvoda **7** odsutan je signal karakterističan za nitrilnu funkciju, ali se na 34.51 ppm i 78.33 ppm javljaju signali (CH_2 -5 i C-4 respektivno), koji dokazuju prisustvo tiazolinskog aglikona u molekulu **7**. Mogući mehanizam ove transformacije prikazan je na *Shemi 3.4*. Prva faza ove ciklokondenzacije verovatno

uključuje nukleofilnu adiciju tiolne grupe L-cistenskog estra na nitrilnu funkciju molekula **6**. Nastali imino intermedijer **7a** podleže sukcesivnoj nukleofilnoj adiciji amino grupe na imino funkciju uz nastajanje tiazolidina **7b**, koji lako gubi NH₃ dajući očekivane tiazoline **7**.



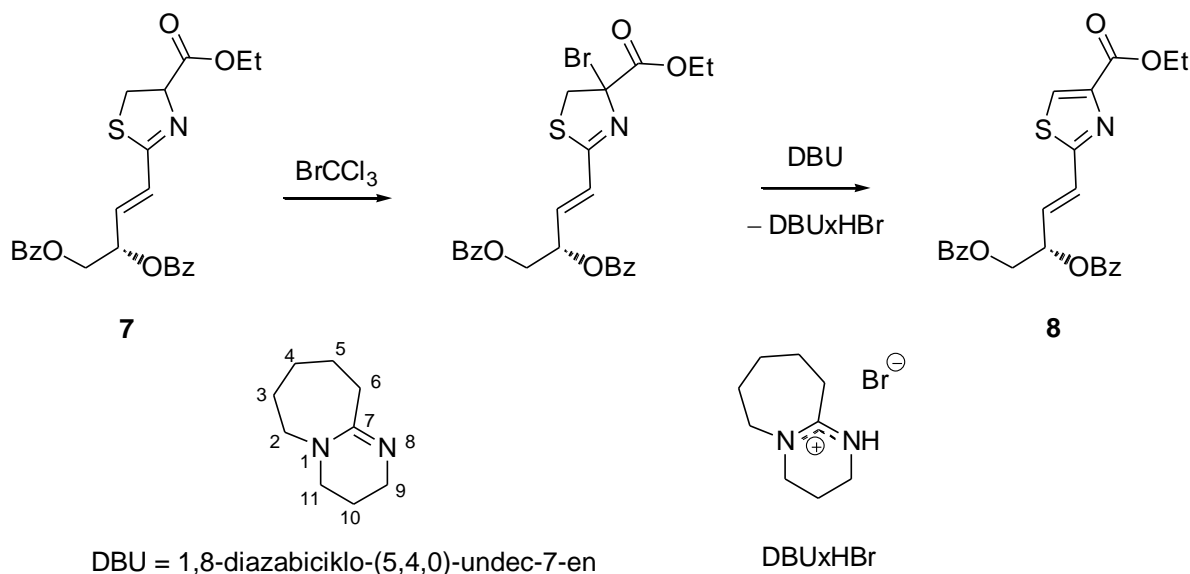
Shema 3.4. Mogući mehanizam prevodjenja nitrila **6** u tiazolin **7**

Tokom ove reakcije odigrava se i uvođenje dvostruke veze u aciklični fragment molekule nakon eliminacije dve benzoatne grupe.

Oksidacijom tiazolina **7** sa BrCCl₃ u apsolutnom metilenhloridu, na 4°C u toku 17 časova, nastao je (*E*),(*S*)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksilat (**8**) u prinosu od 46.86% u odnosu na **6** (računato na dve sintetičke faze). Struktura i čistoća nosintetizovanog C-nukleozida **8** potvrđena je IR-, NMR- i M-spektrima. ¹³C NMR Spektar jedinjenja **8** pokazuju signale C-atoma tiazolnog prstena: δ_C 127.04 (C-5), 147.63 (C-4) i 161.03 (C-2). Dokaz prisustva egzociklične dvostruke veze proizvoda **8** dobijen je takođe analizom njegovog ¹³C NMR spektra, pri čemu signali locirani na 125.96 ppm (C-1'), odnosno na 131.47 ppm (C-2') jasno ukazuju na prisustvo olefinske dvogube veze u položaju C_{1'}-C_{2'}. U protonskom NMR spektru jedinjenja **8** protonu sa C-2' odgovara dubletdubleta na 6.76 ppm, sa vicinalnim kuplovanjima od 5.3 i 16 Hz. činjenica da je ovaj signal pomeren u oblast visokih vrednosti frekvencija, kao i velika vrednost njegovog kuplovanja sa H-1', definitivno potvrđuje *E* konfiguraciju dvostruke veze. Konačno, signal koji se u TOF M-spektru visoke rezolucije javlja na m/e 452.11623 (M+H)⁺ ukazuje na korektnu bruto formulu (izračunato za C₂₄H₂₂NO₆S: 452.11606), kao i visok stepen čistoće nosintetizovanog molekula **8**.

Mogući mehanizam prevođenja tiazolina **7** u tiazol **8** prikazan je na *Shemi 3.5*.

U prvoj fazi ove oksidacije uvodi se brom u položaj C-4 pomoću bromtrihlormetana, a zatim sledi eliminacija bromovodonika dejstvom DBU, koji se pri tom transformiše u odgovarajući hidrobromid stabilizovan rezonancom.



Shema 3.5. Mogući mehanizam prevodjenja tiazolina **7** u tiazol **8**

Dejstvom metanolnog rastvora amonijaka na jedinjenje **8** (sobna temperatura, 6 dana), ostvarena je amonoliza svih estarskih grupa, pri čemu je dobijen slobodni C-nukleozid **9** u prinosu od 86.69% (*Shema 3.3.*).

Na strukturu deblokiranog nukleozida **9** ukazuje odsustvo signala karakterističnih za benzoatnu i etil-estarsku funkciju u njegovim ^1H i ^{13}C NMR spektrima. Oba NMR spektra pokazuju signale locirane u oblasti visokih vrednosti frekvencija [δ_{H} 6.80 (H-2') i 6.96 (H-1'); δ_{C} 124.26 (C-1') i 139.53 (C-2')] koji ukazuju na prisustvo olefinske veze u položaju C₁-C₂'. Signal na 8.14 ppm (s, 1H, H-5) u ^1H NMR spektru potvrđuje prisustvo tiazolnog prstena, dok amidnoj funkciji odgovara signal na 168.30 ppm ($\underline{\text{C}}\text{ONH}_2$) u ^{13}C NMR spektru. Konačno, signal koji se u TOF M-spektru visoke rezolucije javlja na m/e 237.03173 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ ukazuje na korektnu bruto formulu (izračunato za C₈H₁₀N₂NaO₃S: 237.03043), kao i visok stepen čistoće novosintetizovanog molekula **9**.

Naredna etapa istraživanja posvećena je reduktivnoj transformaciji dvostruke veze jedinjenja **8** (*Shema 3.6.*), u cilju dobijanja zasićenog analoga jedinjenja **9**. Katalitičkim hidrogenovanjem olefina **8** u etanolu uz 10% Pd/C kao katalizator, pri normalnom pritisku vodonika, na sobnoj temperaturi u toku 72 časa dobija se zasićeni aciklični nukleozid **10** u prinosu od 54.20%. Iz reakcioni smese izolovan je i butil analog **11** (30.75%), nastao kao rezultat eliminacije ili hidrogenolize estarskih grupa (*Shema 3.6.*).

Strukture novosintetizovanih jedinjenja **10** i **11** potvrđene su NMR spektrima:

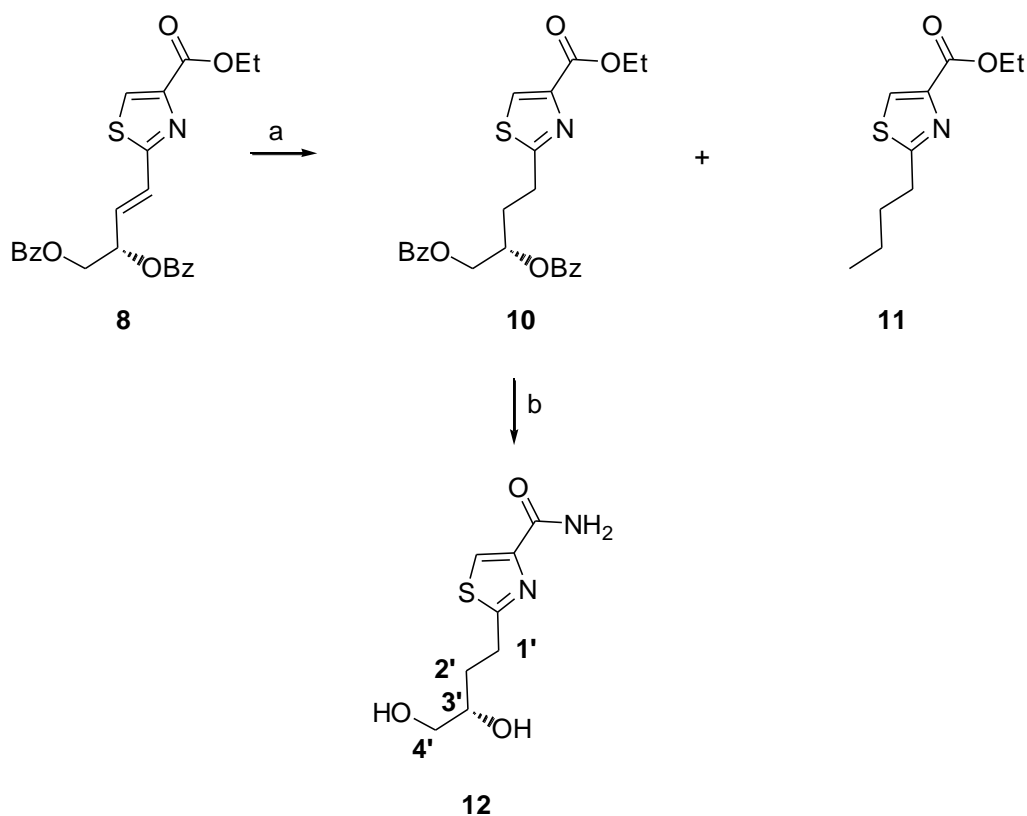
^1H i ^{13}C NMR spektri jedinjenja **10** ne sadrže signale koji bi ukazivali na prisustvo olefinske grupe, dok karakteristični signali u ^{13}C NMR spektru u oblasti niskih vrednosti frekvencija (29.45 i 31.03 ppm, $\text{CH}_2\text{-1'}$ i $\text{CH}_2\text{-2'}$) dokazuje prisustvo dve metilenske grupe.

Prisustvo tiazolnog prstena u strukturi proizvoda **10** potvrđeno je signalom koji se u njegovom protonskom NMR spektru javlja na 8.03 ppm, a potiče od rezonance vinilnog protona u tiazolnom prstenu. Ostali spektroskopski podaci takođe su u potpunoj saglasnosti sa strukturom **10**.

NMR spektroskopijom dokazano je prisustvo butil grupe kao i etil estarske grupe u jedinjenju **11**: δ_{H} 0.95 (t, 3H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 0.34-1.53 (grupa signala, 2H, CH_2), 1.79 (m, 2H, CH_2), 3.07 (t, 2H, CH_2); 1.40 (t, OCH_2CH_3), 4.43 (q, 2H, COCH_2CH_3), δ_{C} 172.49 (COOC_2H_5).

Dejstvom metanolnog rastvora amonijaka na jedinjenje **10** (sobna temperatura, 16 dana), ostvarena je amonoliza svih estarskih grupa, pri čemu je dobijen slobodni C-nukleozid **12** u prinosu od 71.0% (*Shema 3.6.*).

Na strukturu deblokiranog nukleozida **12** ukazuje odsustvo signala karakterističnih za benzoatnu i etil-estarsku funkciju u njegovim ^1H i ^{13}C NMR spektrima. Oba NMR spektra pokazuju signale locirane u oblasti niskih vrednosti frekvencija [δ_{H} 1.86 i 2.03 (H-2') i 3.17 (H-1'); δ_{C} 30.26 i 34.32 (C-2' i C-1')] koji ukazuju na prisustvo tiazolnog prstena i karboksamidne funkcije na njemu u položaju C-4. Signal na 8.07 ppm (s, 1H, H-5) u ^1H NMR spektru potvrđuje prisustvo tiazolnog prstena, dok amidnoj funkciji odgovara signal na 173.10 ppm (CONH_2) u ^{13}C NMR spektru. Konačno, signal koji se u TOF M-spektru visoke rezolucije javlja na m/e 217.06344 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ukazuje na korektnu bruto formulu (izračunato za $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}$: 217.06414), kao i visok stepen čistoće novosintetizovanog molekula **12**.



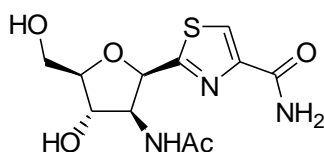
Reagensi i uslovi: (a) H₂, Pd/C, EtOH, 72 h, 54.20% za **10** i 30.75 za **11** (b) NH₃, MeOH, st, 16 dana, 71.0%

Shema 3.6.

3.2.2. Analizi koji nisu sintetizovani u okviru ovog rada a detaljno su biološki i biohemijski ispitivani

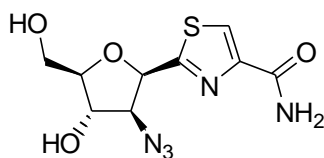
Takođe, predmet ove doktorske disertacije podrazumevao je detaljno ispitivanje bioloških i biohemijskih aspekata antitumorskog dejstva petnaest analoga tiazofurina koji su ranije sintetizovani u našoj laboratoriji.

Analizi tiazofurna *arabino* konfiguracije



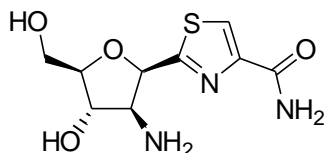
13, 2-(2-Acetamido-2-deoksi-β-D-arabonofuranosil)tiazol-4-karboksamid ¹⁰⁹

Shema 3.7.



14, 2-(2-Azido-2-deoksi- β -D-arabonofuranosil)thiazol-4-karboksamid¹¹⁰

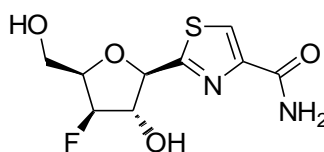
Shema 3.8.



15, 2-(2-Amino-2-deoksi- β -D-arabonofuranosil)thiazol-4-karboksamid¹¹⁰

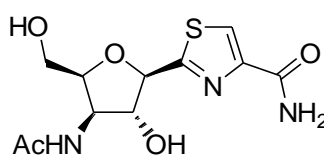
Shema 3.9.

Analozi tiazofurna *ksilo* konfiguracije



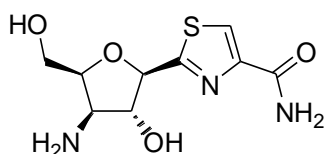
16 2-(3-Deoksi-3-fluoro- β -D-ksilofuranosil)thiazol-4-karboksamid¹¹¹

Shema 3.10.



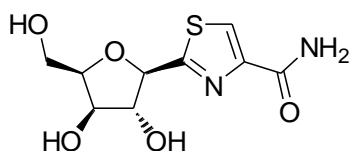
17, 2-(3-Acetamido-3-deoksi- β -D-ksilofuranosil)thiazol-4-karboksamid¹¹¹

Shema 3.11.



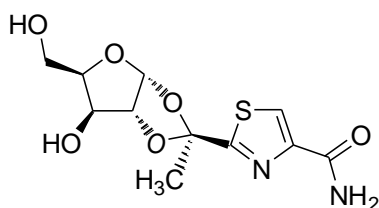
18, 2-(3-Amino-3-deoksi- β -D-ksilofuranosil)thiazol-4-karboksamid¹¹²

Shema 3.12.



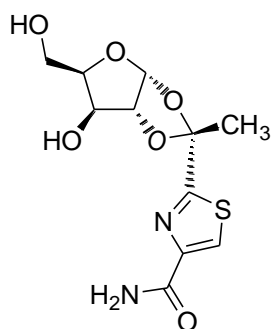
19, 2-(β-D-Ksilofuranozil)tiazol-4-karboksamid¹¹⁰

Shema 3.13.



20, 2-([(S)-1,2-O-(Etiliden-egzo-1-C-il)]-β-D-ksilofuranoza)tiazol-4-karboksamid¹¹⁰

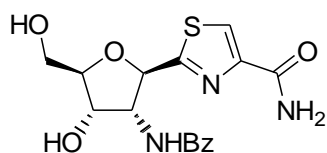
Shema 3.14.



21, 2-([(R)-1,2-O-(Etiliden-endo-1-C-il)]-β-D-ksilofuranoza)tiazol-4-karboksamid¹¹⁰

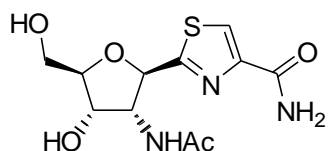
Shema 3.15.

Analozi tiazofurna *ribo* konfiguracije



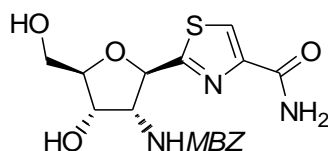
22, 2-(2-Benzamido-2-deoksi-β-D-ribofuranozil)tiazol-4-karboksamid¹¹³

Shema 3.16.



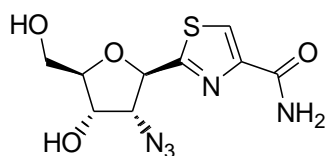
23, 2-(2-Acetamido-2-deoksi-β-D-ribofuranozil)thiazol-4-karboksamid¹¹⁴

Shema 3.17.



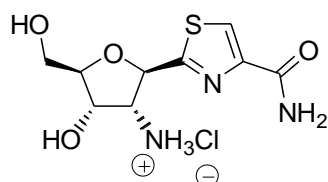
24, 2-[2-deoksi-2-(3-metoksibenzamido)-β-D-ribofuranozil]thiazol-4-karboksamid¹¹⁴

Shema 3.18.



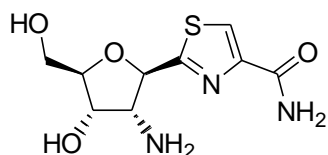
25, 2-(2-Azido-2-deoksi-β-D-ribofuranozil)thiazol-4-karboksamid¹¹³

Shema 3.19.



26, 2-(2-Amino-2-deoksi-β-D-ribofuranozil)thiazol-4-karboksamid hidrohlorid

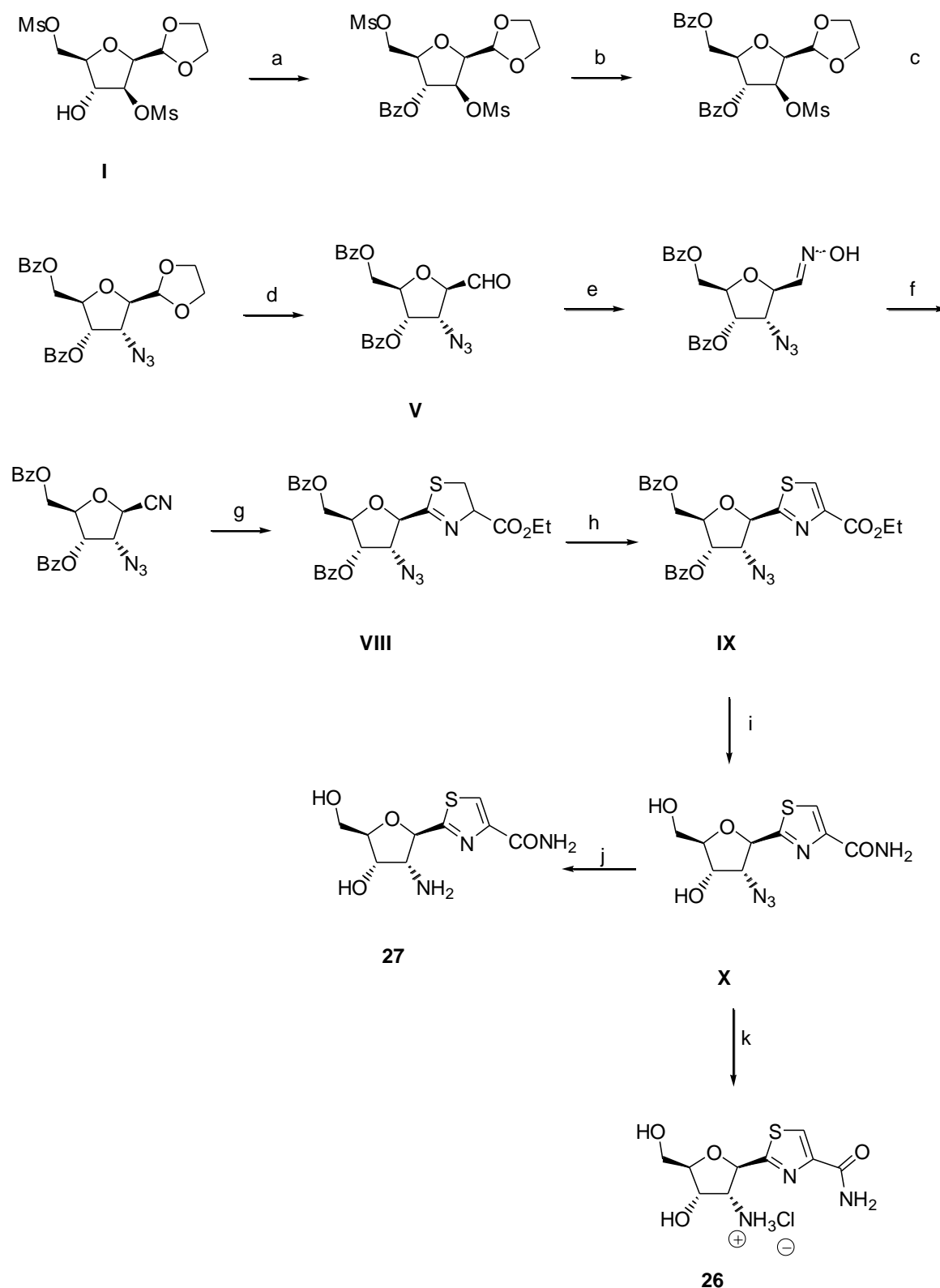
Shema 3.20.



27, 2-(2-Amino-2-deoksi-β-D-ribofuranozil)thiazol-4-karboksamid

Shema 3.21.

Jedinjenja **26** i **27** su dobijena primenom reakcione sekvence koja je prikazana na *Shemi 3.22*.



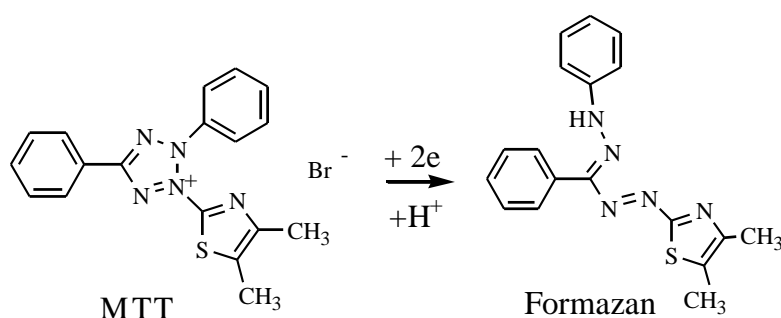
Reagensi i uslovi: (a) BzCl, Py, CH_2Cl_2 , st, 48 h, 95.44%; (b) KOBz, DMF, $100^\circ C$, 12 h, 85.02%; (c) NaN_3 , DMSO, $108-110^\circ C$, 24 h, 60.61%; (d) 4:1 TFA-6M HCl, $4^\circ C$, 140 h; (e) $NH_2OH \cdot HCl$, NaOAc, EtOH, CH_2Cl_2 , st, 2 h; (f) MsCl, Py, $-15^\circ C$, 0.5 h, zatim st, 2 h, 59.27% u odnosu na **IV**; (g) Hidrohlorid etilestra L-cisteina, Et_3N , MeOH, st, 2h, 76.44%; (h) DBU, $BrCCl_3$, CH_2Cl_2 , $0^\circ C$, 5h \rightarrow $4^\circ C$, 17h, 84.22%; (i) NH_3 , MeOH, st, 7 dana, 93.2% (j) H_2 , 10% Pd/C, EtOH, st, 36 h, 64.93%; (k) H_2 , 10% Pd/C, EtOH i $CHCl_3$, st, 24 h, 88.70%.

Shema 3.22.

3.3. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti

Uspešan ishod procesa razvoja novih, efikasnijih antitumorskih agenasa podrazumeva pronalaženje takvih molekula koji u niskim koncentracijama izazivaju visok stepen inhibicije rasta neoplastičnih ćelija. Sposobnost nekog jedinjenja da inhibira rast kulture ćelija kvantitativno se izražava u procentima, odnosno kao IC₅₀ vrednost (koncentracija ispitivane supstance pri kojoj se broj tretiranih ćelija smanjuje za 50% u odnosu na netretiranu kontrolu).

Imajući u vidu postavljeni cilj ove doktorske disertacije, u finalnoj etapi naših radova ispitivan je uticaj novosintetizovanih C-nukleozida na rast sledećih humanih ćelijskih linija: hronična mijeloidna leukemija (K562), promijelocitna leukemija (HL-60), leukemija T-limfocita (Jurkat), Burkittov limfom (Raji), adenokarcinom prostate (PC-3), karcinom kolona (HT-29), adenokarcinom dojke (MCF-7) pozitivan na estrogenske receptore (ER+), adenokarcinom dojke (MDA-MB-231) negativan na estrogenske receptore (ER-), karcinom grlića materice (HeLa), melanom (Hs 294T) i normalni fibroblasti pluća (MRC-5). Tiazofurin je primenjen kao referentno jedinjenje. Ćelijske linije su izložene delovanju tiazofurina, **9** i **12-27** tokom 24, 48 i 72 h u rasponu koncentracija od 0.01 do 100 μM. Efekat pomenutih jedinjenja na rast ćelija izmeren je tetrazolijum kolorimetrijskim testom (MTT test)¹¹⁵ neposredno po završetku inkubacije. Princip metode se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid, (MTT)] u plavo obojeni proizvod (formazan; *Shema 3.23.*), u prisustvu mitohondrijalnog enzima sukcinat dehidrogenaze. Količina nagrađenog formazana direktno je proporcionalna broju vijabilnih ćelija, a apsorbanca se određuje na spektrofotometru (mikročitaču), na dve talasne dužine: test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm.*



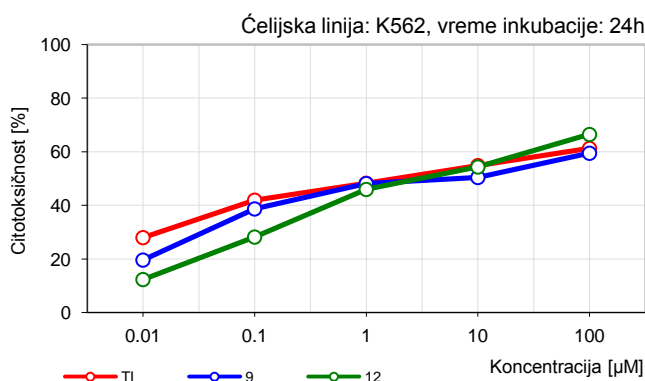
Shema 3.23.: Metabolička transformacija MTT u formazan

* Za detalje videti eksperimentalni deo.

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni pomoću programa *Statistica for Windows, Release 5.0*. Srednja vrednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije izračunati su za replikate (najmanje triplikati) uzoraka u svakom eksperimentu. Svaki eksperiment je urađen tri puta. Koeficijent varijacije (CV) u eksperimentalnim i kontrolnim kulturama bio je manji od 10%. Koncentracija pri kojoj se postiže 50% inhibicije rasta, odnosno citotoksičnosti (IC_{50}), određena je “Median effect” analizom pomoću programa *CalcuSyn*.

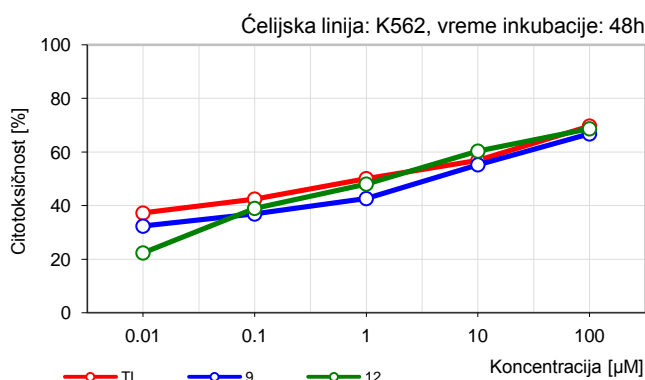
Uticaj tiazofurina i analoga na rast K562 ćelija

Na osnovu rezultata dobijenih tretiranjem K562 ćelijske linije tiazofurinom i njegovim analogima, **9** i **12**, u rasponu koncentracija od 0.01 do 100 μM i u toku 24, 48 i 72 h (Slika 3.1.), može se zaključiti da tiazofurin i oba analoga inhibiraju rast K562 ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije ispitivane supstance i vremena tretmana. Tip odgovora za sva ispitivana jedinjenja je isti u svim ispitivanim vremenima.



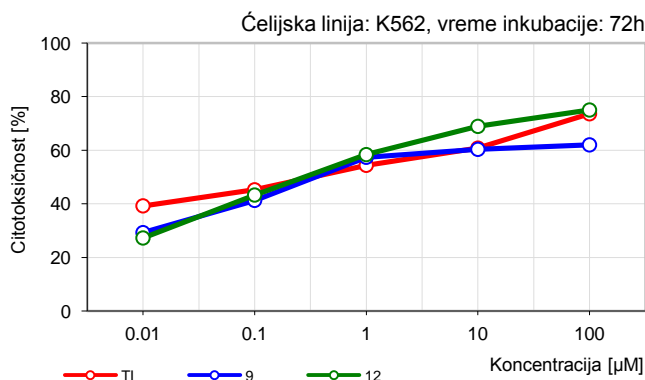
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 28.01 | 41.98 | 48.29 | 54.88 | 61.28 |
| 9 | 19.64 | 38.72 | 48.18 | 50.45 | 59.48 |
| 12 | 12.38 | 28.23 | 45.98 | 54.36 | 66.48 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 37.24 | 42.46 | 50.09 | 56.87 | 69.69 |
| 9 | 32.36 | 36.88 | 42.65 | 55.24 | 66.77 |
| 12 | 22.36 | 38.98 | 48.05 | 60.34 | 68.67 |



Inkubacija: **72h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 39.24 | 45.23 | 54.37 | 60.78 | 73.59 |
| 9 | 29.26 | 41.28 | 57.36 | 60.33 | 61.99 |
| 12 | 27.26 | 43.28 | 58.36 | 68.89 | 74.99 |

Slika 3.1. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju K562 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

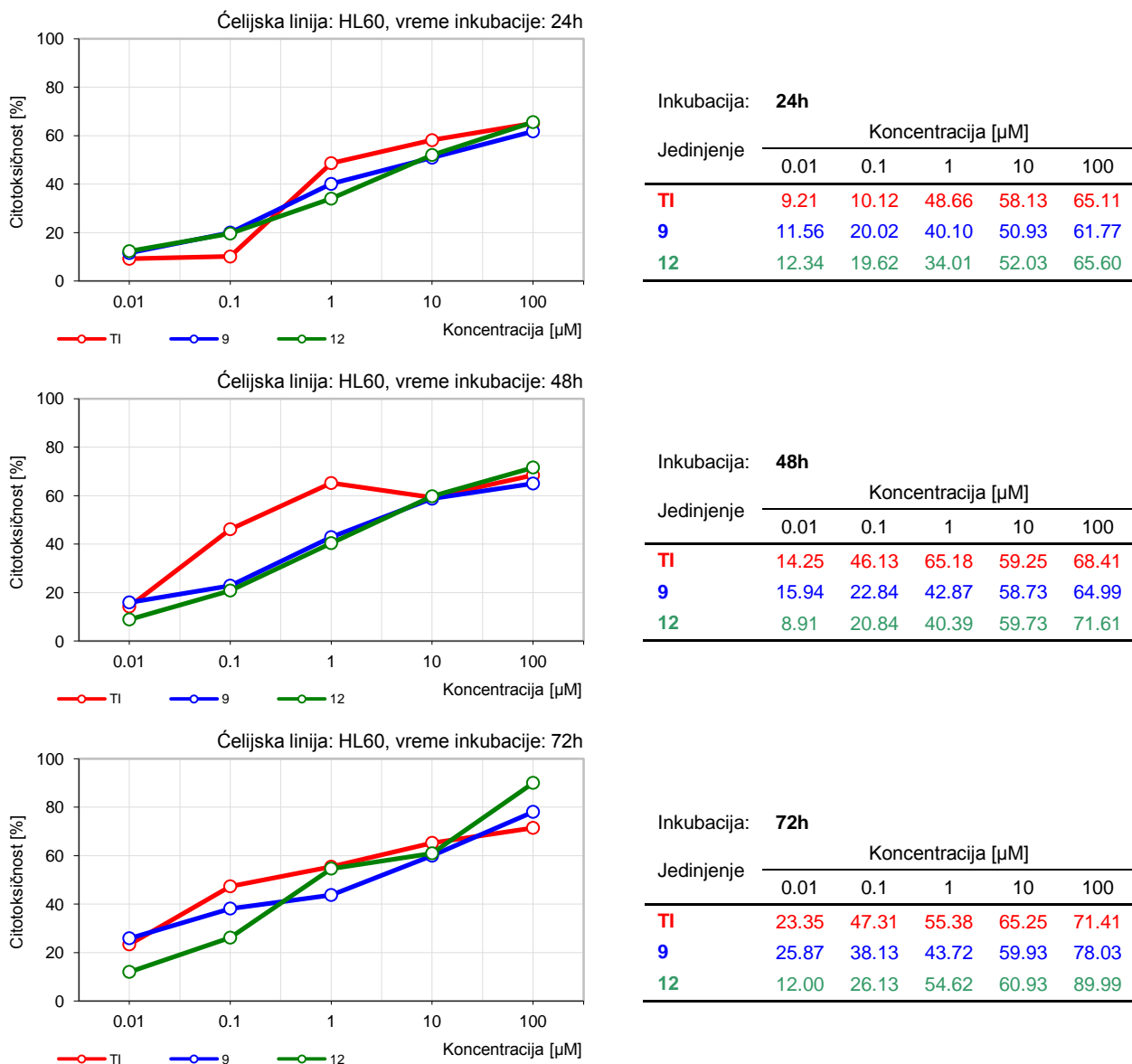
Utvrđeno je da se nakon 24 h inkubacije najsnažniji antiproliferativni efekat imao analog **12**, koji pri koncentraciji od 100 μM smanjuje broj ćelija za 66% u odnosu na kontrolu. Nukleozid **9** i tiazofurin, pri istoj koncentraciji, izazivaju gotovo isti antiproliferativni efekat (59 odnosno

61%). Najveća razlika u citotoksičnosti ispitivanih jedinjenja registrovana je pri koncentraciji od 0,01 μ M, pri kojoj je antiproliferativni efekat analoga **12** bio za 8 i 20% niži od **9**, odnosno od tiazofurina.

Nakon inkubacije u toku 48 i 72 h sva tri ispitivana jedinjenja pokazuju dozno-zavisnu inhibiciju proliferacije K562 ćelija pri svim koncentracijama (*Slika 3.1.*). Pri tome je ponovo potvrđeno da snažniji antiproliferativni efekat ima analog **12** koji je pokazao veći antiproliferativni efekat pa je za 100 μ M stepen inhibicije 75%. Analog **12** je pokazao veći antiproliferativni efekat od tiazofurina za koncentracije od 1 do 100 μ M, a najveći stepen citotoksičnosti registrovan je pri koncentraciji od 10 μ M (69% za **12** i 60% za **TI**). U najvećoj koncentraciji tiazofurin je ispoljio neznatno nižu antiproliferativnu aktivnost (69% za 48 h i 73% za 72 h) od analoga **12** (68% i 75%).

Uticaj tiazofurina i analoga na rast HL-60 ćelija

Citotoksični profil tiazofurina i analoga (**9** i **12**) prema HL-60 ćelijskoj liniji prikazan je na *Slici 3.2*.



Slika 3.2. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju HL-60 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

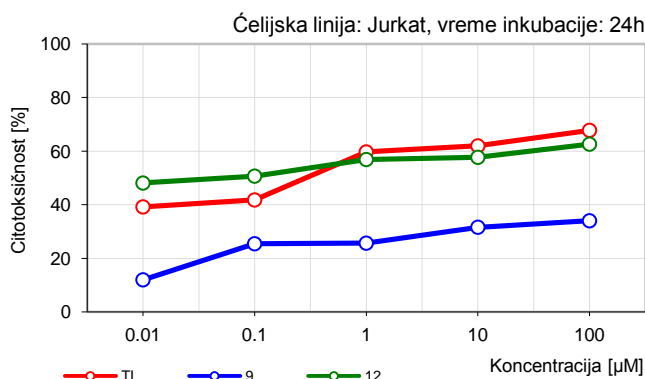
Iz priloženih dijagrama se vidi da sve tri supstance inhibiraju rast HL-60 ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije ispitivane supstance i vremena inkubacije. Sva ispitivana jedinjenja pokazuju sličnu aktivnost i isti tip odgovora tokom sva tri ispitivana vremenska intervala.

Nakon 24 h inkubacije, snažniji antiproliferativni efekat imala su oba analoga **9** i **12**, koji već pri koncentraciji od 0.1 μ M smanjuje broj ćelija za 20% odnosno 19% u odnosu na kontrolu, dok se dejstvom tiazofurina, pri istoj koncentraciji, postiže antiproliferativni efekat od samo 10%. Pri najvećoj koncentraciji referentno jedinjenje je pokazalo nešto veći antiproliferativan efekat (66%) od **9** (60%) a neznatno veći od **12** (65%).

Nakon inkubacije u toku 48 i 72 h analozi **9** i **12** pokazali su sličan antiproliferativni efekat pri svim ispitivanim koncentracijama. Pri koncentraciji od 100 μ M i za isti vremenski period tiazofurin je pokazao sličan ili slabiji antiproliferativni efekat (68% za 48 h i 71% za 72 h), a analog **12** (72% i 90%) je bio efikasniji od **9** (65% i 78%). Tiazofurin i oba analoga pri najnižoj koncentraciji inhibiraju rast HL-60 ćelija u intervalu 9–25%.

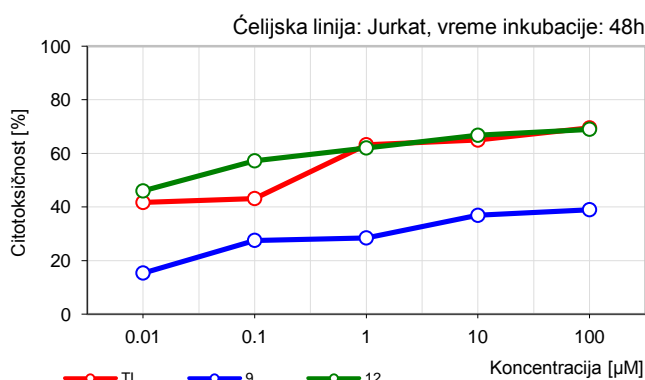
Uticaj tiazofurina i analoga na rast Jurkat ćelija

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih tretiranjem Jurkat ćelijske linije tiazofurinom i analogima **9** i **12**, u intervalu koncentracija od 0.01 do 100 μM tokom 24, 48 i 72 časa, vidi se da tiazofurin i oba analoga inhibiraju rast Jurkat ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije ispitivane supstance i dužine tretmana. Analog **9** pokazuje veoma nisku citotoksičnost prilikom inkubacije u toku 24 i 48 h (Slika 3.3.).



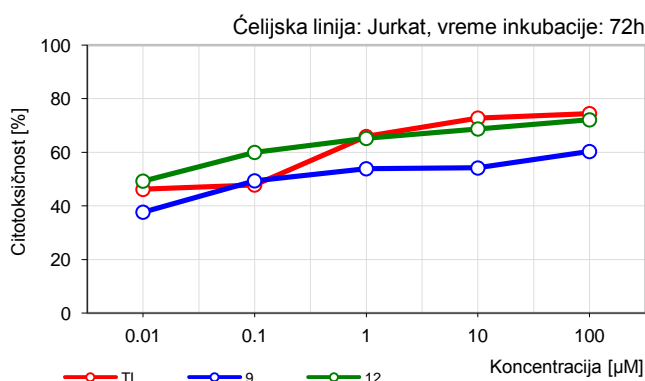
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 39.19 | 41.78 | 59.69 | 61.95 | 67.75 |
| 9 | 11.99 | 25.45 | 25.67 | 31.61 | 34.02 |
| 12 | 48.09 | 50.66 | 56.86 | 57.69 | 62.60 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 41.67 | 43.13 | 63.20 | 64.93 | 69.48 |
| 9 | 15.36 | 27.54 | 28.45 | 36.87 | 38.97 |
| 12 | 45.98 | 57.20 | 62.01 | 66.73 | 68.98 |



Inkubacija: **72h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 46.18 | 47.82 | 65.93 | 72.80 | 74.47 |
| 9 | 37.70 | 49.39 | 53.90 | 54.18 | 60.32 |
| 12 | 49.28 | 59.99 | 65.21 | 68.73 | 72.14 |

Slika 3.3. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju Jurkat ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

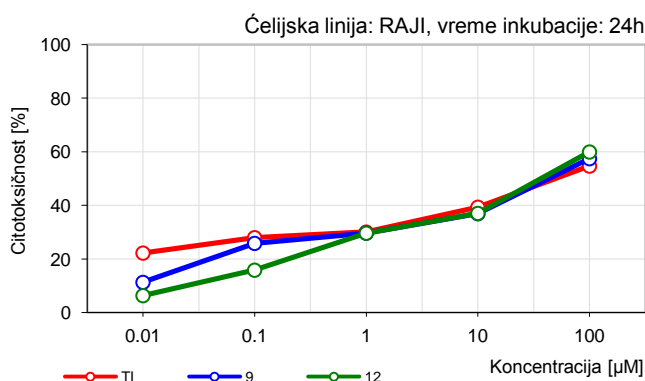
Nakon 24 h inkubacije najsnažniji antiproliferativni efekat imao je analog **12**, koji već pri koncentraciji od 0.01 μM smanjuje broj ćelija na 48% u odnosu na kontrolu, dok se dejstvom

analog **9** i tiazofurina pri istoj koncentraciji, postiže slabiji antiproliferativni efekat (12, odnosno 39%). Pri najvećoj koncentraciji **12** je pokazao aktivnost sličnu tiazofurinu, dok je aktivnost **9** bila manja za ceo raspon koncentracija u sva tri vremena inkubacije.

Sa porastom koncentracije, citotoksičnost tiazofurina i **12** je gotovo ista u toku 48 i 72 h, pa je pri koncentraciji od 100 μM kod oba jedinjenja oko 70%, dok je analog **9** bio aktivan tek nakon 72 h, tako da je za 100 μM dostigao aktivnost od 60%.

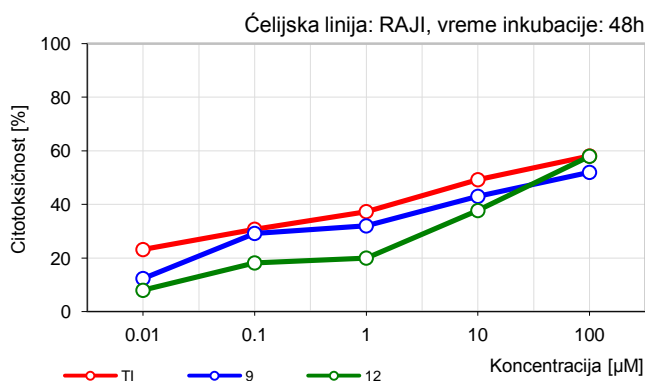
Uticaj tiazofurina i analoga na rast Raji ćelija

Na osnovu prikazanih rezultata dobijenih tretiranjem Raji ćelijske linije tiazofurinom i analogima, **9** i **12**, u opsegu koncentracija od 0.01 do 100 μM tokom 24, 48 i 72 h, može se zaključiti da sve tri supstance inhibiraju rast Raji ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije ispitivane supstance i dužine tretmana (Slika 3.4.).



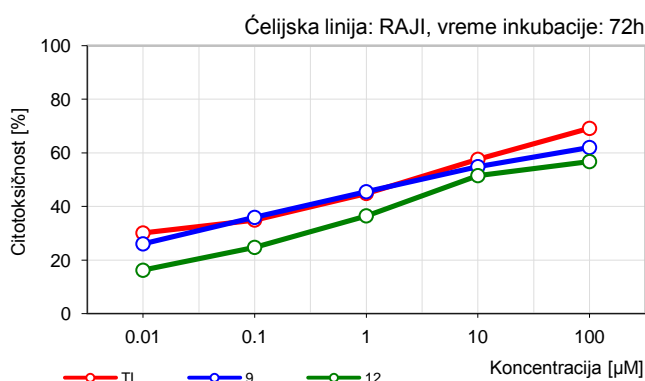
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 22.25 | 28.00 | 30.06 | 39.36 | 54.69 |
| 9 | 11.32 | 25.87 | 29.67 | 36.94 | 57.45 |
| 12 | 6.37 | 15.87 | 29.67 | 37.04 | 59.95 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 23.17 | 30.77 | 37.33 | 49.23 | 58.07 |
| 9 | 12.38 | 29.20 | 32.01 | 43.03 | 51.98 |
| 12 | 7.98 | 18.20 | 20.01 | 37.73 | 57.98 |



Inkubacija: **72h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 30.11 | 34.94 | 44.86 | 57.58 | 69.12 |
| 9 | 26.05 | 35.92 | 45.49 | 54.85 | 61.99 |
| 12 | 16.21 | 24.73 | 36.49 | 51.50 | 56.73 |

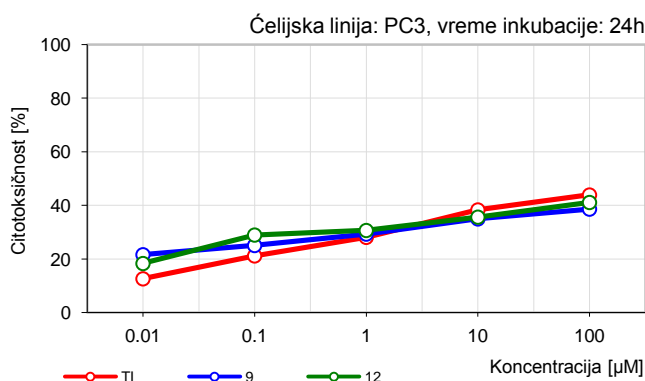
Slika 3.4. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju Raji ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Pri koncentraciji od 0.01 μM tiazofurin inhibira rast ćelija za 22%, dok se pri dejstvu analoga, pri istoj koncentraciji, nakon 24 h, postiže gotovo isti antiproliferativni efekat od 12% za **9**, odnosno 16% za **12**.

Nakon inkubacije u toku 48 i 72 h tiazofurin je pokazao nešto jači antiproliferativni efekat pri svim ispitivanim koncentracijama u odnosu na oba novosintetizovana analoga. Citotoksičnost tiazofurina pri koncentraciji od 100 μM je neznatno veća od antiproliferativnog efekta analoga **9** (za 8%), odnosno **12** (za 16%) nakon 72 h inkubacije.

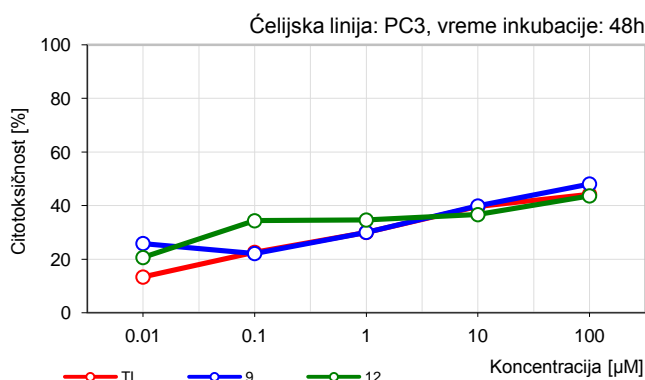
Uticaj tiazofurina i analoga na rast PC-3 ćelija

Tretiranjem PC-3 ćelijske linije tiazofurinom i analogima **9** i **12** u rasponu koncentracija od 0.01 do 100 μM u toku 24, 48 i 72 časa, zaključuje se da tiazofurin i oba analoga pokazuju dozno ali ne i vremenski zavisnu inhibiciju. Utvrđeno je da nakon sva tri ispitivana vremena inkubacije jedinjenja daju isti tip biološkog odgovora (Slika 3.5.).



