



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Емилија Н. Миловић

**СИНТЕЗА, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА И
ИСПИТИВАЊЕ БИОЛОШКЕ
АКТИВНОСТИ ОДАБРАНИХ ДЕРИВАТА
ТЕТРАХИДРОПИРИМИДИНА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2025.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Emilija N. Milović

**SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND
BIOLOGICAL EXAMINATION OF
SELECTED TETRAHYDOPYRIMIDINES**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2025

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Емилија Миловић
Датум и место рођења: 04.11.1995., Крагујевац
Садашње запослење: Истраживач-сарадник, Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу
Докторска дисертација
Наслов: <i>Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности одабраних деривата тетрахидропиримидина</i>
Број страница: 204
Број слика: 149
Број библиографских података: 313
Установа и место где је рад израђен: Институт за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и Институт за информационе технологије Крагујевац Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): Хемијске науке (547)
Ментор: Др Ненад Јанковић, научни саветник, Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације:
Број одлуке: IV-01-754/6, датум: 12.10.2022.

Захвалница

Ова докторска дисертација је рађена у Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и Институту за информационе технологије Крагујевац Универзитета у Крагујевцу под менторством научног саветника др Ненада Јанковића.

Свом ментору упућујем најискренију захвалност на указаном поверењу, предложеној теми докторске дисертације, као и на стручним саветима и несебично подељеном знању. Хвала на свему! Радујем се будућој сарадњи и заједничким успесима.

Захваљујем се свим члановима комисије на конструктивним сугестијама и коментарима који су допринели да ова дисертација добије свој најбољи облик.

Посебну захвалност упућујем сарадницима који су својим радом и залагањем допринели квалитету истраживања, а нарочито др Татјани Станојковић са Института за онкологију и радиологију Србије и њеној истраживачкој групи на испитивању цитотоксичности.

Својим пријатељима се неизмерно захваљујем што су били уз мене и радовали се сваком мом успеху.

Бескрајно хвала мом Николи на безусловној љубави, разумевању и подршци.

Највећу захвалност дугујем својој породици, родитељима Татјани и Небојши, и браћи Лазару и Душану. Ваша љубав, подршка и вера у мене носили су ме кроз сваки корак овог пута!

Емилија

Апстракт

У оквиру ове докторске дисертације описани су синтеза, карактеризација и испитивање биолошког потенцијала деривата тетрахидропиримидина добијених применом Biginelli-јеве реакције. У оквиру три серије једињења (**A**, **B** и **V**) синтетисано је укупно 44 нових деривата чије су структуре потврђене применом ^1H и ^{13}C NMR и инфрацрвене (IR) спектроскопије и масене (ESI-MS) спектрометрије. Биолошка активност добијених једињења испитивана је *in vitro* на различитим ћелијским линијама тумора: серија **A** на HeLa, A549 и LS174, док су једињења серија **B** и **V** тестирана на HeLa, K562 и MDA-MB-231 ћелијским линијама. Поред тога, анализирана је и токсичност према здравој MRC-5 ћелијској линији као и потенцијални механизми деловања. Једињења серије **A** показала су умерену активност према HeLa ћелијској линији ($\text{IC}_{50} = 10,36\text{--}51,76\text{ }\mu\text{M}$), док су једињења серије **V** испољила значајну микромоларну активност према K562 ћелијској линији ($\text{IC}_{50} = 1,66\text{--}6,12\text{ }\mu\text{M}$). За једињења **B2–11** испитивана је антимикуробна активност према одабраним врстама бактерија и гљивица. Једињење **B18** је одабрано за даља *in vivo* истраживања на експерименталним животињама, која су обухватала процену акутне оралне токсичности, генотоксичности и биохемијских параметара серума. Резултати су показали да примењена доза једињења **B18** није изазвала знаке тровања ни смрт животиња. Такође, алкални Комет тест је показао да при најнижој дози од 5 mg/kg т.м. једињење **B18** није изазвало оштећење ДНК, већ је имало значајан протективни ефекат код оштећења ДНК изазваних угљен-тетрахлоридом. Креирани 3D-QSAR је открио кључне структурне параметре активности и омогућио смернице за даљу дериватизацију. Испитивања интеракције са ДНК различитим техникама показала су да се једињења везују у мали жлеб ДНК хеликса, што је потврђено и молекулским докингом.

Кључне речи

- Органска синтеза
- Медицинска хемија
- Biginelli-јева реакција
- Тетрахидропиримидини
- Цитотоксичност
- Генотоксичност/Антигенотоксичност
- 3D-QSAR

Abstract

This doctoral thesis describes the synthesis, characterization, and biological evaluation of tetrahydropyrimidine derivatives obtained via the Biginelli reaction. Three series (**A**, **B**, and **C**) of 44 different compounds were synthesized and characterized by ^1H and ^{13}C NMR and infrared (IR) spectroscopy, and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The biological activity of compounds was examined on different cancer cell lines *in vitro*: serie **A** was tested on HeLa, A549, and LS174 cell lines, whereas series **B** and **C** were evaluated on HeLa, K562, and MDA-MB-231 cells. Moreover, compounds were also tested on normal lung fibroblasts (MRC-5). Compounds from serie **A** exhibited moderate activity against HeLa cells ($\text{IC}_{50} = 10.36\text{--}51.76\ \mu\text{M}$) whereas those from serie **B** displayed significant activity against K562 cells ($\text{IC}_{50} = 1.66\text{--}6.12\ \mu\text{M}$). Additionally, compounds **B2–11** were evaluated for antimicrobial activity against selected bacteria and fungi. Compound **B18** was chosen for further *in vivo* studies, including examination of acute oral toxicity, genotoxicity, and biochemical parameters in the serum of experimental animals. Compound **B18** showed no toxic effects or lethality at the applied dose. After comet assays, a dose of 5 mg/kg b.w. of compound **B18** exhibited a protective effect against CCl_4 -induced DNA damage. A 3D-QSAR model provided valuable insights into the structure–activity relationship and suggested directions for further optimization via molecular derivatization. DNA-binding studies, supported by molecular docking analysis, revealed interactions within the minor groove of the DNA helix.

Keywords

- Organic synthesis
- Medicinal chemistry
- Biginelli reaction
- Tetrahydropyrimidines
- Cytotoxicity
- Genotoxicity/Antigenotoxicity
- 3D-QSAR

Садржај

1. Општи део.....	1
1.1. Увод.....	2
1.2. Историјски преглед и откриће Biginelli-јеве реакције.....	3
1.3. Механизам Biginelli-јеве реакције.....	5
1.4. Синтеза тетрахидропиримидина.....	9
1.4.1. Примена органокатализатора у Biginelli-јевој реакцији.....	12
1.4.2. Јонске течности (IL) и дубоко еутектичке смеше (DES) у Biginelli-јевој реакцији.....	19
1.4.3. Вода као реакциони медијум.....	25
1.5. Биолошка активност деривата тетрахидропиримидина.....	28
1.5.1. Антитуморска и антипролиферативна активност.....	29
1.5.2. Антиоксидативна активност.....	35
1.5.3. Антимикробна активност.....	36
1.5.4. Тетрахидропиримидини као блокатори калцијумових канала.....	39
1.5.5. Антивирусна активност.....	43
1.5.6. Остала значајна биолошка дејства.....	46
1.6. Biginelli-јеве реакција у синтези полимера.....	48
1.7. Пријављени патенти.....	51
2. Резултати и дискусија.....	55
2.1. Увод.....	56
2.2. Једињења серије А.....	57
2.2.1. Синтеза и карактеризација једињења серије А и предложени механизам реакције.....	58
2.2.2. Кристалографска анализа једињења А1 и А5.....	61
2.2.3. Цитотоксична активност једињења серије А и SAR анализа.....	64
2.2.4. Интеракције са биомолекулима.....	65
2.2.5. Молекулски докинг.....	69
2.2.6. 3D-QSAR анализа.....	71
2.3. Синтеза и карактеризација једињења серије Б.....	76
2.3.1. Кристалографска анализа једињења Б11 и Б16.....	78
2.3.2. Цитотоксична активност једињења серије Б.....	84
2.3.3. SAR анализа.....	85
2.3.4. Ефекти одабраних једињења на ћелијски циклус.....	86
2.3.5. Ефекти претходног третмана специфичним инхибиторима каспазе на K562 ћелије у subG1 фази.....	87
2.3.6. Морфолошка анализа ћелијске смрти HeLa ћелија.....	88
2.3.7. Ефекти одабраних једињења на интерцелуларни ниво ROS у K562 ћелијама.....	89