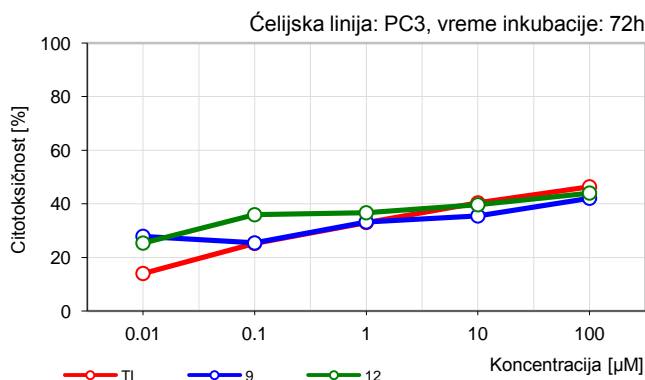
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 12.65 | 21.19 | 28.12 | 38.34 | 43.91 |
| 9 | 21.63 | 25.07 | 29.32 | 34.99 | 38.65 |
| 12 | 18.36 | 28.97 | 30.68 | 35.65 | 41.12 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 13.36 | 22.58 | 30.02 | 39.65 | 44.25 |
| 9 | 25.87 | 22.14 | 30.04 | 39.87 | 48.08 |
| 12 | 20.64 | 34.36 | 34.64 | 36.64 | 43.64 |



Inkubacija: **72h**

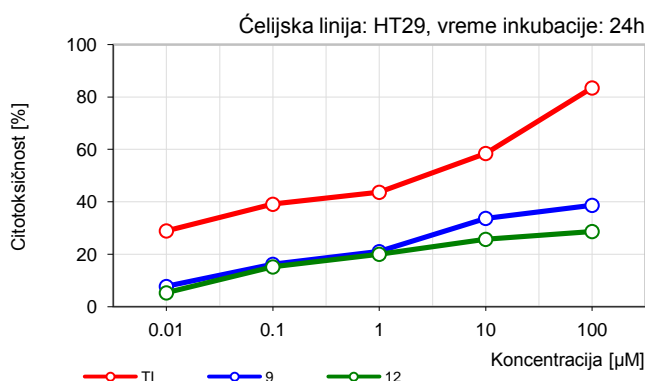
| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 14.02 | 25.23 | 33.03 | 40.36 | 46.35 |
| 9 | 27.87 | 25.41 | 33.24 | 35.48 | 42.09 |
| 12 | 25.36 | 35.93 | 36.67 | 39.65 | 44.02 |

Slika 3.5. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju PC-3 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Tiazofurin, kao i oba analoga, pokazali su veoma nisku, gotovo identičanu citotoksičnost, u sva tri ispitivana vremena inkubacije, za ceo raspon koncentracija (12-46% za TI, 21-42% za **9** i 18-44% za **12**) (Slika 3.5.).

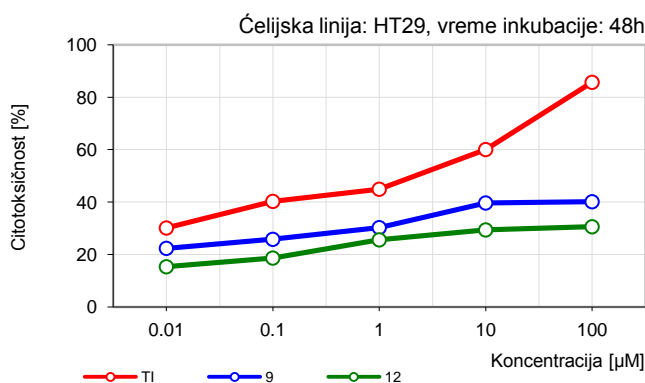
Uticaj tiazofurina i analoga na rast HT-29 ćelija

Na Slici 3.6. prikazan je uticaj **9**, **12** i tiazofurina na HT-29 ćelije nakon inkubacije u toku 24, 48 i 72 h. Sva tri ispitivana jedinjenja inhibiraju proliferaciju HT-29 ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije, ali ne i od dužine tretmana. Oba analoga **9** i **12** su ispoljila veoma nisku citotoksičnost (10–44%) u sva tri ispitivana vremena inkubacije.



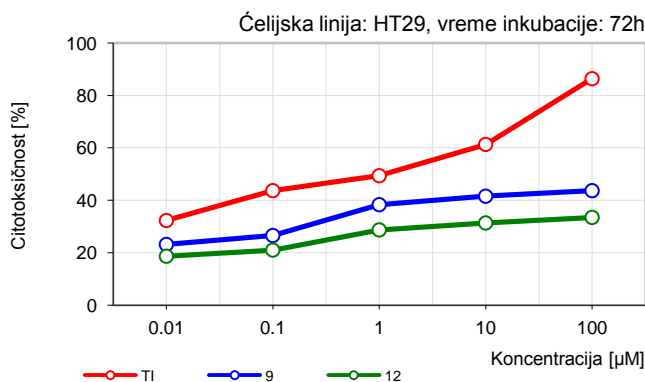
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [µM] | | | | |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 28.91 | 39.09 | 43.66 | 58.47 | 83.46 |
| 9 | 7.71 | 16.17 | 21.01 | 33.70 | 38.68 |
| 12 | 5.28 | 15.17 | 20.01 | 25.70 | 28.68 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [µM] | | | | |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 30.11 | 40.26 | 44.89 | 60.03 | 85.69 |
| 9 | 22.34 | 25.78 | 30.24 | 39.64 | 40.12 |
| 12 | 15.32 | 18.64 | 25.58 | 29.36 | 30.57 |



Inkubacija: **72h**

| Jedinjenje | Koncentracija [µM] | | | | |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 32.25 | 43.65 | 49.35 | 61.29 | 86.37 |
| 9 | 23.12 | 26.54 | 38.31 | 41.54 | 43.65 |
| 12 | 18.65 | 20.98 | 28.67 | 31.33 | 33.43 |

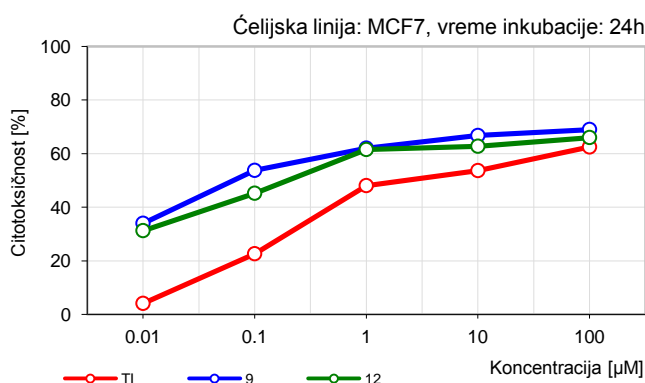
Slika 3.6. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju HT-29 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Sva ispitivana jedinjenja u svim vremenskim periodima pokazuju skoro identičan tip odgovora. Oba analoga su ispoljila nisku citotoksičnost (8–43% za **9**, 6–33% za **12**). Tiazofurin je pokazao skoro isti antiproliferativni efekat u intervalu koncentracija od 0.01 do 1 µM u sva tri vremenska

perioda. Pri koncentraciji $\geq 1 \mu\text{M}$ detektovan je znatno jači antiproliferativni efekat tiazofurina od oba analoga (oko 40%).

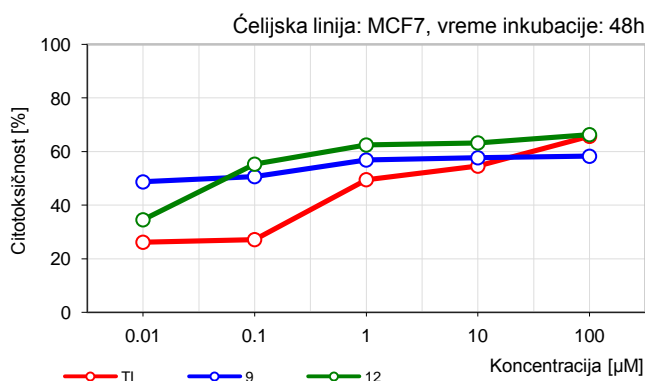
Uticaj tiazofurina i analoga na rast MCF-7 ćelija

Na Slici 3.7. je prikazan uticaj **9**, **12** i tiazofurina u toku 24, 48 i 72 časa inkubacije na MCF-7 ćelijsku liniju. Sva tri ispitivana jedinjenja inhibiraju rast MCF-7 ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije i od vremena tretmana.



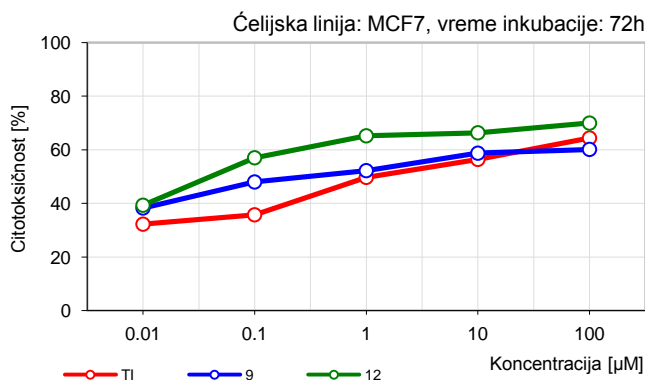
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 4.11 | 22.63 | 48.04 | 53.64 | 62.45 |
| 9 | 33.98 | 53.72 | 62.01 | 66.73 | 68.98 |
| 12 | 31.25 | 45.20 | 61.51 | 62.73 | 65.98 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 26.19 | 27.17 | 49.52 | 54.58 | 65.70 |
| 9 | 48.69 | 50.66 | 56.86 | 57.69 | 58.26 |
| 12 | 34.56 | 55.31 | 62.45 | 63.24 | 66.31 |



Inkubacija: **72h**

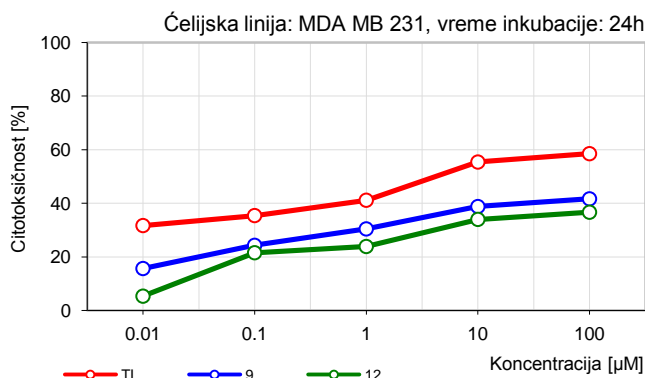
| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 32.25 | 35.74 | 49.70 | 56.41 | 64.38 |
| 9 | 38.28 | 47.99 | 52.21 | 58.73 | 60.14 |
| 12 | 39.32 | 57.02 | 65.21 | 66.34 | 69.95 |

Slika 3.7. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju MCF-7 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Nakon 24 i 48 h inkubacije tiazofurin je pokazao niži antiproliferativni efekat pri koncentracijama od 0.01 do 10 μM u odnosu na nosintetizovane analoge. Takođe je utvrđeno da oba analoga, **9** i **12**, pri svim ispitivanim koncentracijama (33–69% za **9** i 33–70% za **12**), pokazuju skoro identičan antiproliferativni efekat. Pri koncentraciji od 1 μM i većim detektovan je slabiji antiproliferativni efekat tiazofurina od oba analoga.

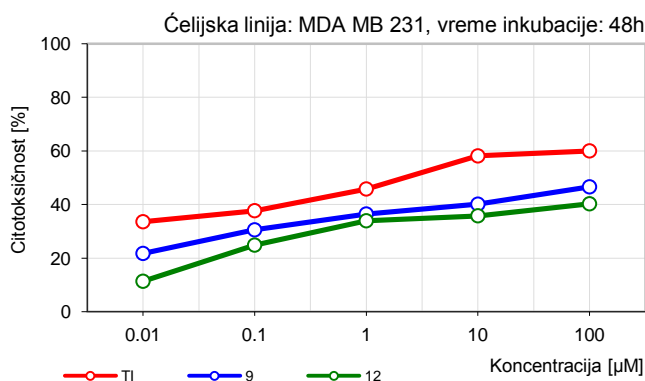
Uticaj tiazofurina i analoga na rast MDA-MB-231 ćelija

Tretiranjem MDA-MB-231 ćelijske linije tiazofurinom i analogima **9** i **12**, u rasponu koncentracija od 0.01 do 100 μM tokom 24, 48 i 72 časa, može se zaključiti da sve tri supstance inhibiraju rast MDA-MB-231 ćelija, a stepen inhibicije zavisi od koncentracije i od vremena tretmana.



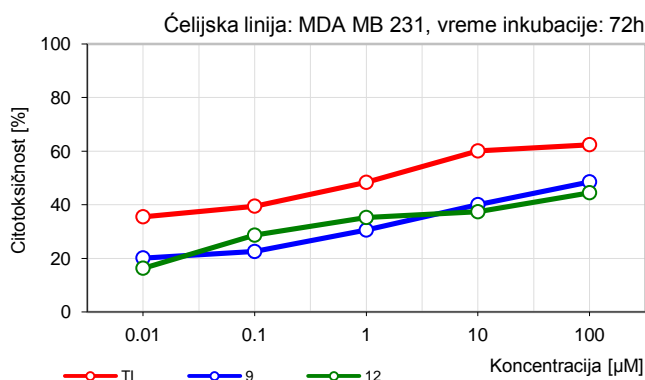
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 31.70 | 35.42 | 41.15 | 55.40 | 58.51 |
| 9 | 15.67 | 24.33 | 30.45 | 38.79 | 41.65 |
| 12 | 5.36 | 21.56 | 23.89 | 34.00 | 36.68 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 33.56 | 37.68 | 45.78 | 58.12 | 59.99 |
| 9 | 21.74 | 30.54 | 36.45 | 40.12 | 46.58 |
| 12 | 11.36 | 24.85 | 33.92 | 35.78 | 40.26 |



Inkubacija: **72h**

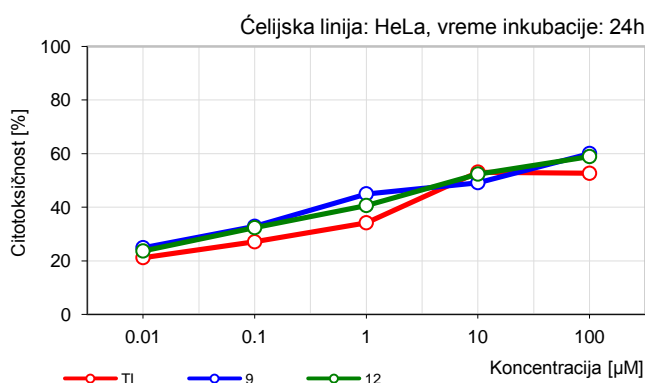
| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 35.48 | 39.45 | 48.34 | 60.05 | 62.38 |
| 9 | 20.14 | 22.54 | 30.54 | 40.02 | 48.52 |
| 12 | 16.31 | 28.64 | 35.22 | 37.36 | 44.46 |

Slika 3.8. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju MDA-MB-231 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Oba analoga pokazala su veoma nisku, gotovo identičnu citotoksičnost, u sva tri ispitivana vremena inkubacije, za ceo raspon koncentracija (16-48% za **9** i 6-44% za **12**). Tiazofurin je pokazao znatno veći antiproliferativni efekat (32-58% za 24 h, 33-60% za 48 h i 35-62% za 72 h) od **9** i od **12** pri svim koncentracijama (Slika 3.8.).

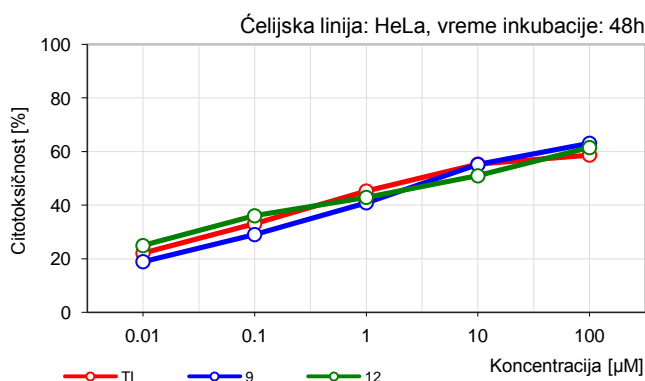
Uticaj tiazofurina i analoga na rast HeLa ćelija

Na Slici 3.9. prikazani su rezultati dobijeni tretiranjem HeLa ćelijske linije tiazofurinom i analogima **9** i **12** pri koncentracijama od 0.01 do 100 μM tokom 24, 48 i 72 h.



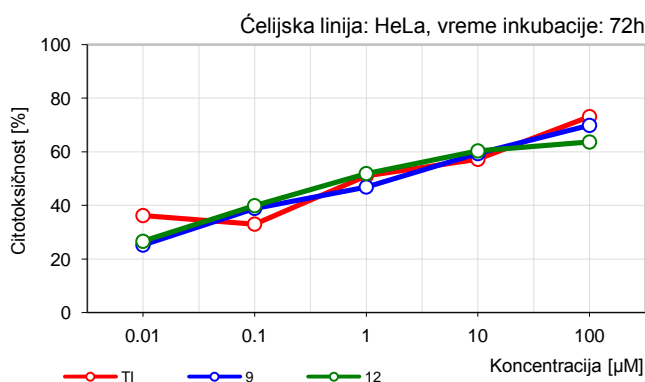
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 21.18 | 27.08 | 34.17 | 53.07 | 52.63 |
| 9 | 24.89 | 32.85 | 44.97 | 49.14 | 60.01 |
| 12 | 23.65 | 32.35 | 40.62 | 52.34 | 58.88 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 22.09 | 33.09 | 45.28 | 55.34 | 58.71 |
| 9 | 18.94 | 29.05 | 40.91 | 55.17 | 63.09 |
| 12 | 24.94 | 36.05 | 42.91 | 50.97 | 61.49 |



Inkubacija: **72h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 36.21 | 33.03 | 50.98 | 57.18 | 73.11 |
| 9 | 25.21 | 38.89 | 46.87 | 59.32 | 69.84 |
| 12 | 26.61 | 39.89 | 51.87 | 60.32 | 63.64 |

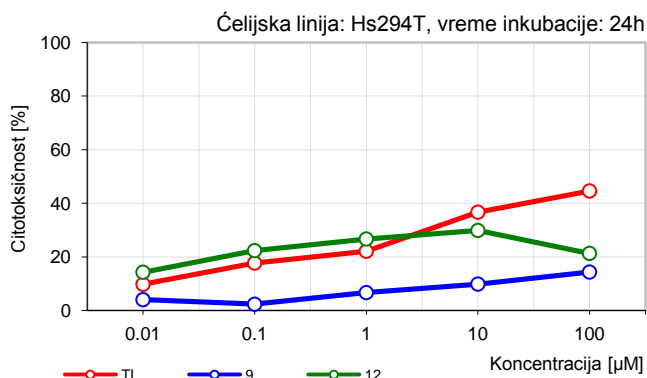
Slika 3.9. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju HeLa ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Iz navedenog proizilazi da tiazofurin i oba nosintetizovana analoga inhibiraju rast HeLa ćelija a stepen inhibicije zavisi od koncentracije i od vremena tretmana. Tip odgovora tokom svih ispitivanih vremena je sličan.

Tiazofurin je pokazao gotovo isti antiproliferativni efekat pri svim ispitivanim koncentracijama (21-53% za 24 h, 22-59% za 48 h i 36-73% za 72 h) u poređenju sa **9** i **12**.

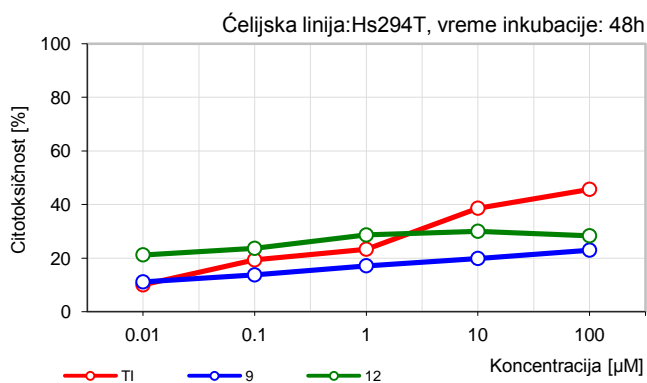
Uticaj tiazofurina i analoga na rast Hs294T ćelija

Na Slici 3.10. prikazani su rezultati dobijeni tretiranjem Hs294T ćelijske linije tiazofurinom i novosintetisanim analogima **9** i **12** u intervalu koncentracija od 0.01 do 100 μM tokom 24, 48 i 72 h.



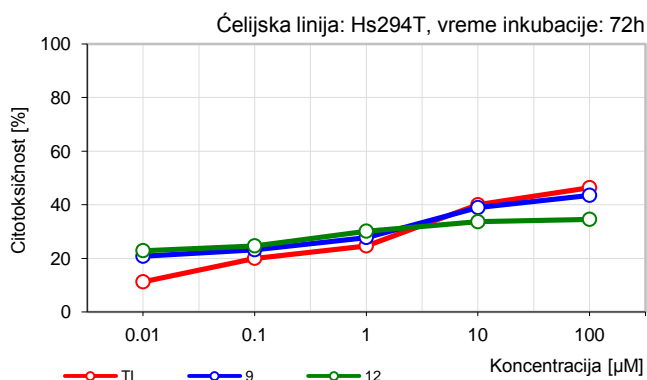
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 9.78 | 17.70 | 22.13 | 36.69 | 44.61 |
| 9 | 4.05 | 2.36 | 6.69 | 9.87 | 14.36 |
| 12 | 14.29 | 22.36 | 26.69 | 29.87 | 21.32 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 10.03 | 19.34 | 23.33 | 38.63 | 45.67 |
| 9 | 11.15 | 13.75 | 17.16 | 19.88 | 22.99 |
| 12 | 21.22 | 23.65 | 28.64 | 30.02 | 28.34 |



Inkubacija: **72h**

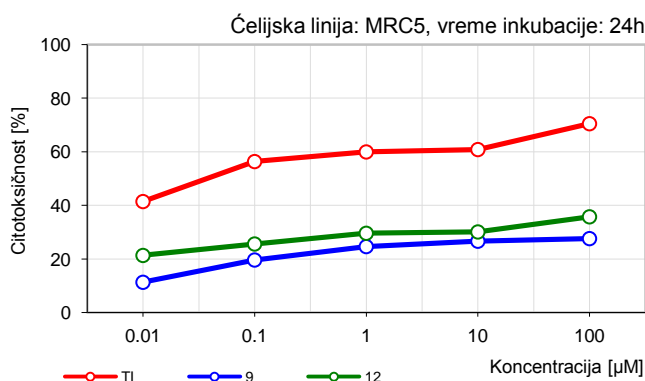
| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 11.24 | 20.02 | 24.65 | 39.98 | 46.35 |
| 9 | 20.79 | 23.20 | 27.78 | 38.94 | 43.51 |
| 12 | 22.87 | 24.65 | 30.14 | 33.65 | 34.55 |

Slika 3.10. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju Hs294T ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Sve tri ispitivane supstance su pokazale veoma nisku citotoksičnost u sva tri ispitivana vremena inkubacije (4-46%).

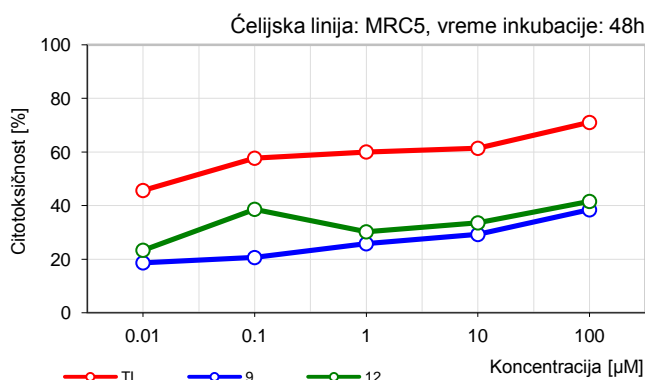
Uticaj tiazofurina i analoga na rast MRC-5 ćelija

Na Slici 3.1. prikazani su rezultati koji su dobijeni tretiranjem normalne MRC-5 ćelijske linije tiazofurinom i novosintetizovanim analogima **9** i **12**, pri koncentracijama od 0.01 do 100 μM tokom 24, 48 i 72 h. Sve tri supstance inhibiraju rast MRC-5 ćelija a stepen inhibicije zavisi kako od koncentracije, tako i od dužine tretmana.



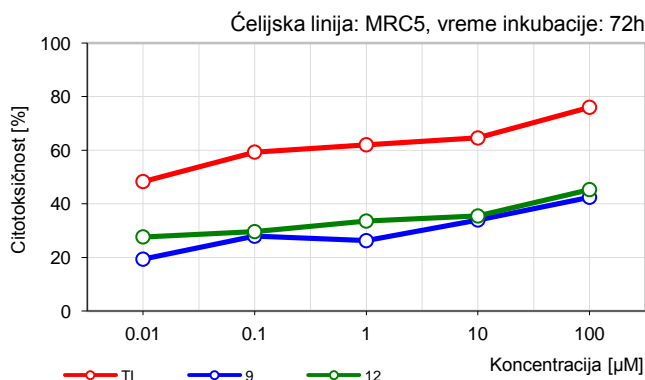
Inkubacija: **24h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 41.47 | 56.39 | 59.98 | 60.86 | 70.51 |
| 9 | 11.36 | 19.67 | 24.68 | 26.69 | 27.65 |
| 12 | 21.37 | 25.64 | 29.64 | 30.14 | 35.78 |



Inkubacija: **48h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 45.65 | 57.69 | 60.03 | 61.39 | 71.02 |
| 9 | 18.67 | 20.64 | 25.78 | 29.24 | 38.45 |
| 12 | 23.36 | 38.64 | 30.24 | 33.57 | 41.57 |



Inkubacija: **72h**

| Jedinjenje | Koncentracija [μM] | | | | |
|------------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0.01 | 0.1 | 1 | 10 | 100 |
| TI | 48.32 | 59.31 | 62.03 | 64.58 | 76.02 |
| 9 | 19.36 | 27.93 | 26.27 | 33.98 | 42.45 |
| 12 | 27.67 | 29.64 | 33.58 | 35.47 | 45.31 |

Slika 3.11. Uticaj tiazofurina i analoga **9** i **12** na proliferaciju MRC-5 ćelija nakon inkubacije u toku: (a) 24 h, (b) 48 h, (c) 72 h.

Nakon inkubacije u toku 24, 48 i 72 h tiazofurin je pokazao nešto jači antiproliferativni efekat pri svim ispitivanim koncentracijama u odnosu na oba novosintetizovana analoga.

Pri koncentraciji od 0.01 μM tiazofurin inhibira rast ćelija za 41-48%, dok se pri dejstvu analoga, pri istoj koncentraciji, postiže antiproliferativni efekat od 11-19% za **9**, odnosno 21-28% za **12**. Citotoksičnost tiazofurina pri koncentraciji od 100 μM je znatno veća od antiproliferativnog efekta analoga **9** (za 40%), odnosno **12** (za 30%).

Poređenje antiproliferativne aktivnosti na osnovu IC_{50} vrednosti

Vrednosti IC_{50} za svih jedanaest ispitivanih ćelijskih linija nakon inkubacije u toku 24, 48 i 72 h prikazane su u *Tabeli 3.1*.

Tabela 3.1. IC_{50} vrednosti tiazofurina i analoga

| $IC_{50} / \mu\text{M}$ | K562 | | | HL-60 | | | Jurkat | | | Raji | | |
|-------------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| TI | 5.29 | 2.98 | 1.89 | 9.32 | 1.84 | 0.19 | 0.14 | 0.51 | 0.04 | 89.32 | 16.06 | 5.28 |
| 9 | 5.02 | 2.34 | 1.02 | 10.24 | 5.19 | 1.11 | >100 | >100 | 0.61 | 53.21 | 42 | 4.01 |
| 12 | 4.35 | 1.65 | 0.95 | 9.54 | 4.68 | 1.01 | 0.02 | 0.01 | 0.02 | 55.21 | 47.01 | 14.02 |
| 13 | 19.98 | 10.82 | 0.01 | 38.28 | >100 | 12.86 | >100 | >100 | >100 | 3.29 | 3.12 | 2.56 |
| 14 | 17.44 | 7.44 | 6.28 | >100 | >100 | 7.55 | >100 | >100 | >100 | 71.32 | 71.32 | 40.52 |
| 15 | 4.42 | 2.67 | 1.97 | 9.11 | 1.34 | 1.02 | 5.97 | 2.66 | 0.04 | 20.2 | 10.34 | 1.03 |
| 16 | 96.60 | 95.88 | 44.29 | 10.50 | 0.09 | 0.06 | 0.19 | 0.03 | 0.03 | 6.34 | 2.07 | 1.05 |
| 17 | 0.095 | 0.03 | 0.34 | >100 | 13.4 | 3.77 | 0.45 | 0.15 | 0.01 | 0.01 | 0.004 | 0.004 |
| 18 | 0.052 | 0.04 | 0.04 | >100 | 59.11 | 9.39 | 0.06 | 0.02 | 0.004 | >100 | 4.57 | 3.85 |
| 19 | 3.65 | 1.98 | 0.12 | 10.56 | 6.29 | 0.13 | 5.64 | 1.11 | 0.53 | 46.58 | 20.09 | 3.11 |
| 20 | 6.58 | 2.12 | 0.11 | 16.24 | 2.03 | 0.05 | 4.67 | 1.01 | 0.59 | 36.45 | 21.22 | 2.64 |
| 21 | 9.96 | 1.45 | 0.02 | 19.31 | 3.67 | 0.34 | 2.34 | 0.97 | 0.64 | 24.12 | 15.94 | 5.61 |
| 22 | 9.84 | 0.04 | 0.02 | 0.12 | 70.29 | 20.43 | 0.41 | 0.12 | 0.03 | 0.03 | 0.04 | 0.01 |
| 23 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 21.68 | 20.64 | 14.74 |
| 24 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 2.69 | >100 | >100 | 23.58 | 78.08 | 10.16 | 6.29 |
| 25 | >100 | >100 | 0.31 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 26 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 0.02 | >100 | >100 | >100 | 15.23 | 10.43 | 9.28 |
| 27 | 19.12 | 5.15 | 0.51 | 56.31 | 24.36 | 12.17 | >100 | >100 | >100 | 18.92 | 10.07 | 2.59 |

| IC ₅₀ / μ M | PC 3 | | | HT-29 | | | MCF-7 | | | MDA -MB 231 | | |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| TI | >100 | >100 | >100 | 1,01 | 0.89 | 0.26 | 7,98 | 6.39 | 1.78 | 1,12 | 0.98 | 0.79 |
| 9 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 0.54 | 0.14 | 0.02 | >100 | >100 | >100 |
| 12 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 0.34 | 0.13 | 0.04 | >100 | >100 | >100 |
| 13 | 15.8 | 10.3 | 8.99 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 14 | >100 | >100 | >100 | 8.44 | 6.79 | 2.48 | 89.43 | 81.09 | 78.05 | >100 | >100 | >100 |
| 15 | 47.61 | 23.64 | 12.64 | >100 | >100 | 23.45 | >100 | >100 | 21.34 | 14.49 | 2.06 | 1.02 |
| 16 | 41.5 | 30.1 | 26.4 | 0,91 | 0.56 | 0.09 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 17 | 0.71 | 0.51 | 0.23 | 1,00 | 0.95 | 0.26 | >100 | >100 | 1.09 | >100 | >100 | >100 |
| 18 | >100 | >100 | >100 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 19 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 20 | 35.6 | 30 | 15.7 | >100 | >100 | 15.78 | >100 | 50.21 | 9.21 | 15.32 | 5.64 | 3.33 |
| 21 | 56.4 | 33.6 | 17.6 | >100 | >100 | 34.12 | >100 | >100 | 11.67 | 21.31 | 13.64 | 2.94 |
| 22 | 0.9 | 0.64 | 0.25 | 0,93 | 0.58 | 0.02 | >100 | >100 | 19.86 | >100 | >100 | >100 |
| 23 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 3.92 | >100 | >100 | >100 |
| 24 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 9.54 | >100 | >100 | >100 |
| 25 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 0.04 | 0.02 | 0.004 | 244.,83 | 92.35 | 69.34 |
| 26 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 27 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |

| IC ₅₀ / μ M | HeLa | | | Hs 294T | | | MRC-5 | | |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h | 24h | 48h | 72h |
| TI | 4.76 | 4.52 | 3.82 | >100 | >100 | >100 | 0.85 | 0.49 | 0.36 |
| 9 | 7.75 | 5.91 | 1.51 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 12 | 8.75 | 5.01 | 2.51 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 13 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 6.53 | 5.68 | 3.21 |
| 14 | 89.55 | 59.17 | 29.87 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 15 | 5.65 | 2.12 | 1.03 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 16 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 17 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 89.7 | 50.36 | 42.35 |
| 18 | 0.28 | 1.46 | 0.01 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 19 | 1.25 | 0.96 | 0.08 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 20 | 3.64 | 2.01 | 0.06 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 21 | 3.99 | 3.87 | 0.64 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 22 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 0.11 | 0.09 | 0.05 |
| 23 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 10,2 | 6.34 | 5.26 |
| 24 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 25 | 16,43 | 5.68 | 4.08 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 26 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| 27 | 1.75 | 0.67 | 0.15 | 55.8 | 34.7 | 22.6 | >100 | >100 | >100 |

Uopšteno, na osnovu rezultata iz *Tabele 3.1.* proizilazi da novosintetisani analog **9** ispoljava snažnu antiproliferativnu aktivnost prema K562, HL-60, Jukat, Raji, PC-3, MCF-7 i HeLa ćelijskim linijama, dok analog **12** pokazuje snažnu citotoksičnu aktivnost prema K562, HL-60, Jukat, Raji i MCF-7 malignim ćelijama.

Na osnovu IC₅₀ vrednosti određenih za K562 ćelijsku liniju, može se zaključiti da oba analoga, **9** i **12**, snažno inhibiraju rast u sva tri ispitivana vremena inkubacije. Pri tome su oba analoga oko 2 puta aktivnija od tiazofurina nakon 72 h inkubacije, dok je antiproliferativna aktivnost analoga nakon 24 i 48 h gotovo ista kao kod tiazofurina.

Prema HL-60 ćelijskoj liniji oba analoga su ispoljila značajniju antiproliferativnu aktivnost koja je gotovo identična aktivnosti tiazofurina (9.32-0.19%). Na osnovu rezultata dobijenih nakon tretiranja Jurkat ćelija, proizilazi da je analog **12** pokazao snažnu antiproliferativnu aktivnost nakon 24, 48 i 72 h, dok je jedinjenje **9** bilo aktivno samo pri najdužem ispitivanom vremenu inkubacije. Najsnažnija citotoksičnost jedinjenja **12** registrovana je nakon 72 h, pri čemu se pokazalo da je ovaj analog oko 2 puta aktivniji od tiazofurina, dok je nakon 24, odnosno 48 h inkubacije njegova aktivnost bila oko 7, odnosno 36 puta veća u odnosu na referentno jedinjenje. Prema Raji ćelijskoj liniji oba analoga (**9** i **12**) su ispoljila jaču antiproliferativnu aktivnost od tiazofurina samo nakon 24 h, pri čemu su oba analoga bila oko 2 puta aktivnija. Dok je u ostalim vremenskim periodima antiproliferativna aktivnost analoga bila slabija (48 h) ili slična tiazofurinu (72 h).

Oba analoga nisu inhibirala rast PC-3 i HT-29 ćelijskih linija ni u jednom od ispitivanih vremenskih perioda. S druge strane, tiazofurin je ispoljio snažnu, vremenski zavisnu antiproliferativnu aktivnost prema HT-29 ćelijskoj liniji.

Prema MCF-7 ćelijama, najpotentnija citotoksičnost registrovana je kod analoga **9** nakon 72 h inkubacije, pri čemu se pokazalo da je ovaj analog oko 100 puta aktivniji od tiazofurina. Aktivnost **12** nakon 24, 48 i 72 h bila je oko 23, 50 odnosno 44.5 puta veća u odnosu na tiazofurin.

Oba analoga **9** i **12** su bila potpuno neaktivna prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, za razliku od tiazofurina koji je pokazao jaku citotoksičnost nakon sva tri vremena inkubacije (24, 48 i 72 h) sa odgovarajućim IC₅₀ vrednostima od 1.12, 0.98 i 0.79 μM.

Isto tako, tiazofurin i oba novosintetizovana analoga su ispoljila snažnu, vremenski zavisnu citotoksičnost prema HeLa ćelijama. Nakon 24 h registrovana je slabija aktivnost analoga prema ovoj ćelijskoj liniji nakon, dok su oba analoga pokazala sličnu aktivnost kao tiazofurin nakon 48

h. Nakon 72 h inkubacije oba novosintetizovana jedinjenja su bila oko 2 puta aktivnija od referentnog jedinjenja.

Jedina ćelijska linija prema kojoj su i tiazofurin i oba novosintetizovana analoga bili potpuno neaktivni jeste melanom Hs 294T.

Konačno, iz *Tabele 3.1.* se vidi da tiazofurin pokazuje snažnu citotoksičnost prema zdravim ćelijama MRC-5 dok su analozi potpuno neaktivni prema ovoj ćelijskoj liniji.

Takođe, iz *Tabele 3.1.* se vidi da analozi *arabino* konfiguracije (**13**, **14** i **15**) prema K562 ćelijskoj liniji ispoljavaju slabiju ili istu citotoksičnost u odnosu na tiazofurin. Samo je analog **13** nakon 72 h ispoljio 189 puta veću aktivnost od referentnog jedinjenja.

Snažnu, vremenski zavisnu antitumorsku aktivnost, identičnu tiazofurinu, ispoljilo je samo jedinjenje **15** prema HL-60 ćelijskoj liniji .

Analog **15** je bio aktivan i prema Jurkat ćelijskoj liniji pri čemu je pokazao sličnu aktivnost kao tiazofurin, dok analozi **13** i **14** nisu inhibirali rast pomenutih ćelija ni u jednom od ispitivanih vremenskih perioda.

Sva tri ispitivana analoga su ispoljila značajnu, vremenski zavisnu citotoksičnost prema Raji ćelijama. Citotoksična aktivnost analoga **13** je bila 27, 5, odnosno 2 puta veća od aktivnosti tiazofurina zavisno od vremena inkubacije (24, 48 odnosno 72 h), dok je analog **15** bio oko 5 puta aktivniji nakon 72 h.

Prilično neočekivano, pokazalo se da dva analoga *arabino* konfiguracije (**13** i **15**) snažno inhibiraju rast PC-3 ćelija nakon sva tri perioda inkubacije, dok su tiazofurin i analog **14** bili potpuno neaktivni prema ovoj ćelijskoj liniji. Analog **13** je 1.4 do 2 puta aktivniji od analoga **15** nakon sva tri vremena inkubacije. Najjača antiproliferativna aktivnost oba analoga registrovana je nakon 72 h.

Prema HT-29, MCF-7, MDA-MB-231 i HeLa ćelijskim linijama nijedno jedinjenje iz ove grupe nije pokazalo izrazitu aktivnost, osim jedinjenja **14** za HT-29 i **15** za HeLa ćelijske linije. S druge strane, tiazofurin je ispoljilo snažnu, vremenski zavisnu antiproliferativnu aktivnost prema svim ćelijskim linijama.

Melanom Hs 294T je jedina ćelijska linija prema kojoj su i tiazofurin i oba novosintetizovana analoga bili potpuno neaktivni.

Takođe, iz *Tabele 3.1.* se vidi da tiazofurin i analog **13** pokazuju snažnu citotoksičnost prema zdravim ćelijama MRC-5 dok su analozi **14** i **15** potpuno neaktivni.

Na osnovu rezultata iz *Tabele 3.1* vidi se da su novosintetizovani analozi **17**, **18**, **19**, **20** i **21** (analozi *ksilo* konfiguracije) ispoljili snažnu antiproliferativnu aktivnost prema K562, HL-60,

Jurkat i Raji ćelijskoj liniji, dok analog **16** pokazuje snažnu citotoksičnu aktivnost prema HL-60, Jurkat, Raji, PC-3 i HT-29 malignim ćelijama.

Na osnovu IC₅₀ vrednosti određenih za K562 ćelijsku liniju, može se zaključiti da analozi **17**, **18**, **19**, **20** i **21** snažno inhibiraju rast u sva tri ispitivana vremena inkubacije. Pri tome je molekul **18** oko 102 puta aktivniji od tiazofurina nakon 24 h inkubacije, dok je antiproliferativna aktivnost analoga **17**, **19**, **20** i **21** veća od tiazofurina 2–100 puta, zavisno od vremena inkubacije.

Prema HL-60 ćelijskoj liniji analozi **17** i **18** su ispoljili značajniju antiproliferativnu aktivnost tek nakon inkubacije od 72 h. Najjača citotoksičnost je registrovana kod analoga **16**, pri čemu se pokazalo da je ovaj molekul 20, odnosno 3 puta aktivniji od tiazofurina nakon 48, odnosno 72 h. Rezultati dobijeni nakon tretiranja Jurkat ćelija, ukazuju da su svi analozi *ksilo* konfiguracije pokazali snažnu antiproliferativnu aktivnost nakon 24, 48 i 72 h, dok su jedinjenja **16**, **17** i **18** pokazala značajniju aktivnost od tiazofurina pri sva tri ispitivana vremena inkubacije. Naj snažnija citotoksičnost jedinjenja **18** registrovana je nakon 72 h, pri čemu se pokazalo da je ovaj analog oko 11 puta aktivniji od tiazofurina, dok je nakon 24, odnosno 48 h inkubacije njegova aktivnost bila oko 2.3 i 25.5 puta veća u odnosu na referentno jedinjenje.

Prema Raji ćelijskoj liniji svi analozi (**16**, **17**, **13**, **18**, **20** i **21**) su ispoljili jaču ili sličnu antiproliferativnu aktivnost od tiazofurina u svim vremenskim periodima. Najpotentnija citotoksičnost registrovana je kod analoga **17** nakon 72 h inkubacije, pri čemu se pokazalo da je ovaj analog oko 1 354 puta aktivniji od tiazofurina. Aktivnost molekula **17** nakon 24 i 48 h bila je oko 8 932, odnosno 4 049 puta veća u odnosu na tiazofurin.

Prilično neočekivano, pokazalo se da analozi **17**, **20** i **21** snažno inhibiraju rast PC-3 ćelija, dok su tiazofurin i analozi **18** i **19** bili potpuno neaktivni prema ovoj ćelijskoj liniji. Najjača antiproliferativna aktivnost analoga registrovana je nakon 72 h.

Prema HT-29 ćelijskoj liniji samo su jedinjenja **16**, **17** i **18** pokazala jaku citotoksičnost nakon inkubacije u toku 24, 48 i 72 h. IC₅₀ vrednosti analoga **16** i **17**, registrovane nakon sva tri vremena inkubacije, bile su skoro identične odgovarajućim vrednostima tiazofurina, dok je jedinjenje **18** bilo oko 50 puta aktivnije, u svim ispitivanim vremenima. Nasuprot tome, analozi **19**, **20** i **21** su bili potpuno neaktivni prema HT-29 ćelijama.

Prema MCF-7 ćelijama, analozi **17**, **20** i **21** su pokazali snažnu aktivnost samo nakon 72 h inkubacije, dok jedinjenja **16**, **18**, i **19** nisu inhibirala rast ni u jednom od ispitivanih vremenskih perioda. S druge strane, tiazofurin je ispoljio snažnu, vremenski zavisnu antiproliferativnu aktivnost prema ovoj ćelijskoj liniji.

Analozi **16**, **17**, **18** i **19** su bili potpuno neaktivni prema MDA-MB-231 ćelijskoj liniji, za razliku od tiazofurina koji je pokazao jaku citotoksičnost nakon sva tri vremena inkubacije (24, 48 i 72

h) sa odgovarajućim IC_{50} vrednostima od 1.12, 0.98 i 0.79 μ M. Nešto slabiju ali snažniju citotoksičnost u poređenju s tiazofurinom, ispoljila su jedinjenja **20** i **21**.

Isto tako, tiazofurin je ispoljio snažnu, vremenski zavisnu citotoksičnost prema HeLa ćelijama, dok su dva novosintetizovana analoga **16** i **17** bila potpuno neaktivna prema ovoj ćelijskoj liniji. Analози **18**, **19**, **20** i **21** su inhibirali rast ove ćelijske linije snažnije od referentnog molekula od 2 do 382 puta, zavisno od perioda inkubacije.

Jedina ćelijska linija prema kojoj su i tiazofurin i novosintetisani analози bili potpuno neaktivni je melanom Hs 294T.

Konačno, iz *Tabele 3.1.* se vidi da novosintetizovani analози pokazuju neaktivnost ili nisku citotoksičnost (samo molekul **17**) prema zdravim ćelijama MRC-5, za razliku od referentnog jedinjenja.

Od novosintetisanih analoga *ribo* konfiguracije, samo analози **22** i **27** su pokazala jaku citotoksičnost prema K562 ćelijskoj liniji, nakon inkubacije u toku 24, 48 i 72 h. IC_{50} vrednosti analoga **22** i **27**, registrovane nakon najdužeg vremena inkubacije, bile su skoro 100 i 4 puta manje od odgovarajućih vrednosti za tiazofurin, dok je analog **22** pokazao snažniju citotoksičnost, tako da je nakon 24 tj. 72 h oko 75 tj. oko 100 puta bio aktivniji od tiazofurina. Nasuprot tome, analози **23**, **24** i **26** su se pokazali potpuno neaktivnim prema K562 ćelijama.

Značajniju citotoksičnost prema HL-60 ćelijama pokazala su samo analози *ribo* konfiguracije **24**, **26** i **27**, pri čemu je analog **26** bio 9.5 puta aktivniji od tiazofurina i to samo nakon 72 h. Ostali analози nisu bili aktivni prema ovoj ćelijskoj liniji.

Analog **22** je pokazao jaku citotoksičnost, sličnu tiazofurinu u svim vremenskim intervalima prema Jurkat ćelijama. Ostali analози su bili neaktivni.

Raji ćelijska linija je bila osetljiva na delovanje pet analoga *ribo* konfiguracije **22**, **23**, **24**, **26** i **27**, dok analog **25** nije delovao na ovu ćelijsku liniju. Najjača citotoksičnost je registrovana kod analoga **22**, pri čemu se pokazalo da je ovaj molekul 3 000 puta aktivniji od tiazofurina (posle 24 h), od **26** oko 928 puta (posle 72 h), dok mu je aktivnost bila veća oko 630 puta od analoga **27** (posle 24 h).

Prilično neočekivano, pokazalo se da analog **22** snažno inhibira rast PC-3 ćelija nakon sva tri perioda inkubacije, dok su tiazofurin i ostali ispitivani analози bili neaktivni prema ovoj ćelijskoj liniji. Najjača antiproliferativna aktivnost analoga **22** registrovana je nakon 72 h.

Jedino je analog **22** pokazao značajnu citotoksičnost prema HT-29 ćelijskim linijama. Aktivnost **22** nakon 72 h bila je oko 13 puta veća u odnosu na tiazofurin. Ostali analози nisu bili aktivni prema ovoj ćelijskoj liniji.

Prema MCF-7 ćelijskoj liniji samo je analog **25** pokazao značajnu antiproliferativnu aktivnost u sva tri vremena inkubacije, koja je bila 200, 300 i 450 puta veća od aktivnosti tiazofurina (nakon 24, 48 i 72 h inkubacije), dok analozi **26** i **27** nisu inhibirali rast ni u jednom od ispitivanih vremenskih perioda.

Nijedan analog *ribo* konfiguracije nije inhibirao rast MDA-MB-231 ćelija ni u jednom od ispitivanih vremenskih perioda. S druge strane, tiazofurin je ispoljio snažnu, vremenski zavisnu antiproliferativnu aktivnost prema ovoj ćelijskoj liniji.

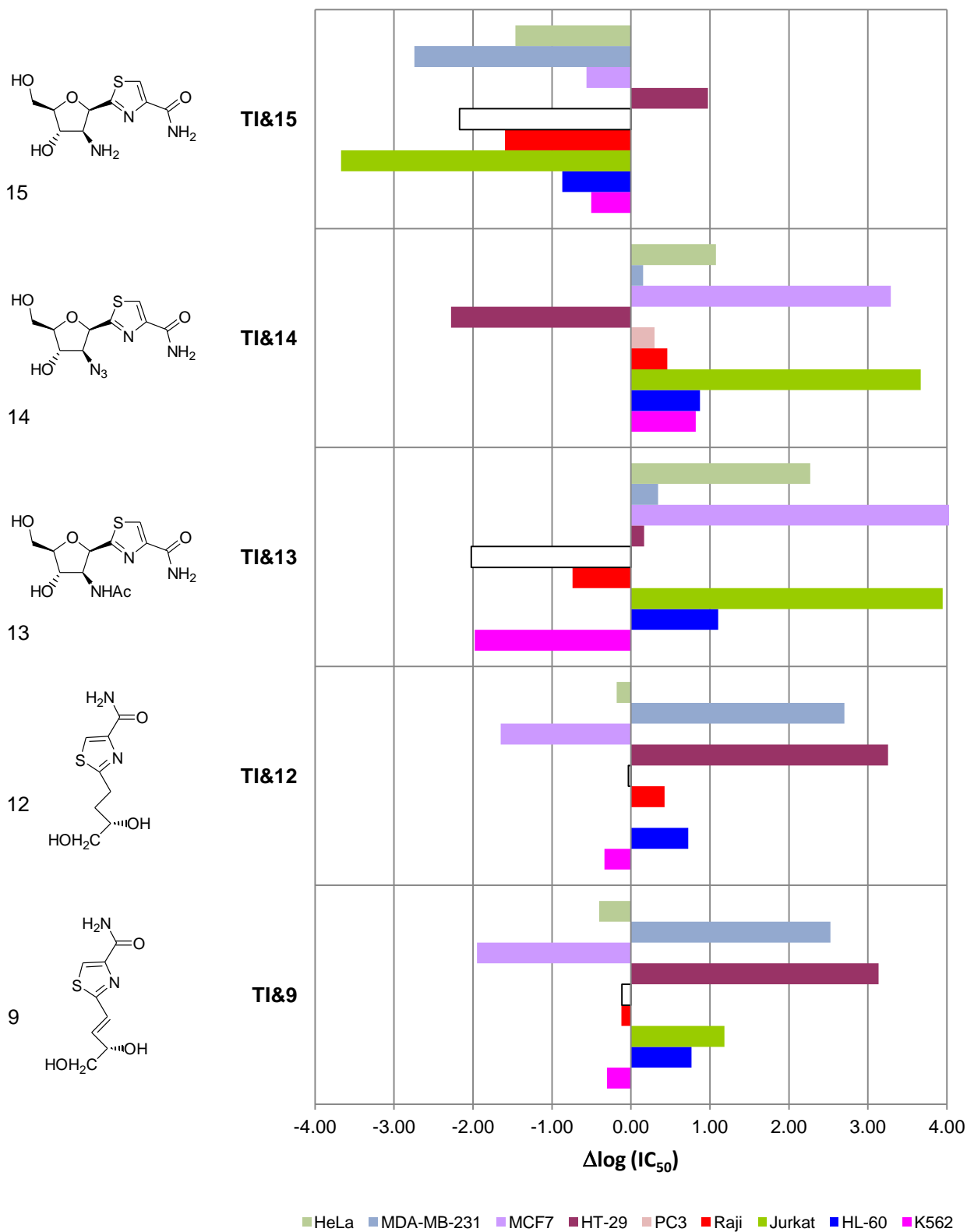
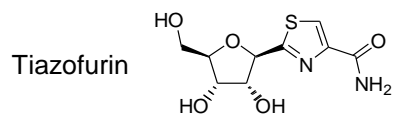
Isto tako, tiazofurin je ispoljio snažnu, vremenski zavisnu citotoksičnost prema HeLa ćelijama, dok su novosintetizovani analozi **22**, **23**, **24** i **26** bili potpuno neaktivni prema ovoj ćelijskoj liniji. Analog **27** je 8 do 27 puta aktivniji kako od analoga **25**, tako i od referentnog jedinjenja nakon sva tri vremena inkubacije. Najjača antiproliferativna aktivnost oba analoga registrovana je nakon 72 h.

Tiazofurin i novosintetizovani analozi (osim analoga **27**) bili su potpuno neaktivni prema Hs 294T ćelijskoj liniji.

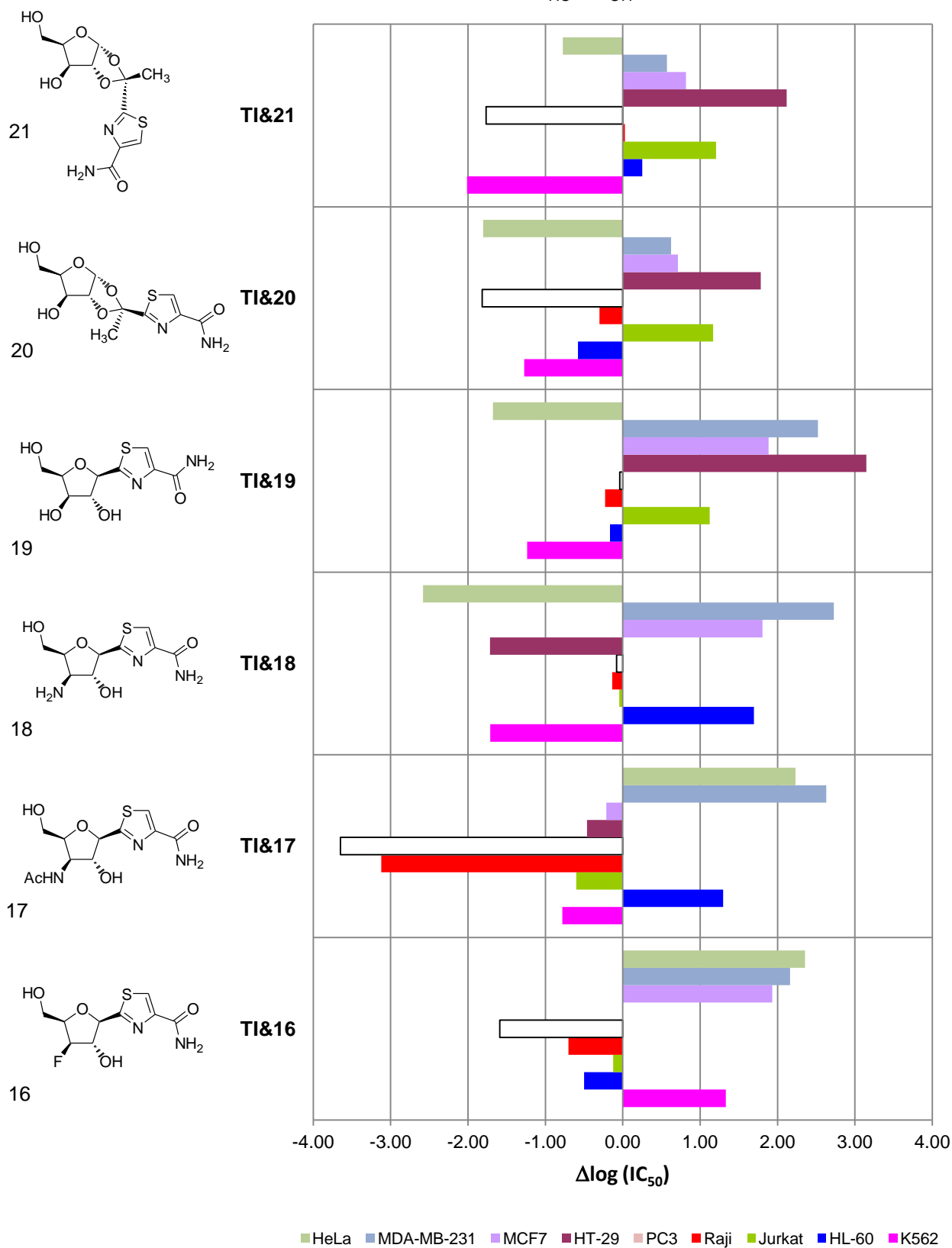
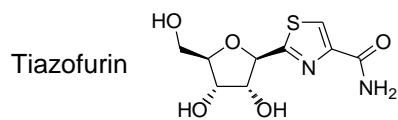
Takođe, iz *Tabele 3.1.* se vidi da tiazofurin i analog **22** pokazuju snažnu citotoksičnost prema zdravim ćelijama MRC-5, dok su analozi **23**, **24**, **25**, **26** i **27** bili neaktivni prema ovoj ćelijskoj liniji.

3.4 Korelacioni odnosi (SAR)

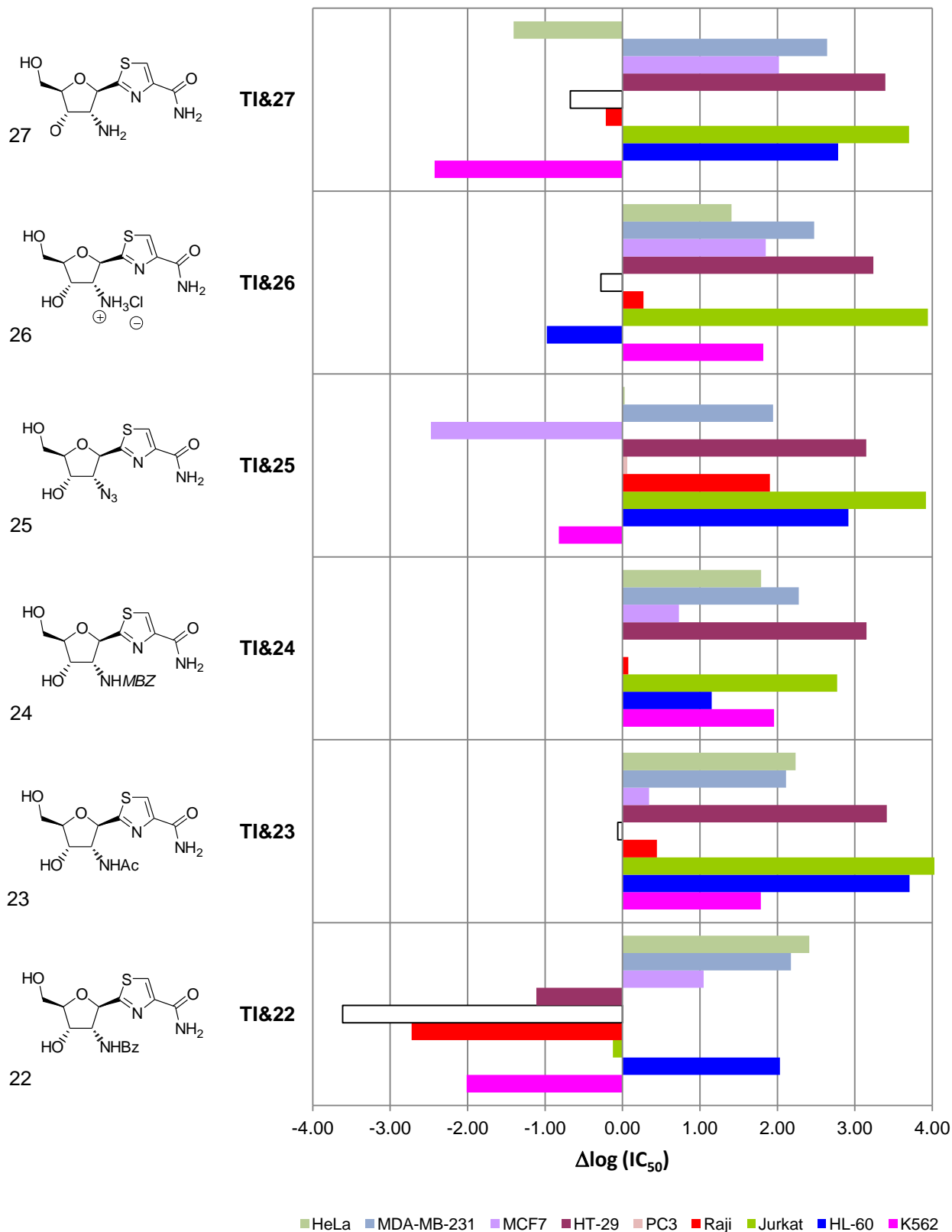
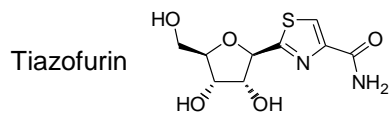
Naredna etapa naših radova odnosila se na uspostavljanje korelacionih odnosa (SAR) između strukture i antiproliferativne aktivnosti analoga tiazofurina. Uticaj izosterne varijacije na antitumorsku aktivnost određen je upoređivanjem citotoksičnosti parova novosintetisanih analoga tiazofurina i tiazofurina. Citotoksičnost je kvantitativno izražena kao $\Delta\log(\text{IC}_{50})$, a predstavlja razliku dekadnih logaritama od IC_{50} vrednosti analoga i kontrolnog molekula [$\log(\text{IC}_{50})_{\text{an}} - \log(\text{IC}_{50})_{\text{ko}}$]. Negativne vrednosti $\Delta\log(\text{IC}_{50})$ pokazuju da analog ima snažniju antiproliferativnu aktivnost od kontrolnog molekula, dok pozitivne vrednosti odgovaraju većoj aktivnosti kontrolnog molekula u odnosu na analog.



Slika 3.12. Korelacije između strukture i antiproliferativne aktivnosti tiazofurina i analoga (acikličkih tiazolnih nukleozida **9** i **12** i analoga *arabino* konfiguracije **13,14** i **15**)



Slika 3.13. Korelacije između strukture i antiproliferativne aktivnosti tiazofurina i analoga *ksilo* konfiguracije (16, 17, 18, 19, 20 i 21)



Slika 3.14. Korelacije između strukture i antiproliferativne aktivnosti tiazofurina i analoga *ribo* konfiguracije (22, 23, 24, 25, 26 i 27)

Prilikom uspostavljanja korelacionih odnosa (*Slika 3.12, 3.13 i 3.14.*), tiazofurin je predstavljao kao kontrolni molekul.

Kao što se sa *Slike 3.12.* vidi, aciklični tiazolni nukleozidi prouzrokuju promene antiproliferativne aktivnosti u poređenju sa tiazofurinom. Naime, analog **9** pokazuje jaču antiproliferativnu aktivnost prema pet od devet ispitanih tumorskih ćelija (K562, Raji, PC-3, MCF-7 i HeLa), dok je analog **12** pokazao veću citotoksičnost u odnosu na tiazofurin prema četiri maligne ćelijske linije (K562, PC-3, MCF-7 i HeLa). Prema K562 ćelijskoj liniji oba jedinjenja su ispoljila sličnu aktivnost. Značajno veća antiproliferativna aktivnost u korist jedinjenja **9** registrovana je u kulturi MCF-7 i HeLa, gde je analog **9** bio aktivniji od analoga **12**.

Kao što se sa *Slike 3.12.* dalje vidi, analozi *arabino* konfiguracije pokazuju razlike u antiproliferativnoj aktivnosti. Analog **15** je aktivniji od tiazofurina prema osam od devet ispitanih tumorskih ćelija (K562, HL-60, Jurkat, Raji, PC-3, MCF-7, MDA-MB-231 i HeLa), dok je analog **13** pokazao veću citotoksičnost od kontrole prema tri maligne ćelijske linije (K562, PC-3 i Raji). Prema HT-29 neoplastičnim ćelijama samo je analog **14** aktivniji, dok je isti analog prema ostalim ispitivanim ćelijskim linijama bio neaktivan u odnosu na tiazofurin.

Razlika u antiproliferativnoj aktivnosti takođe je registrovana i kod analoga *ksilo* konfiguracije (*Slika 3.13.*). Analozi **17** i **18** pokazuju značajnu antiproliferativnu aktivnost prema šest od devet ispitanih tumorskih ćelija (K562, Jurkat, Raji, PC-3, HT-29 i HeLa), dok su analozi **19** i **20** aktivniji prema pet ispitanih ćelijskih linija (K562, HL-60, Raji, PC-3 i HeLa). Za razliku od analoga **16**, koji je bio aktivniji prema četiri ispitane ćeljske linije (HL-60, Jurkat, Raji i PC-3), analog **21** je pokazao jaču citotoksičnost prema tri maligne ćelijske linije (K562, PC-3 i HeLa).

Kao što se sa *Slike 3.14.* vidi, analozi *ribo* konfiguracije prouzrokuju različite promene antiproliferativne aktivnosti u odnosu na tiazofurin. Naime, analog **22** pokazuje jaču antiproliferativnu aktivnost prema pet od devet ispitanih neoplastičnih ćelija (K562, Jurkat, Raji, PC-3 i HT-29), dok je prema četiri maligne ćelijske linije (K562, Raji, PC-3 i HeLa) analog **27** pokazao veću aktivnost. Jedinjenje **25** je ispoljilo jaču citotoksičnost prema dve ćelijske linije (K562 i MCF-7), dok je molekul **23** bio aktivniji od tiazofurina samo prema jednoj liniji (PC-3).

3.5. Čelijski ciklus

Početni eksperimenti o biološkoj aktivnosti novosintetizovanih jedinjenja na panelu malignih čelijskih linija pokazali su da većina jedinjenja ispoljava značajnu antitumorsku aktivnost. S obzirom na to da MTT test daje informacije o preživljavanju i proliferativnoj sposobnosti ćelija, sledeći korak u istraživanjima bio je da se ispita da li u osnovi antitumorske aktivnosti ovih jedinjenja leži njihova antiproliferativna i/ili citotoksična aktivnost, odnosno indukcija čelijske smrti,

U cilju ispitivanja molekulskih mehanizama koji leže u osnovi antitumorskog dejstva ispitivanih jedinjenja, odabrali smo K562 (humana hronična mijelogena leukemija) tumorsku čelijsku liniju kao model sistem. Dokazano je da tiazofurin indukuje apoptozu u K562 ćelijama, *in vitro*,^{116,117} koja se pokazala kao najosetljivija linija prema ispitivanim analogima. U svim daljim eksperimentima K562 ćelije su kontinualno tretirane ispitivanim jedinjenjima tokom 24 i 72 h pri koncentraciji koja odgovara IC₅₀ vrednosti ispitivanog jedinjenja, nakon 24- i 72-časovnog tretmana.

3.5.1. Uticaj analoga tiazofurina na distribuciju faza čelijskog ciklusa

U cilju određivanja antiproliferativnog efekta sintetizovanih analoga tiazofurina, ispitivan je njihov uticaj na faze čelijskog ciklusa K562 ćelija primenom protočne citometrije.

Aciklični tiazolni nukleozid **9** i **12** kao i tiazofurin su, nakon 24-časovnog kontinualnog tretmana, smanjili procenat ćelija u G2/M fazi za oko 50% u odnosu na kontrolu. Analozii *arabino* konfiguracije **13** i **14** smanjili su procenat ćelija u G0/G1 i S fazi u odnosu na tiazofurin i kontrolu, dok je procenat ćelija u G2/M fazi veći od tiazofurina za oko 10-13.3% a od kontrole 3.4-6.5%. Nakon izlaganja K562 ćelija ovim jedinjenjima tokom 72 h, utvrđeno je da sva ispitivana jedinjenja (**9**, **12**, **13**, **14** i **15**) i tiazofurin povećavaju procenat apoptotskih ćelija (sub G1 pik) uz smanjen procenat ćelija u G0/G1 u odnosu na kontrolu, dok je procenat ćelija u S fazi neznatno veći i od tiazofurina i od kontrole. Procenat ćelija u G2/M fazi za sva ispitivana jedinjenja, osim tiazofurina, sličan je kontroli. (Slika 3.15)

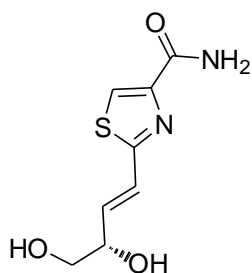
Među analogima *ksilo* konfiguracije, nakon 24-časovnog tretmana K562 ćelija samo je jedinjenje **18** značajnije uticalo na čelijski ciklus: procenat ćelija u G0/G1 fazi povećan je za ~1.5 puta a u S fazi je smanjen za ~ 1.5-1.3 puta u poređenju sa tiazofurinom i kontrolom. Sličan odgovor dobijen je i nakon 72-časovnog tretmana. Sva jedinjenja *ksilo* konfiguracije smanjuju procenat ćelija u G2/M fazi, a posebno nizak procenat daju **17** i **18** u poređenju sa tiazofurinom nakon 24-

časovnog tretmana, dok je nakon 72 h taj procenat sličan kontroli i ~2.4 puta je veći od vrednosti dobijenih sa tiazofurinom. Značajniju apoptozu K562 ćelija (subG1) izaziva samo jedinjenje **17** nakon 24 h i tiazofurin nakon 72 h (*Slika 3.16*). Formiranje subG1 pika potiče od populacije ćelija sa fragmentisanim molekulima DNK. Ovakav hipodiploidan DNK sadržaj osnovna je karakteristika ćelija koje su ušle u apoptozu, te se populacija ovih ćelija jasno izdvaja u vidu subG1 pika, na jednoparametarskom histogramu ćelijskog ciklusa.

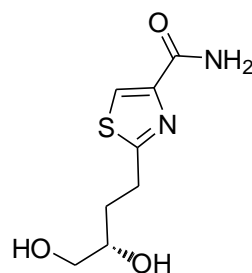
K562 ćelije tretirane analogima *ribo* konfiguracije **22**, **23**, **24** i **25** u toku 24 h imaju povećan procenat ćelija u G0/G1 fazi, a manji u S (osim **22**) i G2/M fazi u poređenju sa kontrolom. Međutim, analogi **26** i **27** neznatno (~1.1-4.1%), smanjuju procenat ćelija u G0/G1 fazi u poređenju i sa tiazofurinom i sa kontrolom, ne menjaju značajno procenat ćelija u S fazi, dok značajnije povećanje procenta ćelija u G2/M fazi izaziva analog **27**. Izlaganje K562 ćelija analogima *ribo* konfiguracije tokom 72 h povećava procenat ćelija u G0/G1 fazi u odnosu na tiazofurin dok je gotovo isti u odnosu na kontrolu. Procenat ćelija u S fazi je sličan vrednostima dobijenim za tiazofurin a neznatno je niži (~1%) od kontrole. Procenat ćelija u G2/M fazi je podjednak za sva ispitivana jedinjenja, sličan je vrednostima dobijenim nakon 24-časovnog tretmana, ali je ~2 puta veći u poređenju sa tiazofurinom. Procenat apoptotskih ćelija (sub-G1 pik) manji je u prva 24 h u odnosu na 72 h za sva ispitivana jedinjenja, dok tiazofurin izaziva značajnu apoptozu samo posle 72 h (24.99%). (*Slika 3.17*)

Na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da analogi tiazofurina dovode do promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Promene u fazama ćelijskog ciklusa K562 ćelija zavise od tipa jedinjenja, kao i od vremena izloženosti ćelija jedinjenjima, odnosno dužini tretmana.

ACIKLIČNI TIAZOLNI NUKLEOZIDI

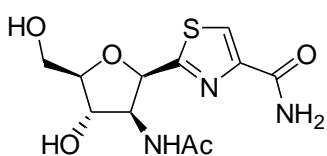


9

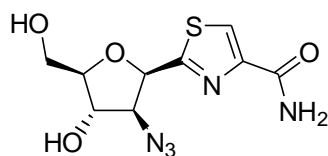


12

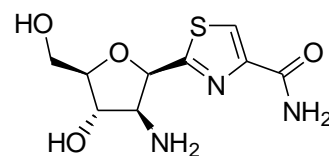
ANALOZI TIAZOFURINA ARABINO KONFIGURACIJE



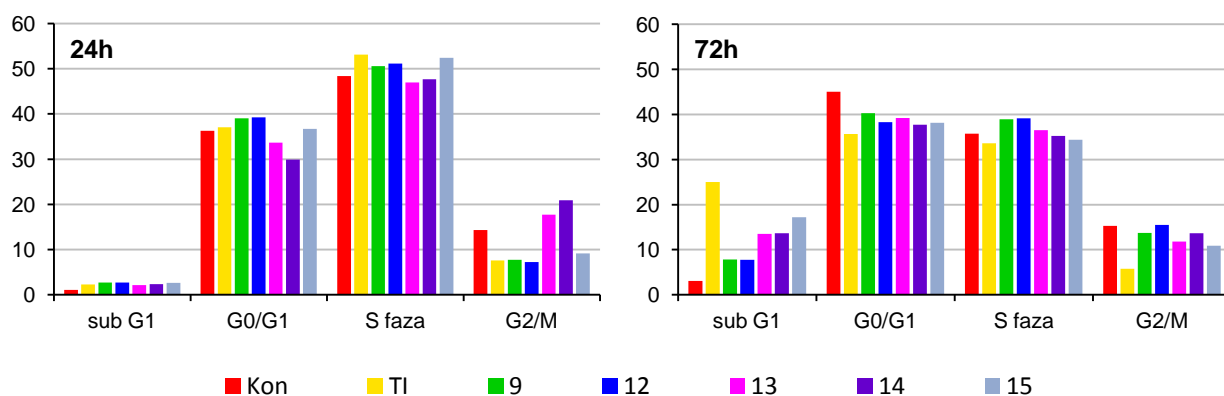
13



14



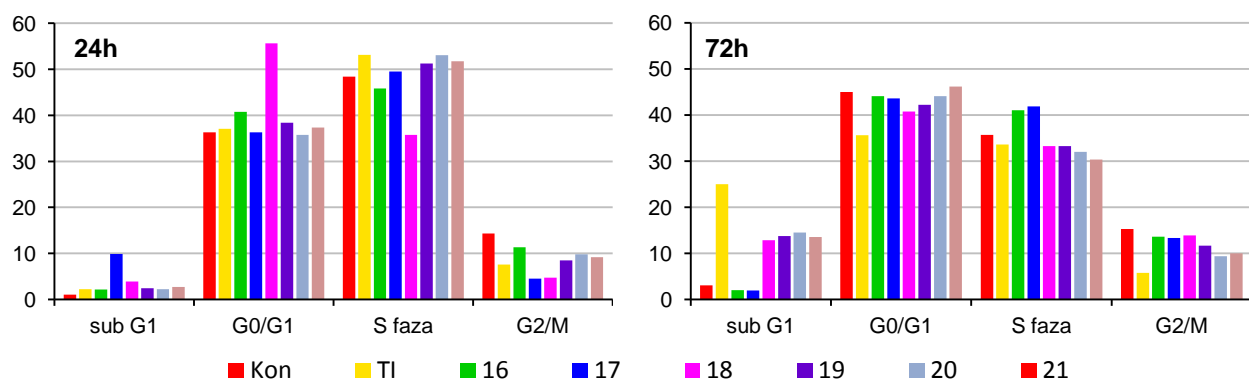
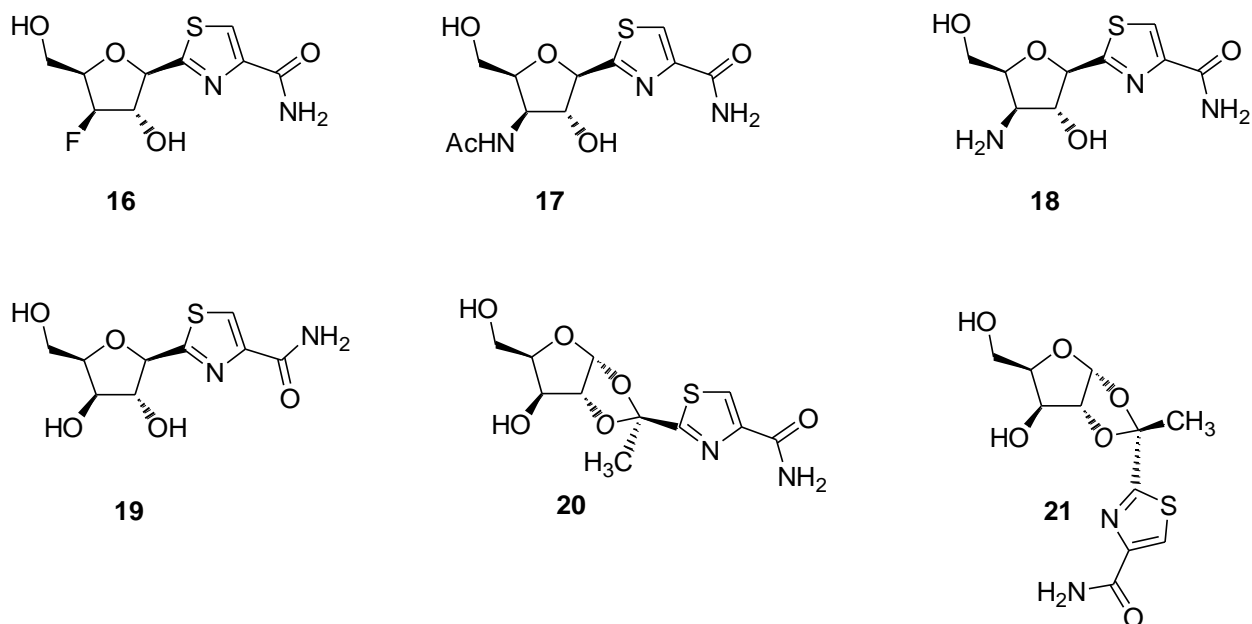
15



| 24h | sub G1 | G0/G1 | S faza | G2/M | 72h | sub G1 | G0/G1 | S faza | G2/M |
|-----|--------|-------|--------|-------------|-----|--------------|--------------|--------|-------------|
| Kon | 1.05 | 36.28 | 48.38 | 14.29 | Kon | 3.04 | 45.02 | 35.73 | 15.31 |
| TI | 2.22 | 37.08 | 53.16 | 7.55 | TI | 24.99 | 35.66 | 33.62 | 5.74 |
| 9 | 2.67 | 39.04 | 50.60 | 7.74 | 9 | 7.81 | 40.31 | 38.91 | 13.70 |
| 12 | 2.70 | 39.28 | 51.13 | 7.24 | 12 | 7.77 | 38.30 | 39.15 | 15.47 |
| 13 | 2.11 | 33.68 | 47.01 | 17.70 | 13 | 13.49 | 39.24 | 36.48 | 11.77 |
| 14 | 2.33 | 29.89 | 47.71 | 20.87 | 14 | 13.62 | 37.73 | 35.23 | 13.63 |
| 15 | 2.59 | 36.68 | 52.44 | 9.11 | 15 | 17.17 | 38.15 | 34.39 | 10.85 |

Slika 3.15. Uticaj tiazofurina i analoga na ćelijski ciklus K562 ćelija primenom protočne citometrije; aciklični tiazolni nukleozidi (9, 12); analozi tiazofurina *arabino* konfiguracije (13, 14, 15)

ANALOZI TIAZOFURINA *KSIL*O KONFIGURACIJE

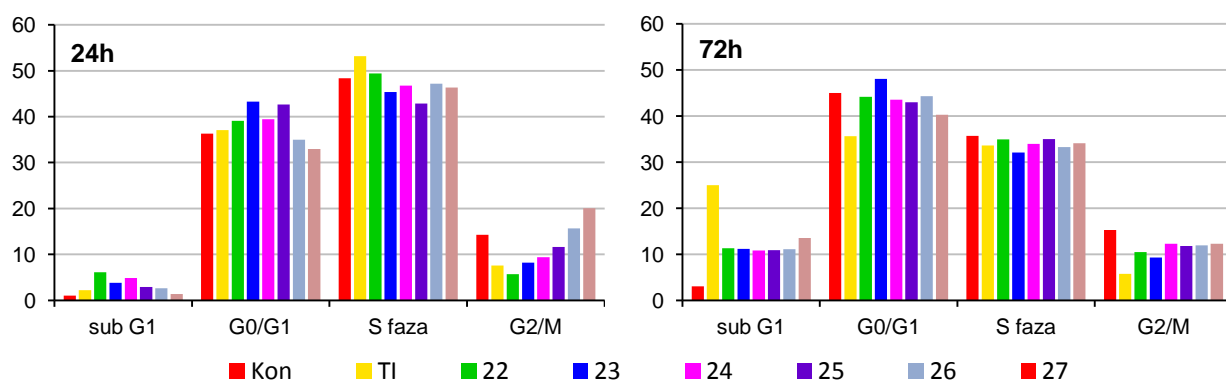
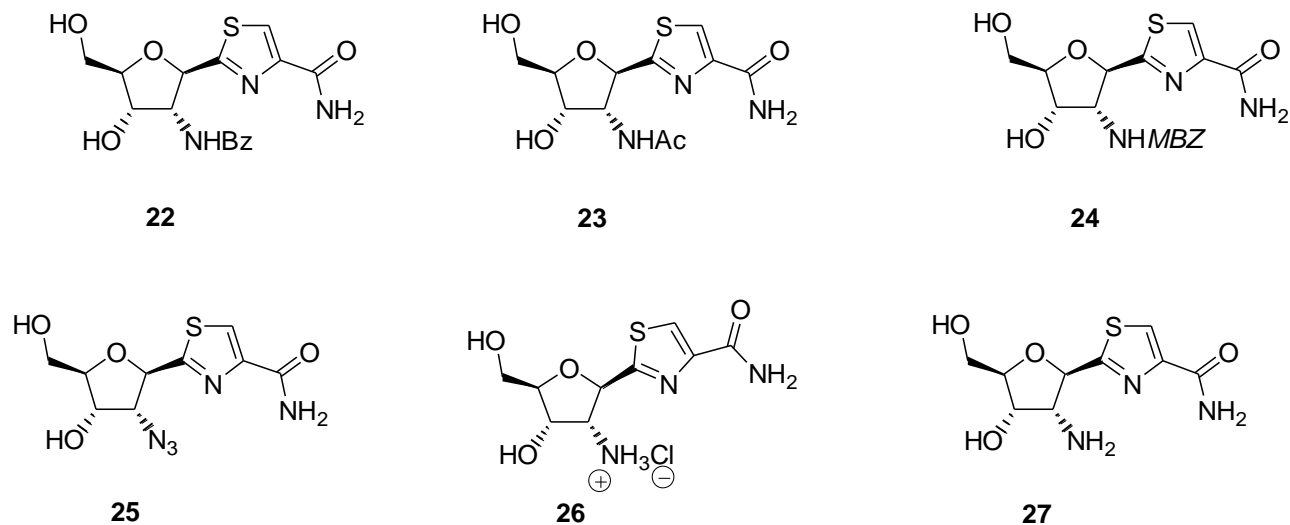


| 24h | sub G1 | G0/G1 | S faza | G2/M | 72h | sub G1 | G0/G1 | S faza | G2/M |
|-----|-------------|--------------|--------------|-------------|-----|--------------|--------------|--------|-------------|
| Kon | 1.05 | 36.28 | 48.38 | 14.29 | Kon | 3.04 | 45.02 | 35.73 | 15.31 |
| TI | 2.22 | 37.08 | 53.16 | 7.55 | TI | 24.99 | 35.66 | 33.62 | 5.74 |
| 16 | 2.17 | 40.77 | 45.86 | 11.36 | 16 | 2.02 | 44.12 | 41.04 | 13.60 |
| 17 | 9.86 | 36.33 | 49.51 | 4.48 | 17 | 1.92 | 43.62 | 41.90 | 13.32 |
| 18 | 3.88 | 55.66 | 35.76 | 4.72 | 18 | 12.88 | 40.77 | 33.25 | 13.88 |
| 19 | 2.41 | 38.36 | 51.28 | 8.50 | 19 | 13.72 | 42.24 | 33.24 | 11.70 |
| 20 | 2.23 | 35.76 | 53.08 | 9.81 | 20 | 14.52 | 44.11 | 32.04 | 9.35 |
| 21 | 2.71 | 37.32 | 51.76 | 9.19 | 21 | 13.54 | 46.22 | 30.36 | 9.99 |

Slika 3.16. Uticaj tiazofurina i analoga na ćelijski ciklus K562 ćelija primenom protočne citometrije; analozi tiazofurina *ksilo* konfiguracije (jedinjenja **16-21**)

ANALOZI TIAZOFURINA *RIBO* KONFIGURACIJE

(MBZ = *m*-metoksibenzoil)



| 24h | sub G1 | G0/G1 | S faza | G2/M | 72h | sub G1 | G0/G1 | S faza | G2/M |
|-----|--------|-------|--------|-------------|-----|--------|-------|--------|-------|
| Kon | 1.05 | 36.28 | 48.38 | 14.29 | Kon | 3.04 | 45.02 | 35.73 | 15.31 |
| TI | 2.22 | 37.08 | 53.16 | 7.55 | TI | 24.99 | 35.66 | 33.62 | 5.74 |
| 22 | 6.12 | 39.08 | 49.42 | 5.67 | 22 | 11.29 | 44.19 | 34.92 | 10.50 |
| 23 | 3.81 | 43.28 | 45.36 | 8.21 | 23 | 11.17 | 48.09 | 32.08 | 9.32 |
| 24 | 4.84 | 39.46 | 46.77 | 9.41 | 24 | 10.84 | 43.53 | 34.00 | 12.31 |
| 25 | 2.93 | 42.67 | 42.89 | 11.60 | 25 | 10.90 | 42.98 | 35.04 | 11.82 |
| 26 | 2.61 | 35.02 | 47.22 | 15.65 | 26 | 11.13 | 44.32 | 33.29 | 11.95 |
| 27 | 1.40 | 32.96 | 46.33 | 20.06 | 27 | 13.52 | 40.28 | 34.08 | 12.28 |

Slika 3.17. Uticaj tiazofurina i analoga na ćelijski ciklus K562 ćelija primenom protočne citometrije; analogi tiazofurina *ribo* konfiguracije (jedinjenja **22-27**)

3.5.2. Apoptoza

Prilikom analize ćelijskog ciklusa bojenjem propidijum-jodidom na protočnom citometru, uočen je proapoptotski efekat ispitivanih analoga na tretiranoj ćelijskoj liniji, kroz jasno formiranje subG1 pika koji odgovara nakupljenim hipodiploidnim apoptotskim ćelijama. U daljem istraživanju, ispitivan je tip ćelijske smrti koji je indukovano dejstvom analoga na K562 ćelije. Ispitivanje ćelijske smrti praćeno je, uz korišćenje dvostrukog bojenja Annexin V-FITC/propidijum-jodida. Gubitak asimetrije plazma membrane predstavlja prvi korak u procesu apoptotske ćelijske smrti. U apoptotskim ćelijama, membranski fosfolipid, fosfatidil-serin se premešta sa unutrašnje na spoljašnju stranu plazma membrane, čime se omogućava vezivanje Annexina V (kalcijum zavisnog fosfolipid-vezujućeg proteina), koji ima veliki afinitet za fosfatidil-serin. Za Annexin V može biti vezana fluorescentna boja, kao što je fluorescein izotiocijanat (FITC). Korišćenjem dvostrukog bojenja ćelija sa Annexin V-FITC i propidijum-jodidom, moguća je detekcija ćelija u ranoj fazi apoptotske ćelijske smrti u odnosu na testove zasnovane na određivanju nuklearnih promena, kao što je DNK fragmentacija.

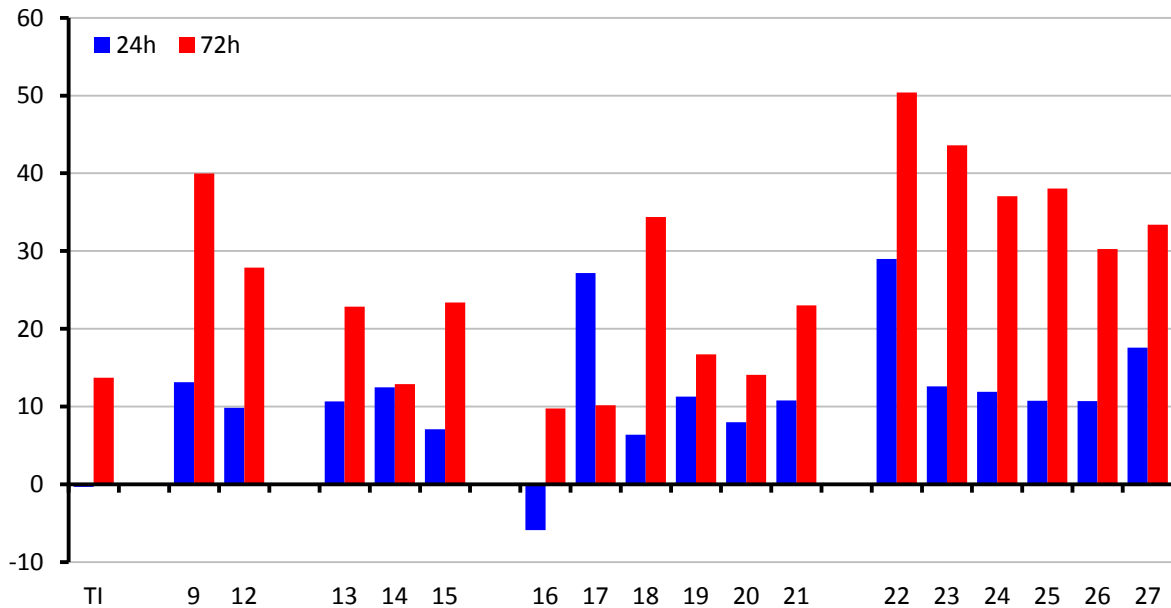
Ispitali smo kinetiku ćelijske smrti u K562 ćelijama tretiranim analogima tiazofurina, kao i referentnim tiazofurinom. Ćelije su kontinualno tretirane ispitivanim jedinjenjima u toku 24 i 72 h, pri koncentracijama koje odgovaraju njihovim IC_{50} vrednostima za 24 odnosno 72 h, nakon čega je određivan procenat apoptotskih i nekrotičnih ćelija na protočnom citometru.

3.5.2.1. Apoptoza kao dominantan tip ćelijske smrti

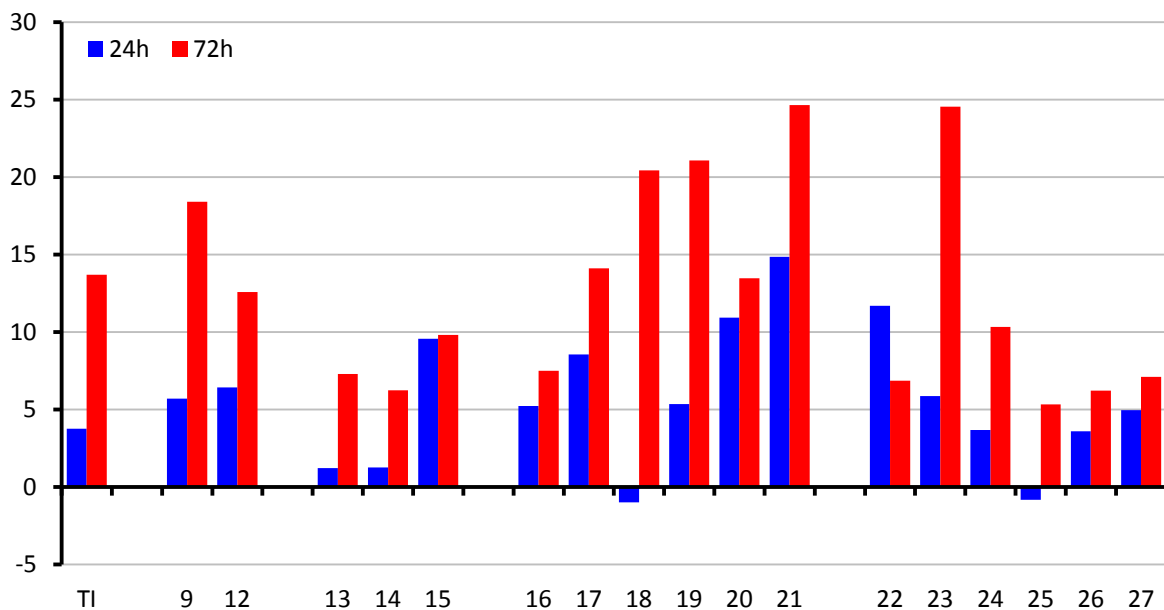
Tretman ćelija tiazofurinom u koncentraciji od 8.7 μ M tokom 24 h, ne indukuje apoptozu u K562 ćelijama u poređenju sa netretiranim K562 ćelijama. Ovo je u skladu sa rezultatima De Abreu,¹¹⁸ koji je ustanovio da tiazofurin pri sličnim koncentracijama ne indukuje apoptozu na Molt-4 ćelijskoj liniji tokom prvih 24 h. Dužim delovanjem tiazofurina na ćelijske linije dolazi do blagog povećanja pozitivnih Annexin-V ćelija. Ovo ukazuje da tiazofurin, nakon 24 h pri IC_{50} koncentraciji, deluje uglavnom kao inhibitor inozinmonofosfat-dehidrogenaza (IMPDH). Apoptotski odgovor, predstavljen je kao procenat specifične apoptoze (*Slika 3.18*) pokazuje 64as vi analozi tiazofurina nakon 24 i 72 h višestruko povećavaju procenat Annexin-V pozitivnih K562 ćelija u odnosu na tiazofurin. Analog **22** je bio najaktivniji u oba ispitivana vremena. Procenat specifične apoptoze povećava se sa dužinom tretmana pa je nakon 72 h dva (**13**, **19**, **20**, **21**, **22** i **27**), tri (**9**, **12**, **25n**, **16**, **23**, **24**, i **26**), četiri (**25**) ili pet (**18**) puta veći u poređenju sa vrednostima dobijenim za 24 h. Jedinjenje **22** izaziva najveću specifičnu apoptozu u oba

ispitivana vremenska perioda (29.00% za 24 h i 50.41% za 72 h). Jedino je analog **17** izazvao veći procenat specifične apoptoze nakon 24 h, dok je posle 72 h procenat specifične apoptoze bio 2,7 puta manji.

Procenat specifične nekroze raste s produženjem vremena inkubacije (Slika 3.19). Procenat specifične nekroze nakon 72 h za analoge **19**, **21** i **23** je između 20% i 25%, dok je za ostale analoge bio nešto niži (6-18%).



Slika 3.18. Procenat specifične apoptoze



Slika 3.19. Procenat specifične nekroze

3.5.3. Ispitivanje uticaja novosintetisanih analoga tiazofurna na ćelijske signalne molekule koji su uključeni u apoptotsku kaskadu

U cilju definisanja antitumorske aktivnosti sintetizovanih analoga na molekulskom nivou, a radi otkrivanja molekulskih signalnih puteva preko kojih se ispoljava, ispitan je njihov uticaj na ekspresiju proteina koji se nalaze uzvodno i nizvodno u signalnoj kaskadi ćelijske proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Efekat ispitivanih jedinjenja na promenu nivoa pro-apoptotskih i anti-apoptotskih proteina u tretiranim ćelijama, utvrđivan je semi-kvantitativnom Western blot metodom.

Da bismo objasnili mehanizme apoptoze indukovane analogima tiazofurina **9**, **12-27** koji su dobijeni u našim laboratorijama, ispitali smo kako ova jedinjenja menjaju ekspresiju Bcl-2, Bax, kaspaze 3 i Poli (ADP-riboze) polimeraze (PARP) koji su uključeni u kritične faze apoptotskog puta. Članovi Bcl-2 familije proteina ključni su regulatori apoptoze. Apoptoza zavisi od balansa između pro- i antiapoptotskih proteina Bcl-2 familije. Antiapoptotski član Bcl-2 ima ključnu ulogu u apoptozi, jer sprečavajući indukciju apoptoze izaziva rezistenciju tumorskih ćelija na lek.¹¹⁹⁻¹²²

3.5.3.1. Uticaj analoga na rane događaje u apoptozi

Bax, proapoptotski protein Bcl-2 porodice, prolazi konformacione promene kao odgovor na apoptotski stimulans, i na taj način se suprotstavlja aktivnosti Bcl-2, stimulišući oslobađanje citohroma *c* (CytC) i drugih apoptogenih proteina u citoplazmu, nastavljajući proces apoptoze.

Radi utvrđivanja uticaja novosintetizovanih analoga tiazofurina i tiazofurina na ekspresiju proteina Bcl-2 i Bax u tretiranoj K562 ćelijskoj liniji, supstance su primenjene u odgovarajućoj IC₅₀ koncentraciji, a ćelije su inkubirane u toku 24 h, odnosno 72 h.

Western blot analiza ispitivanih analoga **9** i **12-27** (Slika 3.20.a-3.22.a i 3.20.b-3.22.b.) pokazuje da nakon 24-časovnog tretmana neki analozi (**12**, **14**, **20**, **21**, **26** i **27**) smanjuju ekspresiju Bcl-2 u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) i tiazofurin, dok analozi **9**, **13**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **22**, **23**, **24** i **25** neznatno povećavaju ukupnu količinu Bcl-2 proteina u odnosu na kontrolu, a znatno više u odnosu na tiazofurin. Nakon 72 h ispitivani analozi **14** i **27** smanjuju ekspresiju antiapoptotskog Bcl-2 proteina u odnosu na kontrolu i tiazofurin, dok analozi **13**, **18**, **25** i **26** neznatno povećavaju ukupnu količinu Bcl-2 proteina u odnosu na kontrolu. U odnosu na tiazofurin, ekspresija Bcl-2 je približno ista, osim za analoge **13**, **14**, **17**, **18**, **22**, **25**, **26** i **27** gde je niža.