2.3.8.	Ефекти одабраних једињења на нивое експресије гена и микроРНК.....	89
2.3.9.	Антимикробна активност одабраних једињења серије Б.....	90
2.3.10.	Инхибиција α -глюкозидазе.....	91
2.3.11.	Одређивање фармакокинетичких дескриптора	92
2.3.12.	Молекулски докинг	95
2.3.13.	Интеракције са ДНК.....	97
2.3.14.	Студија акутне оралне токсичности	100
2.3.15.	Генотоксично и антигенотоксично деловање једињења Б18	101
2.3.16.	Биохемијски параметри у серуму експерименталних животиња	102
2.3.17.	Параметри оксидативног стреса код експерименталних животиња	104
2.3.18.	Молекулски докинг: интеракције са ензимима CAT, GPx4 и SOD	105
2.4.	Једињења серије В.....	107
2.4.1.	Синтеза и карактеризација једињења серије В	107
2.4.2.	Рендгенска структурна анализа једињења В4.....	108
2.4.3.	Цитотоксична активност једињења серије В	110
2.4.4.	SAR анализа	111
2.4.5.	Ефекти одабраних једињења на ћелијски циклус K562 ћелија	111
2.4.6.	Ефекти одабраних једињења на ћелијску смрт.....	112
2.4.7.	Ефекти одабраних једињења на интрацелуларни ниво ROS	114
2.4.8.	Ефекти одабраних једињења на нивое експресије гена и микроРНК.....	115
3.	Експериментални део	117
3.1.	Опште напомене, хемикалије и реагенси.....	118
3.2.	Поступак за синтезу једињења серије А	119
3.3.	Синтеза интермедијера ИНТ3 и ИНТ3- <i>d</i>	119
3.4.	Спектроскопски подаци за једињења серије А	119
3.5.	Поступак за добијање 5-бромованилина (АЛД11).....	122
3.6.	Поступак за добијање 5-јодованилина (АЛД12).....	122
3.7.	Поступак за добијање 5-нитрованилина (АЛД13)	122
3.8.	Општа процедура за ациловање фенолне групе ванилина и њему сродних ароматичних алдехида	123
3.9.	Спектроскопски подаци за естре ванилина и сродних ароматичних алдехида	123
3.10.	Поступак за алкиловање ванилина	125
3.11.	Спектроскопски подаци за <i>O</i> -алкил деривате ванилина	125
3.12.	Поступак за синтезу једињења серије Б.....	126
3.13.	Спектроскопски подаци за једињења серије Б	127
3.14.	Поступак за синтезу једињења серије В	132

3.15.	Спектроскопски подаци за једињења серије В.....	133
3.16.	Кристалографска анализа.....	135
3.17.	<i>In vitro</i> биолошка испитивања	137
3.17.1.	Ћелијске културе	137
3.17.2.	Третман ћелијских линија	137
3.17.3.	Одређивање преживљавања ћелија	137
3.17.4.	Проточна цитометрија	138
3.17.5.	Анализа експресије гена	139
3.17.6.	Одређивање односа ћелија које су у апоптози и некрози методом FITC Annexin V/пропидијум јодид бојења.....	139
3.17.7.	Одређивање антимикуробне активности	139
3.17.8.	Испитивање инхибиције α -глюкозидазе	140
3.18.	Интеракције са макромолекулама.....	141
3.18.1.	Флуоресцентна мерења.....	141
3.18.2.	Мерење вискозности	141
3.18.3.	Мерења диференцијалном скенирајућом калориметријом (DSC).....	141
3.19.	Припрема једињења за 3D-QSAR студију	142
3.19.1.	Креирање 3D-QSAR модела	143
3.19.2.	Избор једињења за тренинг и тест сет.....	143
3.19.3.	Интерна и екстерна валидација модела.....	144
3.20.	Молекулски докинг.....	145
3.21.	Фармакокинетичка испитивања.....	146
3.21.1.	Хроматографија	146
3.21.2.	Израчунавање молекулских дескриптора	147
3.22.	<i>In vivo</i> биолошка испитивања	149
3.22.1.	Акутна орална токсичност.....	149
3.22.2.	Експерименталне животиње и дизајн експеримената за испитивање (анти)генотоксичности, биохемијских и оксидативних параметара	150
3.22.3.	Одређивање степена оштећења ДНК применом Комет-теста.....	150
3.22.4.	Одређивање биохемијских маркера у серуму.....	150
3.22.5.	Одређивање маркера оксидативног стреса у хомогенатима ткива јетре	151
3.22.6.	Статистичка анализа	151
4.	Закључак.....	152
5.	Литература	155
6.	Прилог	174
6.1.	^1H и ^{13}C NMR спектри за релевантна једињења	175

6.2. Публиковани научни radови у којима су представљени резултати докторске дисертације.....	188
Листа скраћеница	194
Биографија.....	200

1. Onumtu deo

1.1. Увод

Хемија хетероцикличних једињења заузима значајно место у развоју модерне органске хемије како због њихове виталне улоге у метаболизму човека као саставних делова многих биолошки важних молекула попут нуклеинских киселина и витамина, тако и због широке примене у агрохемијској и фармацеутској индустрији. Поред тога, врло често су хетероциклична једињења полазне супстанце у синтези комплекснијих органских једињења која налазе разноврсне примене. Нека од хетероцикличних једињења користе се у лечењу многобројних обољења, као инхибитори корозије, у дезинфекционим средствима, пестицидима, бојама, пластици и др.^{1,2}

Хетероциклична једињења која у свом прстену садрже азотов атом представљају једну од најзначајнијих структурних компоненти фармацеутских производа. Анализом базе лекова одобрених од стране Управе за храну и лекове (енг. *Food and Drug Administration*, FDA) долази се до податка да 59% лекова на бази малих молекула (молекулске масе приближно 900 Da) у својој структури садрже азот у прстену.³ Најзаступљенији хетероциклични систем са азотом у структури лекова на бази малих молекула је пиперидин, док су пиридин и пиперазин на другом и трећем месту. Од шесточланих аза-хетероцикличних ароматичних једињења, пиридин, пиримидин, хиназолин, хинолин и пиразин се појављују у 9% лекова од укупног броја јединствених структура у бази FDA. Од тих 9% лекова, више од 60% структура садржи пиридин, а 16% садржи пиримидин.³

Због велике заступљености пиримидинске структуре у лековима, као и своје разноликости и лаке доступности, тетрахидропиримидини (претходни назив: дихидропиримидини) последњих деценија заузимају посебно место у многим научним областима. Деривати тетрахидропиримидина се могу синтетисати различитим методама, али како се углавном добијају као производ Biginelli-јеве реакције, у литератури се често називају „Biginelli-јева једињења“ (енг. *Biginelli hybrids/adducts*). Biginelli-јева реакција је једна од првих и најстаријих мултикомпонентних реакција (енг. *multicomponent reactions*, MCR). Овај тип хемијских реакција последњих година има све већи значај за органску и медицинску хемију, јер се предност даје брзим и ефикасним процесима. Pietro Biginelli је 1893. године објавио своју прву мултикомпонентну реакцију која је представљала једноставну кисело катализовану кондензацију етил ацетоацетата, бензалдехида и урее у етанолу уз рефлукс, а која је као производ дала тетрахидропиримидин (Схема 1).

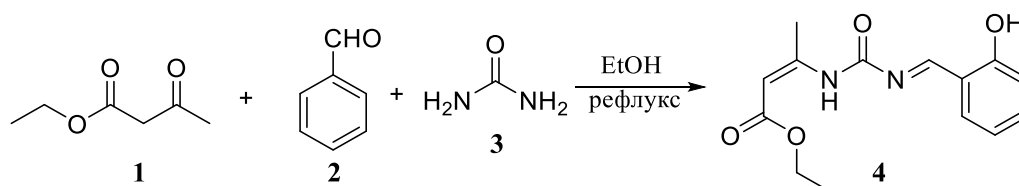


Схема 1. Biginelli-јева реакција.

Ова реакција је годинама занемаривана, а интересовање за њу је почело тек сто година након њеног открића. Чињеница да тетрахидропиримидини имају сличну структуру као веома важни инхибитори калцијумових канала нифедипинског типа, допринела је популаризацији ове реакције. Поред тога, када је први пут објављен рад у коме је описано дејство монастрола,⁴ почело је још интензивније да се ради на синтези аналога који би се показали ефикаснијим у лечењу канцера. О механизму реакције се још увек полемише и постоји много радова на ту тему, али за сада је потврђено да се производ

добија једним од три могућа механистичка пута (иминијум, енамино или Knoevenagel-ов пут), а који ће бити најзаступљенији и најефикаснији, зависи од природе реактанта и услова реакције, као и од методе која се користи за праћење реакције и испитивање механизма.

1.2. Историјски преглед и откриће Biginelli-јеве реакције

Pietro Biginelli (1860–1937) је био италијански хемичар рођен у малом селу у тадашњој Краљевини Сардинији. Уписао се на Универзитет у Торину 1881. године где су његов ментор, Icilio Guareschi, и он радили на полихалогеновању нафталена. Дипломирао је на Фармацеутском факултету 1886. године, а студију о нафталену је објавио годину дана касније. Biginelli се преселио из Милана у Фиренцу у октобру 1890. године и тамо остао наредних седам година. У Фиренцу се преселио јер је био заинтересован за рад већ познатог научника Hugo Schiff-a (1834–1915) и желео је да ради са њим у једној од најбољих хемијских лабораторија у то време у Италији. Осим његовог суштинског доприноса многим аспектима хемије, Schiff је такође био талентовани иноватор у прављењу лабораторијске опреме. Иако је Schiff био познат по захтевном и тешком карактеру, Biginelli је, захваљујући пријатељству свог ментора из Торина са Schiffom, добио прилику да оствари своју жељу и започне рад у његовој лабораторији.

Почетком 1890-их, у Schiff-овим лабораторијама се активно радило, тако да је Biginelli између осталог присуствовао и открићу Pellizzari-јеве синтезе 1,2,4-триазола. Годину дана након доласка у Фиренцу, Biginelli је послао два дела својих прелиминарних резултата у *Gazzetta Chimica Italiana* и *Berichte*, а резултати тог рада су данас познати као Biginelli-јева реакција. Потпуни извештаји о реакцији су на крају објављени у *Gazzetta Chimica Italiana* 1895. године⁵ и у *Berichte* следеће године, а Biginelli је био једини аутор оба рада.⁶

Откриће Biginelli-јеве вишекомпонентне реакције ослања се на раније радове Schiff-a и Behrend-a у којима су се бавили применом уреје као замене за амин у реакцијама карбонилних једињења. Behrend је открио да уреа **3** даје стабилан производ са етил ацетоацетатом **1**, док је Schiff у својим експериментима показао да уреа **3** може да реагује са ароматичним и алифатичним алдехидима **6** дајући симетричне бисуреиде **7** (Схема 2 и Схема 3).

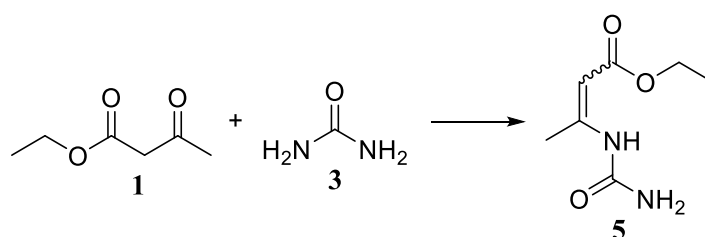


Схема 2. Behrend-ова реакција етил ацетоацетата и уреје.

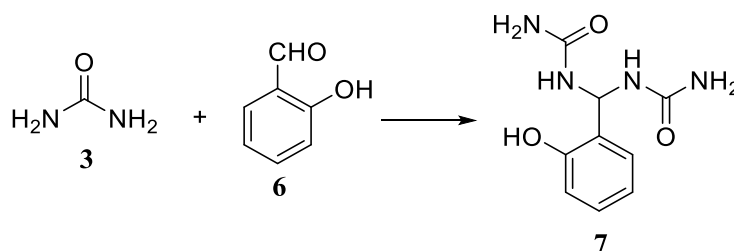


Схема 3. Schiff-ова реакција уреје и салицилалдехида.

Након ових запажања, Biginelli је испитивао реакцију етил ацетоацетата и урее у присуству алдехида (**Схема 1**). Реакција урее, салицилалдехида и етил ацетоацетата у апсолутном етанолу током два сата рефлукса, дала је талог који је испрао хладним етанолом, а након тога и прекристалисао из истог растварача. Елементална анализа талоба ($C_{14}H_{16}N_2O_3$) показала је да су сви атоми из реактанта инкорпорирани у продукт коме је приписана линеарна структура комбиновањем претходних сазнања о реактивности појединачних електрофилних врста (алдехида и етил ацетоацетата са уреем).

Како би доказао своју претпостављену структуру производа, Biginelli-јева идеја је била да испита могуће комбинације реактанта као низ различитих појединачних процеса. Сва три реагенса могу да се комбинују независно, било у односу 1:1 (етил ацетоацетат/уреа или етил ацетоацетат/алдехид) или 2:1 (уреа/алдехид) што је сумирано на **Схеми 4**.