Jedinjenja **14**, **26**, **27** pokazuju najveće smanjenje ekspresije Bcl-2 proteina u oba ispitivana vremena. Razni hemoterapeutici indukuju apoptozu koja se ispoljava značajnom ekspresijom Bax proteina. Međutim, u našim eksperimentima analozi tiazofurina **9**, **12-27** nisu bitno uticali na ekspresiju Bax proteina nakon 24 h. Takođe je potvrđeno da apoptoza u raznim humanim solidnim tumorima može biti izazvana i u odsustvu bilo kakvih promena u nivou Bax proteina.¹²³ Ekspresija Bax proteina je povećana nakon 72 h tretmana sa svim ispitivanim supstancama, kao i sa tiazofurinom, u odnosu na vreme tretmana od 24 h. Ovi rezultati su u skladu sa povećanjem specifične apoptoze nakon 72 h.

3.5.3.2. Uticaj analoga na ekspresiju kaspaze 3

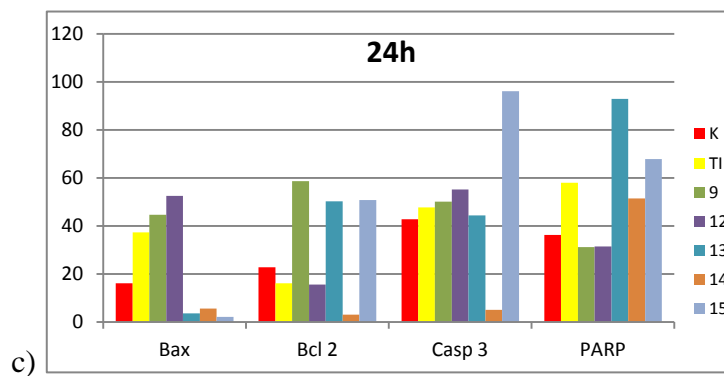
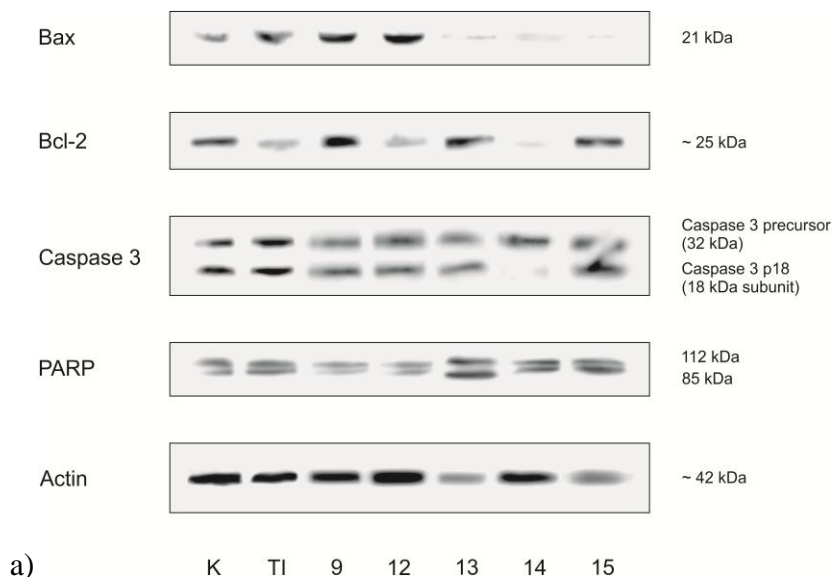
Kaspaze, familija aspartat-specifičnih cisteinskih proteaza, igraju ključnu ulogu u programiranoj apoptotskoj ćelijskoj smrti. Kaspaze su značajni medijatori u iniciranju i izvršenju apoptotskog signala.^{119,124-126} U nastavku istraživanja ispitivali smo da li tretman K562 ćelija aktivira kaspazu 3, koja je ključna egzekutivna kaspaza u apoptotskoj kaskadi. Međutim, morfologija apoptoze može biti ostvarena ne samo delovanjem kaspaza već i proteazama iz drugih familija.

Ćelijska smrt izazvana antitumorskim agensom je obično povezana sa povećanjem apoptoze preko kaspaza-zavisnog puta, iako kaspaza-nezavisni put može takođe biti uključen.^{104,127} Drugim rečima, apoptoza se može izazvati bez aktivacije kaspaza, odnosno aktivacija kaspaza ne mora nužno da izazove ćelijsku smrt.¹³⁰

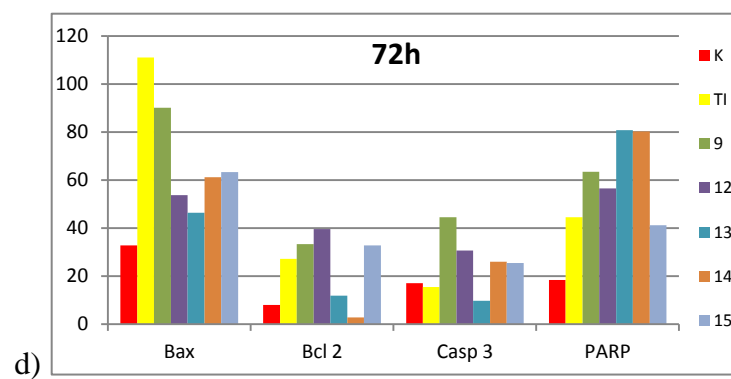
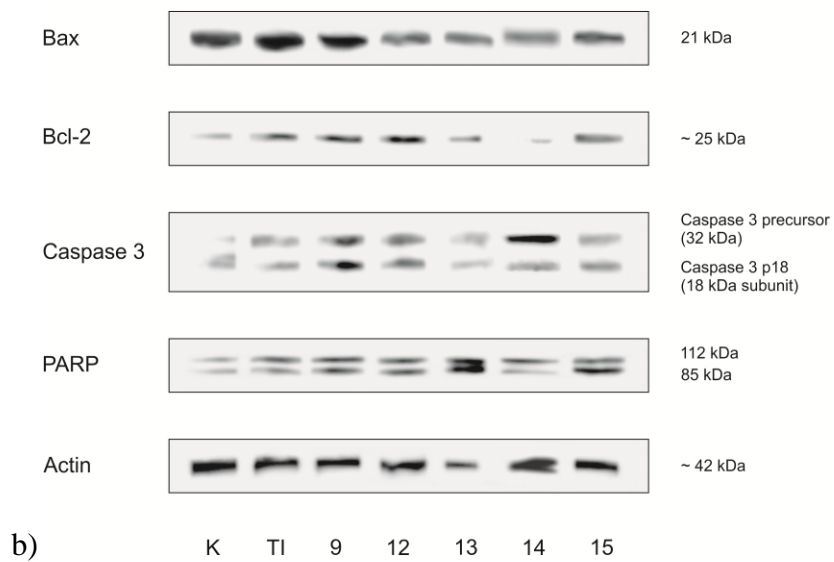
Nivo ekspresije prekursora i aktivne podjedinice kaspaze 3 u ćelijama izloženim dejstvu tiazofurina i njegovih analoga (aciklični tiazolni nukleozidi, analozi *arabino*, *ksilo* i *ribo* konfiguracije) **9**, **12-27**, određivali smo u cilju provere da li ova jedinjenja indukuju apoptozu aktiviranjem kaspaze 3. Western blot analiza je pokazala da dolazi do ekspresije proteinskog prekursora kaspaze 3 u K562 ćelijama tretiranim sa svim ispitivanim analogima (**9**, **12-27**), međutim, nivo ekspresije aktivne podjedinice kaspaze 3 je bio drugačiji i zavisi kako od prirode analoga, tako i od ispitivanog vremena. Nakon 24 h (Slike 3.20.a, 3.21.a, 3.22.a), svi analozi (osim **14**, **18**, **26** i **27**), kao i tiazofurin povećavaju ekspresiju kaspaze 3, što jasno ukazuje na uključenost kaspaze 3 u apoptotske procese u tretiranoj ćeliji. Manji efekat na ćelijski sadržaj kaspaze 3 je uočen nakon 72-časovnog tretmana ćelija sa ispitivanim supstancama (osim **14**, **18** i **27**) (Slike 3.20.b, 3.21.b, 3.22.b).

Aktivacija kaspaze 3 dovodi do cepanja različitih "nizvodnih" proteina, uključujući poli-(ADP-riboza) polimerazu (PARP).^{128,129} Enzim PARP uključen je u mehanizam kojim se popravljaju oštećena DNK tokom ćelijskog ciklusa isecanjem baza (engl. *base excision repair*) i stoga je

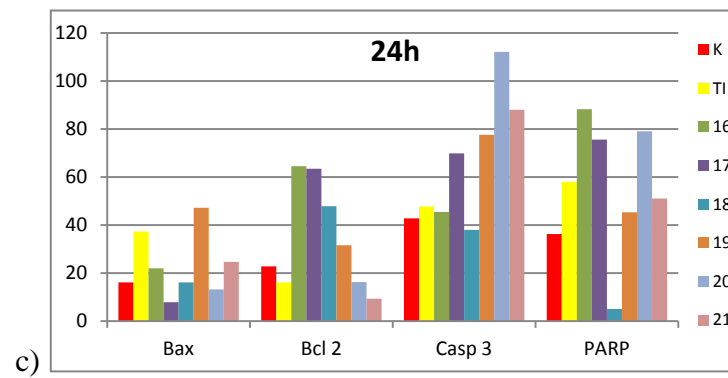
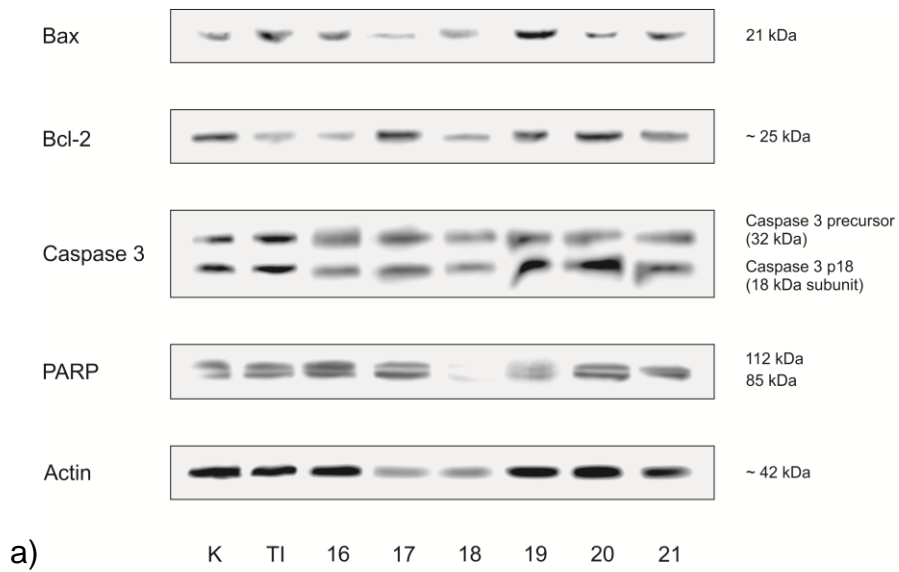
jedan od biohemijskih obeležja apoptoze.¹³⁰ Western blot analizom smo pokazali proteolitičko cepanje PARP-a u K562 ćelijama nakon tretmana sa svim ispitivanim analogima **9**, **12-27**, koje zavisi kako od strukture analoga tako i od vremena delovanja. U poređenju sa drugim analogima, analozi **18** (*ksilo* konfiguracije) (24h, 72h), i **27** (*ribo* konfiguracije) (72 h) indukuju najslabije cepanje PARP (Slike 3.20.a, 3.21.a, 3.22.a, 3.20.b, 3.21.b, 3.22.b).



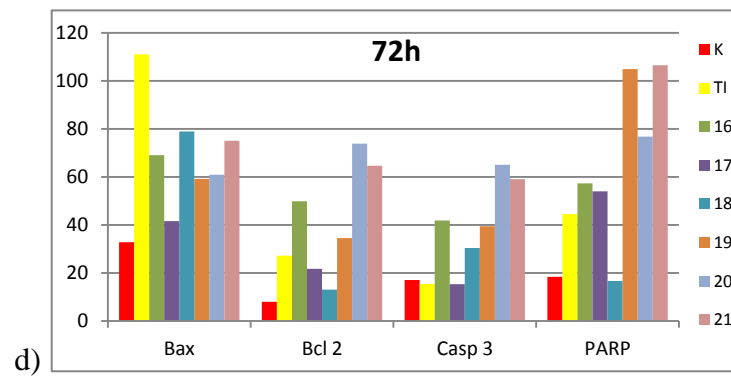
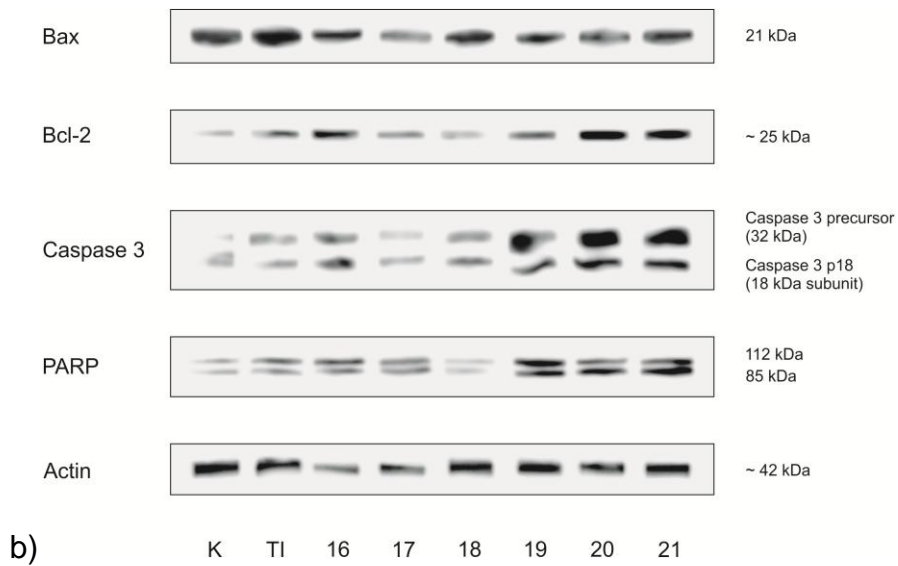
Slika 3.20a, c: Rezultati Western blot analize za jedinjenja iz grupe acikličnih tiazolnih nukleozida (**9**, **12**); *arabino* konfiguracije (**13**, **14**, **15**), 24 h.



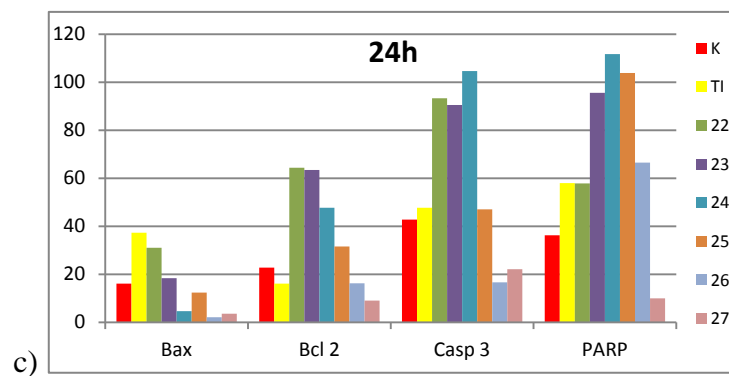
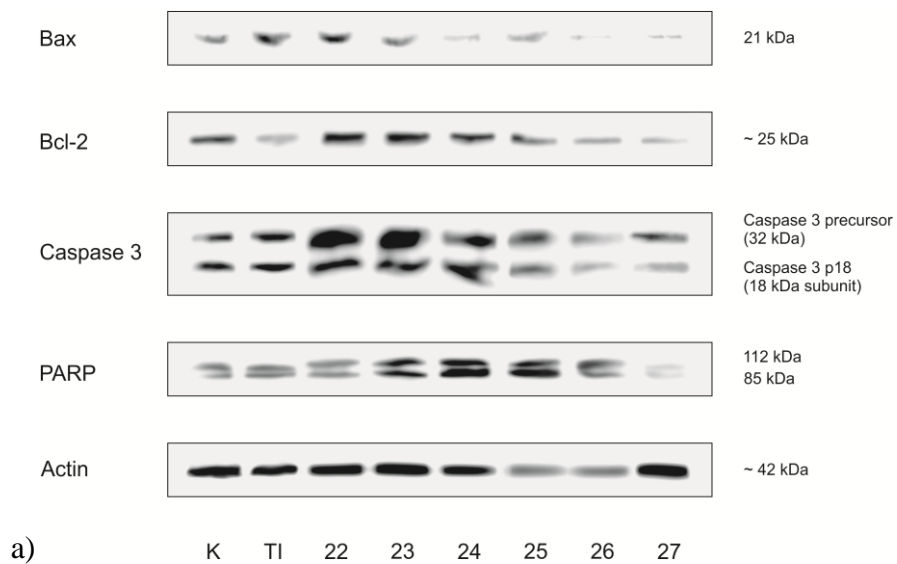
Slika 3.20b, d: Rezultati Western blot analize za jedinjenja iz grupe acikličnih tiazolnih nukleozida (**9, 12**); *arabino* konfiguracije (**13, 14, 15**), 72 h.



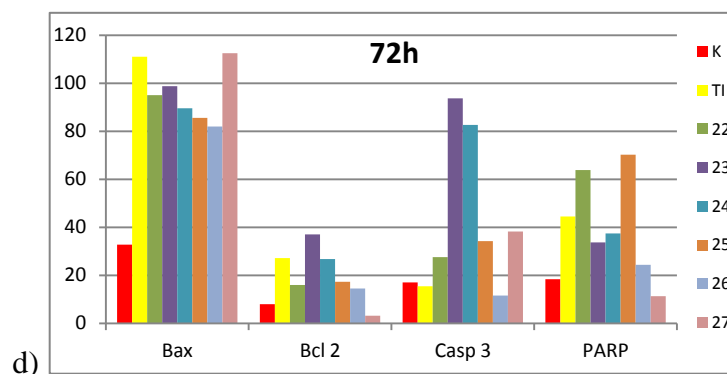
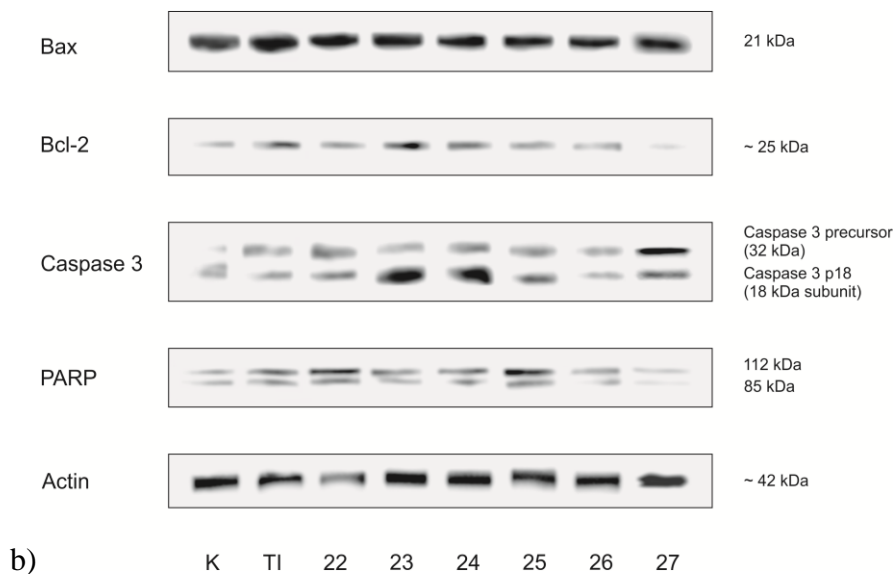
Slika 3.21a, c: Rezultati Western blot analize za jedinjenja iz grupe analoga tiazofurina *ksilo* konfiguracije (jedinjenja 16-21), 24 h.



Slika 3.21b, d: Rezultati Western blot analize za jedinjenja iz grupe analoga tiazofurina *ksilo* konfiguracije (jedinjenja 16-21), 72 h.



Slika 3.22a, c: Rezultati Western blot analize za jedinjenja iz grupe analoga tiazofurina *ribo* konfiguracije (jedinjenja 22-27), 24 h.



Slika 3.22b,d: Rezultati Western blot analize za jedinjenja iz grupe analoga tiazofurina *ribo* konfiguracije (jedinjenja 22-27), 72 h.

Slike 3.21-3.22 Nakon 24 h i 72 h tretmana K562 ćelija analogima tiazofurina i tiazofurinom, primenjenim u IC_{50} koncentraciji, ćelijski lizati su podvrgnuti imunoblotu. Membrane su inkubirane sa anti-Bax, Bcl2, Kaspasa 3, PARP i anti- β -aktin antitelima. Nivo β -aktin proteina je korišćen kao kontrola uspešnosti Western blot-a.

Na slikama 3.20-3.22c,d prikazan je rezultat kvantifikacije traka dobijenih Western blotom, koje odgovaraju Bax, Bcl2, Kaspasa 3 i PARP proteinima. Kvantifikacija traka dobijenih u Western blotu je odrađena denzitometrijskom analizom, koristeći ImageJ softver. Relativne količine Bax, Bcl2, Caspase 3 i PARP proteina u lizatima K562 ćelija prikazane su u arbitrarnim jedinicama.

3.6. Diskusija rezultata bioloških ispitivanja

Potreba za razvojem novih, efikasnijih i manje toksičnih antitumorskih lekova podstakla je istraživanja u pravcu novih farmakološki aktivnih supstanci. Ova potreba je naročito važna za većinu rasprostranjenih karcinoma, kao što su karcinom grlića materice, dojke, pluća i debelog creva. Trenutno, hemoterapija i hormonski preparati nisu potpuno efikasni upravo zbog nespecifičnih mehanizama delovanja.¹³² Pored toga, rezistencija mnogih tumora na već postojeće terapije predstavlja i dalje jedan od glavnih problema u terapiji malignih bolesti. Stoga bi strategija u razvoju novih lekova bazirana na prevazilaženju tumorske rezistencije mogla doprineti preživljavanju pacijenata obolelih od karcinoma.¹³³ Većina antitumorskih terapija, uključujući hemioterapiju, zračenje, imunoterapiju ili terapiju citokinima, prevashodno deluju putem indukcije apoptoze tumorskih ćelija, pa defekti u procesu apoptoze mogu dovesti do rezistencije.¹³⁴

Cilj ovog rada bio je utvrđivanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi antitumorskog dejstva novosintetizovanih analoga tiazofurina. Eksperimentima na panelu od devet malignih i jednoj normalnoj ćelijskoj liniji pokazali smo da derivati tiazofurina sa modifikovanim ugljenohidratnim segmentom prema nekim ćelijskim linijama pokazuju jaču antiproliferativnu aktivnost od samog tiazofurina, i to nedvosmisleno ukazuje da prisustvo inherentnog ribofuranozil ostatka nije neophodno za antitumorsku aktivnost tiazofurina. Naime, do sada se smatralo da je prisustvo ostatka D-ribofuranoze u molekulu tiazofurina od presudnog značaja za njegovu biološku aktivnost.

Dobijeni rezultati bioloških testova *in vitro* pokazuju velike varijacije u aktivnosti analoga zavisno od ispitivane ćelijske linije. Ovo ukazuje da novosintetizovani analozi ne deluju na istu biološku metu (IMPDH) kao tiazofurin. Kada bi testirana jedinjenja delovala na istu biološku metu, analozi bi trebalo da pokazuju slične antiproliferativne efekte kao tiazofurin prema svim ćelijskim linijama. Rezultati testova citotoksične aktivnosti daju nam informaciju o smanjenju broja vijabilnih ćelija unutar populacije tretiranih ćelija, u poređenju sa netretiranim ćelijama. Na osnovu dobijene IC_{50} vrednosti nije moguće utvrditi da li je uočena antiproliferativna aktivnost posledica izazvane ćelijske smrti ili inhibicije ćelijske deobe. S obzirom na to da je apoptoza jedan od ključnih ćelijskih puteva kojim hemoterapeutici deluju,¹³⁴⁻¹³⁶ u daljem radu smo proučavali upravo ćelijske mehanizme koji su u osnovi uočenog citotoksičnog potencijala sintetizovanih analoga.

Pokazali smo da sintetizovani analozi tiazofurina, indukuju promene broja ćelija po fazama ćelijskog ciklusa K562 ćelija. Nakon 24 h tretmana K562 ćelija sintetizovanim analogima (osim

analogu **18**) dolazi do akumulacije ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa. Ispitivani analozi i tiazofurin su za duže vreme inkubacije, od 72 h, izazvali akumulaciju ćelija u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa, gde je nešto manja akumulacija tiazofurina i analogu (osim **18**, **21**, **23**) u odnosu na kontrolu. Svi analozi *arabino* i *ribo* konfiguracije, kao i tiazofurin posle 72-časovnog tretmana K562 ćelija pokazuju značajan procenat apoptotskih ćelija (sub-G1 pik). Dalje smo pokazali da novosintetisani analozi tiazofurina indukuju vremenski zavisnu apoptozu u tretiranoj ćelijskoj liniji. Može se spekulirati da je apoptotska aktivnost novosintetisanih jedinjenja zapravo posledica strukturnih promena, i da su ovakve promene u hemijskoj strukturi osnova pokazane antitumorske aktivnosti.

Naša dalja istraživanja išla su u pravcu ispitivanja signalnih puteva koje novosintetizovani analozi tiazofurina koriste u ispoljavanju svog antitumorskog dejstva. Pokazano je da je u K562 ćelijama apoptoza praćena aktivacijom "nizvodnog" molekula apoptotskog puta, kaspaze-3. Ova proteaza ima značajnu ulogu u apoptozi¹³⁷⁻¹⁴⁰ kao i ključnu ulogu u morfo-funkcionalnim promenama jedra tokom apoptoze.¹⁴⁰ U našem modelu molekulskog mehanizma delovanja novosintetizovanih analogu tiazofurina dolazi do aktivacije kaspaze-3. Aktivaciji kaspaze-3 prethodi aktivacija proteina p53 - tumor supresorske familije proteina, koji imaju centralnu ulogu u ćelijskom odgovoru na oštećenja DNK.¹⁴¹ Ovi proteini se nakupljaju u jedru nakon oštećenja DNK i kontrolišu dalju proliferaciju ćelije.^{142,143} Protein p53 učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa,¹⁴⁴ tako što podstiče transkripciju nekih od p53-ciljnih gena kao što su p21/Waf1/Cip1, zatim RGC (ribozomalni klaster gena), mdm2, Bax, cyclinG, GADD 45, IGF-BP3 (insulinu sličan faktor rasta-vezujući protein 3).¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Dalje je ispitivana količina molekula Bax u tretiranim ćelijama, koji je proapoptotski faktor iz familije Bcl-2 proteina, i predstavlja ciljni gen za protein p53.^{149,150} U ćelijama koje su u homeostazi Bax protein postoji kao neaktivni monomer u citosolu ćelija. Stimulusi koji vode ćelijskoj smrti dovode do homooligomerizacije ovog proteina i njegove translokacije do mitohondrija, nakon čega dolazi i do oslobađanja Cyt C u citosol i aktivacije kaspaza.¹⁵¹⁻¹⁵³ S druge strane, pretpostavka je da aktiviranje MEKK-MKK-JNK (engl. *Mitogen-activated protein kinase kinase-Jun N-terminal kinases*) proteinskog puta c-Abl proteinskom-kinazom, predstavlja okidač za oslobađanje molekula Cyt C iz mitohondrija, što vodi povećanoj ekspresiji upravo Bax proteina.^{54,155} Mitohondrije imaju ključnu ulogu u ćelijskoj smrti, kao centralne organele uključene u signalnu transdukciju i amplifikaciju apoptotskog odgovora.¹⁵⁶⁻¹⁶⁰ Na osnovu naših rezultata, ne može se zaključiti da li translokacija Bax proteina direktno ili indirektno indukuje apoptozu preko mitohondrijalnog puta.

Apoptoza i nekroza predstavljaju dva tipa ćelijske smrti sa različitim morfološkim i biohemijskim karakteristikama. Mada su nekada smatrane dvoma potpuno različitim vidovima

suštinski istog događaja, danas se apoptoza i nekroza posmatraju sa istog stanovišta, tj. kao ekstremi u kontinuitetu jednog događaja.^{161,162} Zanimljivo je da se oba procesa mogu dešavati simultano u ćelijama izloženim istom stimulusu,¹⁶³ što potvrđuju i naši rezultati. Naime, pokazali smo da analozi **19**, **21** i **23** imaju ovakvu dvostruku funkciju u izazivanju kako apoptoze, tako i nekroze u tretiranim ćelijama. Mada su apoptotski putevi oduvek bili željeni cilj prilikom sinteze, karakterizacije i razvoja novih onko terapeutika, u novije vreme se sve više izučava selektivna prednost nekroze u sprečavanju progresije tumora. Poznato je da se tumorske ćelije karakterišu nakupljanjem velike količine genomskih mutacija,¹⁶⁴ a posledica toga su česte strukturno funkcionalne promene u proteinima koji su ili integralni deo mitohondrijalnog apoptotskog puta ili tumor-supresori koji utiču na uzvodne apoptotske događaje. Ovakve genomske promene često finalno vode rezistenciji ćelija na ustanovljene antitumorske lekove, koji deluju putem apoptotskih mehanizama. U ovim slučajevima nekroza može biti alternativni mehanizam zaustavljanja proliferacije tumorskih ćelija. Neki autori čak spekulisu da bi supstance koje izazivaju nekrozu mogle imati širi spektar pozitivnih hemioterapeutskih aktivnosti s obzirom na to da ne zavise od aktivnosti gena koji kontrolišu apoptotski odgovor.¹⁶⁵⁻
168

U prilog prethodno iznetom, uočeno je da pored apoptoze antitumorski lekovi koji su u kliničkoj primeni mogu izazivati i nekrozu u ćelijama tumora.¹⁶⁹⁻¹⁷² Duskora se u poređenju sa nekrozom, apoptoza smatrala superiornim mehanizmom odstranjivanja tumorske mase. Međutim, s obzirom na to da se apoptoza dešava bez narušavanja plazma membrane same ćelije, ona sprečava početak inflamatornog odgovora, što je osnovna razlika u odnosu na put nekroze. Novija istraživanja ukazuju da je izloženost nekrotičnih, mrtvih ćelija makrofagima izazivala pojačanu stimulaciju makrofagne antitumorske aktivnosti, što vodi bržem odstranjivanju tumorskih ćelija iz organizma.^{173,174} Spekuliše se da bi ovakav antitumorski efekat nastao usled nespecifične aktivacije imunog sistema makrofagama i nekrotičnim ćelijama, mogao voditi dugotrajnijem i efikasnijem antitumorskom efektu.^{169,173,175}

Naši rezultati ukazuju, po prvi put, da antitumorska aktivnost ispitivanih nosintetizovanih jedinjenja na testiranoj ćelijskoj liniji K562 obuhvata promene u fazama ćelijskog ciklusa, kao i indukciju apoptoze putem različitih mehanizma (kaspaza-zavisni i kaspaza-nezavisni put).

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Hemijski deo

Opšte metode – Tačke topljenja su određene na aparatu Büchi 510 i nisu korigovane. Vrednosti optičke rotacije su izmerene na automatskim polarimetrima P 3002 (Krüss) i Polamat A (Zeiss, Jena) na sobnoj temperaturi. IR Spektri su snimljeni na spektrofotometrima Specord 75 IR (Zeiss, Jena) i Nexus 670 (ThermoNicolet, detektor DTGS), a položaj traka je dat u cm^{-1} . NMR Spektri su snimljeni na instrumentu Bruker AC 250 E, a hemijska pomeranja (δ -skala) su izražena u *ppm* vrednostima uz tetrametilsilan kao interni standard. Protonski NMR Spektri su asignirani metodom *homo*-dekuplovanja, odnosno 2D COSY tehnikom. ^{13}C NMR Spektri su asignirani metodom selektivnog dekuplovanja. CI Maseni Spektri snimljeni su na Finningan-MAT 8230 spektrometru uz izobutan kao reagens gas. Tok reakcija je praćen tankoslojnom hromatografijom na aluminijskim folijama Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Hromatogrami su izazivani sa 50%-nom H_2SO_4 uz naknadno zagrevanje na 120°C . Fleš hromatografija je urađena na kolonama Kieselgel 60 (0.040–0.063, E. Merck). Ekstrakti su sušeni anhidrovanim Na_2SO_4 . Organski rastvarači su uparavani na rotacionom vakuum uparivaču pri temperaturama vodenog kupatila do 40°C .

4.1.1. Dietilditioacetal D-arabinoze (2)

Rastvoru D-arabinoze (10 g; 66.75 mmol) u koncentrovanoj HCl (8.5 mL) doda se etilmerkaptan (10 mL). Ovako pripremljena reakciona smeša meša se na ledenom kupatilu, sve dok se ne pojave kristali. Posle toga, reakciona smeša se ostavi u kupatilu sa ledom i soli u toku narednih pola časa. Kristali se odvoje filtracijom, isperu ledenom vodom i brzo se prekrystališu iz toplog rastvora NaHCO_3 . Izdvojeni kristali se filtruju, isperu s ledenom vodom, apsolutnim alkoholom i etrom, pri čemu se dobija čist proizvod **2** (6.1 g; 40.31%) u vidu belih kristala, *mp* 126°C (lit³² 126°C).

NAPOMENA: Ogljed se izvodi u digestoru sa dobrom ventilacijom, a zaostali etilmerkaptan (u filtratu) se uništava viškom hlornog kreča.

4.1.2. Dietilditioacetal 2,3,4,5-tetra-*O*-benzoil-D-arabinoze (3)

Rastvoru jedinjenja **2** (1.00 g; 3.49 mmol) u apsolutnom piridinu (4 mL) doda se benzoil-hlorid (2.84 mL; 24.44 mmol) na ledenom kupatilu, a dobijeni rastvor se zatim ostavi na sobnoj temperaturi u toku 48 h. Reakciona smesa se upari višestrukom ko-distilacijom sa etanolom, a ostatak se rastvori u metilenhloridu (15 mL). Ekstrakt se ispere zasićenim vodenim rastvorom NaHCO₃ (15 mL), vodom (10 mL), 10 % HCl, ponovo vodom (10 mL), a zatim osuši. Nakon udaljavanja sušila i rastvarača zaostaje žuto ulje (2.89 g), koje se prečišćava preparativnom tankoslojnom hromatografijom (toluen/EtOAc 8:1; eluiranje sa silikagela EtOAc). Dobija se čist proizvod **3** (2.25 g; 95.74%) u vidu bezbojnog ulja, $[\alpha]_D$ 39.58 (*c* 1.24; CHCl₃), $R_f=0.6$ (toluen/EtOAc 8:2).

4.1.3. Tetra-*O*-benzoil-aldehido-D-arabinoza (4)

Rastvoru jedinjenja **3** (2.8665 g; 4.26 mmol) u acetonu (9 mL) i destilovanoj vodi (1.31 mL) dodaje se uz energično mešanje HgO (3.1687 g; 14.63 mmol) i HgCl₂ (3.1694 g; 11.67 mmol). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi u toku 3.5 h a zatim filtruje i upari. Preostali suvi ostatak se rastvori u metilenhloridu (20 mL) i ispere 1M KI, a zatim destilovanom vodom. Ekstrakt se suši i upari pri čemu zaostaje sirovi proizvod **4** (2.0879 g) kao žuto ulje. Kristalizacijom iz smeše hloroform/metilenhlorid/heksan dobija se čisto jedinjenje **4** (1.4658 g, 60.73%), u vidu belih kristala, *tt* 123°C.

IR (film): ν_{\max} 3064 (C-H, Ph), 1725 (C=O, estar i aldehyd), 1601 (C=C, Ph).

4.1.4. (*E,Z*)- 2,3,4,5-Tetra-*O*-benzoil-D-arabinozaoksim (5)

Sirovi aldehyd **4** (0.8597 g, 1.52 mmol) suspenduje se u etanolu (16 mL) uz dodatak anhidrovanog natrijum-acetata (1.0629 g; 12.96 mmol) i hidrosilamin-hidrohlorida (0.5915 g; 8.51 mmol). Suspenzija se energično meša na sobnoj temperaturi u toku 2 časa. Reakciona smesa se upari u vakuumu, a suvi ostatak se suspenduje u vodi (10 mL) i ekstrahuje metilenhloridom (3×20 mL). Ekstrakt se osuši i upari dajući smeđe ulje koje se prečišćava preparativnom tankoslojnom hromatografijom (toluen/EtOAc 8:2; eluiranje sa silikagela EtOAc). Dobija se smesa izomernih *E*- i *Z*- oksima **5** (0.3169 g; 35.91%) u vidu bezbojnog ulja, $R_f=0.41$ (toluen/EtOAc 8:2).

4.1.5. 2,3,4,5-Tetra-*O*-benzoil-D-arabinonitril (6)

Smesa oksima **5** (0.3169 g, 0.54 mmol) se rastvori u apsolutnom piridinu (3 mL) i u tako dobijeni ohlađeni rastvor (-15°C) postepeno se dokapava, u toku 30 minuta, prethodno ohlađeni rastvor (-10°C) metansulfonil-hlorida (0.20 mL; 2.95 mmol) u apsolutnom piridinu (0.34 mL). Rastvor se meša na -15°C u toku pola časa i na sobnoj temperaturi još dva časa. Reakcija se prekida dodatkom leda i 6M HCl (pH≈2), a dobijena suspenzija se ekstrahuje metilenhloridom (4×20 mL). Ekstrakt se ispere vodom (20 mL), zasićenim rastvorom NaHCO₃ (10 mL) i ponovo vodom (10 mL), a zatim se suši (smesa anhidrovanih Na₂SO₄ i Na₂CO₃). Nakon udaljavanja sušila, filtrat se upari, pri čemu zaostaje smeđe ulje (0.3820 g). Preparativnom tankoslojnom hromatografijom (cikloheksan/acetone 6.5:3.5; eluiranje sa silikagela EtOAc) dobija se čist proizvod **6** (0.2511 g; 81.76%) u vidu bezbojnog ulja, $[\alpha]_D$ 11.08 (*c* 0.279; CHCl₃), ¹⁷⁷ $[\alpha]_D$ 13.8 (*c* 1; CHCl₃), $R_f=0.38$ (cikloheksan/acetone 7:3).

IR (film): ν_{\max} 1728.68 (C=O, estar).

TOF M-Spektar: m/e 564.16435 (M⁺+H). Izračunato za C₃₃H₂₆N₂O₈: 564.16529.

4.1.6. (*E*),(*S*)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-but-1-enil)tiiazolin-4-karboksilat (7)

Rastvoru jedinjenja **6** (0.2099 g; 0.3725 mmol) u apsolutnom metanolu (5 mL) doda se uz mešanje hidrohlorid etilestra L-cisteina (0.1924 g, 1.0361 mmol) i trietilamina (0.14 mL, 1.0361 mmol). Reakciona smesa se meša na sobnoj temperaturi u toku 2 časa i nakon toga upari. Ostatak se rastvori u metilenhloridu ispere vodom, zasićenim rastvorom NaHCO₃ i zatim zasićenim rastvorom NaCl, osuši i upari. Dobija se sirova reakciona smesa tiazolinskih derivata **7** (0.3163 g).

4.1.7. (*E*),(*S*)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksilat (8)

U rastvor jedinjenja **7** (0.2592 g; 0.3725 mmol) u apsolutnom metilenhloridu (4.35 mL) doda se DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en; 0.11 mL, 0.7450 mmol) uz mešanje. Ohlađenom rastvoru (ledeno kupatilo) postepeno je dodat BrCCl₃ (0.04 mL; 0.4422 mmol) u toku 10 minuta. Reakciona smesa se meša na toj temperaturi dodatnih 5 h, u atmosferi N₂, a zatim se ostavi na +4°C u toku 17 časova. Reakciona smesa se upari u vakuumu a suvi ostatak se prečisti preparativnom tankoslojnom hromatografijom (toluen/EtOAc 9:1; eluiranje sa silikagela EtOAc)

pri čemu se dobija čist proizvod **8** (0.0788 g; 46.86% u odnosu na jedinjenje **6**) u obliku bezbojnog ulja, $[\alpha]_D -21.87$ (*c* 0.798; CHCl₃), $R_f=0.38$ (toluen/EtOAc 9:1).

IR (film): ν_{\max} 1722 (C=O, estar).

TOF M-Spektar: m/e 452.11606 (M+H)⁺. Izračunato za C₂₄H₂₂NO₆S: 452.11623.

4.1.8. (E),(S)-2-(3,4-dihidroksi-but-1-enil)thiazol-4-karboksamida (9)

Rastvor jedinjenja **8** (0.0681 g; 0.1508 mmol) u zasićenom metanolnom rastvoru amonijaka (5 mL) ostavi se na sobnoj temperaturi u toku 6 dana, a zatim upari. Ostatak nakon uparavanja rastvarača se prečisti preparativnom tankoslojnom hromatografijom (EtOAc/*i*-PrOH 8:2; eluiranje sa silikagela EtOAc/*i*-PrOH 1:1) pri čemu se dobija čist proizvod **9** (0.0280 g; 86.69%) u obliku žutog ulja, $[\alpha]_D -3.82$ (*c* 1.02; CH₃OH), $R_f=0.40$ (EtOAc/*i*-PrOH 8:2)..

TOF M-Spektar: m/e 237.03173 (M+Na)⁺. Izračunato za C₈H₁₀N₂NaO₃S: 237.03043.

4.1.9. (S)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-butil)thiazol-4-karboksilat (10) i etil-2-(butil)thiazol-4-karboksilat (11)

Jedinjenje **8** (0.1349 g; 0.298 mmol) se rastvori u 96% etanolu (7 mL) i hidrogenuje u prisustvu 10% Pd/C (0.020 g) pri normalnom pritisku vodonika, na sobnoj temperaturi, u toku 24 h. Pošto reakcija nije ni krenula (snimljena je TLC) nastavljena je uz dodatak sveže količine katalizatora (0.045 g) u toku dodatnih 48 časova. Suspenzija se procedi kroz celit, talog ispere sa EtOH i upari. Ostatak nakon uparavanja rastvarača se prečisti preparativnom tankoslojnom hromatografijom (toluen/EtOAc 9:1; eluiranje sa silikagela CH₂Cl₂/EtOAc 1:1) pri čemu se dobija čist proizvod **10** (0.0734 g; 54.20%) u obliku bezbojnog ulja, $[\alpha]_D -24.15$ (*c* 0.39; CHCl₃), $R_f=0.29$ (toluen/EtOAc 9:1) i jedinjenje **11** (0.0196 g; 30.75%) takođe u obliku bezbojnog ulja $R_f=0.40$ (toluen/EtOAc 9:1).

TOF M-Spektar za jedinjenje **10**: m/e 454.13198 (M+H)⁺. Izračunato za C₂₄H₂₄NO₆S: 454.13188.

4.1.10. (S)-2-(3,4-dihidroksi-butil)thiazol-4-karboksamid (12)

Rastvor jedinjenja **10** (0.0354 g; 0.0784 mmol) u zasićenom metanolnom rastvoru amonijaka (5 mL) ostavi se na sobnoj temperaturi u toku 16 dana, a zatim upari. Ostatak nakon uparavanja rastvarača se prečisti preparativnom tankoslojnom hromatografijom (CHCl₃/MeOH 5:1;

eluiranje sa silikagela EtOAc/*i*-PrOH 1:1) pri čemu se dobija čist proizvod **12** (0.012 g; 71%) u obliku belih kristala, $[\alpha]_D -46.25$ (*c* 0.192; CH₃OH), $R_f=0.37$ (CHCl₃/MeOH 5:1).

TOF M-Spektar: *m/e* 217.06344 (M+H)⁺. Izračunato za C₈H₁₃N₂O₃S: 217.06414.

4.2. Biomedicinski deo

4.2.1. Održavanje ćelijskih kultura

Ćelije su gajene u različitim medijumima u zavisnosti od linije kojoj pripadaju. U *Tabeli 4.1.* su prikazane korišćene ćelijske linije i odgovarajući medijumi za gajenje.

Tabela 4.1. Uslovi održavanja i presađivanja ćelijskih linija

| Naziv linije | Održavanje | Presađivanje |
|--|---|--|
| ATCC CCL 243 K562 Humana hronična mijelogena leukemija | RPMI 1640 + 2 mM glutamina + 10% FTS | 2 puta nedeljno; 5-10 x10 ⁴ /ml |
| ATCC CCL 240 HL-60 Humana promijelocitna leukemija | | |
| ATCC CCL 1435 Jurkat Humana leukemija-T ćelija | | |
| ATCC CCL 86 Raji Humani Burkittov limfom | | |
| ATCC CRL 1438 PC-3 Humani adenokarcinom prostate | DMEM + 2 mM glutamina + 10% FTS | 2 puta nedeljno; 2-5 x10 ⁴ /mL 0.05% tripsin u 0.1% EDTA-PBS |
| ATCC HTB 38 HT-29 Humani karcinom kolona | | |
| ATCC HTB 22 MCF-7 Humani karcinom dojke ER+ | | |
| ATCC HTB 26 MDA-MB-231 Humani karcinom dojke ER- | | |
| ATCC CCL 2 HeLa Humani karcinom grlića materice | | |
| ATCC HTB 140 Hs 294T Humani melanom | | |
| ATCC CCL 171 MRC-5 Humani fibroblasti pluća | | |

Medijumi za gajenje kultura sadrže antibiotike: penicilin 100 IJ/mL i streptomycin 100 µg/mL (ICN Galenika). Sve ćelijske linije održavaju se u sudovima za kulturu (Costar, 25 cm²) na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlage i 5% CO₂ (Heraeus).

U eksperimentima su korišćene ćelije u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja.

Ćelije koje rastu u jednom sloju (PC-3, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Hs 294T i MRC-5), neophodno je da se presađuju po postizanju konfluencije od 80% do 90%. Dobijanje jednoćelijske suspenzije je vršeno dodavanjem 0,5% rastvora tripsina, nakon čega su ćelije inkubirane 5 minuta na 37 °C. Enzimska reakcija je zaustavljena dodavanjem odgovarajućeg medijuma, pri čemu komponente seruma vrše inaktivaciju tripsina. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana 10 minuta na 1 500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost.

Ćelije koje rastu u suspenziji (K562, HL-60, Jurkat i Raji), presađuju se po postizanju konfluencije od 80% do 90%. Ćelijska suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 1 500 o/min, a ćelijski talog resuspendovan u svežem medijumu. Nakon toga su određivani broj ćelija i njihova vijabilnost DET testom.

4.2.2. Određivanje broja ćelija i vijabilnosti

U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim⁸⁵. Tripan plavo je boja koja ulazi u ćeliju ukoliko joj je narušen integritet ćelijske membrane. Pri tome se mrtve ćelije boje u plavo, pa ih je na ovaj način moguće razlikovati od živih ćelija.

Ćelijska suspenzija (50 µL) je razblažena sa 200 µL 0.5 % rastvora tripan plavog i ćelije su odmah brojane u hemocitometru na invertnom mikroskopu.

Broj ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli, uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje: $N = N_0 \times 10^4 \times 5$

N = ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije; N_0 = broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra; 5 = faktor razblaženja; 10^4 = korekcionni faktor (dubina komore i zapremina u mL).

Vijabilnost ćelija je izračunata prema sledećoj formuli:

$$V(\%) = (N_0/N_0+M_0) \times 100$$

gde je M_0 = broj mrtvih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra.

Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

4.2.3. Kolorimetrijski MTT test

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, istaložene centrifugiranjem (10 min / 200 x g) i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u kvadrilikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora, tako da je u 90 μ l medijuma bilo 10^4 (K562, HL-60, Jurkat i Raji) ili 5×10^3 (PC-3, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Hs 294T i MRC-5) ćelija. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂ naredna 24 časa. Po isteku inkubacije u sve otvore osim kontrolnih (ćelije u medijumu), dodato je po 10 μ L ispitivane supstance odgovarajuće koncentracije i inkubacija je nastavljena pod istim uslovima u toku 24, 48 ili 72 h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 μ l /otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂). Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 μ l 0.04 mol/l HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na test talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj talasnoj dužini od 690 nm. Otvori na ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba ("blank").

Citotoksičnost je izražena procentom prema formuli:

$CI = (1-A_s/A_k) \times 100$, pri čemu je A_k apsorbancija kontrolnih uzoraka, a A_s apsorbancija uzoraka sa ispitivanom supstancijom.

Kontrola kvaliteta pri izvođenju testa:

Vijabilnost posadenih ćelija je bila veća od 90%, određena testom sa tripan plavim (DET); ćelije su korišćene u logaritamskoj fazi rasta i u koncentraciji koja je obezbeđivala logaritamski rast ćelija tokom trajanja testa (za adherentne ćelije je bilo 5×10^3 /otvoru, a za K562 10^4 /otvoru); Koeficijent varijacije (CV) u eksperimentalnim i kontrolnim kulturama bio je manji od 15%, a za većinu naših eksperimenata je bio manji od 10%.

Apsorbancija (A) kontrole (ćelije u medijumu) bila je najmanje tri puta veća od srednje vrednosti A za slepu probu (medijum).

4.2.4. Analiza podataka

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni pomoću programa Statistica for Windows Release 5. 0. Srednja vrednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije izračunati su za replikate (najmanje triplikati) uzoraka u svakom eksperimentu. Svaki eksperiment je urađen tri puta. Koeficijent varijacije (CV) u eksperimentalnim i kontrolnim kulturama bio je manji od 10%. Citotoksičnost je izražena procentom. Koncentracija kojom se postiže 50% inhibicije rasta odnosno citotoksičnosti (IC₅₀), određena je “Median effect” analizom pomoću programa Calcu Syn.

4.2.5. Annexin-V-FLUOS

Za ranu fazu apoptoze karakteristične su promene na ćelijskoj površini, tj. promene na nivou membrane. Jedna od membranskih promena je translokacija fosfatidil-serina (PS) sa unutrašnje na spoljašnju površinu plazma membrane. Annexin V je 35-36 KD Ca²⁺ zavisan fosfolipid vezujući protein sa visokim afinitetom vezivanja za PS. Na ovoj osobini Annexina V je zasnovan test senzitivnosti za izlaganje PS na spoljašnju stranu ćelijske membrane i detekciju apoptotskih ćelija u ćelijskoj populaciji, ali ne i u tkivima. S obzirom da se i kod nekrotičnih ćelija PS izlazi na spoljašnju stranu membrane, istovremeno bojenje ćelija Annexinom V konjugovanim sa fluorescein isotiocijanatom (FITC) i propidijum-jodidom omogućava razlikovanje apoptotskih od nekrotičnih ćelija.

Princip testa: Analiza PS na spoljašnjoj površini membrane apoptotičnih ćelija je rađena korišćenjem FITC Annexin-V kita za detekciju apoptoze (BD Pharmingen™, BD Biosciences).

Potrebni reagensi:

1. Inkubacioni pufer (Annexin V vezujući): 10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4; 140 mM NaCl; 2.5 mM CaCl₂
2. Propidijum-jodid. Koristimo 5 µl po testu. FITC Annexin-V. Koristimo 5 µl po testu.

Procedura bojenja:

1. Ćelije (1 x 10⁶) isprati dva puta sa 1 ml PBS i centrifugirati na 200 x g; 5'.
2. Preneti 100 µl resuspendovanih ćelija (1 x 10⁵) u epruvetu od 5 ml.
3. Dodati 5 µl Annexin V FITC i 5 µl PI
4. Pažljivo vorteksovati ćelije i inkubirati 15' na sobnoj temperature u mraku

5. Dodati 0.4 ml vezujućeg rastvora (1) i analizirati na protočnom citometru koristeći 488 nm ekscitaciju i 515 nm bandpass filter za detekciju fluoresceina, i filter >560 nm za detekciju PI.

4.2.5.1. Protočna citometrijska analiza distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa Priprema alkoholom fiksiranih ćelija iz suspenzije za DNA analizu

Reagensi

1. Etanol, apsolutni;
2. Ribonukleaza, 200 units/ml (RNase):10 mg (RNase), Sigma; 5 ml PBS;
3. Propidijum jodid (PI): 10 mg PI, Sigma; 0,1 ml Triton X-100, Sigma; 3,7 mg EDTA, Sigma; 90 ml PBS.

Procedura:

1. Prebaciti 1ml suspenzije ćelija (1×10^6) u BD epruvete od 5 ml;
2. Na suspenziju ćelija dodati 2 ml hladnog metanola kap po kap, inkubirati 30' na ledu;
3. Centrifugirati na $300 \times g$, 5'. Aspirirati supernatant;
4. Na ćelijsku suspenziju dodati 500 μ l rastvora za bojenje, resuspendovati, a potom dodati 500 μ l rastvora RNase (finalna koncentracija 100 units/ml) i vorteksovati. Inkubirati u mraku, na sobnoj temperaturi 30'.
5. Pre analize na protočnom citometru profiltrirati kroz 35 μ m mrežicu.

Laserska ekscitacija za PI je od 488-514 nm, dok PI emituje fluorescenciju na talasnoj dužini oko 610 nm.

Materijal i aparati:

1. Ploče 6 well (NUNC);
2. Protočni citometar (Fluorescence Activated Sorting Cells FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA);
3. Vorteks mešalica;
4. CO₂ inkubator.

Supstance i rastvori:

1. Hranljivi medijum za ćelijske kulture;
2. Trypsin;
3. Fosfatni pufer-1 x PBS (9.1 mM Na₂HPO₄; 1.7 mM NaH₂PO₄; 150 mM NaCl, pH=7.4);
4. 70% CH₃CH₂OH;
5. RNase A (100 units/mL);

6. Propidijum-jodid (PI; 500 µg/mL).

Kvantitativno merenje distribucije ćelija po fazama ćelijskog ciklusa je određivano FACS Calibur protočnim citometrom, analizom DNK sadržaja etanolom fiksiranih K562 ćelija, koje su nakon fiksiranja bojene PI.

Sve testirane ćelijske linije u eksponencijalnoj fazi rasta, pri gustini od 2×10^5 ćelija/otvoru neprekidno su izložene dejstvu ispitivanih jedinjenja, pri koncentracijama koje odgovaraju vrednostima za IC_{50} . Nakon 24 h i 72 h neprekidnog tretmana, ćelije su tripsinizirane, isprane dva puta hladnim fosfatnim puferom (PBS) i fiksirane 30 minuta sa 70% etanolom. Fiksirane ćelije su isprane sa PBS, inkubirane sa RNase A (1 mg/mL) u toku 30 minuta na 37°C. Neposredno pre protočno-citometrijske analize ćelije su bojene sa propidijum-jodidom (400 µg/mL). Ćelijski ciklus je analiziran korišćenjem *Fluorescence activated sorting cells (FACS) Calibur* protočnog citometra i *Cell Quest* kompjuterskog softvera.

4.2.5.2. Test za određivanje procenta apoptotskih ćelija

Materijal i aparati:

1. Ploče 6 well (dimenzija 60 x 15mm, NUNC);
2. Protočni citometar (Fluorescence Activated Sorting Cells-FACS Calibur, Becton-Dickinson, San Diego, CA, USA);
3. BD epruvete zapremine 5mL;
4. Vorteks mešalica.

Supstance i rastvori:

1. Hranljivi medijum za ćelijske kulture;
2. Tripsin;
3. Fosfatni pufer-1xPBS (9.1 mM Na_2HPO_4 ; 1.7 mM NaH_2PO_4 ; 150 mM NaCl, pH=7.4);
4. Annexin V-FITC kit za detekciju apoptoze (BD Biosciences, Pharmingen San Diego, CA, USA).
5. Pufer za vezivanje-PV (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$).

Procenat apoptotskih K562 ćelija tretiranih ispitivanim supstancama je određivan korišćenjem Annexin V-FITC kita za detekciju apoptoze.

Jedan puta 10^6 ćelija/mL je tretirano sa ispitivanim supstancama pri koncentraciji koja odgovara IC_{50} vrednosti, tokom 24 h i 72 h. Nakon označenog vremena, ćelije su isprane dva puta sa hladnim PBS-om i resuspendovane u 1000 µL PV (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$). 100 µL ćelijske suspenzije (1×10^5 ćelija) je prebačeno u BD epruvete i

dodato je 5 μ L Annexin V–FITC i 5 μ L propidijum-jodida. Čelije su blago promućkane i inkubirane sa datim fluorescentnim bojama 15 minuta na 25 °C, u mraku. Nakon toga, 400 μ L pufera za vezivanje je dodato u svaku epruvetu i analizirano na BD FACS Calibur protočnom citometru primenom Cell Quest kompjuterskog programa.

Procenat specifične apoptoze je određivan prema formuli:

$$\% \text{ specifične apoptoze} = 100 \times [\text{eksperimentalna apoptoza (\%)} - \text{spontana apoptoza (\%)}] / [100\% - \text{spontana apoptoza (\%)}]$$

Procenat specifične nekroze je određivan prema formuli:

$$\% \text{ specifične nekroze} = 100 \times [\text{eksperimentalna nekroza (\%)} - \text{spontana nekroza (\%)}] / [100\% - \text{spontana nekroza (\%)}]$$

4.2.6. Western blot

Western blot je analitička tehnika koja se koristi za detekciju specifičnih proteina u datom uzorku homogenata ili ekstrakta tkiva. Koristi gel elektroforezu za razdvajanje nativnih (prema 3-D strukturi) ili denaturisanih (prema dužini polipeptidnog lanca) proteina. Proteini se zatim prenose na membranu (obično je u pitanju nitroceluloza ili PVDF) gde se detektuju korišćenjem specifičnih antitela.¹⁷⁶

4.2.6.1. Pripremanje ćelijskog lizata za Western blot analizu

Materijal i aparati:

1. Ploče 6 well (NUNC);
2. Centrifuga.

Supstance i rastvori:

1. Hranljivi medijum za ćelijske kulture;
2. Destilovana voda.

Proteinski uzorci ćelija (K562) su pripremljeni za Western blot analizu pri čemu su ćelije bile tretirane ispitivanim supstancama (IC_{50} koncentracija) tokom 24 h i 72 h. Nakon isteka inkubacije, ćelije centrifugirati, resuspendovati u destilovanoj vodi, prebrojati i ostaviti 2 h na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja na 1300 o/min, 10 minuta, određena je koncentracija proteina metodom po Bradfordu.

4.2.6.2. Određivanje koncentracije proteina u ćelijskom lizatu mikro Bradford metodom

Materijal i aparati:

1. ELISA čitač;
2. ELISA mikrotitar ploče.

Supstance i rastvori:

Bradfordov reagens (BR) (25 mg Coomassie – Blue G-250, 12.5 mL 95% etanola, 25 mL 85% H₃PO₄, dopuniti destilovanom vodom do 25 mL, profiltrirati)

Bovine Serum Albumin (BSA), 0.2 mg/mL, rastvoren u destilovanoj vodi – radni rastvor koji se može zamrznuti u alikvotima za bržu upotrebu.

Goveđi serum albumin (BSA) se rastvori u destilovanoj vodi tako da koncentracija štoka bude 1 mg/ml. Napravi se serija razblaženja (0.4, 1, 1.4, 2, 2.4 i 3 µg/otvoru u 50 µL), vodeći računa da finalna zapremina bude 250 µL.

Priprema standarda:

Iz radnog rastvora (0.2 mg/mL) uzimati po:

2 µL (0.4 µg) + 48 µL dH₂O + 200 µL BR, 5 µL (1 µg) + 45 µL dH₂O + 200 µL BR, 7 µL (1.4 µg) + 43 µL dH₂O + 20 µL BR, 10 µL (2 µg) + 40 µL dH₂O + 200 µL BR, 15 µL (3 µg) + 35 µL dH₂O + 200 µL BR. Paziti da ukupna zapremina po otvoru bude 250 µL.

Natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Materijal i aparati:

1. Aparatura za elektroforezu

Supstance i rastvori:

2. Akrilamid/bis-akrilamis (štok) (30%T; 2.67%C);
3. 1.875 M TRIS-HCl "separate", pH = 8.8;
4. 1.25 M TRIS-HCl "stacking", pH = 6.8;
5. Amonijum- persulfat-APS (10%). APS se priprema neposredno pre upotrebe.
6. Natrijum-dodecil sulfat-SDS (10%);
7. Akrilamidni "separate" gel (10% akrilamid/bis-akrilamid; 0.375 M TRIS-HCl, pH = 8,8; 0.1% SDS; 0.675% TEMED) dopuni se do 10 ml vode i doda se 5 µl 10 % APS.
8. Akrilamidni "stacking" gel, 4,5% (4,5% akrilamid/bis- akrilamid; 0.125 M TRIS-HCl, pH=6,8; 0.1% SDS; 0.1% TEMED) dopuni se sa 10 ml vode i doda se 100 µl 10% APS.

9. "Running" pufer-RP (štok), 10 puta koncentrovan (TRIS-HCl; Glicin; SDS);
10. Pufer za uzorak-PU, 2 puta koncentrovan (pomešati 1.0 mL 1,25 M TRIS, pH=6,8; 3.0 mL 10% SDS; 0.5 mL β -mercaptoethanol; 1-2 mg brom-fenilplavo; 1.0 mL glicerol).

Priprema gelova

Sastavi se aparatura za elektroforezu i naprave se gelovi.

Priprema uzorka

Uzorak i PU se pomešaju u odnosu 1:1 i zagrevaju na 100°C u toku 5 minuta. Nakon dodavanja uzorka u bunarčiče startuje se sa elektroforezom na 100 V, 1 sat.

Western blot analiza

Materijal i aparati:

1. Aparatura za elektroforezu;
2. Aparatura za elektrotransfer.

Supstance i rastvori:

1. Transferni pufer (25 mM Tris; 0.2 M glicin; 20% CH₃OH), pH=8.5;
2. Pufer za blokiranje-BP (PBS; 5% bezmasno mleko; 0.1% Tween-20);
3. 10 x TBS, pH=7.6 (TRIS; NaCl);
4. Pufer za ispiranje-IP, TBS/T (1xPBS; 0.1% Tween-20);
5. Ponceau S (0.1 % Ponceau S; 1% CH₃COOH);
6. Obezbojivač Ponceau S (1% CH₃COOH);
7. Kit za hemiluminescenciju (Pearce, Thermo scientific);
8. Hyperfilm ECL.

Nakon elektroforeze sledi transfer na 100 V, 1h ili preko noći na +4 °C. Posle završenog elektrotransfera membrana se boji sa Poncesau S 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se proverila uspešnost transfera. Nitrocelulozna membrana se potom obezbojava u O. Zatim se blokiraju nespecifična mesta na membrani inkubiranjem membrane u BP u toku 1 h na ST, ili preko noći na 4°C, ili 30 minuta na 37°C. Po završenom blokiranju membrana se ispere 1-2 puta u IP 5 minuta na sobnoj temperaturi uz stalno mućkanje, posle čega se inkubira sa primarnim antitelima (0.1-1 μ g/ml) u BP u toku 1 h na ST, uz mućkanje. Potom se membrana ispere 3-5 puta u IP. Zatim sledi inkubacija membrane sa sekundarnim antitelima rastvorenim u BP (1:1000 – 0.2-1 μ g/ml, ili 1:2000) na sobnoj temperaturi u toku 1 h uz neprestano mućkanje. Potom se membrana ispere 3-5 puta u IP. Korišćenjem kita za hemiluminescenciju detektuju se vezana antitela.

Osnovni podaci o ćelijskim linijama

67. (<http://www.atcc.org>; b) <http://www.camr.org.uk/ecacc.htm>)

K562 (ATCC CCL 243), ćelijska linija uspostavljena je iz pleuralnog izliva bolesnice sa hroničnom mijeloidnom leukemijom u terminalnoj blastnoj krizi. Populacija se sastoji od visoko nediferentovanih ćelija granulocitne loze. Ćelije imaju morfološke osobine limfoblasta, a kariotip je $2n = 46$. Novije studije su pokazale da su K562 blasti multipotentne, hematopoetske maligne ćelije koje spontano diferenciraju u prepoznatljive progenitore eritrocitne, granulocitne i monocitne serije. Diferencijacija u pravcu granulocitne serije može se indukovati i pomoću DMSO. Koriste se kao osetljive ciljne ćelije u testu NK citotoksičnosti. Rastu kao suspenzija pojedinačnih ćelija.

HL-60 (ATCC CCL 240), ćelijska linija uspostavljena iz periferne krvi bolesnice sa akutnom promielocitnom leukemijom. Ćelije imaju morfološke osobine mijeloblasta i pokazuju fagocitnu aktivnost. Rastu kao suspenzija pojedinačnih ćelija.

JURKAT (ATCC CRL 1435), ćelijska linija uspostavljena je iz periferne krvi 14-godišnjeg dečaka sa leukemijom T ćelija. Ćelije imaju morfološke osobine limfoblasta. Ovo su pseudodiploidne ćelije, a kariotip ove linije je $2n = 46$. Rastu kao suspenzija pojedinačnih ćelija.

RAJI (ATCC CCL 86), ćelijska linija uspostavljena iz leve maksile 11-godišnjeg dečaka obolelog od Burkitt-ovog limfoma. Ćelije imaju morfološke osobine limfoblasta, a kariotip je $2n = 46$. Rastu kao suspenzija pojedinačnih ćelija.

PC 3 (ATCC CRL 1435), ćelijska linija dobijena iz kosti, 62 godišnjeg pacijenta sa metastatskim adenokarcinomom prostate. Morfološki imaju osobine epitelijalnih ćelija. Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

HT 29 (ATCC HTB38), ćelijska linija humanog adenokarcinoma kolona, uspostavljena iz primarnog tumora. Ćelije morfološki liče na epitelne ćelije. Kariotip ove linije je $2n = 46$. Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

MCF 7 (ATCC HTB22), ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke. MCF7 je uspostavljena iz pleuralnog izliva i ispoljava neke karakteristike diferenciranog epitela dojke, uključujući i sintezu estradiola. Ćelije eksprimiraju estrogene i progesteronske receptore. MCF-7 ćelije imaju “wild” tip p53 i eksprimiraju P-glikoprotein (Pgp) (35). Morfološki liče na epitelne

ćelije. Kariotip ove linije je $2n = 46$, a kultura je heteroploidna (hipertriploidna do hipotetraploidna). Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

MDA-MB-231 (ATCC HTB26), ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke, uspostavljena je iz pleuralnog izliva. Morfološki liče na epitelne ćelije. Kariotip ove linije je $2n = 46$. Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

HeLa (ATCC CCL2), ćelijska linija karcinoma grlića materice. Morfološki liče na epitelne ćelije. Kariotip ove linije je $2n = 46$. Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

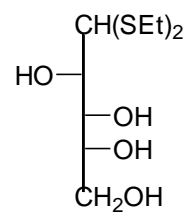
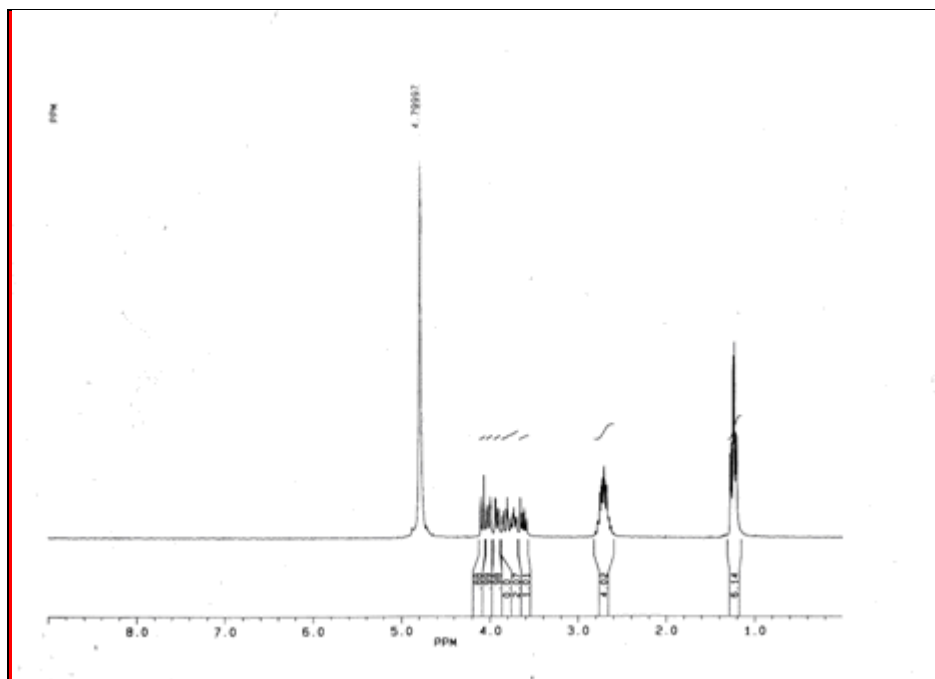
Hs 294T (ATCC HTB140), ćelijska linija melanoma. Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

MRC 5 (ATCC CCL 171), zdrava ćelijska linija fibroblasti pluća. MRC-5 je normalna diploidna ćelijska linija sa 46, XY kariotipom. Rastu zalepljene za podlogu kao jednoredni sloj ćelija (“*monolayer*”).

5. PRILOG

NMR-Spektri novosintetizovanih jedinjenja

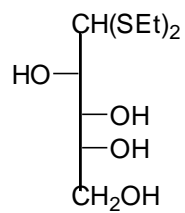
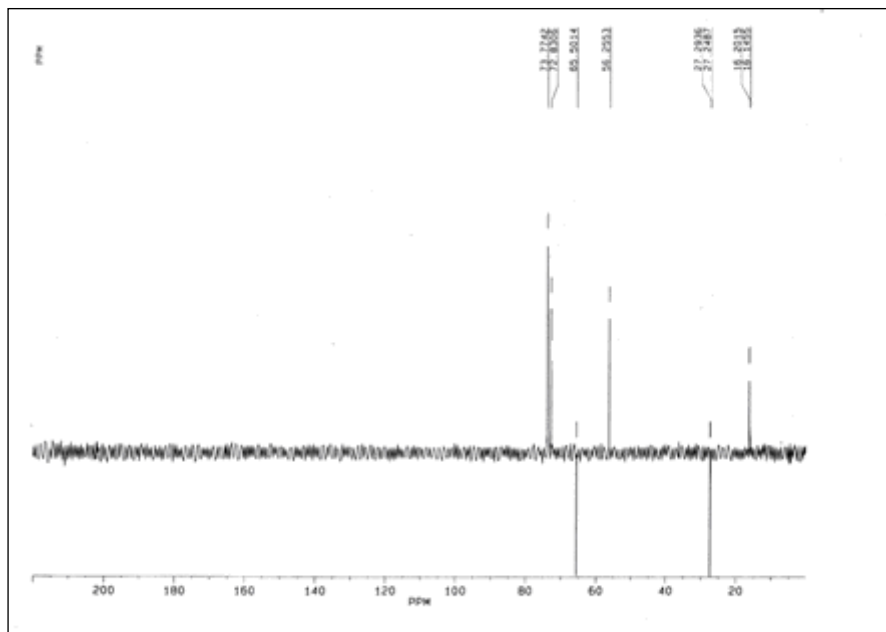
¹H NMR-Spektar 250 MHz jedinjenja 2 (D₂O)



Asignacija [δ , ppm]:

- 3.63 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 11.3$ Hz, $J_{4,5a} = 6.3$ Hz, H-5a)
- 3.74 (ddd, 1H, $J_{4,5a} = 6.3$ Hz, $J_{4,5b} = 2.9$ Hz, $J_{3,4} = 8.5$ Hz, H-4)
- 3.84 (dd, 1H, $J_{4,5b} = 2.7$ Hz, $J_{5a,5b} = 11.3$, H-5b)
- 3.93 (dd, 1H, $J_{2,3} = 1.8$ Hz, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H-2)
- 4.02 (dd, 1H, $J_{2,3} = 1.8$ Hz, $J_{3,4} = 8.3$ Hz, H-3)
- 4.09 (d, 1H, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, H-1)

62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 2 (D_2O)



Asignacija [δ , ppm]:

16.14 i 16.20 (2CH_3 iz SCH_2CH_3)

27.25 i 27.29 ($2\text{SCH}_2\text{CH}_3$)

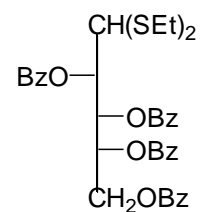
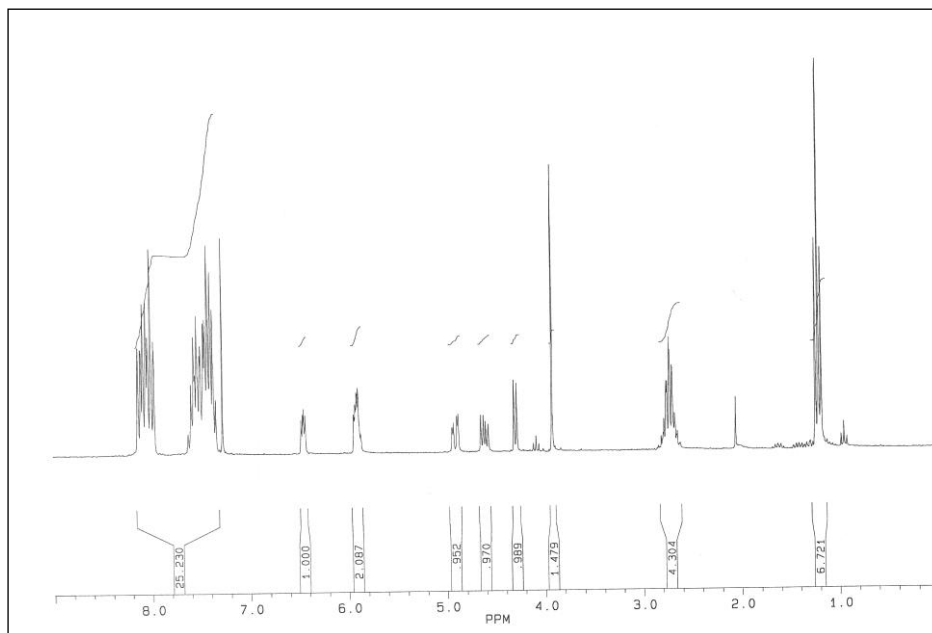
56.25 (C-1)

65.50 (C-5)

72.83 (C-3)

73.77 (C-4 i C-2)

¹H NMR-Spektar 250 MHz jedinjenja 3 (CDCl₃)



Asignacija [δ , ppm]:

4.30 (d, 1H, $J_{2,3} = 7.0$ Hz, H-1)

4.61 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.2$ Hz, $J_{4,5a} = 6.6$ Hz, H-5a)

4.88(dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.2$ Hz, $J_{4,5b} = 3.3$ Hz, H-5b)

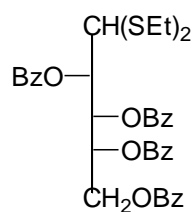
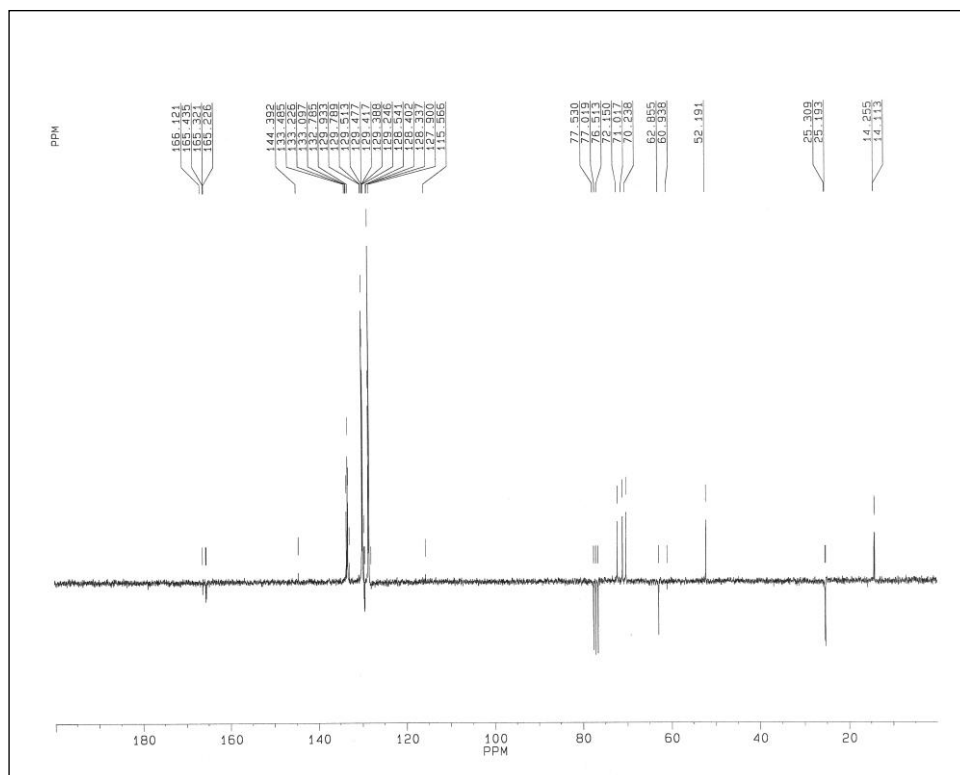
5.92 (m, 2H, H-2 i H-4)

6.45 (dd, 1H, $J_{4,5a} = 5.1$ Hz, $J_{4,5b} = 3.1$ Hz, $J_{3,4} = 8.0$ Hz, H-3)

6.27 (dd, 1H, $J = 3.7$ Hz, $J = 6.0$ Hz, H-3)

7.38-8.18 (m, 20H, Ar-H)

62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 3 (CDCl_3)



Asignacija [δ , ppm]:

14.00 i 14.15 (2CH_3 iz SCH_2CH_3)

25.07 i 25.18 ($2\text{SCH}_2\text{CH}_3$)

52.07 (C-1)

62.74 (C-5)

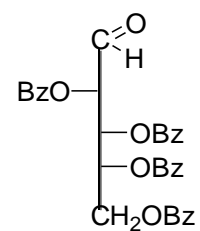
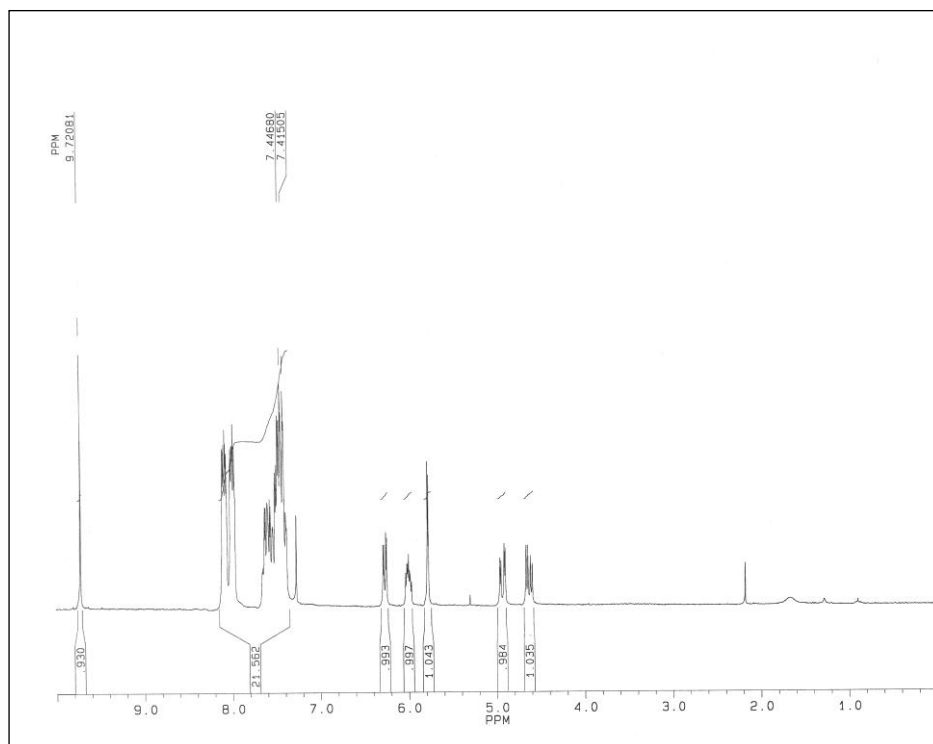
70.11 i 72.03 (C-4 i C-2)

70.91 (C-3)

128.23, 128.30, 128.43, 129.11, 129.25, 129.29, 129.33, 129.41, 129.64, 129.80, 132.78, 133.00, 133.14, 133.39 (Ar-C)

165.11, 165.20, 165.32 i 165.99 ($4\text{C}=\text{O}$ iz 4Bz)

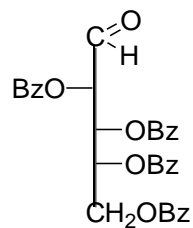
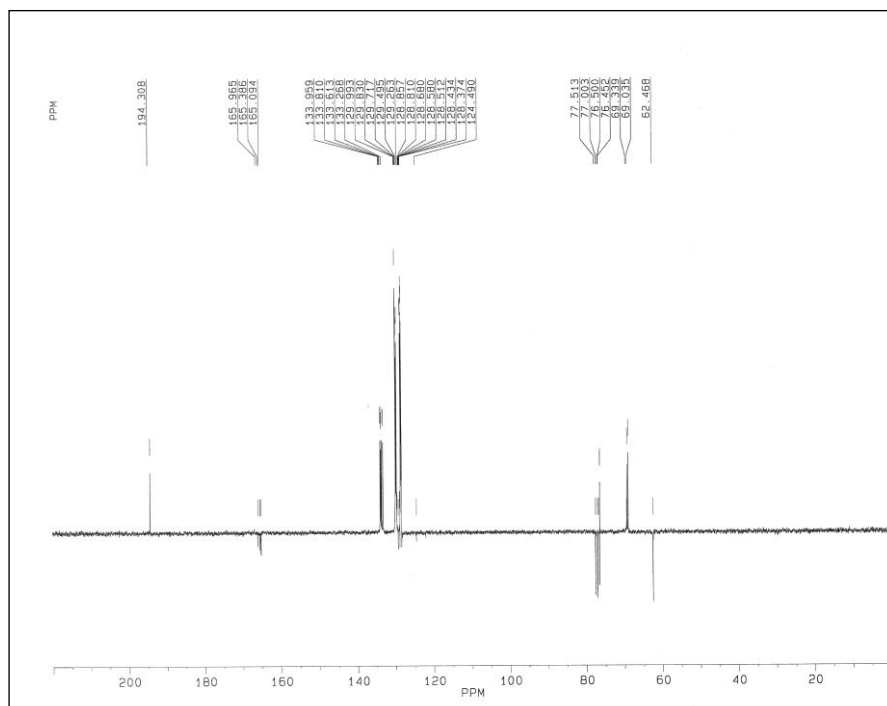
¹H NMR-Spektar 250 MHz jedinjenja 4 (CDCl₃)



Asignacija [δ , ppm]:

- 4.63 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.4$ Hz, $J_{4,5a} = 5.1$ Hz, H-5a)
- 4.93(dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.4$ Hz, $J_{4,5b} = 3.1$ Hz, H-5b)
- 5.78 (d, 1H, $J_{2,3} = 2.4$ Hz, H-2)
- 6.00 (ddd, 1H, $J_{4,5a} = 5.1$ Hz, $J_{4,5b} = 3.1$ Hz, $J_{3,4} = 8.0$ Hz, H-4)
- 6.27 (dd, 1H, $J_{2,3} = 2.4$ Hz, $J_{3,4} = 7.9$ Hz, H-3)
- 7.33-8.15 (m, 20H, Ar-H)
- 9.72 (s, 1H, CHO)

62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 4 (CDCl_3)



Asignacija [δ , ppm]:

62.47 (C-5)

69.03 (C-3)

69.34 (C-4)

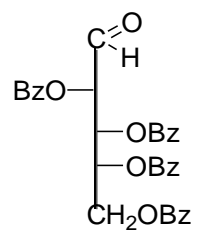
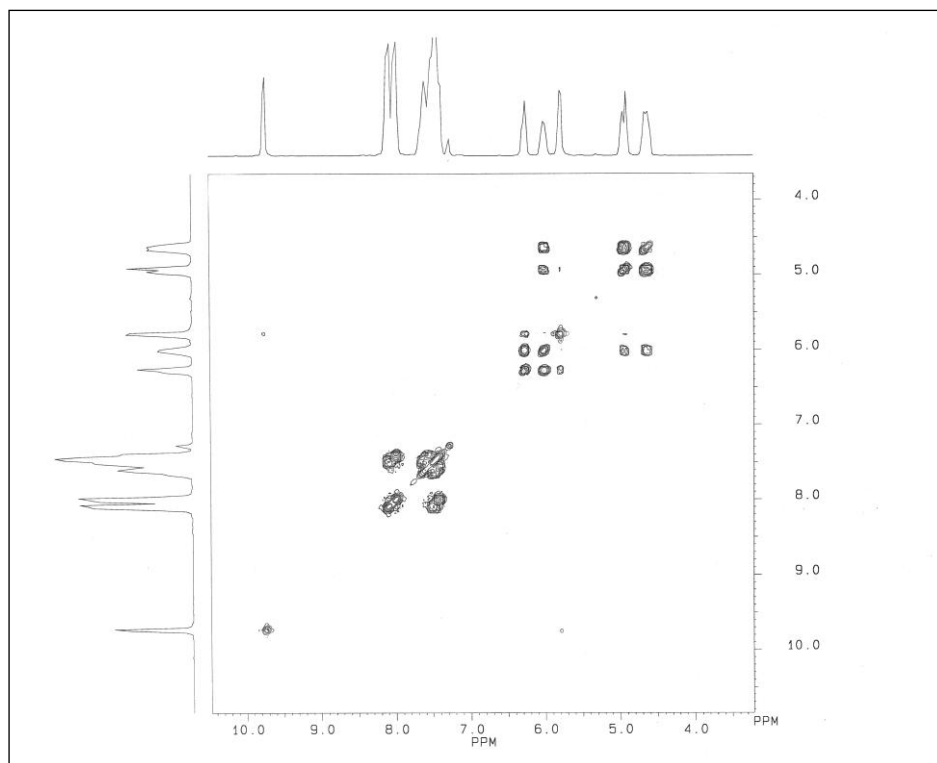
76.45 (C-2)

124.49, 128.37, 128.43, 128.51, 128.58, 128.68, 128.81, 128.85, 129.26, 129.49, 129.71, 129.83, 129.99, 133.26, 133.61, 133.81, 133.96 (Ar-C)

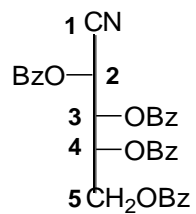
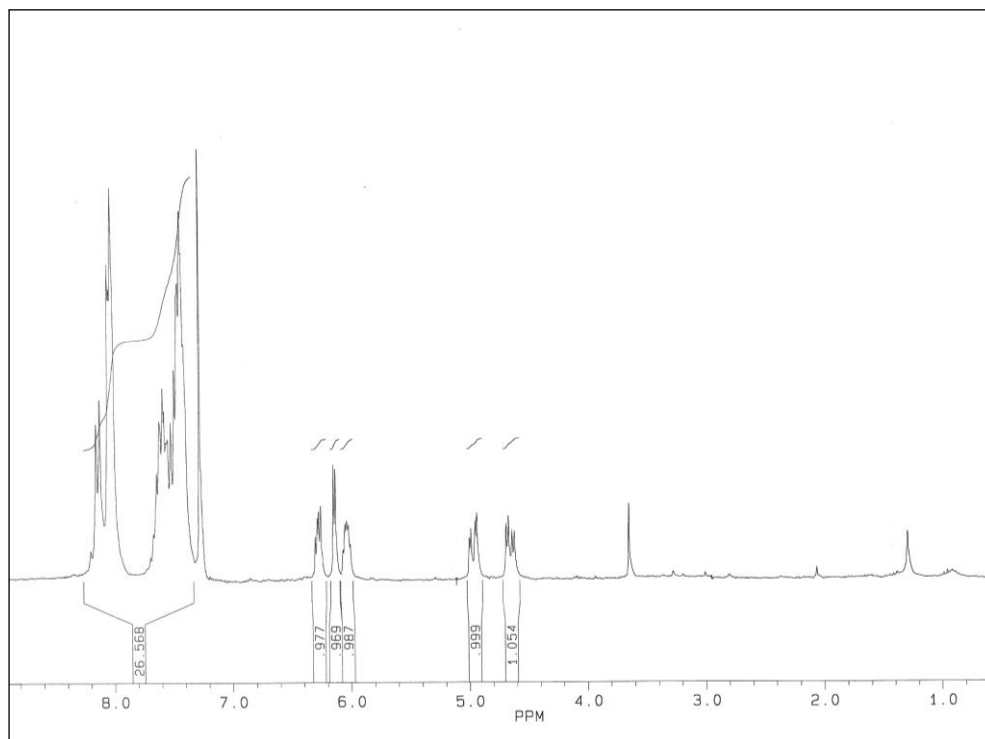
165.09, 165.39 i 165.96 (4 $\text{C}=\text{O}$ iz 4Bz)

194.31 ($\text{C}=\text{O}$)

2D COSY ^1H NMR-Spektar jedinjenja 4 (CDCl_3)



¹H NMR-Spektar 250 MHz jedinjenja 6 (CDCl₃)



Asignacija [δ , ppm]:

4.65 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.3$ Hz, $J_{4,5a} = 5.0$ Hz, H-5a)

4.97 (dd, 1H, $J_{5a,5b} = 12.5$ Hz, $J_{4,5b} = 3.5$ Hz, H-5b)

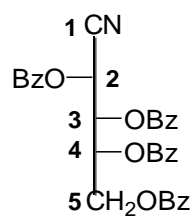
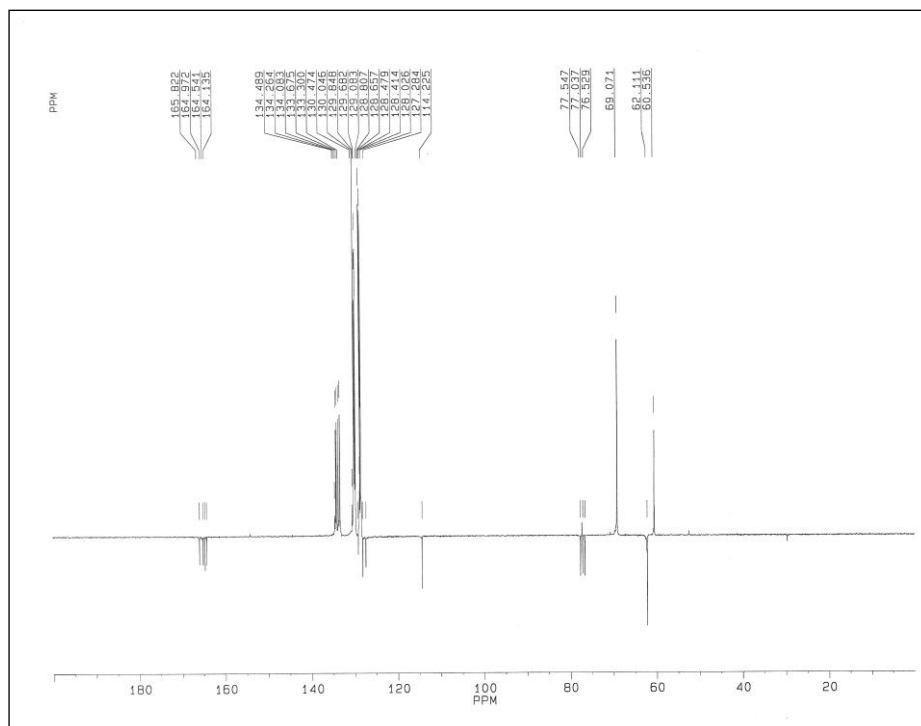
6.03 (m, 1H, H-4)

6.14 (d, 1H, $J_{2,3} = 4.2$ Hz, H-2)

6.28 (dd, 1H, $J_{2,3} = 4.3$ Hz, $J_{3,4} = 7.2$ Hz, H-3)

7.40-8.20 (m, 20H, Ar-H)

62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 6 (CDCl_3)



Asignacija [δ , ppm]:

60.53 (C-2)

62.11 (C-5)

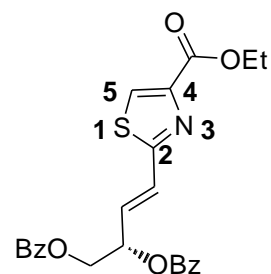
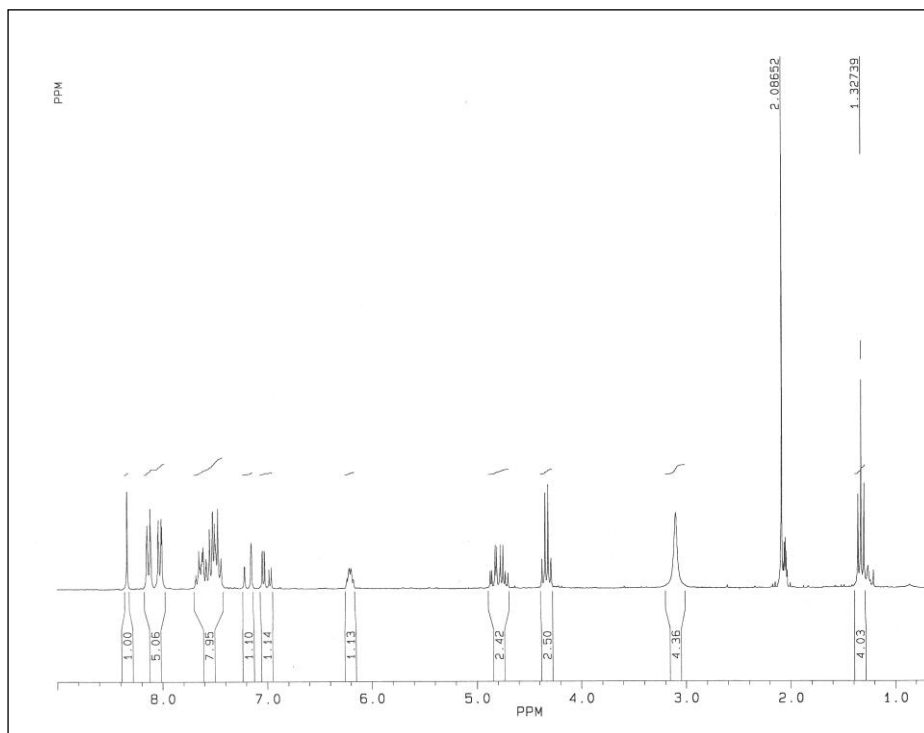
69.07 (C-3 i C-4)

114.22 ($\text{C}\equiv\text{N}$)

127.28, 128.02, 128.41, 128.48, 128.66, 128.81, 129.68, 129.84, 130.05, 133.30, 133.67, 133.08, 133.26 (Ar-C)

164.13, 164.54, 164.96 i 165.82 ($4\text{C}=\text{O}$ iz 4Bz)

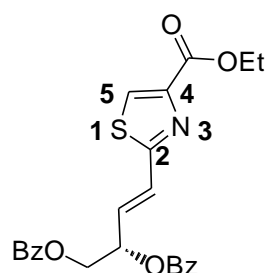
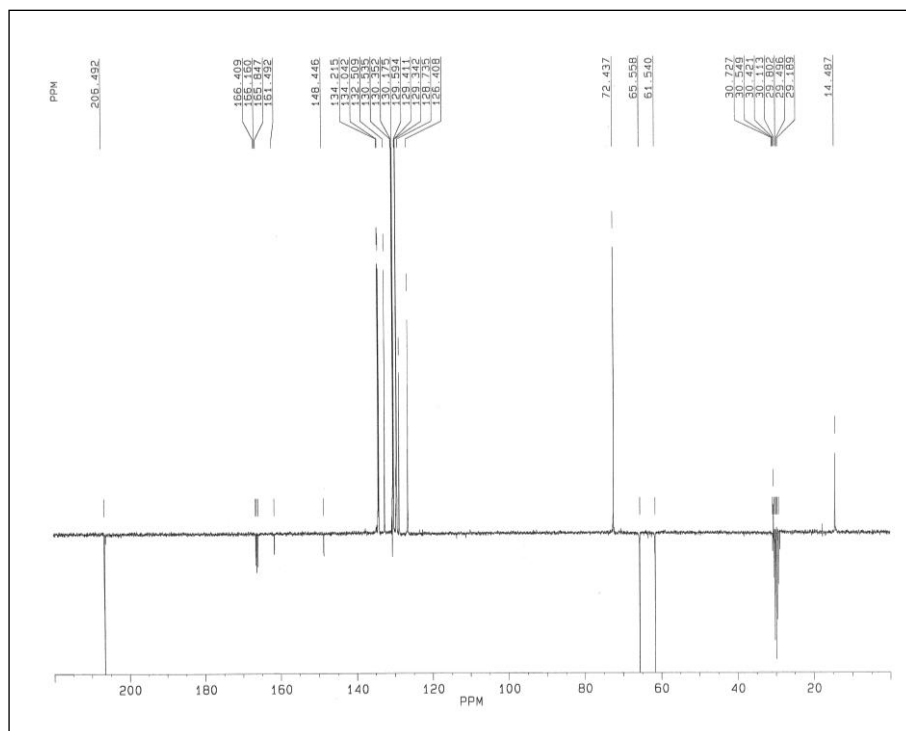
¹H NMR-Spektar 250 MHz jedinjenja 8 (CD₃COCD₃)