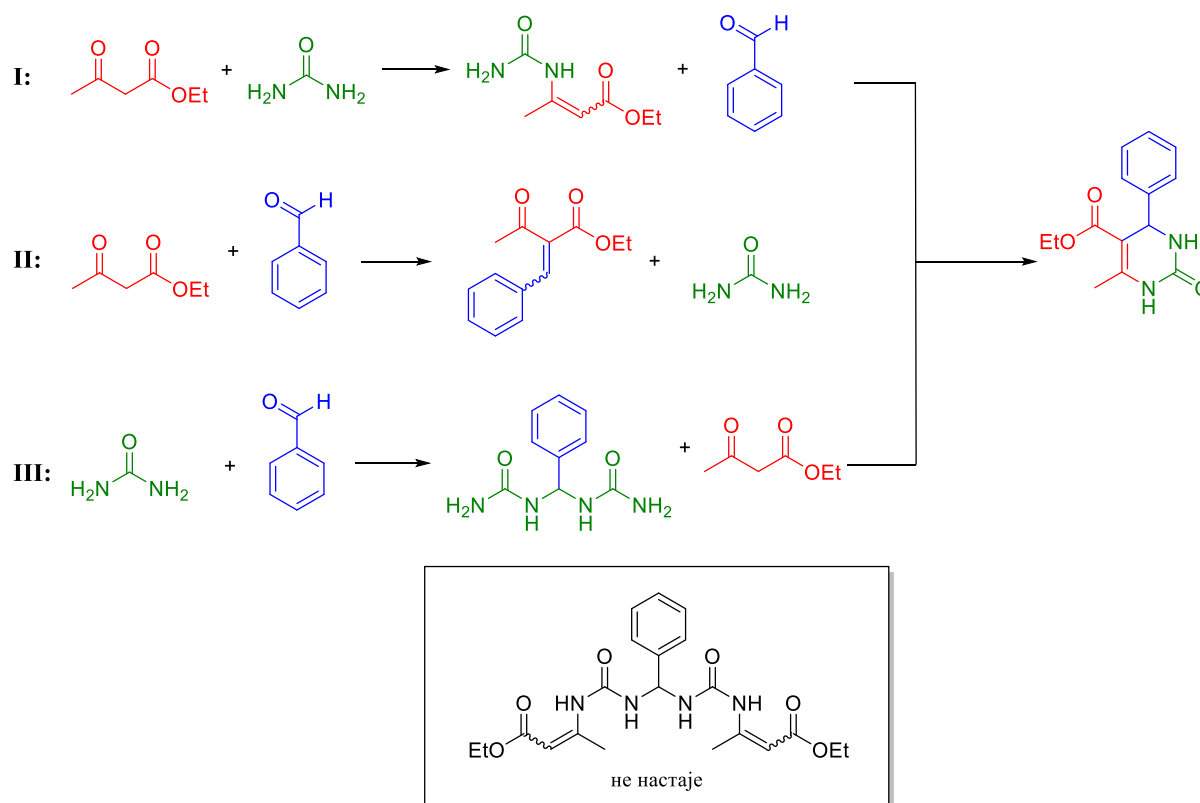


Схема 4. Потврда структуре производа шематски приказана кроз серију бинарних реакционих корака.⁶

Производ реакције урее и етил ацетоацетата може лако даље да реагује са алдехидом и да да исти производ као у случају трокомпонентне реакције. Такође, супротно очекивањима, продукт реакције урее и алдехида (2:1) са етил ацетоацетатом не даје Schiff-ово једињење **7** ни након шест сати рефлукса у етанолу, већ се добија тетрахидропиримидин. Исти производ је добијен и у реакцији бензилиденског адукта (производ реакције етил ацетоацетата и бензалдехида) и урее.

Biginelli је побољшао принос своје вишекомпонентне реакције додавањем Brønsted-ове киселине (хлороводоничне киселине) и доказао је успешност реакције са великим низом различитих алдехида (алифатични алдехида, α,β -незасићени алдехида и фурфурал). Међутим, на прелазу из XIX у XX век, реакције кондензације урее су сматране „старомодним“ што је такође један од разлога због чега је Biginelli-јева реакција

остала занемарена дуже време. Schiff-ова пажња је тих година била усмерена на аминокиселине и њихове реакције са формалдехидом, а занимљиво је рећи да синтеза пиримидина није чак поменута ни у кратком Biginelli-јевом некрологу из 1937. године у *La Chimica e l'Industria*.

1.3. Механизам Biginelli-јеве реакције

Упркос значају и тренутном интересовању за тетрахидропиримидине, механизам класичне трокомпонентне Biginelli-јеве реакције предмет је дискусије годинама уназад и још увек није са сигурношћу потпуно разјашњен. Како је Biginelli-јева реакција трокомпонентна кондензација алдехида, 1,3-дикарбонил једињења и (тио)уреа, имајући на уму реактивност сваког реактанта појединачно, реакција би требало да се одвија на један од следећих начина:

1. Кондензација алдехида и уреа преко иминијум интермедијера и затим нуклеофилна адиција 1,3-дикарбонил једињења.
2. Нуклеофилна кондензација уреа и 1,3-дикарбонил једињења која даје енамино интермедијер који затим реагује са алдехидом.
3. Knoevenagel-ова реакција алдехида и 1,3-дикарбонил једињења у којој се формира карбенијум јон који даље реагује са уреом.

Први покушај да се разјасни стварни механизам реакције се спомиње у раним радовима Folkers-а и Johnson-а 1933. године, где су предложили да је бисурид **17a** (Схема 8) главни интермедијер који се формира у првом кораку реакције као производ кондензације бензалдехида **2** и уреа **3a**.⁷

Sweet и Fissekis су пак сматрали да је реч о другачијем механизму у коме је карбенијум јон **8** настао кисело-катализованом алдолном реакцијом бензалдехида **2** са етил ацетоацетатом **1**, кључни интермедијер који се формира у првом кораку реакције (Схема 5).⁸

Карпе је 90-их година прошлог века спровео детаљнија истраживања помоћу ¹H и ¹³C спектроскопије нуклеарне магнетне резонанце (енг. *nuclear magnetic resonance*, NMR) како би добио више података о интермедијерима који настају током реакције и коначно потврдио који је од ова два поменута предлога тачан.⁹ Карпе-ово истраживање се заснивало на извођењу реакција између уреа/алдехида, етил ацетоацетата/уреа и алдехида/етил ацетоацетата у CD₃OH као растварачу на собној температури у присуству каталитичке количине HCl.

У механизму који су предложили Sweet и Fissekis, кисело-катализована алдолна кондензација је први корак Biginelli-јеве реакције. Бензалдехид **2** и етил ацетоацетат **1** реагују у присуству киселине дајући одговарајући алдол **7**, који се затим дехидратише до карбенијум јона **8**. Затим карбенијум јон **8** реагује са уреом **3a** или *N*-метилуреом **3b** дајући као производе уреиде **9**, који на крају интрамолекулском циклизацијом дају жељени производ **4**. Ауторима је као главна чињеница која их је подстакла да на поменути начин објасне механизам, била реакција независно припремљеног енона **10** са *N*-метилуреом **3b** у киселим условима која такође као крајњи производ даје пиримидин **4b**, али у нешто мањем приносу.⁸ Према Sweet-у и Fissekis-у, протоновање енона **10** регенерише карбокатјонски интермедијер **8** који затим може да реагује са уреом **3a** или *N*-метилуреом **3b**. Такође је сматрано значајним то што се у реакцији енона **10** са *N*-метилуреом **3b** добија искључиво *N1*-метил дериват **4b**, а не *N3*-супституисани изомер **14b**, што одговара региохемијској специфичности уоченој у трокомпонентној Biginelli-јевој реакцији етил ацетоацетата **1**, бензалдехида **2** и *N*-метилуреа **3b**.^{7,10}

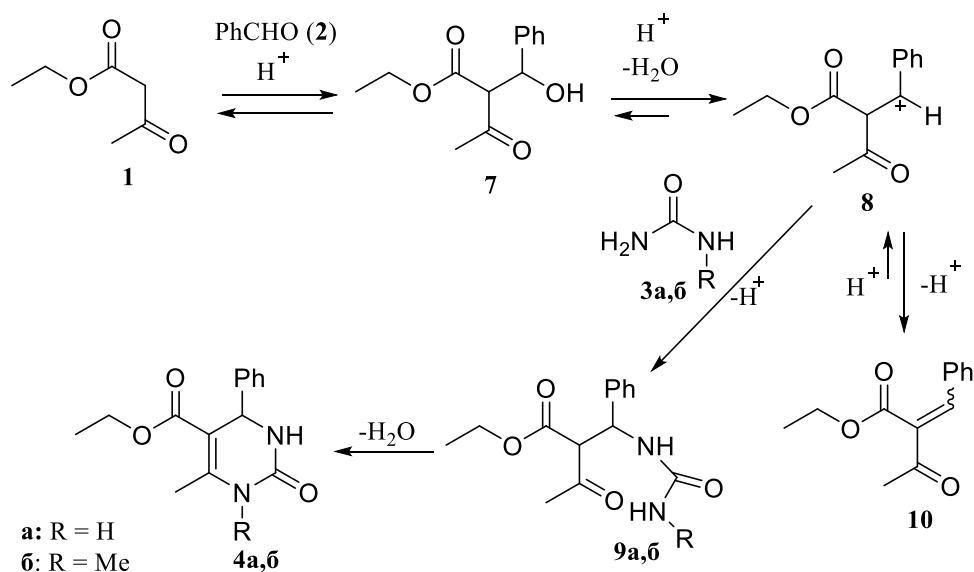


Схема 5. Предложени механизам Sweet-a и Fissekis-a.

Међутим, предложени механизнички пут Sweet-a и Fissekis-a у коме је карбенијум јон **8** кључни интермедијер је ипак мало вероватан. Карпе и сарадници су испитивали кисело-катализовану алдолну реакцију бензалдехида **2** и етил ацетоацетата **1** при типичним условима Biginelli-јеве реакције како су раније предложили Sweet и Fissekis. Иако су алдолне реакције најчешће базно катализоване, не може потпуно да се искључи могућност кисело-катализоване алдолне реакције бензалдехида са 1,3-дикарбонил једињењима попут етил ацетоацетата. Међутим, добро је познато да су у случају киселе катализе реакциони производи алдолне реакције у већини случајева α,β -незасићена карбонилна једињења (**10**), а не алдони. Након праћења реакције бензалдехида **2** и етил ацетоацетата **1** у $\text{CD}_3\text{OH}/\text{HCl}$ помоћу ^1H и ^{13}C NMR спектроскопије, није било могуће добити доказе за алдолну реакцију или било коју другу реакцију између ове две компоненте на собној температури. Чињеница да бензалдехид **2** и етил ацетоацетат **1** не реагују у условима у којима се сама Biginelli-јева кондензација несметано одвија, искључује механизам у коме је карбенијум јон кључни интермедијер. Могућност настанка интермедијера **8** у Biginelli-јевој кондензацији изгледа још мање вероватна ако се узме у обзир случај у коме се уместо урее као реагенс користи тиуреа. Познато је да и тиуреа **11a**¹⁰ и *N*-метилтиуреа **11b**¹¹ дају тетрахидропиримидине када реагују са бензалдехидом **2** и етил ацетоацетатом **1** при стандардним Biginelli-јевим условима.^{7,10,11} Насупрот томе, реакција енона **10** са тиуреом **11a** или *N*-метилтиуреом **11b** при киселим условима, односно при условима у којима се према Sweet-у и Fissekis-у ствара карбенијум јон **8**,⁸ даје искључиво изомерни 2-амино-1,3-тиазин **12a,6** у одличним приносима (Схема 6).

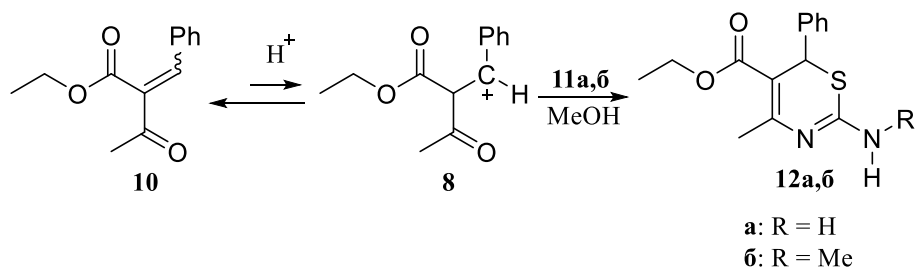


Схема 6. Фаворизовано формирање 2-амино-1,3-тиазина.

Структуре тиазина **12a,b** потврђене су спектроскопским методама.¹¹ У реакцији енона **10** са *N*-метилуреом,⁸ време реакције је знатно дуже (2 недеље) и приноси су умерени, док су реакциона времена енона и тиоурее **11** много краћа (3-5 сати), а то се може објаснити тиме да је сумпор знатно нуклеофилнији од кисеоника. Како се у трокомпонентној Biginelli-јевој реакцији уз употребу тиоурее тиазински производ **12** не добија, скоро да се у потпуности може одбацити механизам у коме је карбокатијон могући интермедијер.

Folkers и Johnson су већ разматрали такозвани „уреидо-кротонатни механизам“ (Схема 7) али је тај предлог одбачен, јер је показано да производ кондензације етил ацетоацетата **1** и урее **3a** брзо хидролизује при типичним условима Biginelli-јеве реакције (EtOH, HCl).⁷ Иако је уреидо-кротонат **13a** осетљив на хидролизу, не може се искључити као интермедијер у Biginelli-јевој реакцији. Водећи се тиме, Карпе је поново испитао ову путању (укључујући *N*-метил аналог **13b**). Показало се да независно добијени **13a,b** брзо хидролизују у CD₃OH када су присутне каталитичке количине киселине (и воде). Једињења типа **13a,b** могу да се добију у реакцији **1** и **3a,b** у стриктно анхидрованим условима, тј. након што смеша **1** и **3** неколико дана реагује у ексикатору преко концентроване H₂SO₄. Евидентно је да је при стандардним условима Biginelli-јеве реакције равнотежа далеко померена ка страни етил ацетоацетат/урее (Схема 7).

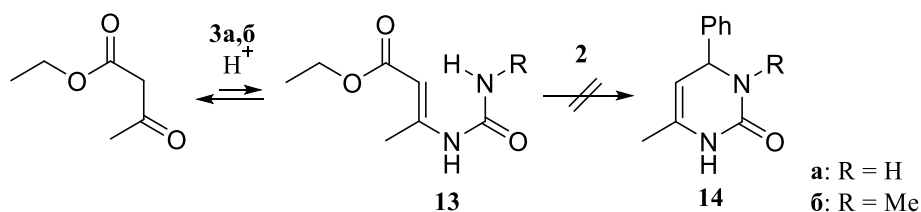


Схема 7. Уреидо-кротонатни механизам.

Када су Карпе и сарадници размотрили механистички предлог Folkers-а и Johnson-а у коме је први корак реакција бензалдехида **2** и урее **3a** (2 mol еквивалента), очекивани производ кондензације, бисуреид **17a**, почео је да се таложи из раствора након 15-20 минута при типичним условима Biginelli-јеве реакције (CH₃OH/HCl) на собној температури (Схема 8). Бисуреид **17a** је такође настао када су коришћене еквимоларне количине две компоненте, а аналогни производ кондензације **17b**¹² је настао када је коришћена *N*-метилуреа **3b** уместо урее **3a**. Међутим, када су ове реакције извели у присуству етил ацетоацетата **1** под идентичним реакционим условима, бисуреиди **17a,b** нису настали, већ су тетрахидропиримидини **4a,b** почели да се полако талоче из реакционе смеше у периоду од два сата (потпуна конверзија је трајала 2 до 3 дана). На основу ових експерименталних резултата, Карпе је предложио механистички концепт у коме додавање урее **3a** или **3b** бензалдехиду **2** доводи до настанка *N*-(1-хидроксibenзил)-урее **15** путем стандардног нуклеофилног напада. Иако је ово вероватно равнотежна реакција, очекује се да ће „хемиаминал“ **15** бити подвргнут брзој дехидратацији у присуству киселине до карбенијум јона који се може формулисати као високо реактивна врста *N*-ацилиминијума **16**. У одсуству 1,3-дикарбонил једињења други еквивалент урее **3a,b** се додаје да би се добио бисуреид **17a,b**, који се због своје ниске растворљивости¹² таложи из реакционе смеше. Међутим, ако је **1** присутан у реакционом медијуму, иминијум јон **16**, вероватно преко свог енолног таутомера реагује са 1,3-дикарбонилом, дајући интермедијер **9a,b**, који се затим интрамолекулски циклизује у **4a,b**. Праћење формирања бисуреида **17a,b** из **2** и **3a,b** помоћу ¹H NMR (CD₃OH, HCl) није показало настанак било каквих интермедијера у овом процесу, нпр. типа **13**, како је раније предложено. Претпоставили су да је први корак реакције тај који одређује брзину (спор) и да се накнадна дехидратација катализована киселином и додавање другог еквивалента