Asignacija [δ , ppm]:

- 1.33 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2\text{CH}_3} = 7.2$ Hz, CH_3 iz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- 4.33 (q, 2H, CH_2 iz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- 3.73 (dd, 1H, $J_{3',4'a} = 6.6$ Hz, $J_{4'a,4'b} = 12.0$ Hz, H-4'a)
- 3.68 (dd, 1H, $J_{3',4'b} = 3.7$ Hz, $J_{4'a,4'b} = 12.0$ Hz, H-4'b)
- 6.20 (m, 1H, H-3')
- 6.99 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 6.4$ Hz, $J_{1',2'} = 16.0$ Hz, H-2')
- 7.17 (d, 1H, $J_{1',2'} = 16.2$ Hz, H-1')
- 7.40-8.16 (m, 10H, Ar-H)
- 8.33 (s, 1H, H-5)

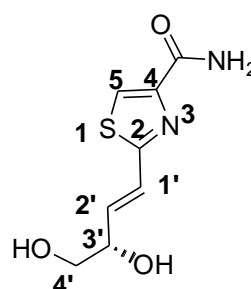
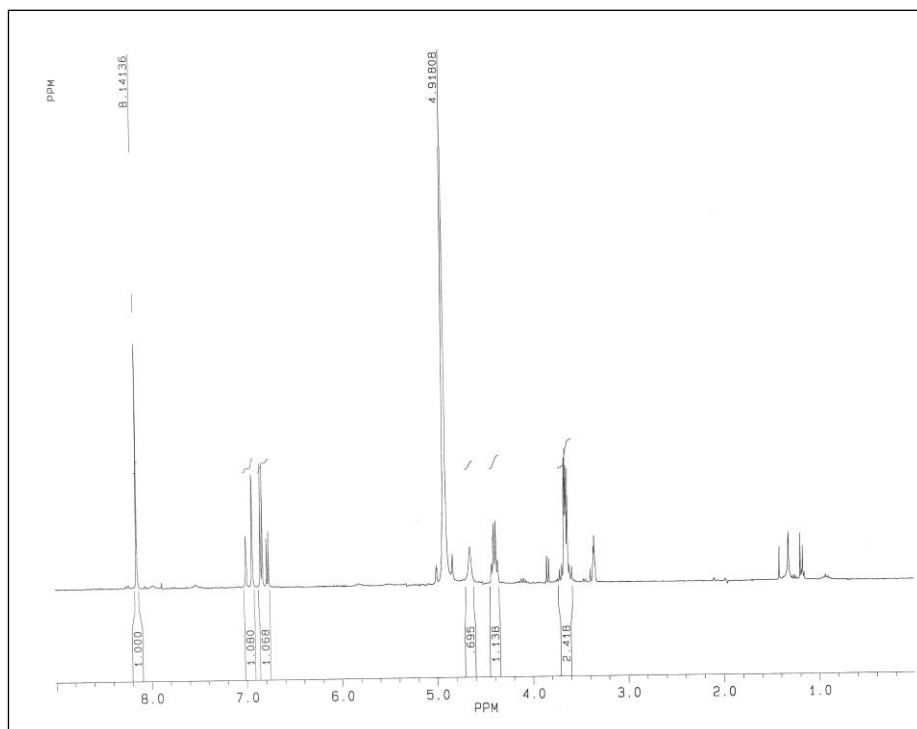
62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 8 (CD_3COCD_3)



Asignacija [δ , ppm]:

- 14.22 (CH_3 iz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- 61.48 (CH_2CH_3)
- 64.67 (C-4')
- 71.05 (C-3')
- 125.96 (C-1')
- 127.04 (C-5)
- 128.34, 128.41, 129.21, 129.32, 129.57, 129.70, 129.80, 131.47, 133.16 i 133.38 (Ar-C)
- 131.47 (C-2')
- 147.64 (C-4)
- 161.03 (C-2)
- 165.22, 165.67 i 165.98 ($3\text{C}=\text{O}$ iz 2Bz i $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

250 MHz ^1H NMR-Spektar jedinjenja 9 (CD_3OD)



Asignacija [δ , ppm]:

3.62 (dd, 1H, $J_{3',4'a} = 6.3$ Hz, $J_{4'a,4'b} = 11.2$ Hz, H-4'a)

3.68 (dd, 1H, $J_{3',4'b} = 5.2$ Hz, $J_{4'a,4'b} = 11.2$ Hz, H-4'b)

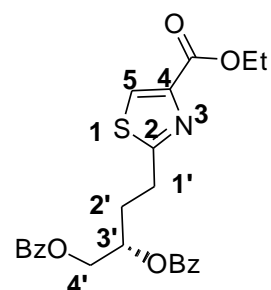
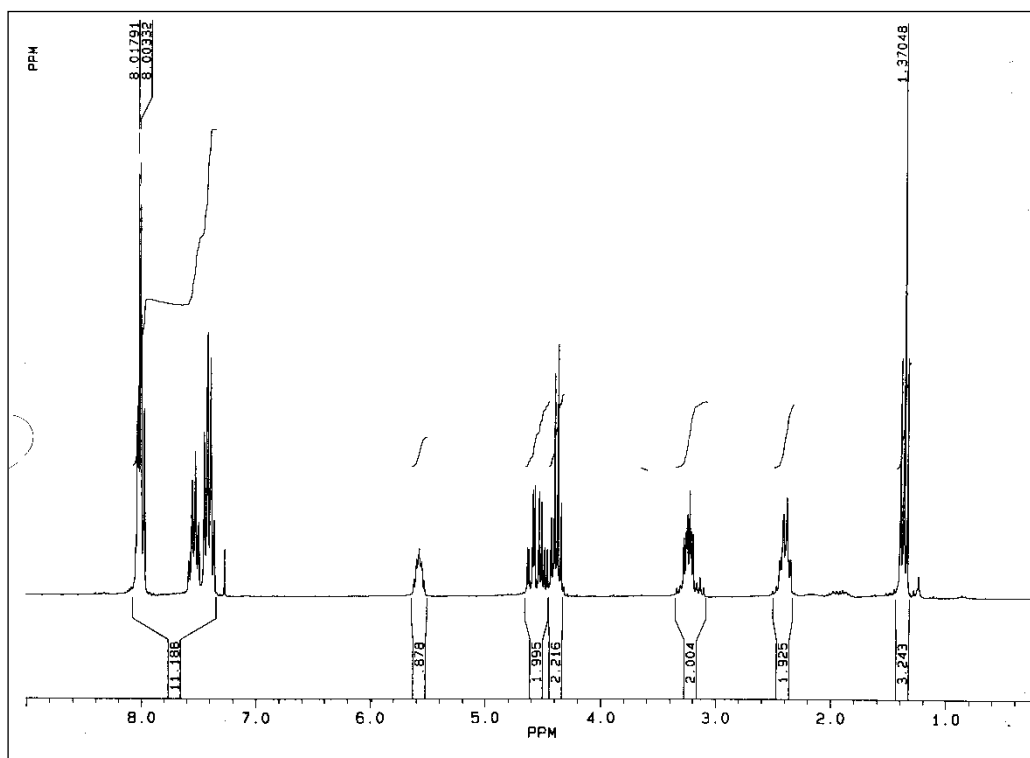
4.39 (m, 1H, H-3')

6.80 (dd, 1H, $J_{2',3'} = 4.9$ Hz, $J_{1',2'} = 16.2$ Hz, H-2')

6.96 (d, 1H, $J_{1',2'} = 16.2$ Hz, H-1')

8.14 (s, 1H, H-5)

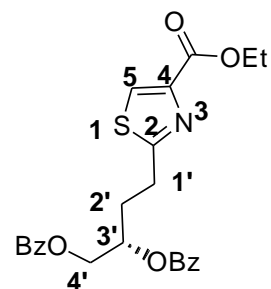
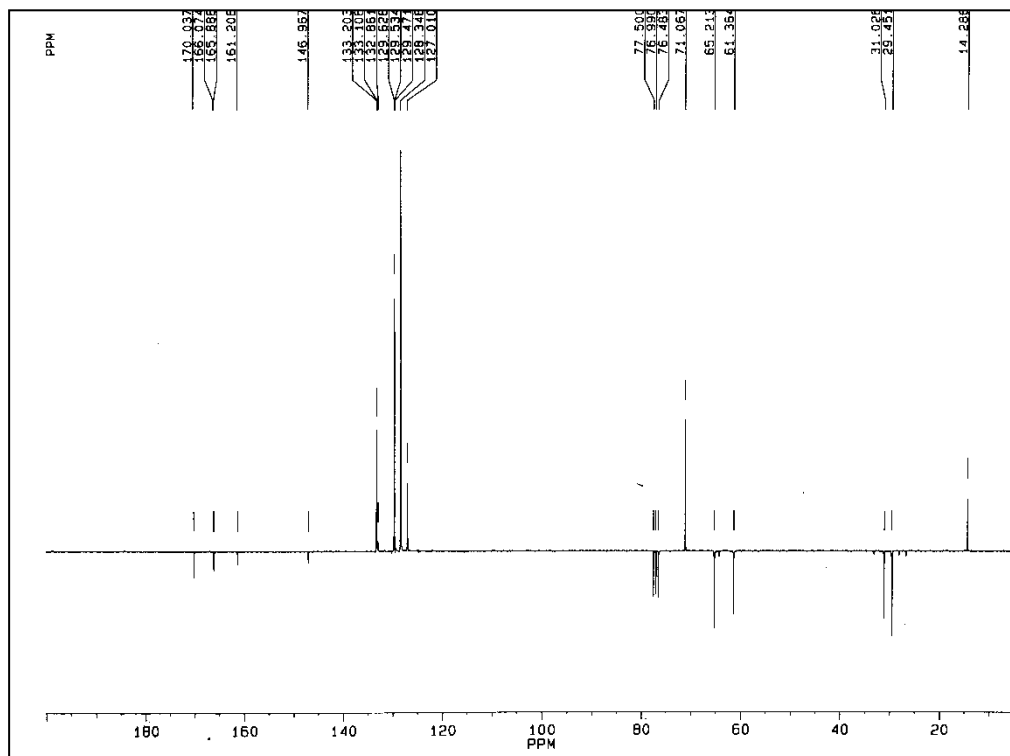
250 MHz ^1H NMR-Spektar jedinjenja 10 (CDCl_3)



Asignacija [δ , ppm]:

- 1.38 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 7.2$ Hz, CH_2CH_3)
- 2.41 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}2'$)
- 3.25 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-}1'$)
- 4.40 (q, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 7.2$ Hz, CH_2CH_3)
- 4.51 (dd, 1H, $J_{3',4'a} = 6.0$ Hz, $J_{4'a,4'b} = 12.0$ Hz, H-4'a)
- 4.61 (dd, 1H, $J_{3',4'b} = 3.7$ Hz, $J_{4'a,4'b} = 12.0$ Hz, H-4'b)
- 5.589 (m, 1H, H-3')
- 7.35-8.08 (m, 10H, Ar-H)
- 8.03 (s, 1H, H-5)

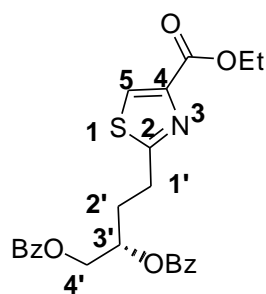
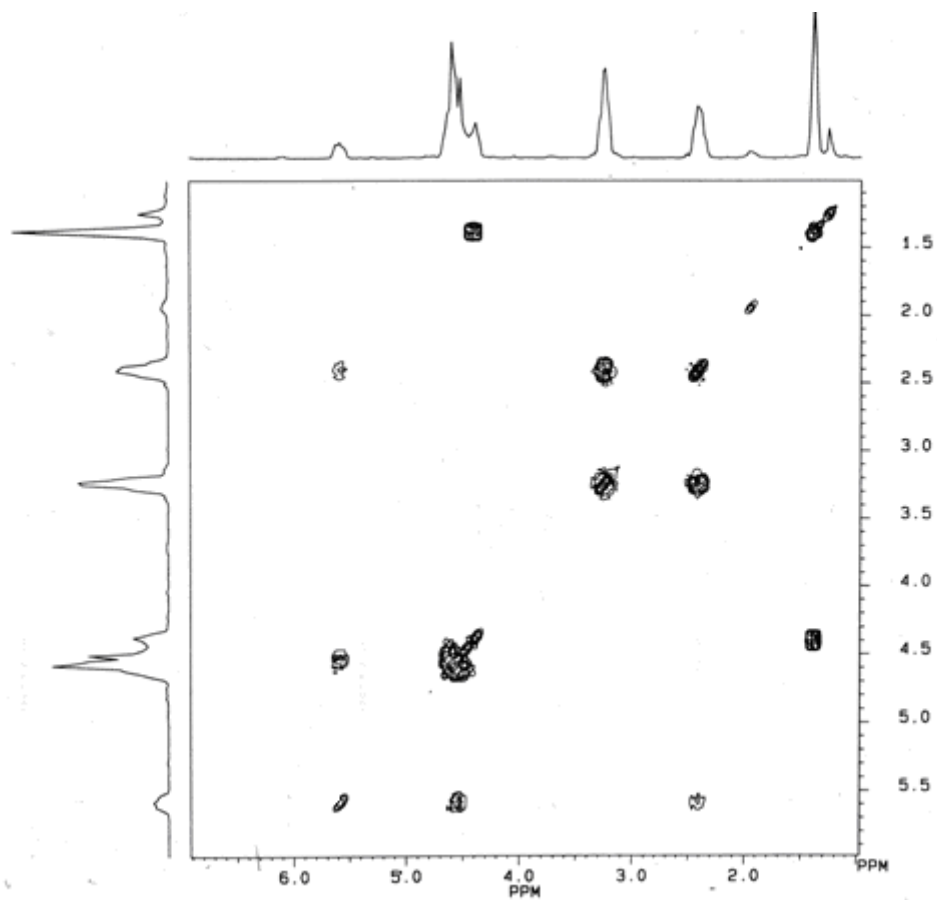
62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 10 (CDCl_3)



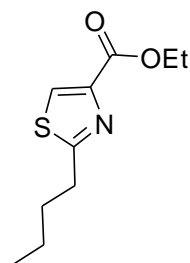
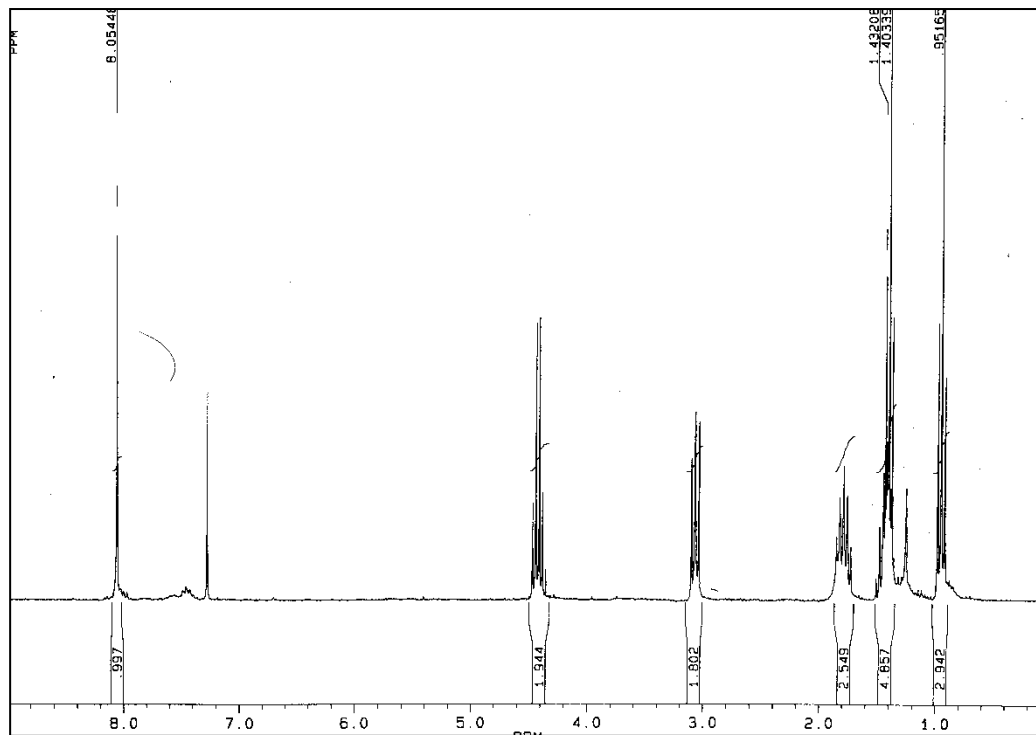
Asignacija [δ , ppm]:

- 14.29 (CH_3 iz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- 29.45 (C-1')
- 31.03 (C-2')
- 61.36 (CH_2CH_3)
- 65.21 (C-4')
- 71.07 (C-3')
- 127.01 (C-5)
- 128.35, 129.47, 129.53, 129.63, 133.11, i 133.20 (Ar-C)
- 146.97 (C-4)
- 161.21 (C-2)
- 165.89, 166.07 i 170.04 ($3\text{C}=\text{O}$ iz 2Bz i $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

2D COSY ^1H NMR-Spektar jedinjenja 10 (oblast skeletnih protona; CDCl_3)



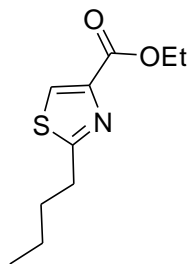
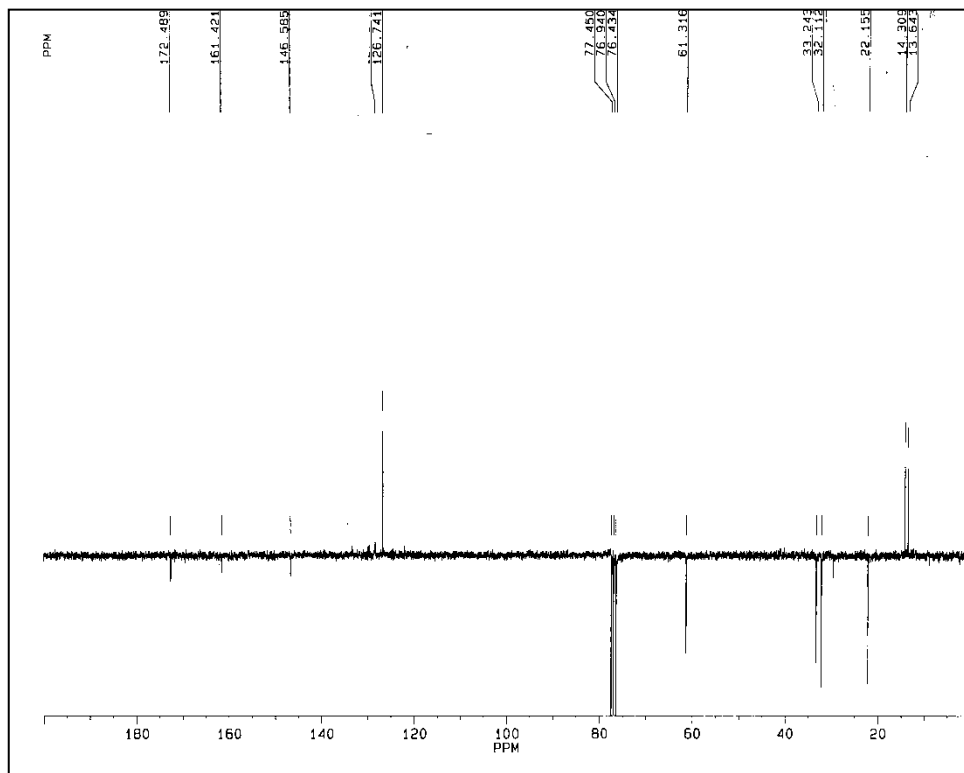
250 MHz ^1H NMR-Spektar jedinjenja 11 (CDCl_3)



Asignacija [δ , ppm]:

- 0.95 (t, 3H, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$)
- 1.34-1.53 (m, 2H, CH_2 iz Bu)
- 1.40 (t, 3H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 7.2$ Hz, CH_2CH_3)
- 1.79 (m, 2H, CH_2 iz Bu)
- 3.07 (t, 2H, $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$)
- 4.43 (q, 2H, $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3} = 7.2$ Hz, CH_2CH_3)
- 8.05 (s, 1H, H-5)

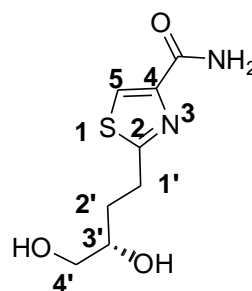
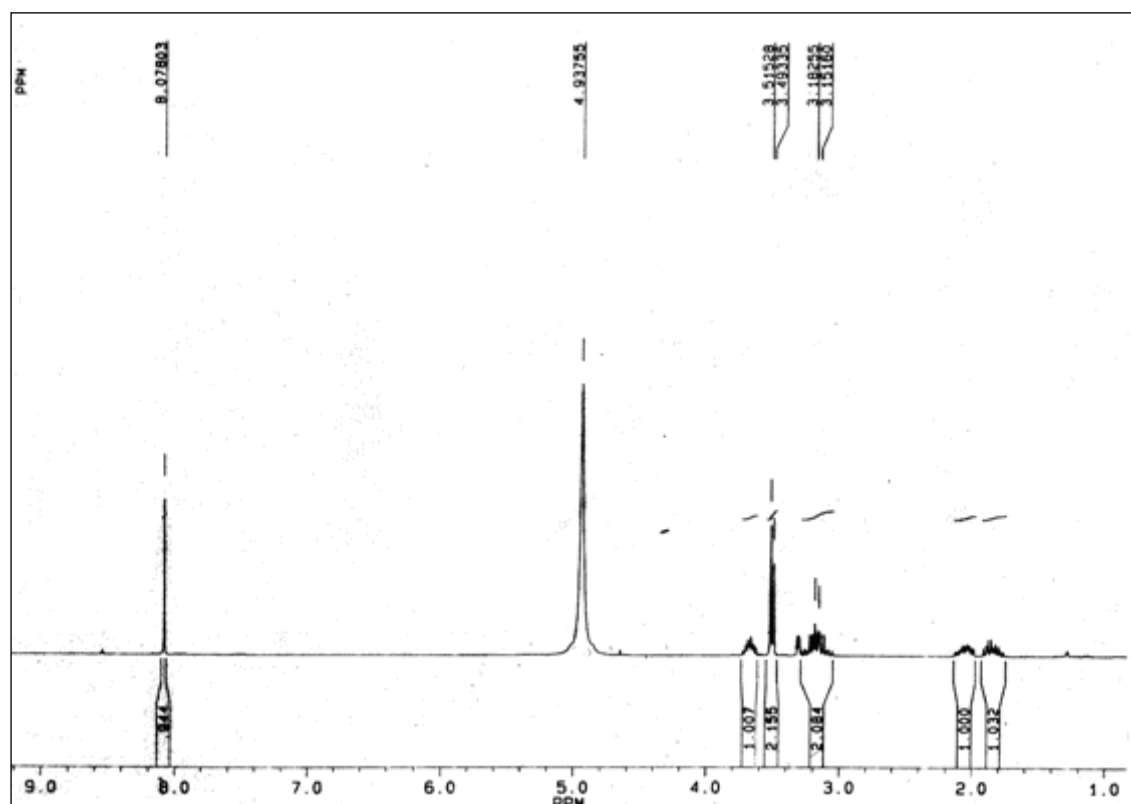
62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 11 (CDCl_3)



Asignacija [δ , ppm]:

- 13.64 [$(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$]
- 14.31 (CH_3 iz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- 22.15, 32.11, 33.24 (3CH_2 iz Bu)
- 61.32 (CH_2CH_3)
- 126.74 (C-5)
- 146.58 (C-4)
- 161.42 (C-2)
- 172.49 ($\text{C}=\text{O}$ iz $\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

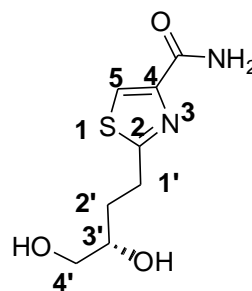
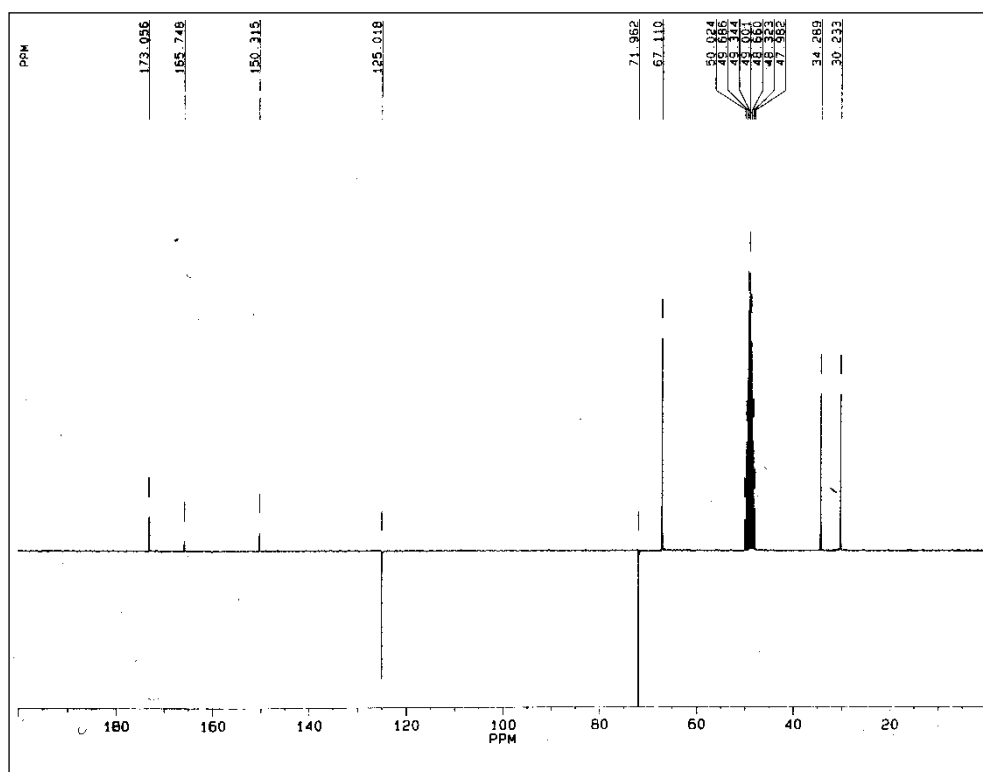
250 MHz ^1H NMR-Spektar jedinjenja 12 (CD_3OD)



Asignacija [δ , ppm]:

- 1.86 i 2.03 (2m, 2H, 2H-2')
- 3.17 (m, 2H, 2H-1')
- 3.50 (d, 2H, $J_{3',4'} = 5.5$ Hz, 2H-4')
- 3.68 (m, 1H, $J_{3',4'} = 5.5$ Hz, H-3')
- 8.07 (s, 1H, H-5)

62.9 MHz ^{13}C NMR-Spektar jedinjenja 12 (CD_3OD)



Asignacija [δ , ppm]:

30.26 i 34.32 (C-2' i C-1')

67.14 (C-4')

72.07 (C-3')

125.00 (C-5)

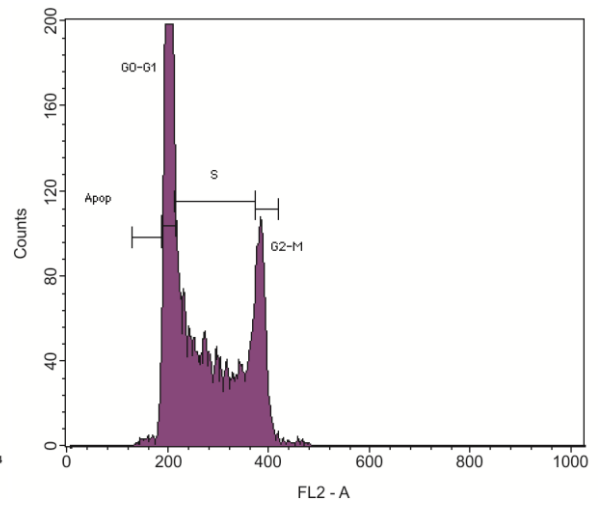
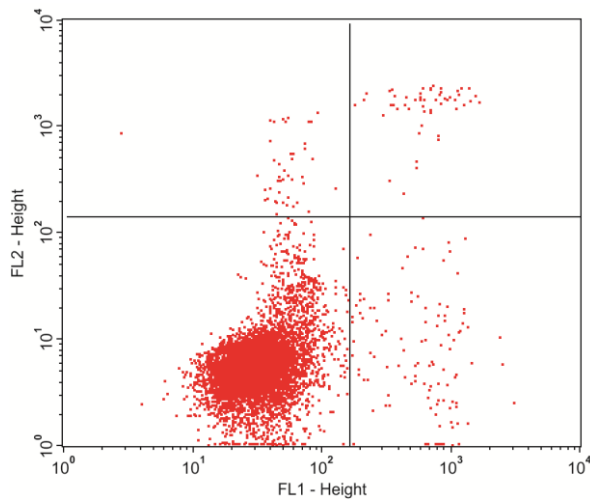
150.36 (C-4)

165.74 (C-2)

173.10 ($\text{C}=\text{O}$ iz CONH_2)

Rezultati ispitivanja na floucitometru

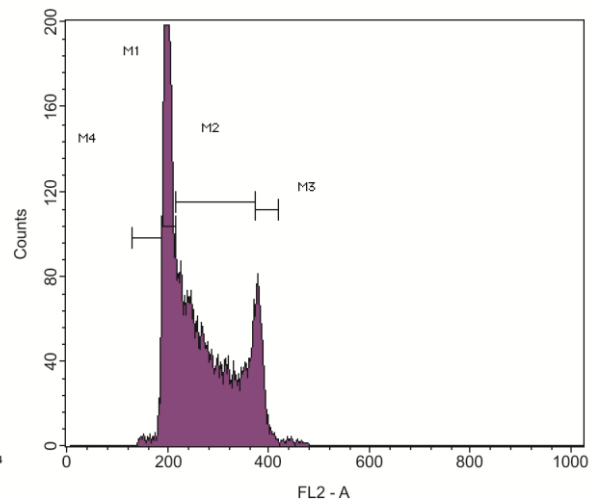
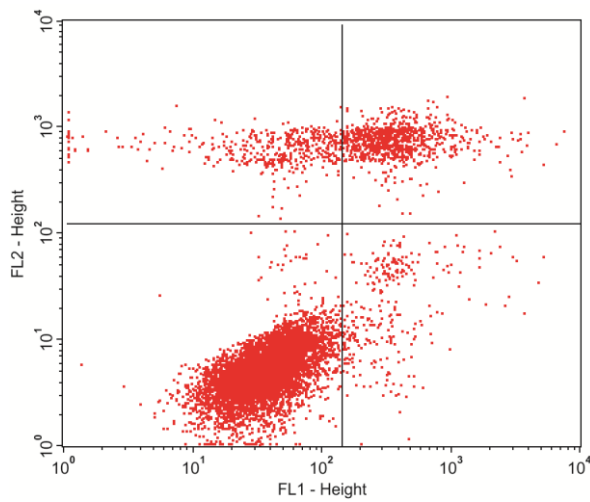
K - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 1.50 | Nekroza |
| UR | 4.58 | Kasna apoptoza |
| LL | 85.85 | Žive ćelije |
| LR | 8.09 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 36.28 | G0/G1 |
| M2 | 48.38 | S |
| M3 | 14.29 | G2/M |
| M4 | 1.05 | sub G1 |

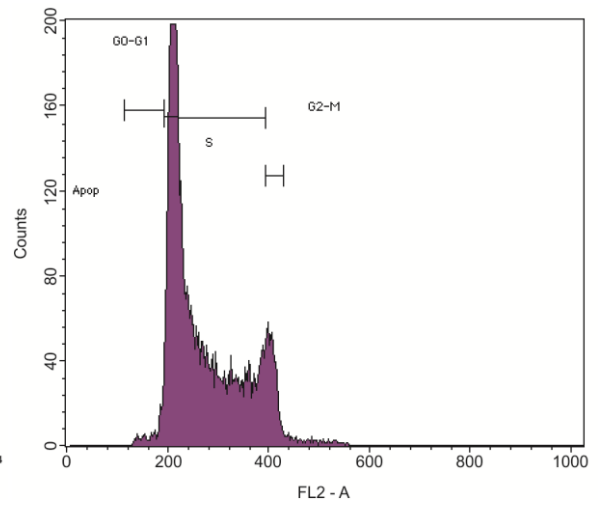
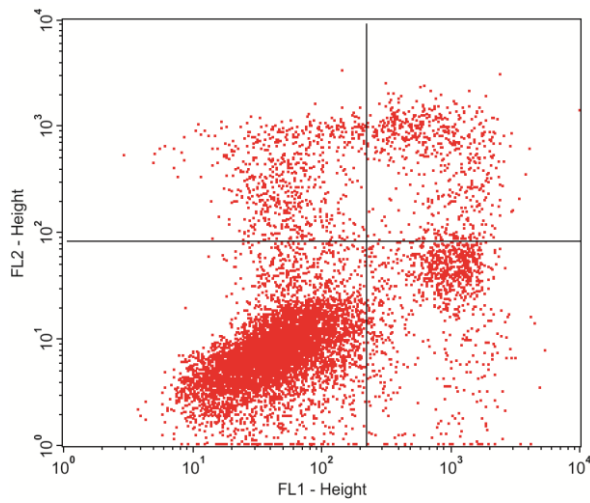
TI - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL* | 5.27 | Nekroza |
| UR | 11.58 | Kasna apoptoza |
| LL | 79.36 | Žive ćelije |
| LR | 3.79 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 37.08 | G0/G1 |
| M2 | 53.16 | S |
| M3 | 7.55 | G2/M |
| M4 | 2.22 | sub G1 |

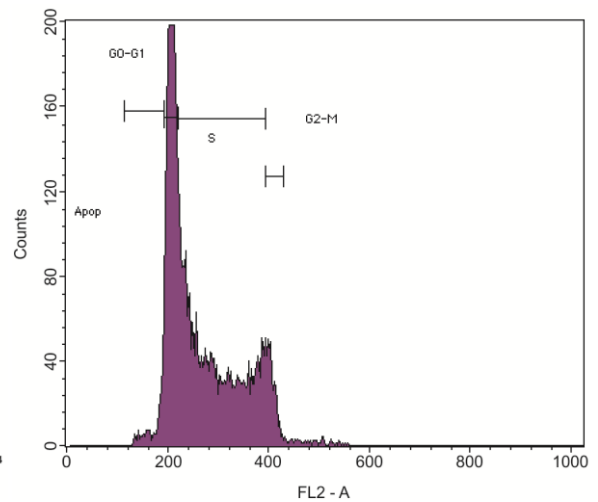
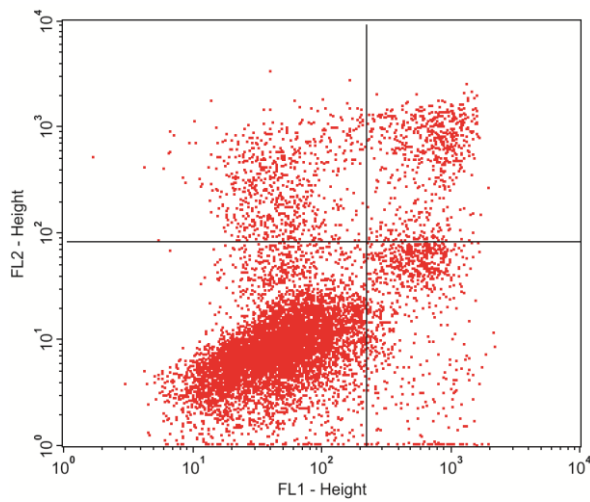
9 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.21 | Nekroza |
| UR | 7.12 | Kasna apoptoza |
| LL | 74.79 | Žive ćelije |
| LR | 10.90 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 39.01 | G0/G1 |
| M2 | 50.60 | S |
| M3 | 7.74 | G2/M |
| M4 | 2.67 | sub G1 |

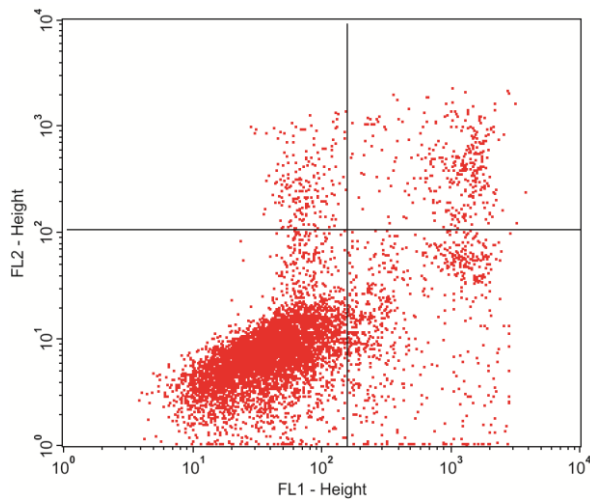
12 - 24h



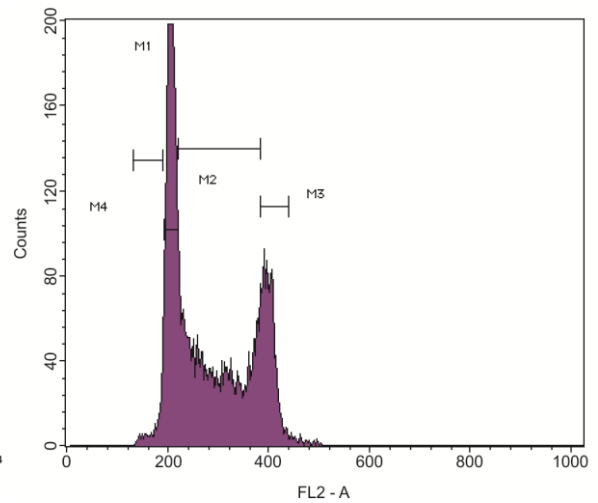
| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.93 | Nekroza |
| UR | 7.16 | Kasna apoptoza |
| LL | 77.16 | Žive ćelije |
| LR | 7.74 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 39.06 | G0/G1 |
| M2 | 51.13 | S |
| M3 | 7.11 | G2/M |
| M4 | 2.70 | sub G1 |

13 - 24h

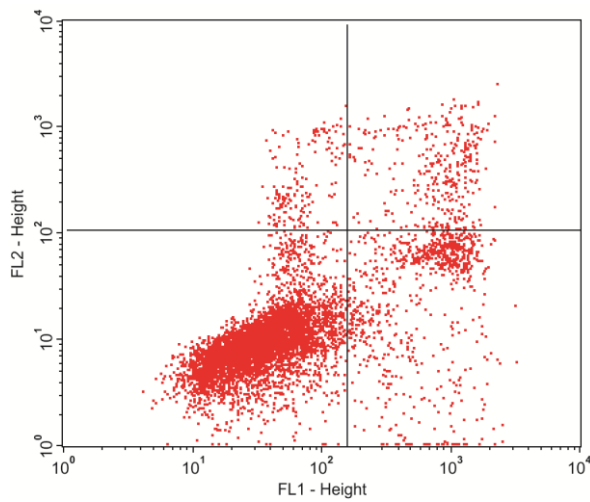


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 2.74 | Nekroza |
| UR | 4.79 | Kasna apoptoza |
| LL | 81.62 | Žive ćelije |
| LR | 10.86 | Rana apoptoza |

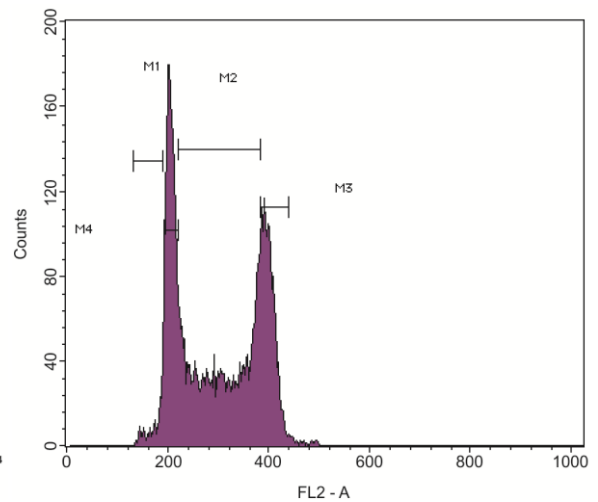


| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 33.18 | G0/G1 |
| M2 | 47.01 | S |
| M3 | 17.70 | G2/M |
| M4 | 2.11 | sub G1 |

14 - 24h

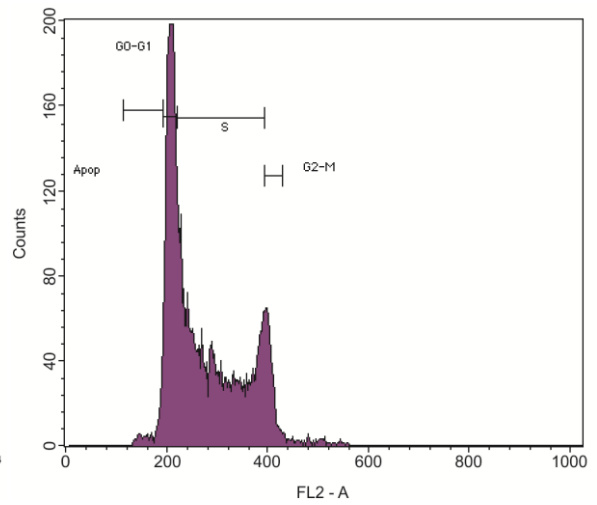
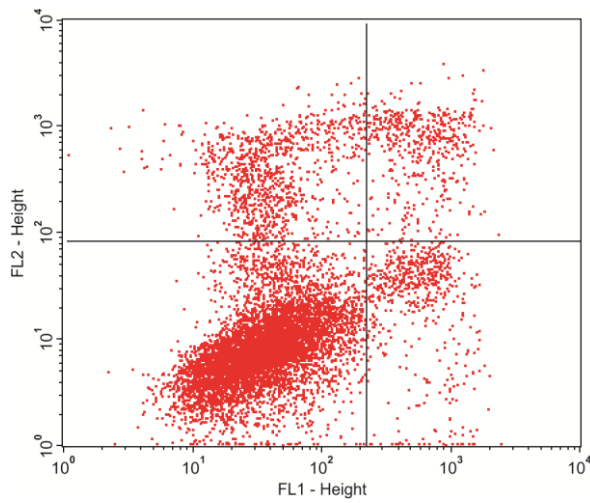


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 2.77 | Nekroza |
| UR | 5.22 | Kasna apoptoza |
| LL | 79.85 | Žive ćelije |
| LR | 12.17 | Rana apoptoza |



| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 29.86 | G0/G1 |
| M2 | 47.71 | S |
| M3 | 20.11 | G2/M |
| M4 | 2.33 | sub G1 |

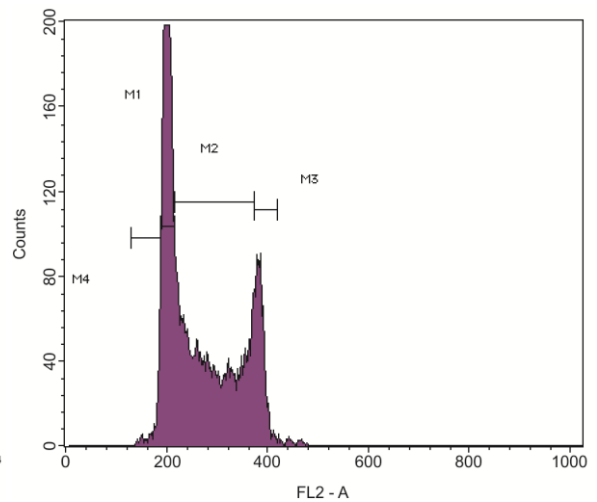
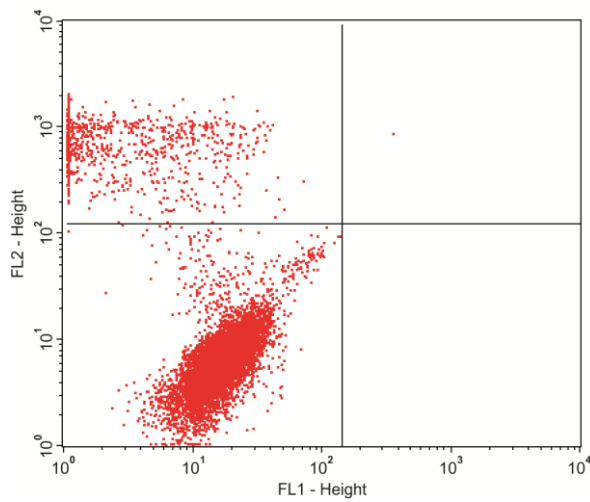
15 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 11.09 | Nekroza |
| UR | 5.35 | Kasna apoptoza |
| LL | 76.64 | Žive ćelije |
| LR | 6.93 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 36.28 | G0/G1 |
| M2 | 52.02 | S |
| M3 | 9.11 | G2/M |
| M4 | 2.59 | sub G1 |

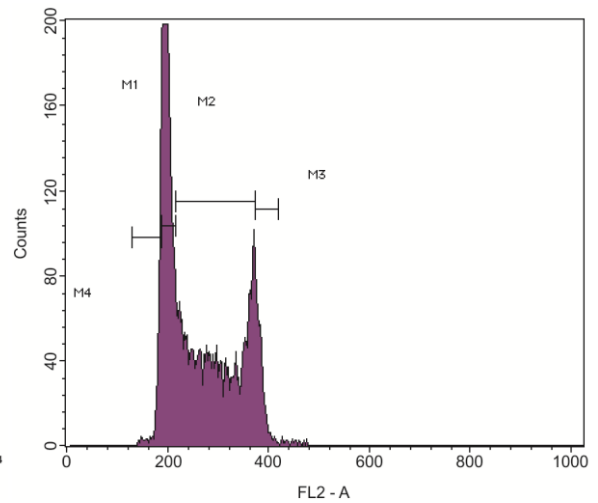
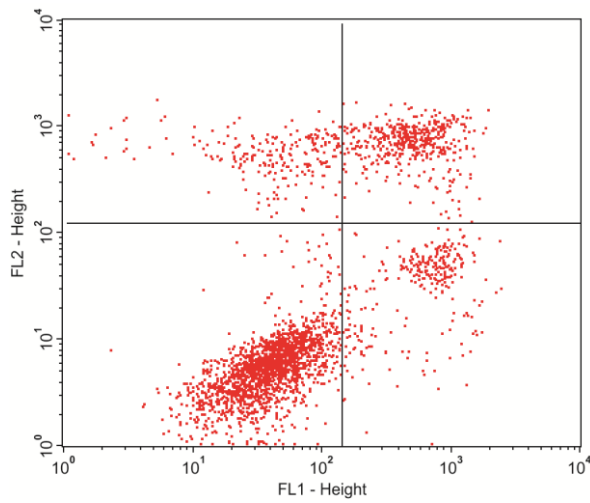
16 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 19.01 | Nekroza |
| UR | 0.02 | Kasna apoptoza |
| LL | 80.98 | Žive ćelije |
| LR | 0.01 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 40.62 | G0/G1 |
| M2 | 45.86 | S |
| M3 | 11.36 | G2/M |
| M4 | 2.17 | sub G1 |