урее иминијум јону одвијају брзо што не дозвољава да се **15** таложи. Под типичним Biginelli-јевим условима, ^1H или ^{13}C NMR спектроскопијом не може да се уочи настанак било каквих интермедијера у реакцији етил ацетоацетата **1**, бензалдехида **2** и *N*-метилурее **36**. После приближно 30 минута, сигнали који потичу од коначног производа **46** почели су да се појављују у ^1H NMR спектру и лако су идентификовани, јер су сигнали лепо одвојени од пикова полазних једињења. Како је реакција текла, пикови су постајали све израженији и након 18 сати, постигнуто је 50% конверзије. Експеримент је прекинут у моменту када је **46** почео да се таложи у NMR кивети.

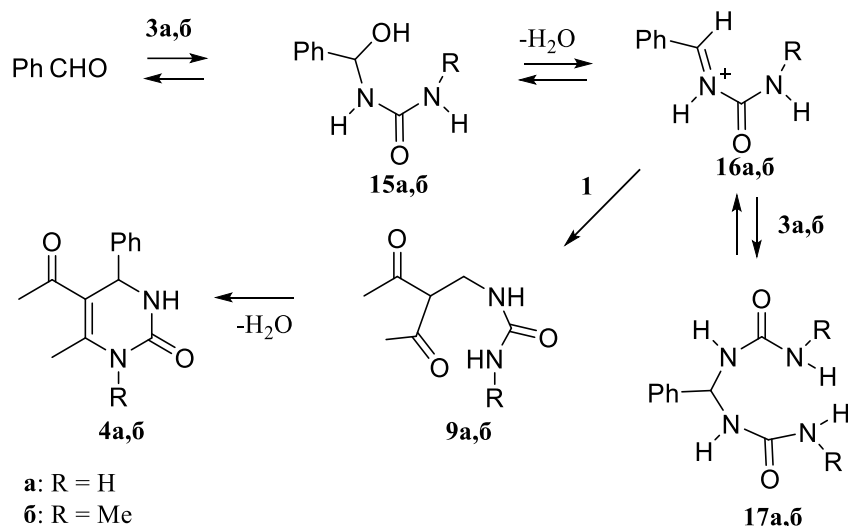
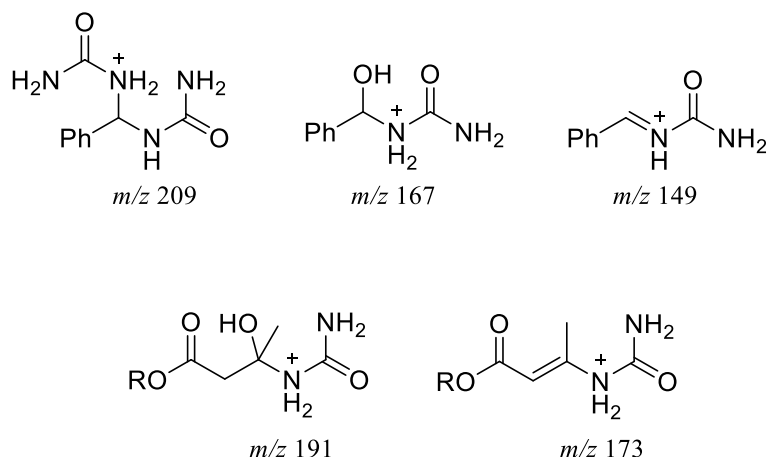


Схема 8. Механизам који је предложио Карпе.

Експерименти које је Карпе урадио су показали да је оригинални предлог механизма који су изнели Folkers и Johnson 1933. године,⁷ који укључује производ кондензације алдехида и урее као кључни интермедијер у Biginelli-јевој кондензацији, тачан. Први корак у овом механизму укључује формирање прекурсора *N*-ацилијум јона **16** насталог у реакцији алдехида и урее.

De Souza и сарадници су испитивали механизам применом масене спектрометрије са електроспреј јонизацијом (енг. *electrospray ionization mass spectrometry*, ESI-MS). У њиховим испитивањима установљено је да је реакција бензалдехида и урее довела до формирања јона са m/z 209, 167 и 149 (Слика 1). Када је реакција извођена у присуству све три компоненте (уреа, ацетоацетат и бензалдехид), исти интермедијери су такође били детектовани.¹³ Поред тога, реакција између урее и ацетоацетата (према енамино механизму) довела је до формирања интермедијера са m/z 191 (Слика 1), уместо очекиваног енамино интермедијера са m/z 173. Према de Souza и сарадницима, одсуство енамино интермедијера у спектру објашњено је његовом краткотрајном стабилношћу у реакционој средини. Ниједан од очекиваних јона који би подржали Knoevenagel-ов механизам није био уочен ESI-MS методом, чак ни након два часа континуираног праћења реакције. Тек након 24 часа су сигнали ових јона постали уочљиви. Претходно наведено указује да Knoevenagel-ов пут није примарно укључен у Biginelli-јеву реакцију.



Слика 1. Детектовани јони интермедијера у Biginelli-јевој реакцији.

Ramos и сарадници су такође испитивали механизам ове реакције применом ESI-MS, NMR спектроскопије и теоријских прорачуна. У свом раду су посебну пажњу посветили испитивању улоге Lewis-ових киселина у присуству јонских течности. И овом приликом је забележено искључиво формирање иминијум-интермедијера (m/z 149) (Слика 1), што указује да се у условима катализе Lewis-овим киселинама и у јонским течностима реакција одвија по иминијум механизму.¹⁴

И остале савремене теоријске студије, укључујући и рад Puripat-a и сарадника из 2015. године, подржавају иминијумски пут као термодинамички и кинетички најповољнији. Аутори су применом компјутерских метода AFIR (енг. *artificial force induced reaction*, AFIR) и DFT (енг. *density functional theory*, DFT) истражили сва три механистичка пута. Показало се да је у иминијумском путу одлучујући корак формирање C–N везе током циклизације, при чему овај корак има најнижу енергетску баријеру (~21,5 kcal/mol). Насупрот томе, у енаминском путу овај корак има вишу енергетску баријеру (~10 kcal/mol више), док је у Knoevenagel-овом путу кључни корак формирање карбенијум-јона, уз енергетску баријеру већу за 6,5 kcal/mol у односу на иминијумски пут.¹⁵

1.4. Синтеза тетрахидропиримидина

Иако је за добијање тетрахидропиримидина, поред класичне Biginelli-јеве синтезе, развијено више синтетичких приступа, Atwal-ова модификација и реакција коју су развили Shutalev и сарадници,¹⁶ су међу реткима које могу да се пореде са једноставним Biginelli-јевим поступком.

Atwal-ова модификација састоји се од синтезе енона у *N,N*-диметилформамиду (DMF), који затим у присуству натријум-хидрогенкарбоната реагује са уреом која има заштитну групу. Уклањањем заштитне групе са урее дејством хлороводоничне киселине добија се коначни производ (Схема 9).