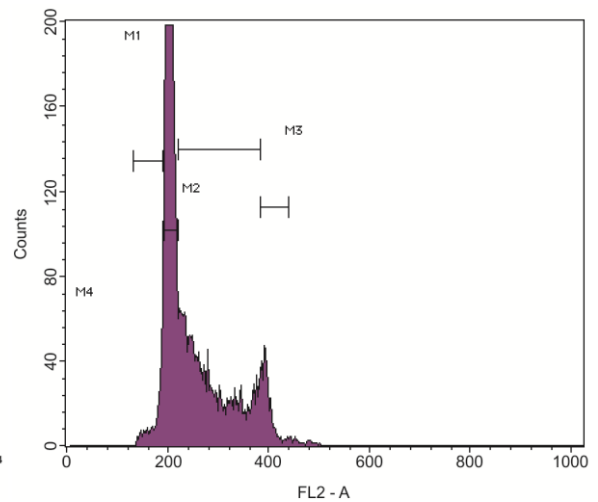
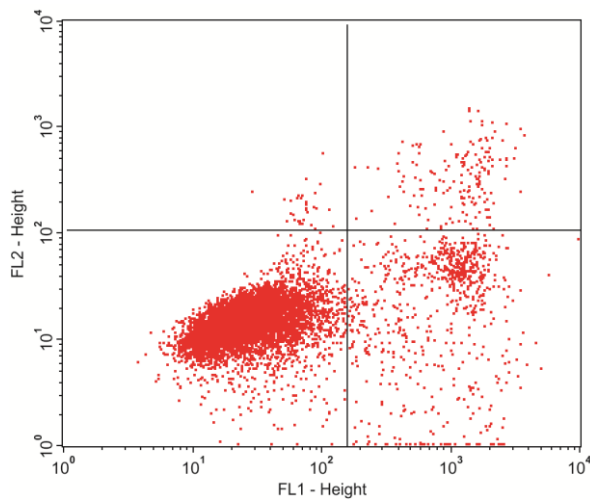
17 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 10.06 | Nekroza |
| UR | 20.65 | Kasna apoptoza |
| LL | 58.69 | Žive ćelije |
| LR | 10.61 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 36.32 | G0/G1 |
| M2 | 49.41 | S |
| M3 | 4.41 | G2/M |
| M4 | 9.86 | sub G1 |

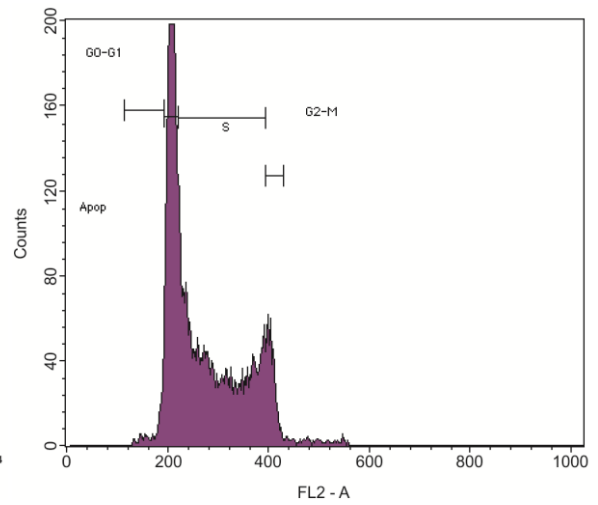
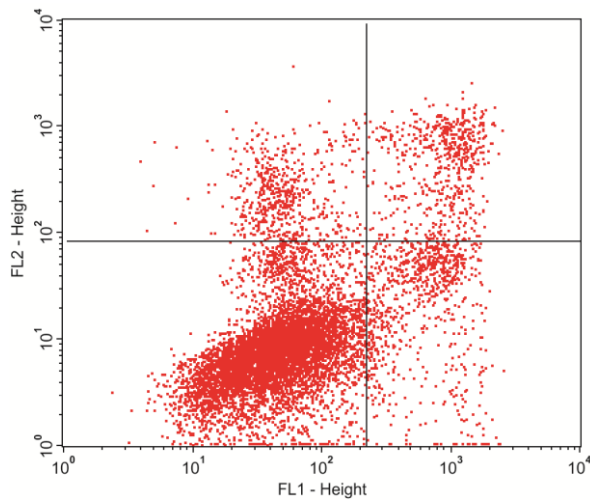
18 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 0.52 | Nekroza |
| UR | 2.35 | Kasna apoptoza |
| LL | 87.88 | Žive ćelije |
| LR | 9.26 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 55.66 | G0/G1 |
| M2 | 35.74 | S |
| M3 | 4.72 | G2/M |
| M4 | 3.88 | sub G1 |

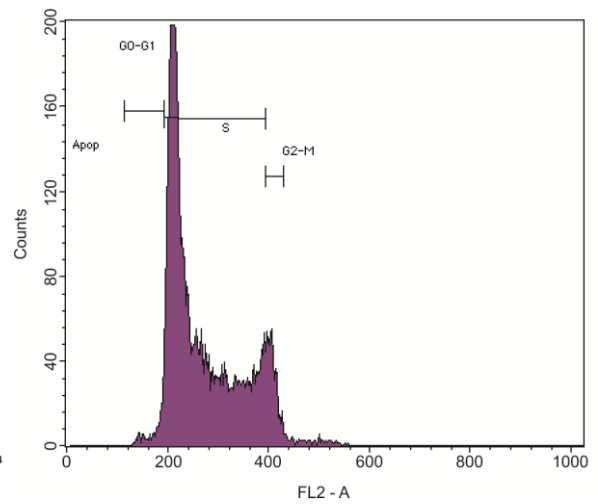
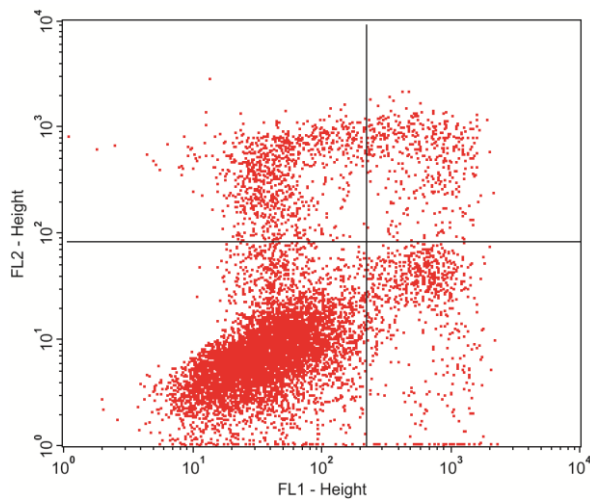
19 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 6.87 | Nekroza |
| UR | 6.68 | Kasna apoptoza |
| LL | 76.88 | Žive ćelije |
| LR | 9.58 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 38.03 | G0/G1 |
| M2 | 51.08 | S |
| M3 | 8.50 | G2/M |
| M4 | 2.41 | sub G1 |

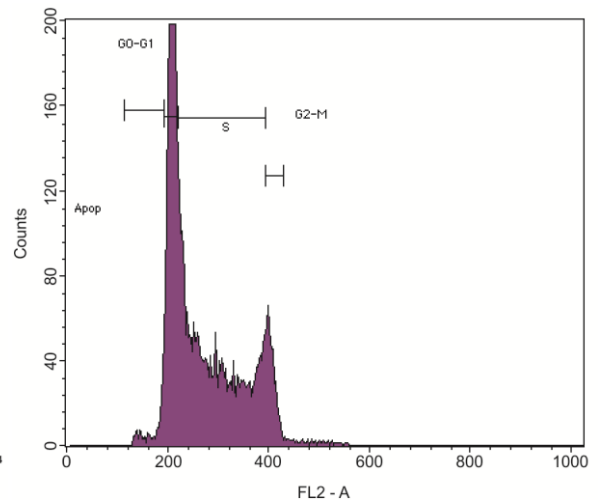
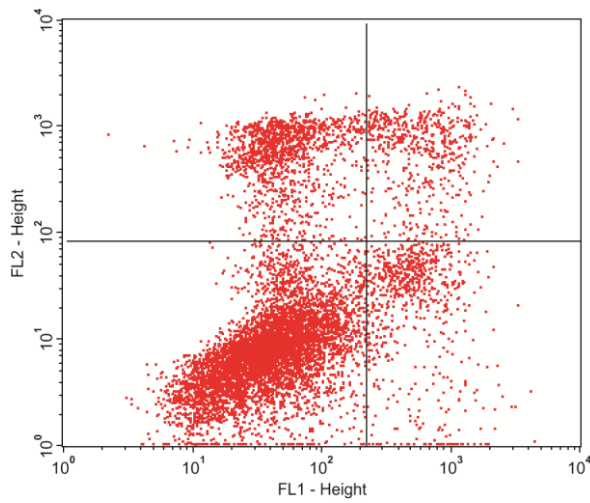
20 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 12.45 | Nekroza |
| UR | 5.28 | Kasna apoptoza |
| LL | 74.43 | Žive ćelije |
| LR | 7.85 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 35.68 | G0/G1 |
| M2 | 53.08 | S |
| M3 | 9.01 | G2/M |
| M4 | 2.23 | sub G1 |

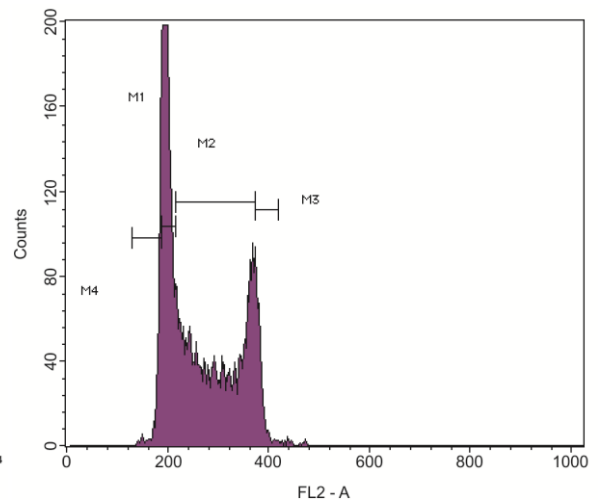
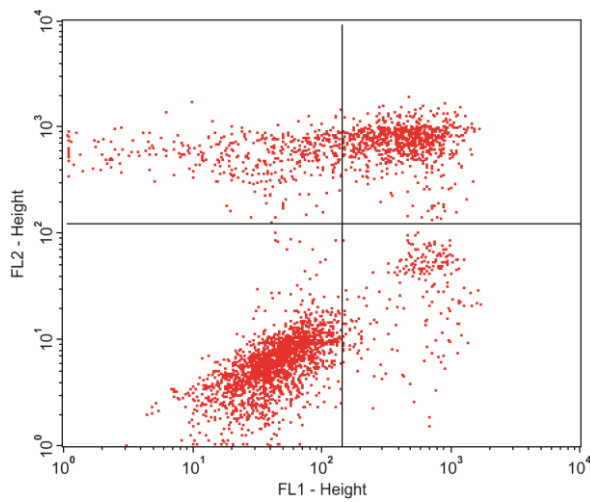
21 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 16.37 | Nekroza |
| UR | 6.90 | Kasna apoptoza |
| LL | 67.87 | Žive ćelije |
| LR | 8.88 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 37.02 | G0/G1 |
| M2 | 51.15 | S |
| M3 | 9.13 | G2/M |
| M4 | 2.71 | sub G1 |

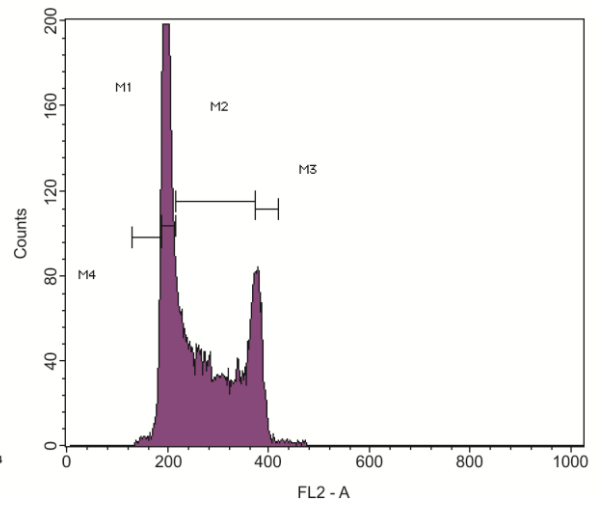
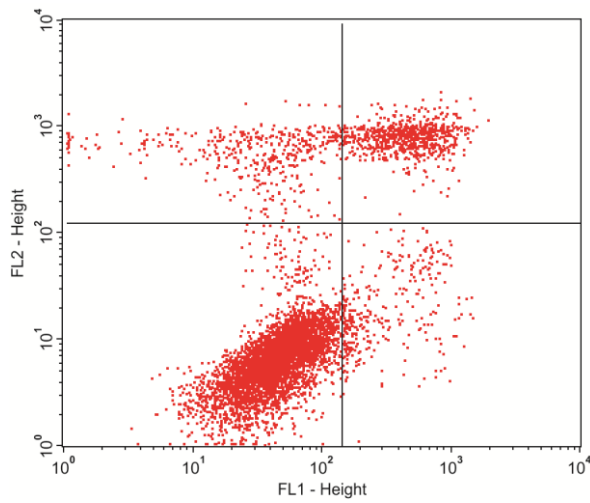
22 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 13.22 | Nekroza |
| UR | 26.45 | Kasna apoptoza |
| LL | 53.81 | Žive ćelije |
| LR | 6.54 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|-------------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 39.08 | G0/G1 |
| M2 | 49.13 | S |
| M3 | 5.67 | G2/M |
| M4 | 6.12 | sub G1 |

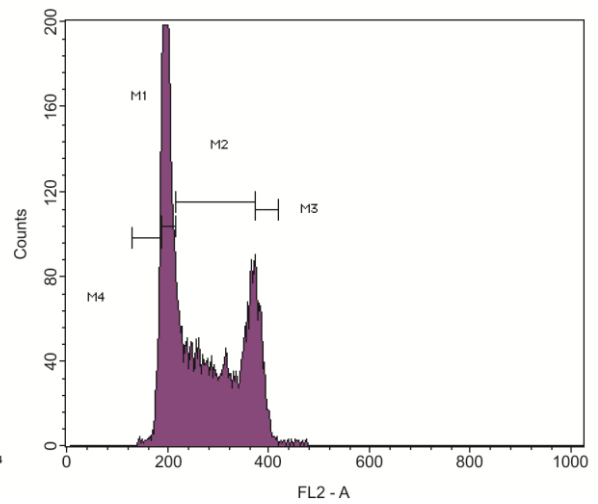
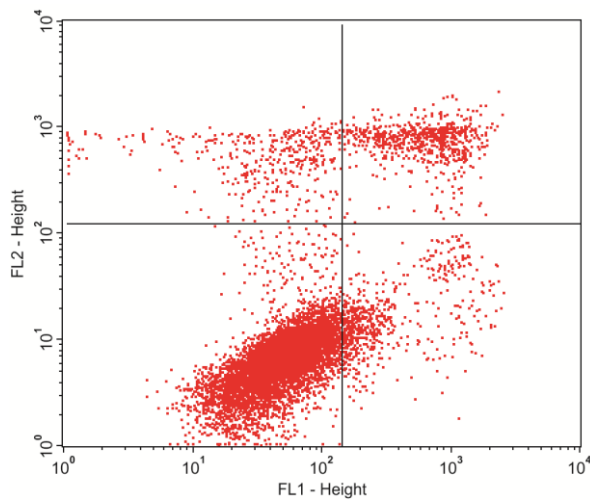
23 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.39 | Nekroza |
| UR | 12.48 | Kasna apoptoza |
| LL | 75.11 | Žive ćelije |
| LR | 5.03 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 43.08 | G0/G1 |
| M2 | 45.06 | S |
| M3 | 8.06 | G2/M |
| M4 | 3.81 | sub G1 |

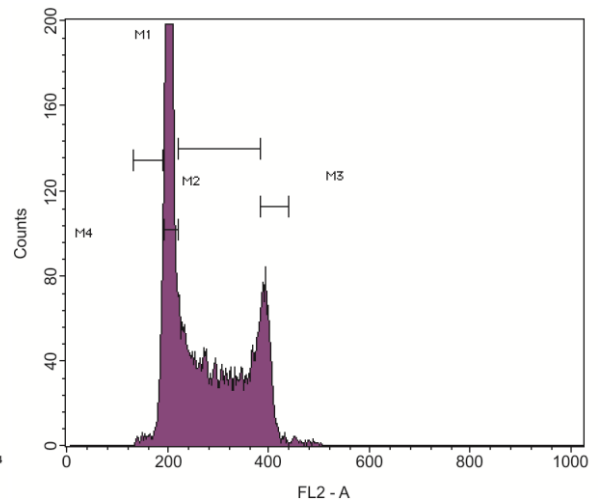
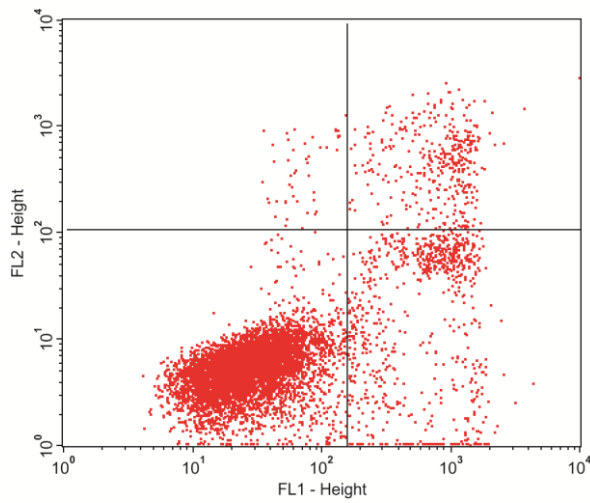
24 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 5.19 | Nekroza |
| UR | 8.67 | Kasna apoptoza |
| LL | 77.99 | Žive ćelije |
| LR | 8.16 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 39.46 | G0/G1 |
| M2 | 46.30 | S |
| M3 | 9.41 | G2/M |
| M4 | 4.84 | sub G1 |

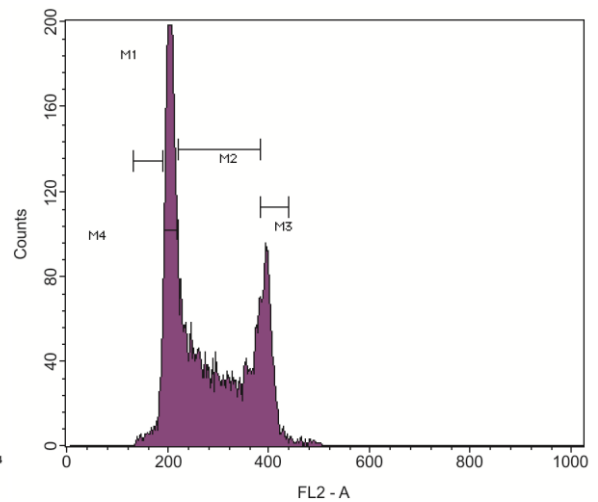
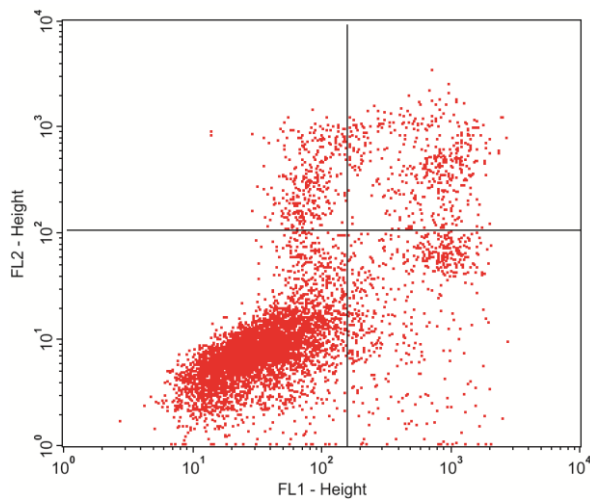
25 - 24h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 0.69 | Nekroza |
| UR | 4.80 | Kasna apoptoza |
| LL | 83.58 | Žive ćelije |
| LR | 10.94 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 42.67 | G0/G1 |
| M2 | 42.80 | S |
| M3 | 11.60 | G2/M |
| M4 | 2.93 | sub G1 |

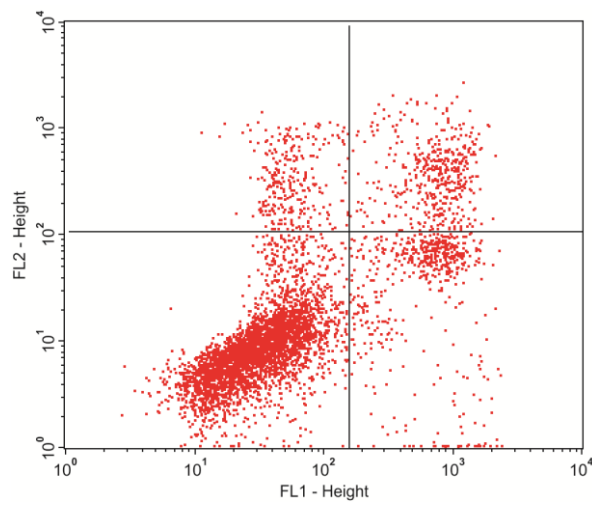
26 - 24h



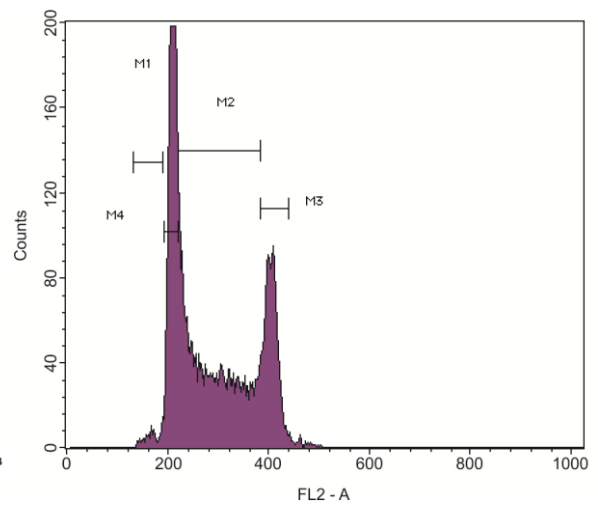
| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 5.11 | Nekroza |
| UR | 7.67 | Kasna apoptoza |
| LL | 78.24 | Žive ćelije |
| LR | 8.99 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 35.03 | G0/G1 |
| M2 | 47.12 | S |
| M3 | 15.25 | G2/M |
| M4 | 2.61 | sub G1 |

27 - 24h

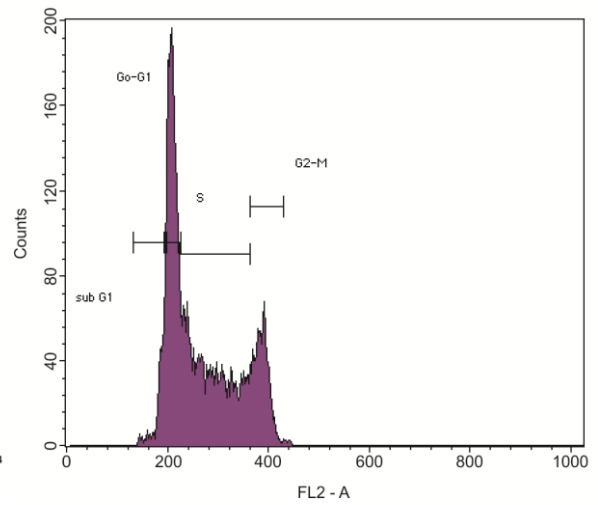
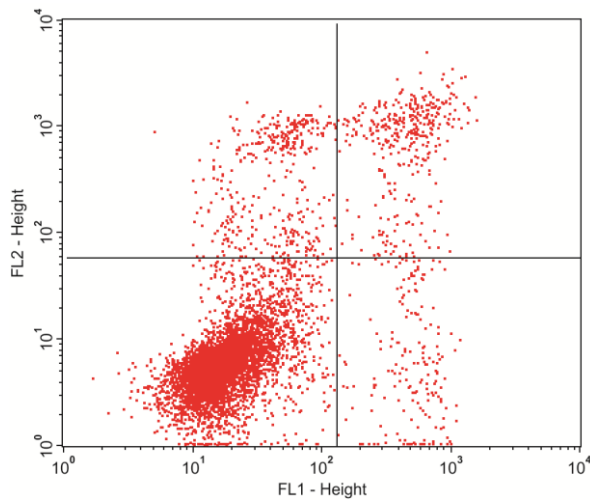


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 6.48 | Nekroza |
| UR | 10.18 | Kasna apoptoza |
| LL | 71.33 | Žive ćelije |
| LR | 12.02 | Rana apoptoza |



| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 32.21 | G0/G1 |
| M2 | 46.33 | S |
| M3 | 20.06 | G2/M |
| M4 | 1.40 | sub G1 |

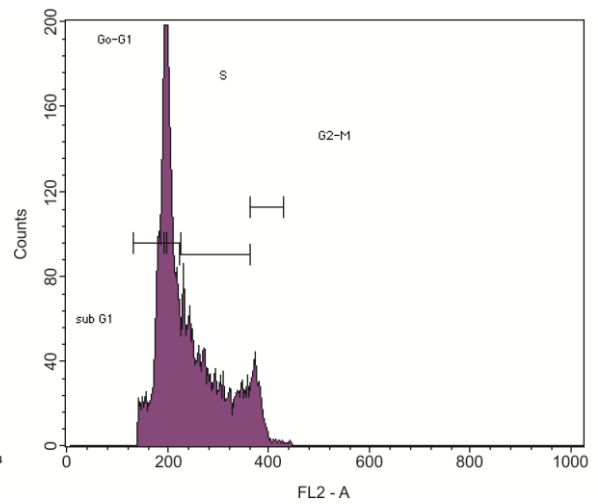
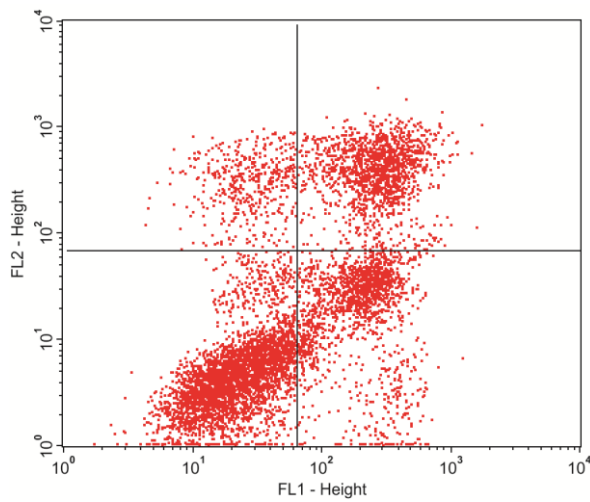
K - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.23 | Nekroza |
| UR | 5.24 | Kasna apoptoza |
| LL | 84.31 | Žive ćelije |
| LR | 3.22 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 45.22 | G0/G1 |
| M2 | 35.93 | S |
| M3 | 15.81 | G2/M |
| M4 | 3.04 | sub G1 |

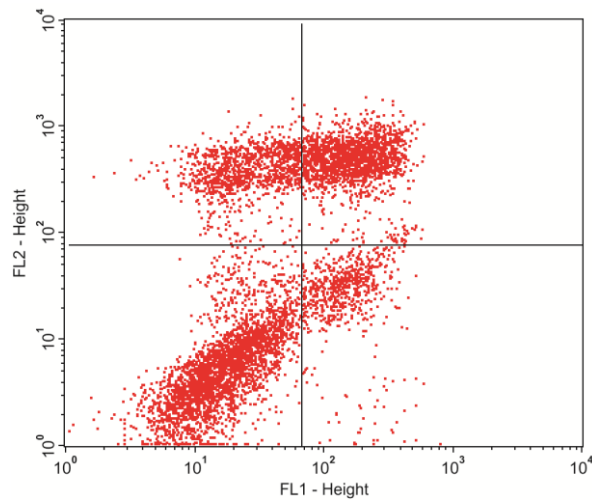
TI - 72h



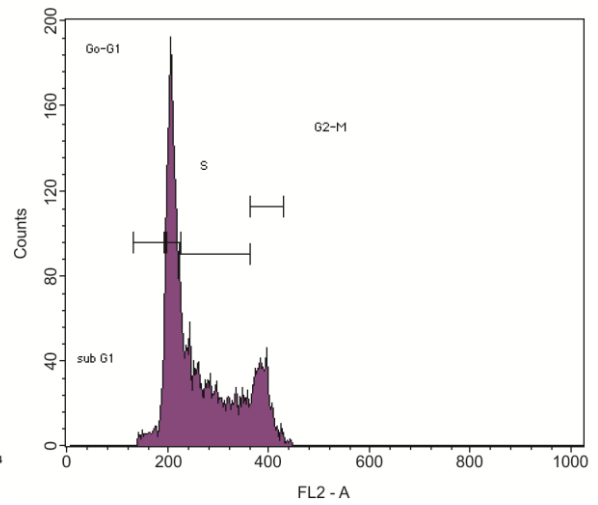
| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 13.76 | Nekroza |
| UR | 15.58 | Kasna apoptoza |
| LL | 41.24 | Žive ćelije |
| LR | 29.42 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 35.66 | G0/G1 |
| M2 | 33.62 | S |
| M3 | 5.74 | G2/M |
| M4 | 24.99 | sub G1 |

9 - 72h

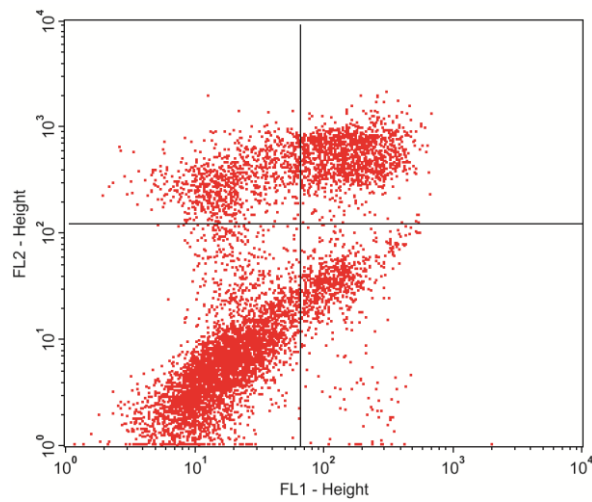


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 18.89 | Nekroza |
| UR | 30.16 | Kasna apoptoza |
| LL | 39.62 | Žive ćelije |
| LR | 11.34 | Rana apoptoza |

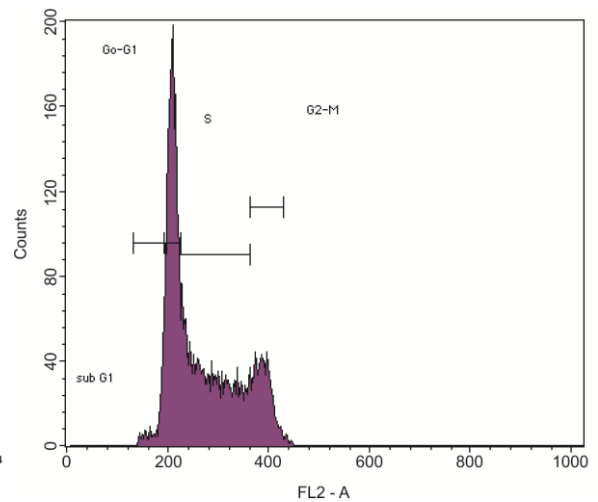


| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 40.31 | G0/G1 |
| M2 | 38.21 | S |
| M3 | 13.67 | G2/M |
| M4 | 7.81 | sub G1 |

12 - 72h

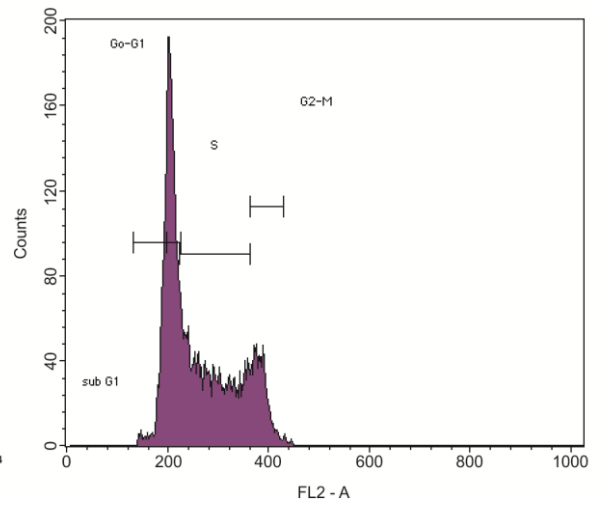
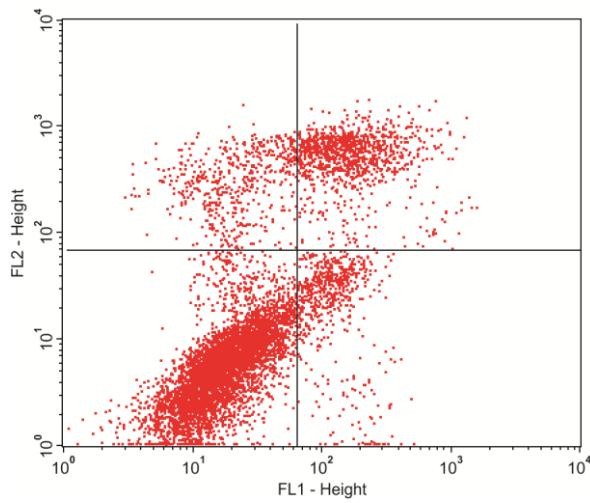


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 13.07 | Nekroza |
| UR | 19.56 | Kasna apoptoza |
| LL | 57.26 | Žive ćelije |
| LR | 10.12 | Rana apoptoza |



| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 38.10 | G0/G1 |
| M2 | 39.02 | S |
| M3 | 15.12 | G2/M |
| M4 | 7.77 | sub G1 |

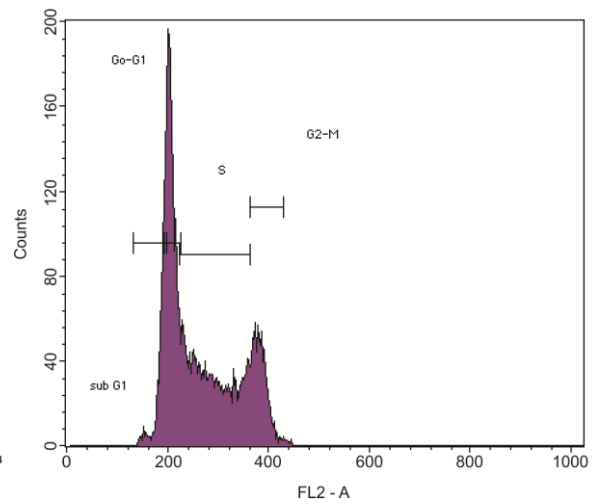
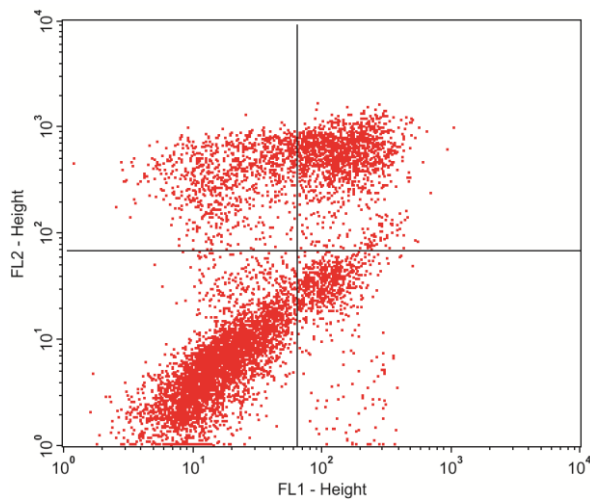
13 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.78 | Nekroza |
| UR | 16.14 | Kasna apoptoza |
| LL | 67.44 | Žive ćelije |
| LR | 8.66 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 39.23 | G0/G1 |
| M2 | 36.21 | S |
| M3 | 11.07 | G2/M |
| M4 | 13.49 | sub G1 |

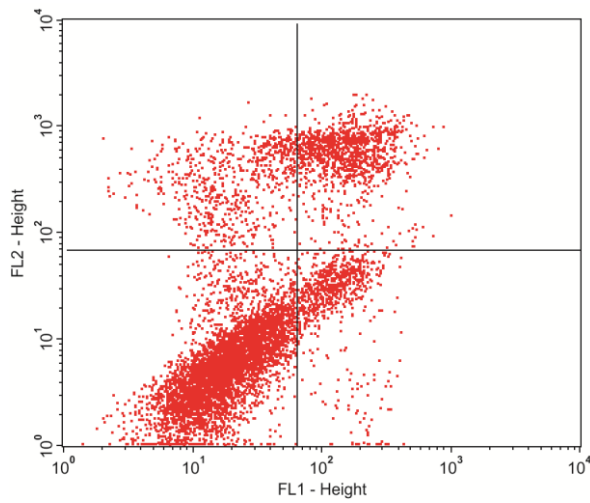
14 - 72h



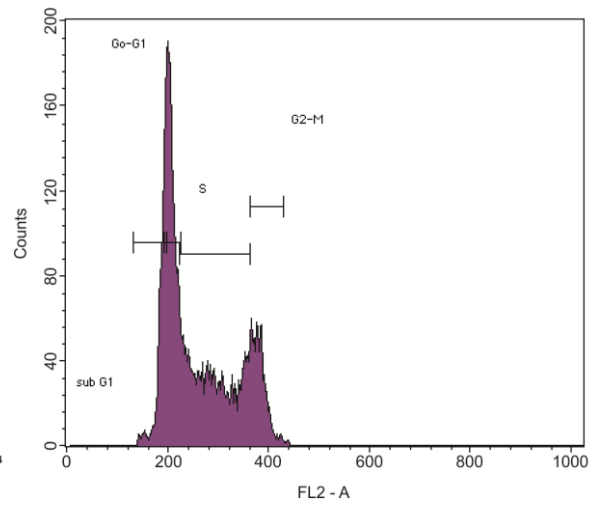
| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 6.73 | Nekroza |
| UR | 10.43 | Kasna apoptoza |
| LL | 28.22 | Žive ćelije |
| LR | 4.62 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 37.53 | G0/G1 |
| M2 | 35.23 | S |
| M3 | 13.63 | G2/M |
| M4 | 13.62 | sub G1 |

15 - 72h

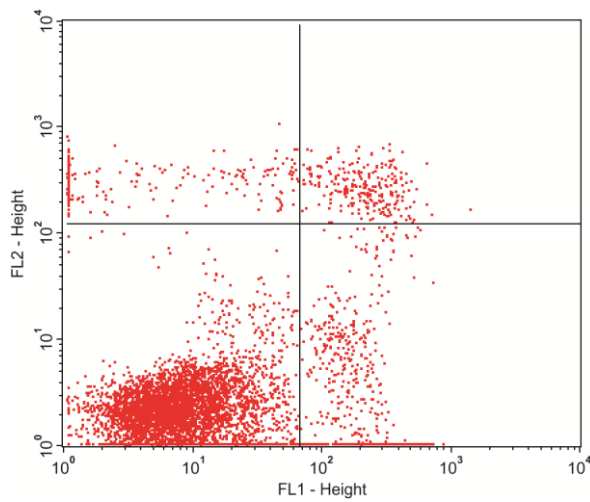


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 10.30 | Nekroza |
| UR | 15.44 | Kasna apoptoza |
| LL | 64.39 | Žive ćelije |
| LR | 9.87 | Rana apoptoza |

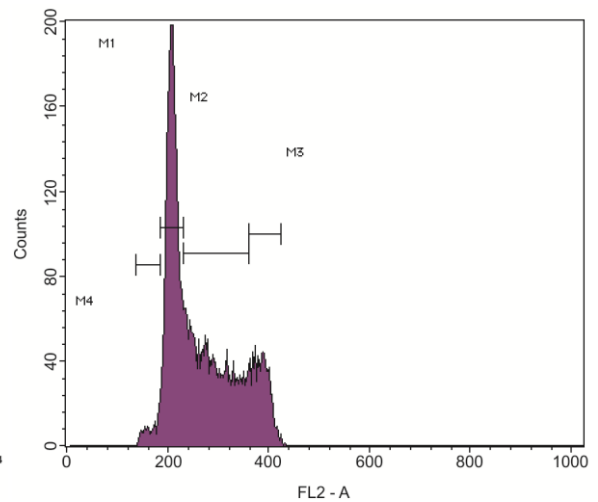


| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 38.15 | G0/G1 |
| M2 | 34.39 | S |
| M3 | 10.30 | G2/M |
| M4 | 17.17 | sub G1 |

16 - 72h

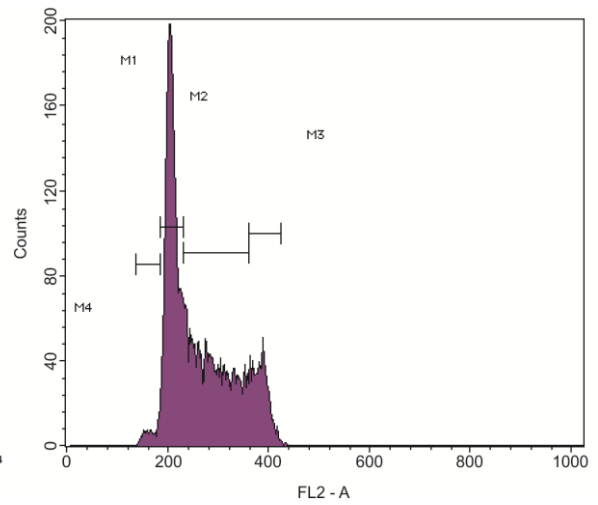
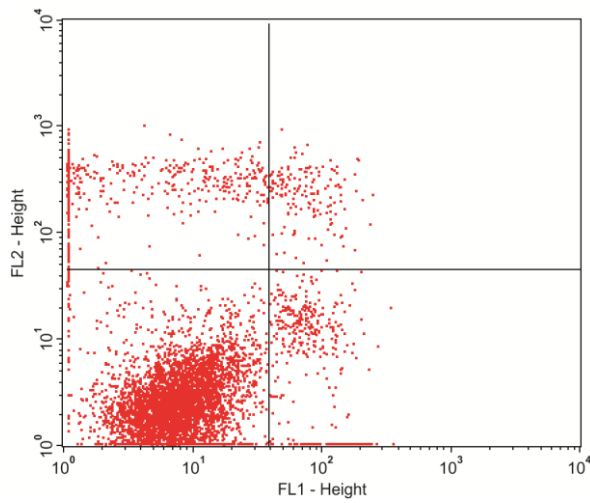


| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.98 | Nekroza |
| UR | 3.78 | Kasna apoptoza |
| LL | 80.02 | Žive ćelije |
| LR | 8.23 | Rana apoptoza |



| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 44.01 | G0/G1 |
| M2 | 41.01 | S |
| M3 | 13.01 | G2/M |
| M4 | 2.02 | sub G1 |

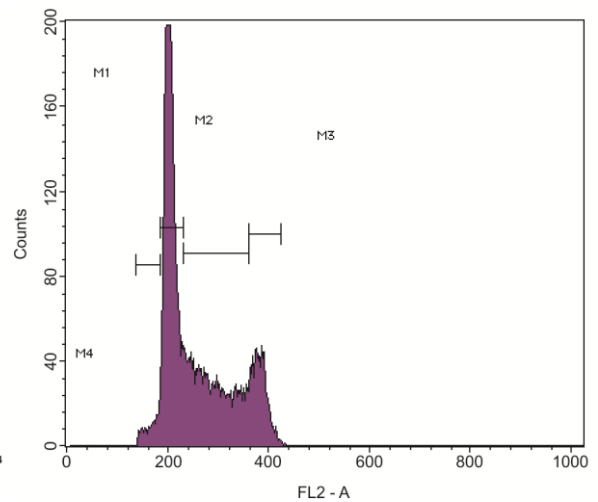
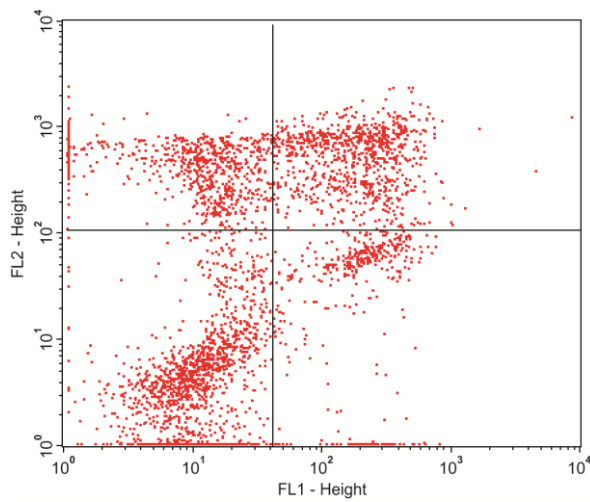
17 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 14.59 | Nekroza |
| UR | 5.31 | Kasna apoptoza |
| LL | 73.01 | Žive ćelije |
| LR | 7.10 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 13.32 | G0/G1 |
| M2 | 41.15 | S |
| M3 | 43.62 | G2/M |
| M4 | 1.92 | sub G1 |

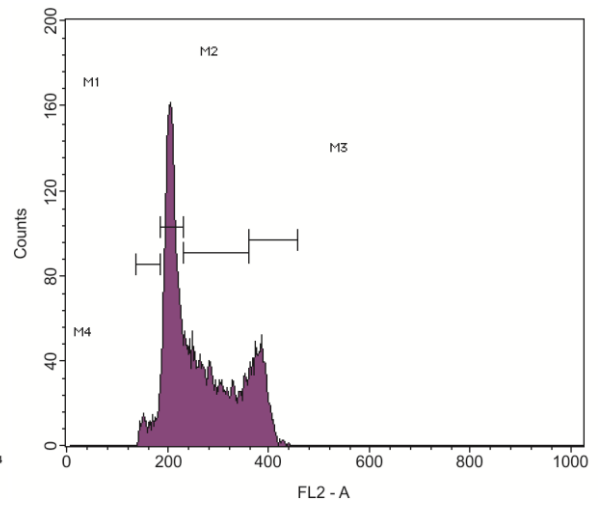
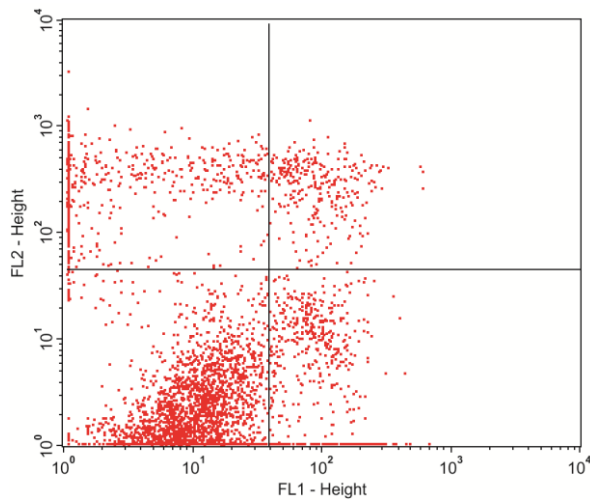
18 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 20.92 | Nekroza |
| UR | 23.97 | Kasna apoptoza |
| LL | 43.02 | Žive ćelije |
| LR | 12.05 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 40.01 | G0/G1 |
| M2 | 33.25 | S |
| M3 | 13.86 | G2/M |
| M4 | 12.88 | sub G1 |

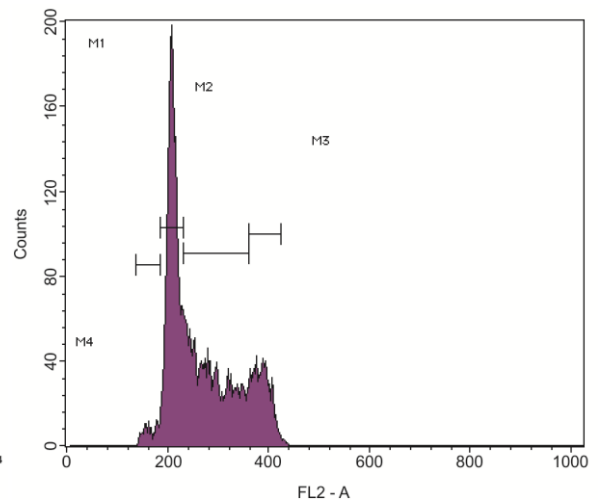
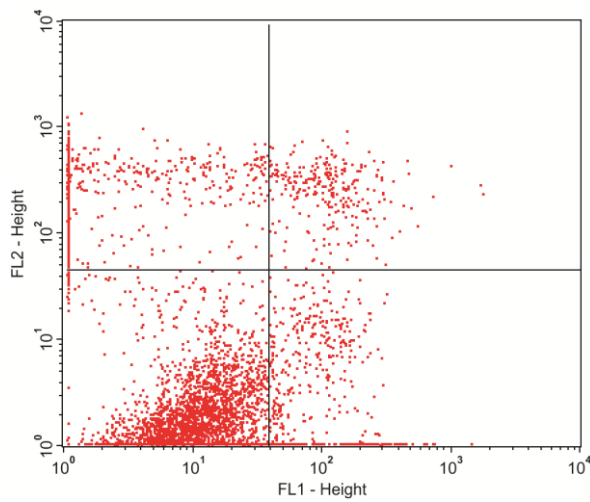
19 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 21.57 | Nekroza |
| UR | 6.81 | Kasna apoptoza |
| LL | 59.66 | Žive ćelije |
| LR | 11.97 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 42.04 | G0/G1 |
| M2 | 33.04 | S |
| M3 | 11.20 | G2/M |
| M4 | 13.72 | sub G1 |

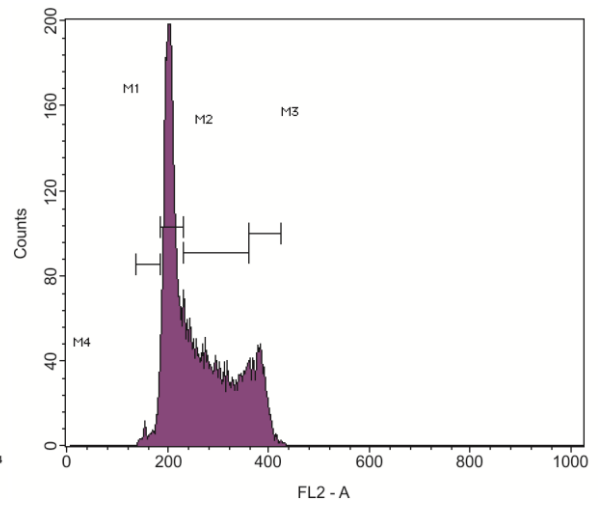
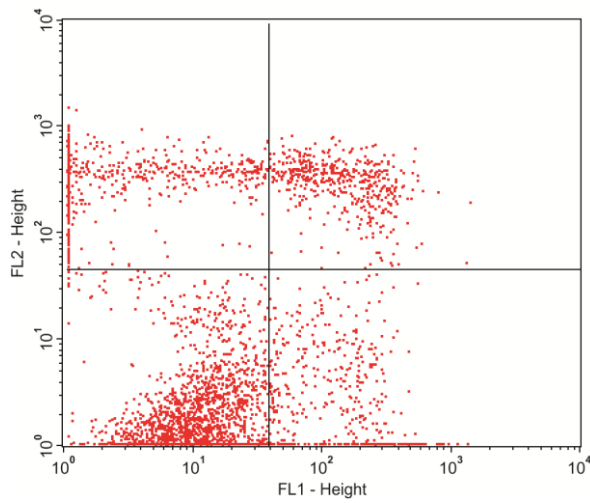
20 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 13.96 | Nekroza |
| UR | 6.01 | Kasna apoptoza |
| LL | 69.83 | Žive ćelije |
| LR | 10.22 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 44.11 | G0/G1 |
| M2 | 32.04 | S |
| M3 | 9.35 | G2/M |
| M4 | 14.52 | sub G1 |

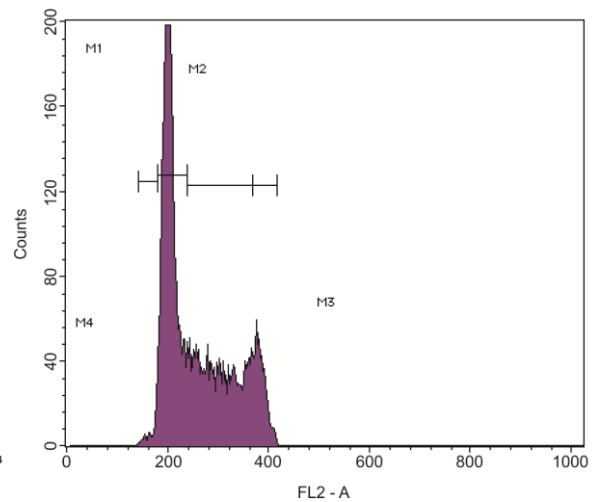
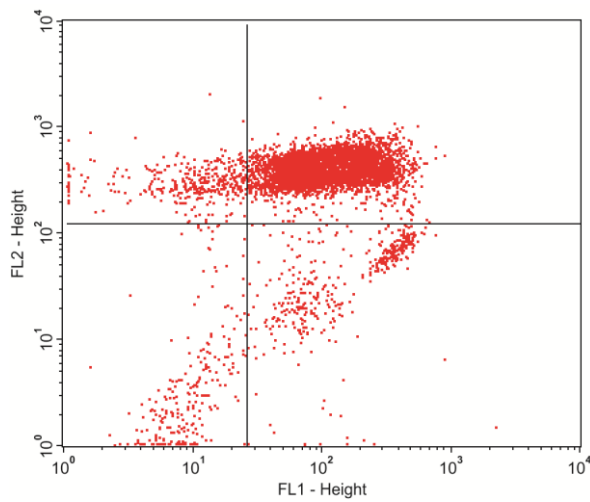
21 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 25.12 | Nekroza |
| UR | 12.31 | Kasna apoptoza |
| LL | 49.96 | Žive ćelije |
| LR | 12.62 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 46.12 | G0/G1 |
| M2 | 30.36 | S |
| M3 | 9.99 | G2/M |
| M4 | 13.54 | sub G1 |

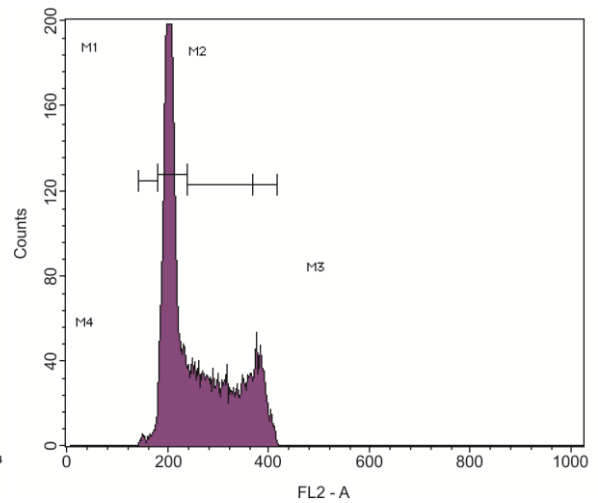
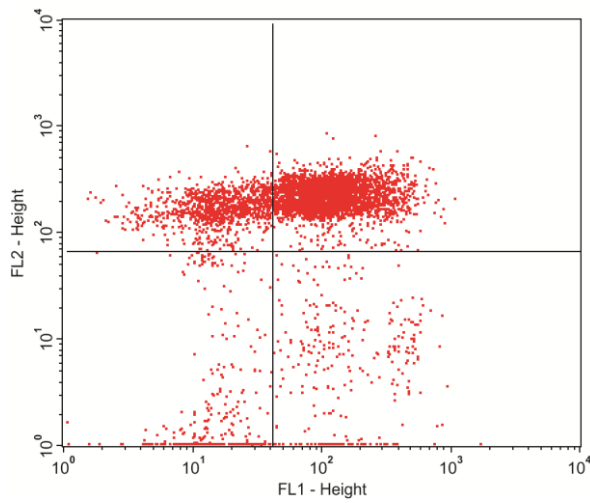
22 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 7.35 | Nekroza |
| UR | 80.99 | Kasna apoptoza |
| LL | 3.74 | Žive ćelije |
| LR | 7.935 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 44.11 | G0/G1 |
| M2 | 34.12 | S |
| M3 | 10.50 | G2/M |
| M4 | 11.29 | sub G1 |

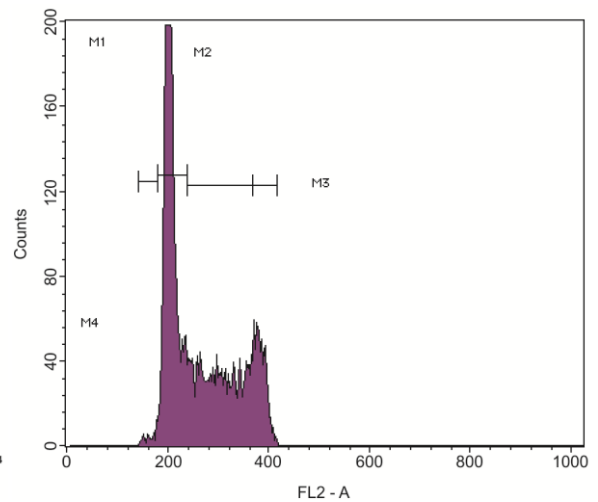
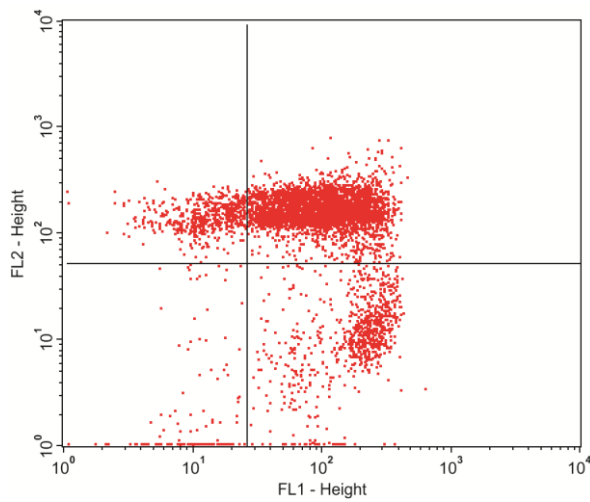
23 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 25.03 | Nekroza |
| UR | 62.01 | Kasna apoptoza |
| LL | 7.05 | Žive ćelije |
| LR | 5.93 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 48.09 | G0/G1 |
| M2 | 31.72 | S |
| M3 | 9.02 | G2/M |
| M4 | 11.17 | sub G1 |

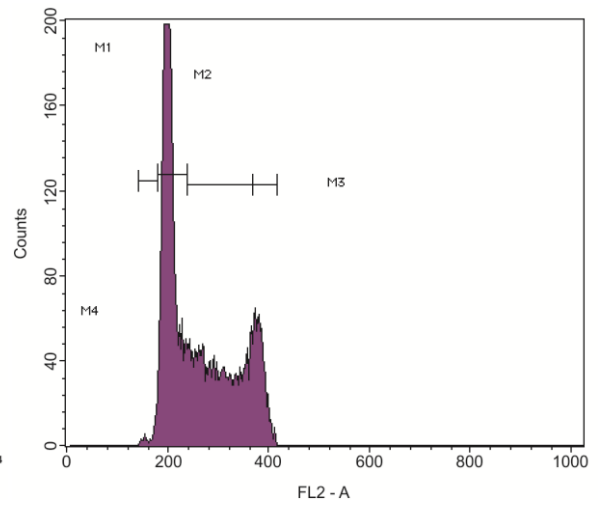
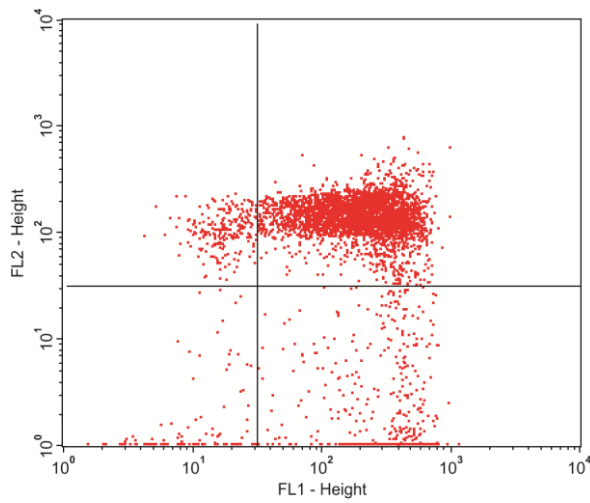
24 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 10.82 | Nekroza |
| UR | 69.98 | Kasna apoptoza |
| LL | 2.76 | Žive ćelije |
| LR | 16.45 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 43.53 | G0/G1 |
| M2 | 33.33 | S |
| M3 | 12.31 | G2/M |
| M4 | 10.84 | sub G1 |

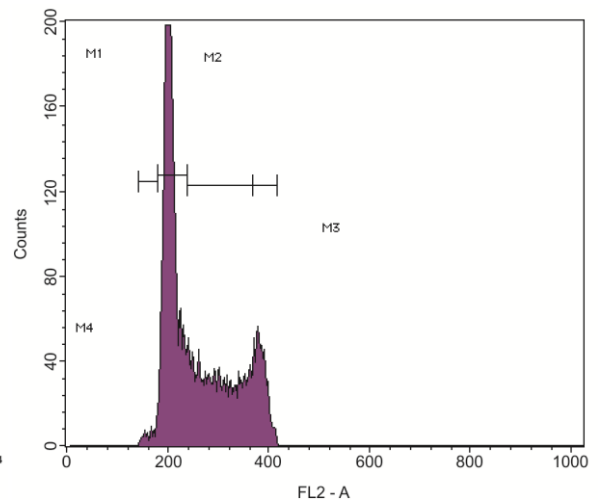
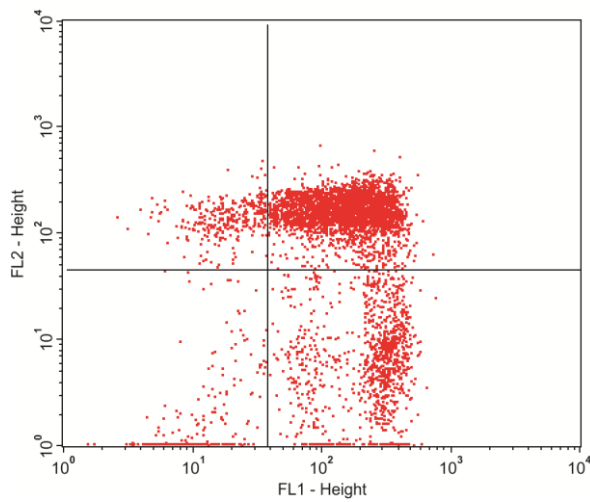
25 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 5.99 | Nekroza |
| UR | 74.34 | Kasna apoptoza |
| LL | 3.00 | Žive ćelije |
| LR | 16.67 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 42.26 | G0/G1 |
| M2 | 35.04 | S |
| M3 | 11.80 | G2/M |
| M4 | 10.90 | sub G1 |

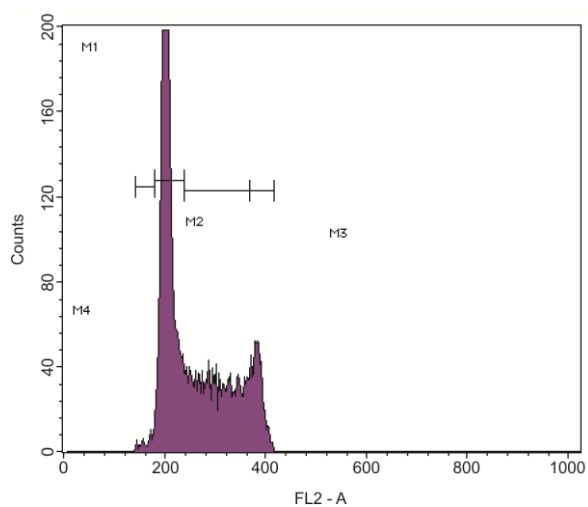
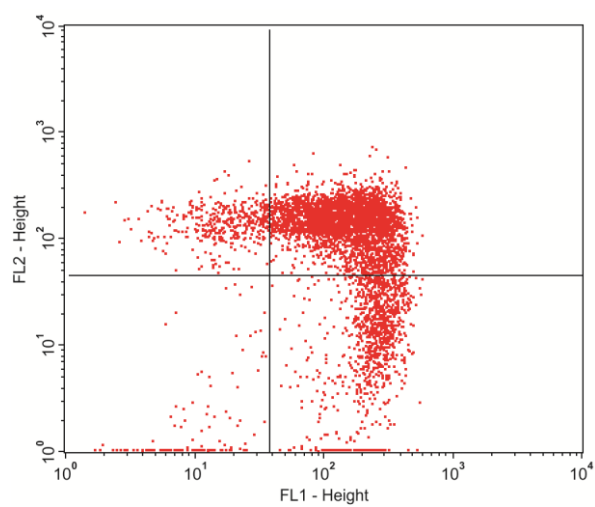
26 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 6.88 | Nekroza |
| UR | 66.30 | Kasna apoptoza |
| LL | 4.53 | Žive ćelije |
| LR | 22.33 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 44.31 | G0/G1 |
| M2 | 33.21 | S |
| M3 | 11.35 | G2/M |
| M4 | 11.13 | sub G1 |

27 - 72h



| Apoptoza | | |
|----------|---------|----------------|
| Quad* | % Gated | Opis |
| UL | 8.02 | Nekroza |
| UR | 66.51 | Kasna apoptoza |
| LL | 2.92 | Žive ćelije |
| LR | 22.56 | Rana apoptoza |

| Ćelijski ciklus | | |
|-----------------|---------|--------|
| Marker | % Gated | Faza |
| M1 | 40.16 | G0/G1 |
| M2 | 34.08 | S |
| M3 | 12.24 | G2/M |
| M4 | 13.52 | sub G1 |

* UL gornji levi kvadrant, UR gornji desni kvadrant, LL donji levi kvadrant, LR donji desni kvadrant.

6. ZAKLJUČAK

U radu je ostvarena sinteza novih acikličnih tiazolnih *C*-nukleozida sa dvostrukom vezom i 2',3'-dideoksi funkcijom u acikličnoj šećernoj komponenti, koja je zasnovana na D-arabinozi kao hiralnom prekursoru.

Višefazna sinteza acikličnih analoga tiazofurina **9** i **12**, polazi od dietilditioacetal D-arabinoze **2** (*Shema 3.1.*), iz kojeg je daljim hemijskim promenama prisutnih supstituenata dobijena tetra-*O*-benzoil-*aldehydo*-D-arabinoza (**4**), koja zbog slobodne aldehydne grupe pogoduje za finalno uvođenje heterocikličnog prstena (*Shema 3.2.*).

Konverzija aldehida **4** u odgovarajući oksimino derivat **5** ostvarena je reakcijom jedinjenja **4** sa hidroksilamin-hidrohloridom i natrijum-acetatom u etanolu na sobnoj temperaturi. Pri tome je dobijena smesa *E* i *Z*-oksima **5**, koji su nakon hromatografskog prečišćavanja izolovani u prinosu od 35.91%. Dehidracija smese oksima ostvarena je sa metansulfonil-hloridom u apsolutnom piridinu (-15°C, 0.5 h; zatim st, 2 h). Na taj način je dobijen odgovarajući aldono-nitril **6** u prinosu od 81.76% (*Shema 3.2.*).

Naredna etapa rada, koja obuhvata reakcije za izgradnju tiazolnog prstena, ostvarena je primenom metodologije koju su razradili Liang *et al.*¹⁰⁸

Reakcijom jedinjenja **6** sa hidrohloridom etilestra L-cisteina u prisustvu trietilamina (apsolutni MeOH; sobna temperatura; 2 časa) dobija se smesa C-4 epimernih tiazolina **7** (*Shema 3.3.*). Tokom ove reakcije odigrava se i uvođenje dvostruke veze u aciklični fragment molekule nakon eliminacije dve benzoatne grupe.

Oksidacijom tiazolina **7** sa BrCCl₃ u apsolutnom metilenhloridu, na 4°C u toku 17 časova, nastao je (*E*),(*S*)-Etil-2-(3,4-dibenzoiloksi-but-1-enil)tiazol-4-karboksilat (**8**) u prinosu od 46.86% u odnosu na **6** (računato na dve sintetičke faze).

Dejstvom metanolnog rastvora amonijaka na jedinjenje **8** (sobna temperatura, 6 dana), ostvarena je amonoliza svih estarskih grupa, pri čemu je dobijen slobodni *C*-nukleozid **9** u prinosu od 86.69% (*Shema 3.3.*).

Katalitičkim hidrogenovanjem jedinjenja **8** (H₂, Pd/C, st) ostvarena je redukcija dvostruke veze u acikličnom delu molekule, pri čemu je dobijen tiazolni derivat **10** u prinosu od 54.20% (*Shema 3.6.*).

Dejstvom metanolnog rastvora amonijaka na jedinjenje **10** (sobna temperatura, 16 dana), ostvarena je amonoliza svih estarskih grupa, pri čemu je dobijen slobodni C-nukleozid **12** u prinosu od 71.0% (*Shema 3.6.*).

U drugom delu rada ispitivana je antiproliferativna aktivnost novosintetizovanih nukleozida **9** i **12**, kao i petnaest analoga tiazofurina **13-27**, pomoću MTT testa,¹¹⁵ prema ćelijskim linijama odabranih humanih leukemija (K562, HL-60, Jurkat), Burkittovog limfoma (Raji), solidnih humanih tumora (HT-29, MCF-7, MDA-MB-231 i HeLa), odnosno prema ćelijama normalnih humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Tiazofurin je korišćen kao referentno jedinjenje, a citotoksičnost je izražena kao IC₅₀ vrednost (*Tabela 3.1.*). Uopšteno, na osnovu dobijenih rezultata proizilazi da novosintetizovani analog **9** ispoljava snažnu antiproliferativnu aktivnost prema K562, HL60, MCF-7 i HeLa ćelijskim linijama, dok analog **12** pokazuje snažnu citotoksičnu aktivnost prema K562, Jurkat, MCF-7 i HeLa malignim ćelijama.

Kao najosetljivija ćelijska linija, na osnovu IC₅₀ vrednosti, prema svim ispitivanim analogima se pokazala K562. Analози *ksilo* konfiguracije (**18, 19, 20** i **21**) su značajno inhibirali rast HeLa ćelija tokom sva tri ispitivana vremena.

Takođe, iz *Tabele 3.1.* se vidi da novosintetizovani analози pokazuju nižu citotoksičnost prema zdravim ćelijama MRC-5 u odnosu na referentno jedinjenje. Najslabiju aktivnost (preko 100 puta) ispoljio je analog **17** u sva tri ispitivana vremena, dok je molekul **13** pokazao 8–12 puta slabiju citotoksičnost od tiazofurina, tokom sva tri ispitivana vremena. Jedino ja analog **22** bio aktivniji od referentnog molekula tokom sva tri ispitivana vremena. Iako ovaj rezultat ukazuje na potencijalnu selektivnost analoga, **9, 12, 14-16, 18-21, 23-27**, prema malignim ćelijama, radi utvrđivanja njihovog potencijala kao selektivnog antitumorskog agensa neophodna su dodatna ispitivanja na većem broju zdravih ćelija.

Na osnovu uspostavljanja korelacionih odnosa (SAR) između strukture i antiproliferativne aktivnosti analoga tiazofurina, utvrđeno je da ispitivani analози, zavisno od konfiguracije, prouzrokuju različite promene antiproliferativne aktivnosti u odnosu na tiazofurin.

Takođe je utvrđeno da ispitivani analози tiazofurina dovode do promena u distribuciji ćelija po fazama ćelijskog ciklusa. Promene u fazama ćelijskog ciklusa K562 ćelija zavise od tipa jedinjenja, i od vremena tretmana.

Ispitujući koji tip ćelijske smrti leži u osnovi citotoksičnog dejstva testiranih jedinjenja, utvrđeno je da svi analози povećavaju kako procenat specifične apoptoze tako i procenat specifične nekroze s dužinom tretmana. Pokazali smo da sintetizovani analози tiazofurina indukuju vremenski zavisnu apoptozu u tretiranoj ćelijskoj liniji. Može se spekulirati da je apoptotska

aktivnost sintetizovanih jedinjenja zapravo posledica strukturnih promena, i da su ovakve promene u hemijskoj strukturi osnova pokazane antitumorske aktivnosti.

Ispitujući signalne puteve pokazano je da je u K562 ćelijama apoptoza praćena aktivacijom "nizvodnog" molekula apoptotskog puta, kaspaze-3. Na osnovu dobijenih rezultata, ne može se sa sigurnošću zaključiti da li translokacija Bax proteina direktno ili indirektno indukuje apoptozu preko mitohondrijalnog puta. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da antitumorska aktivnost ispitivanih sintetizovanih jedinjenja na testiranoj ćelijskoj liniji K562 obuhvata i promene u fazama ćelijskog ciklusa, kao i indukciju apoptoze pomoću dva različita mehanizma (kaspaza-zavisnim i kaspaza-nezavisnim putem).

7. LITERATURA

1. Perigaud, C., Gosselin, G., Inbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* **1992**, *11*, 903.
2. Suhadolnik, R. J. *Nucleoside antibiotics*. Wiley-Interscience, New York, 1970.
3. Grifantini, M. *Current Opininion in Investigational Drugs*. **2000**, *1*, 257.
4. Jayaram, H. N., Dion, R. L., Glazer, R. I., Johns, D. G., Robins, R. K., Srivastava, P. C., Cooney, D. A. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31*, 2371.
5. Natsumeda, Y., Ikegami, T., Olah, E., Weber, G. *Cancer Research* **1989**, *4*, 88.
6. Jayaram, H. N., Pillwein, K., Weber, G. *Nucleosides & Nucleotides* **1986**, *5*, 503.
7. Pankiewicz, K.W., *Pharmacol. Ther.* **1997**, *76*, 89.
8. Weber, G., Prajda, N., Abonzi, M., Look, K. Y., Tricot, G. *Anticancer Res.* **1996**, *6*, 3313.
9. Vitale, M., Zamai, L., Falcieri, E., Zauli, G., Gobbi, P., Santi, S., Cinti, C., Weber, G. *Cytometry* **1997**, *30*, 61.
10. Piperski, V., Vračar, M. Jokanović, M., Stukalov, P., Rakić, L. *Apoptosis* **1998**, *3*, 345.
11. Pankiewicz, K.W. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, *9*, 55.
12. Goldstein, B. M., Mao, D. T., Marquez, V. E. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1026.
13. Kovács, L., Herczegh, P., Batta, G., Farkas, I. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 5539.
14. Dishington, A. P., Humber, D. C., Stoodley, R. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1993**, 57.
15. Hanna, N. B., Upadhya, K. G., Petrie, C. R., Robins, R. K., Revankar, G. R. *Nucleosides Nucleotides*, **1986**, *5*, 343.
16. Fuertes, M., Garcia-López, T., Garcia-Munoz, G., Stud, M. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 4074.
17. Srivastava, P. C., Pickering, V.M., Allen, L.B., Streeter, D.G., Campbell, M.T., Witkowski, J.T., Sidwell, R.W., Robins, R.K. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 256.
18. Upadhya, K. G., Petrie, C. R., Robins, R. K., Revankar, G. R. *Nucleosides Nucleotides*, **1986**, *5*, 343.
19. Lui, M. S., Faderan, M. A., Liepnieks, J. J., Natsumeda, Y., Olah, E., Jayaram, H. N., Weber, G. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 5078.
20. Srivastava, P. C.; Robins, R.K., *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 445.
21. Boritzki, T.S., Berry, D.A., Besserer, J.A., Cook, P. D., Fry, D.W., Leopoid, W.R., Jecksson, R. C. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, *34*, 1109.
22. Franchetti, P.; Grifantini, M. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 599.
23. Lee, H., Pawlak, K., Nguyen, B. T., Robins, R. K., Sadee, W., *Cancer Res.* **1985**, *45*, 5512.
24. Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 217.
25. Kaufmann, S., H., Hengartner, M., O. *Trends Cell. Biol.* **2001**, *11*, 526.
26. Katoch, B., Sebastian, S., Sahdev, S., Padh, H., Hasnain, S.E., Begum, R. *Indian J Exp Biol.* **2002**, *40*, 513.
27. Rutledge, S.,E., Chin, J.,W., Schepartz, A. *Curr Opin Chem Biol.* **2002**, *6*, 479.
28. De Bruin, C. E., Medema, P.J. *CancerTreatment Rev.* **2008**, *34*, 737.
29. Žlender, V. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **2003**, *54*, 267.
30. Colin, A., Seamus, J., M. *Bioschemistry.* **2009**, *2*, 62.
31. Kristoffer, V., Lawrence, F. P. *Oncogene.* **2003**, *22*, 5792

32. Wickman, G., Julian, L., Olson, M. F. *Cell Death Differentiation*. **2012**, 19, 735.
33. Vaux, D.L. *Toxicology*. **2002**, 181-182, 3.
34. Lockshin RA, Williams CM. Programmed cell death – II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol*. **1964**, 10, 643.
35. Kerr, J.F. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol*. **1965**, 90, 419.
36. Lockshin, R.A., Williams, C.M. Programmed cell death – I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the pernyi silkmoth. *J Insect Physiol*. **1965**, 11, 123.
37. Nelson, D.A., White, E. *Genes&Dev*. **2004**, 18, 1223.
38. Leist, M., Jaattela, M. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2001**, 2, 589.
39. Galluzzi, L, Maiuri, M.C., Vitale, I, Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., et al. *Cell Death Differ*. **2007**, 14, 1237.
40. Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P. et al. *Cell Death Differ*. **2005**, 12 (Suppl 2), 1463.
41. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.,M., et al. *Cell Death and Differentiation*. **2011**, 1.
42. Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zivtvogel, L., et al. *Cell Death and Differentiation*, **2007**, 14, 1237.
43. Green, D. R., Ferguson, T., Zitvogel, L., Kroemer, G. *Immunol*, **2009**, 9, 353.
44. Galluzzi, L., Aaronson, S.,A., Abrams, J., Alnemri, E.,S., Andrews, D.,W., Baehrecke, E.,H., et al. *Cell Death Differ*. **2009**, 16, 1093.
45. Klionsky, D.,J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.,K., Aliev, G., Askew, D.,S., et al. *Autophagy*. **2008**, 4, 151.
46. Chipuk, JE., Green, D. R. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2005**, 6, 268.
47. Kroemer, G., Martin, S. J. *Nat Med*. **2005**,11, 725.
48. Vermes, I.H.C., Reutelingsperger, C. J. *Immunol. Methods*. **2000**, 243, 167.
49. Davis, A.M., Ryan, H.D. *Toxicol. Pathol*. **1998**, 26, 810.
50. Lee, H.C., Wei, Y.H. *J Biomed. Sci*. **2000**, 7, 2.
51. Wei, M.Z., Zong, W. X.,Chen, E.H., et.al. *Science*, **2001**, 292, 727.
52. Reed, J.C. *Am. J. Pathol*. **2000**, 157, 1415.
53. Thornberry, N., Lazeb, Y. *Science* **1998**, 281, 1312.
54. Hengarter, M. *Nature*, **2000**,11, 526
55. Elmore, S. *Toxicol. Pathol*. **2007**, 35, 495.
56. Krakstad, C., Chekenya, M. *Moleculr Cancer*. **2010**, 9, 135.
57. Cör, A., Pižem, J., Gale, N. *Virchows Arch*. **2004**, 444, 439.
58. Wajan, H. *Science*, **2002**, 296, 1635.
59. Schutze, S., Tchikov, V., Schneider-Brachert, W. *Nat Rev Cell Biol*. **2008**, 9, 655.
60. Mehlen, P., Bredesen, D. E. *Sci Signal*. **2011**, 4, mr2.
61. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M. *Cell*. **1995**, 81, 505.
62. Faubion, W., Gores, G. *Hepatology*. **1999**, 29, 1.
63. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., et al. *Cell*. **1996**, 85,817.
64. Meler, P., Vousden, K. H. *Moll Cell*. **2007**, 28, 746.
65. Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P. H. *J Cell Sci*. **2005**, 118, 25.

66. Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M., Lenardo, M.J. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2001**, 98, 13884.
67. Reed, J.C. *Am. J. Pathol.* **2000**, 157, 1415.
68. Hengartner, M.O. *Nature*. **2000**, 407, 770.
69. Daniel, P. T., Koert, U., Schuppan, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 872.
70. Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., et al. *Nature*, **1997**, 388, 190.
71. Burns, T. F., El Deiry W. S. *J Biol Chem*, **2001**, 276, 37879.
72. Peter, M. E. *Biochem J*, **2004**, 382, e1.
73. Hyer, M. L., Samuel, T., Reed, J. C. *Clin Cancer Res*, **2006**, 12, 5929.
74. Chang, D.W. Xing, Z., Pen, Y., et al. *EMBO J*, **2002**, 21, 3704.
75. Micheau, O., Thome, M., et al. *J Biol Chem*, **2002**, 277, 45162.
76. Sharp, D. A., Lawrence, D. A., Ashkenazi, A. *J Biol Chem*, **2005**, 280, 19401.
77. Wilson, T. R., McLaughlin, K. M., McEwan, M., et al. *Cancer Res*, **2007**, 67, 5754.
78. Lindsey, A., A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., Clarke, R., P.
79. Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L., et al. *Nature*. **1993**, 362, 849.
80. Komarova, A.E., Gudkov, V.A. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 62, 657.
81. Chipuk, E. J., Green, R. D. *Cell*, **2008**, 18, 157
82. Rust, C., Gores, G.J. *Am. J. Med.* **2000**, 108, 567.
83. Labar, B. *Medicus*. **2001**, 10, 141.
84. Zimmermn, K.C., Douglas, R.G. *J. Allergy. Clin. Immuno.* **2001**, 108, 99.
85. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinvasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., et al. *Cell*. **1997**, 91, 479.
86. Zhang, Y., Herman, B. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, 123, 245.
87. Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y. et al. *Nature*. **2001**, 410, 549.
88. Widlak, P., Li, Y.L., Wang, X., Garrard, T.W. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 48404.
89. Susin, A.S., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M. et al. *J. Exp. Med.* **2000**, 192, 571.
90. Castedo M., Ferri K., Roumier T., Me'tivier D., Zamzami N., Kroemer G. *J. Immunol. Methods*. **2002**, 265, 39.
91. Salvesen, G.,S., Duckett, C.,S. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2002**, 3, 401.
92. Krakstad, C., Chekenya, M. *Moleculr Cancer*. **2010**, 9, 135.
93. Elmore, S. *Toxicol. Pathol.* **2007**, 35, 495.
94. Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N. Neoplasia. In: Robbins and Cotran. Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders **2005**, p.269.
95. Vousden, K. H., Lane, D. P. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**, 8, 275.
96. Ga, J., Morgan, W.A., Sanchez-Medina, A., Corcoran, O. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2011**, 254, 221.
97. Makin, G., Hickman, J. A. *Cell Tissue Res*. **2000**, 301, 143.
98. Mashima, T., Tsuruo, T. *Drug Resist. Update*. **2005**, 8, 339.
99. Lowe, W.S., Lin A.W. *Carcinogenesis*. **2000**, 21, 485.
100. Qi, R., Liu, X.Y. *IJBS*. **2006**, 2, 211.
101. Lockshine, R.A., Zakeri, Z. *Oncogene*. **2004**, 23, 2766.

102. Gewirtz, D.A. *Breast Cancer Res Treat.* **2000**, 62, 223.
103. Brown, J.M., Wilson, G. *Biol Ther.* **2003**, 2, 477.
104. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K., Uchida, Y., Arihiro, K. *EJSO.* **2006**, 32, 269.
105. Debatin KM. *Cancer Immunol Immunother.* **2004**, 53,153.
106. Kim, R., Tanabe, K., Uchida, Y., Emi, M., Inoue, H., Toge, T. *Cancer Chemother Pharmacol.* **2002**, 50, 343.
107. Zinner, H. *Chem. Ber.* **1951**, 84, 780.
108. Liang, C. W., Kim, M. J., Jeong, L. S., Chun, M. W. *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **2003**, 22, 2039.
109. Kojić, V. V., *Magistarska teza*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2010.
110. Spaić, S. B., *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, 2010.
111. Popsavin, M., Torović, Lj., Kojić, V., Bogdanović, G., Spaić, S., Popsavin, V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2003**, 13, 3167.
112. Popsavin, M., Spaić, S., Svirčev, M., Kojić, V., Bogdanović, G., Popsavin, V. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2006**, 16, 5317.
113. Popsavin, M., Torović, Lj., Kojić, V., Bogdanović, G., Popsavin, V. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 7125.
114. Torović, Lj.D., *Doktorska disertacija*, Prirodno-matematičk fakultet, Novi Sad, 2004.
115. Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R. *Cancer. Res.* **1988**, 48, 4827.
116. Vitale, M., Zamai, L., Falcieri, E., Zauli, G., et al. *Cytometry.* **1997**, 30, 61.
117. Pathak, S., Sharma, H., Sharma, C., Jayaram, N. H., Singh, N. *Gene Ther Mol Biol.* **2006**, 10, 199.
118. De Abreu, R. A.; Trueworthy, R. C., van Kuilenburg, A. B. P., Vogels-Mentink, T.M., Lambooy, L. H. J., van Gennip, A. H. Combination therapy in childhood leukaemia: in vitro studies of thiopurines and inhibitors of purine metabolism on apoptosis. *Ann. Clin. Biochem.* **2003**, 40, 70–74.
119. Kumar, S., Vogler, M., Dinsdale, D., Dyer, M.J.S., Cohen, G.M. *Cell Death and Differentiation.* **2007**, 14, 32.
120. Adrain, C., Martin, S. J. *Sci. Signal.* **2009**, 2, Article No. pe62.
121. Logue, S. E., Martin, S. J. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, 36, 1.
122. Kim, R., Emi, M., Tanabe, Uchida, K., Arihiro, K. Y. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2006**, 32, 269.
123. Khanna, N., Jayaram, H. N., Singh, N. *Life Sci.* **2004**, 75, 179.
124. Solary, E., Droin, N., Bettaieb, A., Corcos, L., Dimanche-Boitrel, M.-T., Garrido, C. *Leukemia.* **2000**, 14, 1833.
125. Guimaraes, C. A., Linden, R. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 1638.
126. Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G. *Oncogene.* **2012**, 31, 2805.
127. Hasenjager, A., Gillissen, B., Muller, A., Normand, G., Hemmati, P.G., Schuler, M., Dorken, B., Daniel, P. T. *Oncogene* **2004**, 23, 4523.
128. Brauns, C. S., Dealtry, G., Milne, P., Naude, R., Van de Venter, M. *Anticancer Research.* **2005**, 25, 4197.
129. Oures, A. H., Yakovlev, G. A., Ivanova, V., Stoica, B. A. , Wang, G., Iyer, S., Smulson, M. *The J OF Biol Chem.* **1999**, 274, 33, 22932.
130. Kromer, G., Martin, S. J. *Nat. Med.* **2005**, 11, 725.

131. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G. *Cell Death and Differ.* **2009**, 16, 3.
132. Riva, L., Coradini, D., Di Fronzo, G., De Feo, V., De Tommasi, N., De Simone, F., Cosimo, P. *Anticancer Res.* **2001**, 21, 2457.
133. Peto, J. *Nature.* **2001**, 411, 390.
134. Fisher, D. E. *Cell.* **1994**, 78, 539.
135. Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. *Exp. Cell Res.* **2000**, 256, 42.
136. Sellers, W.R., Fisher, D.E. *J. Clin Invest.* **1999**, 104, 1655.
137. Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R., Porter, A.G. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9357.
138. Mow, B.M., Blajeski, A.L., Chandra, J., Kaufmann, S.H. *Curr. Opin. Oncol.* **2001**, 13, 453.
139. Ohta, T., Kinoshita, T., Naito, M., Nozaki, T., Masutani, M., Tsuruo, T., Miyajima, A. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23111.
140. Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, J., Ni J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Kramme, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. *Cell.* **1996**, 85, 817.
141. Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.F., et al. *Nat Med.* **2011**, 17, 860.
142. May, P., May, E. *Oncogene.* **1999**, 18, 7621.
143. Yang, A., McKeon, F. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, 1, 199.
144. Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrar, P., McKeon, F., Caput, D. *Cell.* **1997**, 90, 809.
145. Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Chen, X. *Cancer Res.* **1998**, 58, 5061.
146. Angers, S., Moon, R.T. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, 10, 468.
147. Chera S, Ghila L, Dobretz K, Wenger Y, Bauer C, Buzgariu W et al. *Dev Cell.* **2009**, 17, 279.
148. Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., et al. *Cell.* **2009**, 136, 1136
149. Oltvai, Z. N., Millman, C. L., Korsmeyer, S. J. *Cell.* **1993**, 74, 609.
150. Yin, X. M., Oltvai, Z. N., Veis-Novack, D. J., Linette, G. P., Korsmeyer, S. J. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1994**, 59, 387.
151. Hsu, Y. T., Wolter, K. G., Youle, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**, 94, 3668.
152. Wolter, K. G., Hsum Y., Smith, C. L., Nechushtan, A., Xi, X., Youle, R. J. *J. Cell Biol.* **1997**, 139, 1281.
153. Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., Borne, C. *Nature.* **1998**, 391, 496.
154. Kharbanda, S., Pandey, P., Yamauchi, T., Kumar, S., Kaneki, M., Kuma, V., Bharti, A., Yuan, Z.M., Ghanem, L., Rana, A., Weichselbaum, R., Johnson, G., Kufe, D. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 4979.
155. Breckenridge, D.G., Xue, D. *Cell Biol.* **2004**, 16, 647.
156. Green, D.R., Reed, J.C. *Anticancer. Res.* **1998**, 281, 1309.
157. Johnson, B. W., Boise, L. H. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18552.

158. Galluzzi, L., Blomgren, K., Kroemer, G. *Nat Rev Neurosci.* **2009**, 10, 481.
159. Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Kroemer, G. *Biochim Biophys Acta.* **2009**, 1787, 402.
160. Breckenridge, D.G., Xue, D. *Cell Biol.* **2004**, 16, 647.
161. Kroemer, G., Dallaporta, B. *Resche-Rigon M. Rev. Physiol.* **1998**, 60, 619.
162. Green, D., Kroemer, G. *Trends Cell Biol.* **1998**, 8, 267.
163. Fantin, V. R., Leder, P. *Cancer research.* **2004**, 64, 329.
164. Hahn, W. C., Weinberg, R. A. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, 2, 331.
165. Kiaris, H., Schally, A.V. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1999**, 221, 87.
166. Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q., Thompson, C. B. *Gene Dev*, **2004**, 18, 1272.
167. Fan ,Y., Bergmann, A. *Dev Cell.* **2008**, 14, 399.
168. Solary, E., Droin, N., Bettaieb, A., Corcos, L., Dimanche-Boitrel, M.T., Garrido, C. *Leukemia* **2000**, 14, 1833.
169. Dartsch, D. C., Schaefer, V., Boldt, S., Kolch W., Marquard, H. *Apoptosis.* **2002**, 7, 537.
170. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., et al. *Cancer Res*, **2001**, 61, 1659.
171. Linder, S., Havelka, A. M., Ueno, T., Shoshan, M. C. *Cancer Lett*, **2004**, 214, 1.
172. Kramer, G., Erdal, H., Mertens, H. J., et al. *Cancer Res*, **2004**, 64, 1751.
173. Reiter, I., Krammer, B., Schwamberger, G. *J. Immunol.* **1999**, 163, 1730.
174. Min-Hsiung, P., Chi-Tang, H. *Chemical Society Reviews*, **2008**, 37, 2558.
175. Proskuryakov S. Y., Konoplyannikov, A. G., Gabai, V. L. *Exp. Cell Res.* **2003**, 283.
176. http://www.leinco.com/general_wb
177. Marzoa, O. G.; Deferrari, J. O.; Thiel, I. M. E. *Carbohzdr. Res.*, **1979**, 73, 323.

8. BIOGRAFIJA



Rođena 16.12.1966. godine u Novom Sadu. Osnovnu kao i srednju školu završila u Novom Sadu. Diplomirala na Prirodno matematičkom fakultetu u Novom Sadu (Odsek za hemiju, smer Diplomirani hemičar bioorganskog smera). Diplomski rad iz oblasti Organske hemije odbranila sa ocenom 10. Magistarski rad odbranila 2009. iz oblasti Hemija na PMF u Novom Sadu. Na Farmaceutskom fakultetu u Beogradu završila specijalističke studije 2004. godine (smer Toksikološka hemija).

Od septembra 1993. godine do decembra 1995. godine zaposlena u OŠ "PRVE VOJVOĐANSKE BRIGADE" u Novom Sadu. Od januara 1996. godine radi u Zavodu za eksperimentalnu onkologiju, u Institutu za

onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici.

Autor i koautor četrdeset naučnih radova, od kojih su petnaest objavljeni u vodećim međunarodnim časopisima (M21), dvanaest objavljenih u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), deset objavljenih u međunarodnim časopisima (M23), četrdesetdevet naučna saopštenja, od kojih je trideset objavljeno na međunarodnom naučnom skupu.

Vesna Kojić

NOVI SAD, 2012. godine.

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija
TD

Tip zapisa: Tekstualni štampani material
TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija
VR

Autor: Vesna V. Kojič, magistar PMF-a u Novom Sadu
AU

Mentor: Dr Mirjana Popsavin, red. prof. PMF-a u Novom Sadu
MN

Naslov rada: **Sinteza i detaljna biološka ispitivanja tiazolnih
NR C-nukleozida**

Jezik publikacije: Srpski (latinica)
JP

Jezik izvoda: Srpski
JI

Zemlja publikovanja: Srbija
ZP

Uže geog. područje: Vojvodina
UGP

Godina: 2012.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3
MA

Fizički opis rada: Broj poglavlja: 8. Strana: 147. Lit. citata: 177.
FO Tabela: 2. Shema 25. Slika: 26.

Naučna oblast: Biohemija
NO

Naučna disciplina: Medicinska hemja
ND

Predmetna odrednica/ Ključne reči: Tiazofurin, D-arabinoza, višefazna sinteza,
PO aciklični analog tiazofurina, biološka ispitivanja

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, biohemiju i
ČU zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 3,
PMF, Novi Sad

Važna napomena: Nema
VN

Izvod:
IZ

U radu je ostvarena totalna sinteza novih acikličnih tiazolnih C-nukleozide sa dvostrukom vezom i 2',3'-dideoksi funkcijom u šećernoj komponenti. Ostvarena višefazna sinteza pomenutih acikličnih analoga tiazofurina zasnovana je na D-arabinozi kao hiralom prekursoru. Ispitana je *in vitro* citotoksična aktivnost novosintetizovanih nukleozida prema ćelijskim linijama K562, HL-60, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Raji, PC3, Jurkat, Hs 294T i MRC-5, kao i provera ćelijskih mehanizama koji su u osnovi uočenog citotoksičnog potencijala novosintetisanih analoga u odnosu na tiazofurin kao referentno jedinjenje.

Datum prihvatanja teme od strane 18. 07. 2012.

NN veća:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik:

Dr Ksenija Kuhajda, red. prof. PMF-a u Novom Sadu, predsednik

Član:

Dr Mirjana Popsavin, red. prof. PMF-a u Novom Sadu, mentor

Član:

Dr Svetlana Trivić, red. prof. PMF-a u Novom Sadu, član

Dr Gordana Četković, red. prof. Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS
KEY WORDS DOCUMENTATION**

Accession number:
ANO

Identification number:
INO

Document type: Monograph publication
DT

Type of record: Textual printed material
TR

Content code: Doctoral thesis
CC

Author: Vesna V Kojić
AU

Mentor/comentor: Dr Mirjana Popsavin, Full Professor
MN

Title: Synthesis and detailed biological testing of thiazole C-nucleozides
TI

Language of text: Serbian (Latin alphabet)
LT

Language of abstract: English
LA

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2012
PY

Publisher: Author's reprint
PU

Publication place: Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
PP

Physical description: Number of chapters: 8 Pages: 147. References: 177. Tables: 2. Sema: 25. Figures: 26.
PD

Scientific field: Biochemistry
SF

Scientific discipline: Medicinal chemistry
SD

Subject/ Key words: Tiazofurin, D-arabinose, multistep synthesis, an acyclic analog tiazofurin, biological evaluation
SKW

UC

Holding data: Library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad
HD

*Note:*N None

Abstract:
AB

A total synthesis of new acyclic thiazole C-nucleozides bearing a double bond or 2',3'-dideoxy functionality in the sugar moiety was achieved in this work. The multi-step synthesis of the mentioned thiazofurin analogues is based on D-arabinose as a chiral precursor. In vitro cytotoxic activity of newly synthesized compounds was evaluated against the following cell lines: K562, HL-60, HT-29, MCF-7, MDA-MB-231, HeLa, Raji, PC3, Jurkat, Hs 294T and MRC-5. A study of cell mechanisms underlying the significant cytotoxic potential of these molecules was carried out and the results were compared to thiazofurin that served as a referent compound in all biological testings.

Accepted by the Scientific Board:

ASB

Defended on:

DE

*Thesis defend board:***DB**

President:

Dr Ksenija Kuhajda, Full Professor, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

Mentor:

Dr Mirjana Popsavin, Full Professor, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

Member:

Dr Svetlana Trivić, Full Professor, Faculty of Sciences
University of Novi Sad

Member:

Dr Gordana Četković, Full Professor, Faculty of
Technology University of Novi Sad