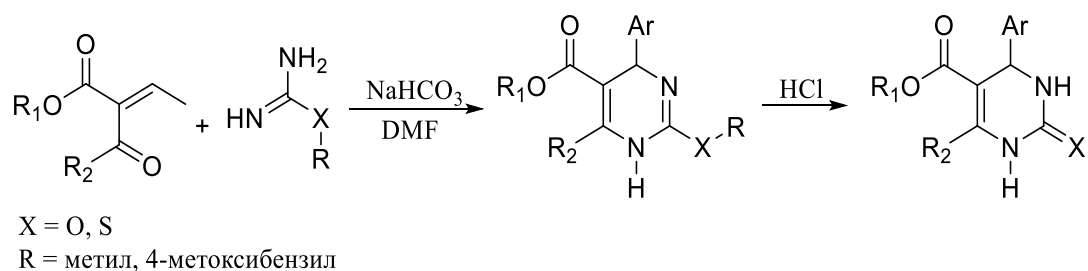


Схема 9. Atwal-ова модификација.

Shutalev и сарадници су показали да Biginelli-јева једињења могу лако да се добију у реакцији α -азидо или α -тозил супституисаних (тио)уреа и натријум енолата β -оксоестара или 1,3-дикарбонилних једињења након чега следи кисело катализована дехидратација добијених 5-ацил-4-хидрокси-6-хидропиридин-2-(тио)на (Схема 10). Обе фазе синтезе се одвијају у благим условима и дају високе приносе.

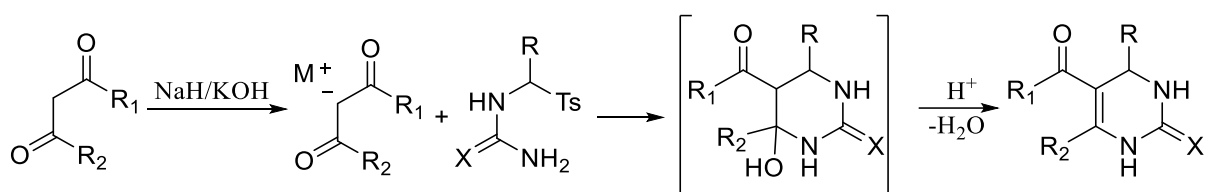


Схема 10. Реакција Shutalev-ог и сарадника.

Како се Biginelli-јева синтеза ипак показала као најједноставнија, научници се баве оптимизацијом оригиналних услова примењујући различите реактанте и катализаторе са циљем добијања жељеног производа високе чистоће и у што већем приносу.

У последње време објављен је велики број унапређених и неконвенционалних метода за Biginelli-јеву синтезу, међу којима су реакције без растварача тзв. *solvent-free* реакције,¹⁷ затим оне које су индуковане ултразвуком,¹⁸ микроталасним зрачењем,¹⁹ светлом²⁰ или уз употребу биокатализатора.²¹ У литератури је забележена примена различитих катализатора, као што су Brønsted-ове киселине: H_3BO_3 ,²² HCOOH , *para*-TsOH- H_2O ,^{23,24} имидазол-1-ил-сирћетна киселина²⁵ и L-(+)-винска киселина-диметилуреа²⁶ или Lewis-ове киселине: LaCl_3 , InCl_3 , BiCl_3 , $\text{Bi}(\text{OTf})_3$, $\text{Mn}(\text{OAc})_3$,²⁷ $\text{Cu}(\text{OTf})_2$,²⁸ CuCl_2 ,²⁹ FeCl_3 , ZrCl_4 , SnCl_2 , $\text{Sr}(\text{OTf})_2$,³⁰ VCl_3 ,³¹ TaBr_5 ,³² $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,³³ $\text{ZrO}_2/\text{SO}_4^{2-}$,³⁴ силика-хлорид ($\text{SiO}_2\text{-Cl}$),³⁵ $\text{Sm}(\text{ClO}_4)_3$,³⁶ $\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,³⁷ $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,³⁸ $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$,³⁹ $\text{Fe}(\text{OTf})_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,⁴⁰ $\text{Ca}(\text{HSO}_4)_2$, $\text{Zn}(\text{HSO}_4)_2$,⁴¹ $\text{SnCl}_2/\text{nano SiO}_2$,⁴² $\text{Cu}(\text{OAc})_2$,⁴³ бакар-цирконитум-хидрогенфосфат $\text{Cu}(\text{OH})_2\text{Zr}(\text{HPO}_4)_2$,⁴⁴ $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, и $\text{Zn}(\text{OTf})_2$.⁴⁵ Други катализатори Biginelli-јеве реакције нађени у литератури су Софталозијанини,⁴⁶ NaHCO_3 ,⁴⁷ зеолити,^{48,49} глине,⁵⁰⁻⁵² органски полимери,^{53,54} органско-неоргански мезопорозни материјали,⁵⁵ јонске течности,⁵⁶⁻⁵⁸ дубоко еутектичке смеше, графит, β -циклодекстрин и др.⁵⁹⁻⁶¹ Обично само један од два енантиомера тетрахиdropиридина показује жељену биолошку активност, због чега су све актуелнији синтетички поступци за добијање енантиомерно чистих тетрахиdropиридина тзв. асиметричне реакције.⁶²⁻⁶⁴

Бројни радови и разноврсност катализатора који се користе у Biginelli-јевој реакцији указују на њен важан значај у хемијској науци. Стога је у Општем делу дат преглед литературе са посебним освртом на еколошки прихватљиве синтетичке поступке. Последњих година, истраживања у области органске синтезе све више су усмерена ка развоју еколошки прихватљивијих процеса. Циљ је да се, где год је то

могуће, избегне употреба токсичних и скувих катализатора, као и испарљивих и штетних органских растварача. Уколико се њихова употреба не може у потпуности избећи, настоје се пронаћи безбедније и одрживије алтернативе.

Зелена хемија је грана хемије која се залаже за примену одрживих метода било да се ради о хемијској синтези или анализи. Базира се на 12 принципа зелене хемије, које су објавили Paul Anastas и John Warner 1998. године (Слика 2).⁶⁵ Иако су Anastas и Warner први предложили принципе зелене хемије и објавили их, сам појам и концепт датира из ранијег периода када је Trevor Kletz у свом раду говорио о примени ефективнијих приступа у хемијском инжењерству и индустрији који би смањили употребу штетних и опасних материја, а сама грана хемије и њени принципи се данас могу применити на све области хемије.



Слика 2. Принципи зелене хемије. Слика је креирана помоћу Biorender.com.

Принципи зелене хемије су:

1. **Превенција стварања отпада:** Боље је спречити стварање отпада него га третирати и уклањати након што се формира.
2. **Искористивост атома:** Концепт осмишљавања синтетичких метода тако да се максимално искористе све супстанце које се користе у процесу, са циљем да се повећа њихова инкорпорација у финални производ.
3. **Одабир нетоксичних супстанци:** Синтетичке методе треба да, где је то изводљиво, користе или генеришу супстанце које су мало или нису уопште штетне за људе и животну средину.
4. **Дизајнирање нетоксичних производа:** Дизајнирање хемијског производа који ће задржати своју ефикасност уз истовремено смањење токсичности.

5. **Употреба безбеднијих растварача и реагенаса:** Избегавање употребе растварача и других помоћних супстанци када је то могуће или проналажење безбеднијих алтернатива.
6. **Планирање енергетске ефикасности:** Енергетски захтеви треба да буду минимални; где је то могуће синтезе треба изводити на собној температури и при нормалном притиску.
7. **Употреба обновљивих сировина:** У хемијским процесима користити сировине из обновљивих извора када год је то могуће.
8. **Редукција непотребних дериватизација:** Непотребну дериватизацију треба свести на минимум.
9. **Паметна катализа:** Каталитички реагенси (треба да су што селективнији) су супериорни над стехиометријским реагенсима.
10. **Дизајнирање разградивих производа:** Хемијски производи треба да буду моделовани тако да буду разградиви до безбедних компоненти при одлагању након употребе.
11. **Правовремена анализа ради превенције од загађења:** Праћење процеса у реалном времену како би се избегле ситуације које могу довести до настанка потенцијално опасних супстанци.
12. **Превенција опасности и незгода.** Супстанце које се користе у хемијском процесу треба изабрати тако да се смањи ризик од настанка хемијских акцидената као што су испуштање опасних хемикалија, експлозије и пожари.

1.4.1. Примена органокатализатора у Biginelli-јевој реакцији

Органокатализатори тј. мали органски молекули се све чешће користе у органској хемији и све више замењују катализаторе који у својој структури имају јон метала.^{66,67} Предности таквих катализатора огледају се у њиховој смањеној токсичности или потпуном одсуству штетног дејства на људе и животну средину. Поред тога, одликују се лако манипулацијом, отпорношћу на влагу и ваздух, као и чињеницом да се често природно јављају или се једноставно синтетишу. Због тога с правом органокатализа заузима посебно место у савременој органској хемији. Примењују се у алдолним реакцијама, Michael-овој адицији, Diels-Alder-овој циклизацији, енантиселективној синтези природних производа, многим мултикомпонентним реакцијама, а у 2021. години су научници David MacMillan и Benjamin List добили Нобелову награду за хемију за примену органокатализе у енантиселективној синтези.^{68,69}

1.4.1.1. Органске киселине као катализатори у Biginelli-јевој реакцији

Винска, лимунска и млечна киселина (**КАТ-1**, **КАТ-2** и **КАТ-3**) су се показале као ефикасни катализатори у Biginelli-јевим реакцијама. Жељени производи су добијени у одличним приносима било да су у реакцији коришћени ароматични алдехиди са електрон-донорским или електрон-акцепторским супституентима. Такође, и уреа и тиоуреа су били погодни супстрати (**Табела 1**).^{70,71} Аскорбинска киселина (**КАТ-4**) је исто ефикасан катализатор, али захтева дуже време реакције. Када се користи тиоуреа, одговарајући производи се добијају у мањим приносима у поређењу са уреом, док су алифатични алдехиди дали производе у нижим приносима (**Табела 1**). Итатонска киселина или њена со (**КАТ-5** и **КАТ-6**) је биоразградив и лако доступан органокатализатор примењен за добијање различитих тетрахидропиримидина у одличним приносима, а развијена метода је примењена и на мултиграмском нивоу. Од испитаних растварача, највећи приноси су остварени у изопропанолу, док су реакциони услови погодвали различитим супстратима (**Схема 11**).⁷²

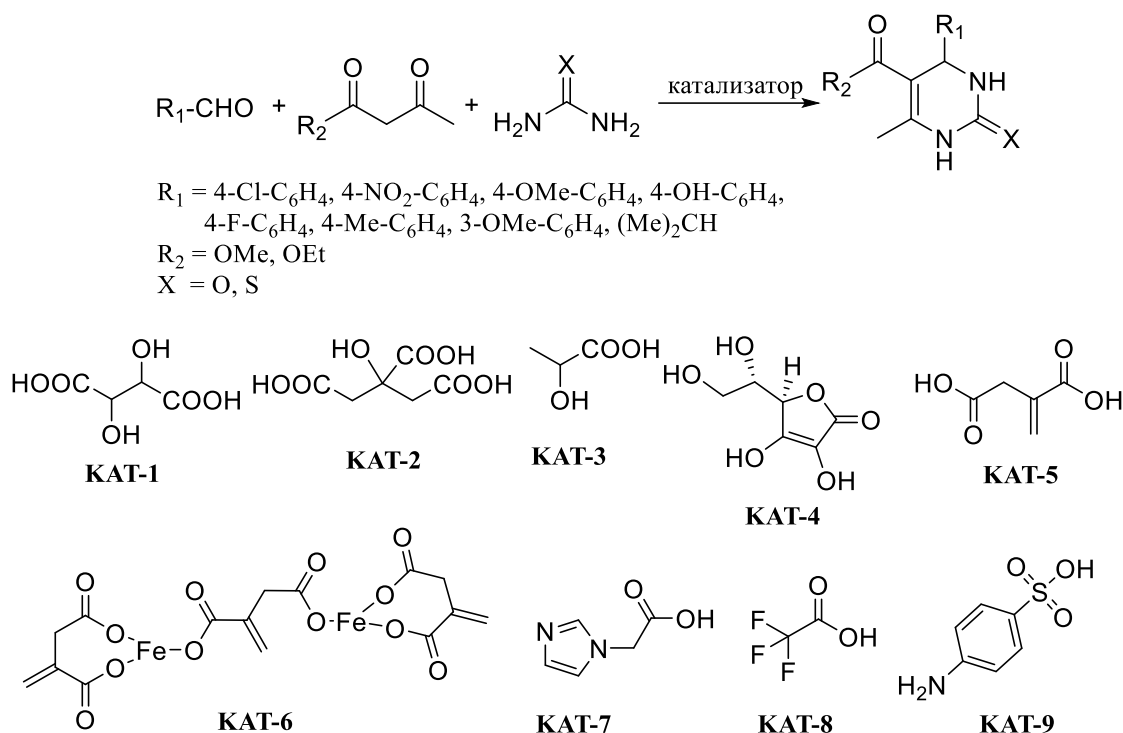


Схема 11. Структуре примењених органокатализатора у Biginelli-јевој реакцији.

Kargar и сарадници²⁵ су објавили у свом раду синтезу тетрахидропиримидина уз имидазол-1-ил-сирћетну киселину (**KAT-7**) као катализатор. **KAT-7** је бифункционални катализатор, који поседује Lewis/Brønsted-киселе или Lewis/Brønsted-базне особине. Производи су добијени у добрим до одличним приносима (>85%). Реакције су изведене без присуства органских раствараача, или у води као растварачу. Није било разлике у приносу када се пореде уреа и тиоуреа, а **KAT-7** је могао да се поново користи и то седам пута без губитка ефикасности. Међутим, у овим истраживањима су коришћени само ароматични алдехиди.

Karimi-Jaberi и сарадници⁷³ су као катализатор користили трифлуоросирћетну киселину (TFA; **KAT-8**). Употреба **KAT-8** је дала низ Biginelli-јевих адуката у одличним приносима и након кратких реакционих времена (Табела 1). **KAT-8** је ефикасно катализовао Biginelli-јеву реакцију са широким спектром ароматичних алдехида, 1,3-дикарбонил једињења и уреа или тиоуреа. Реакција која је изведена без **KAT-8** је дала знатно ниже приносе (20%), док ниједан од примењених реакционих услова није дао жељене производе када су као полазни реагенси били коришћени алифатични алдехиди.

Табела 1. Утицај различитих катализатора на принос реакције при датим условима.

Катализатор	Принос [%]	Време	Растварач	Молски однос ^a
KAT-1 , 5 mmol%	61-88	4 h	EtOH ^b	1:1:1,5
KAT-2 , 5 mmol%	70-96	4 h	EtOH ^b	1:1:1,5
KAT-3 , 25-40 mmol%	79-92	2,5-4 h	EtOH ^b	1:1:1,5
KAT-4 , 5 mmol%	53-85	6-12 h	без растварача, 80°C	1:1:1,5
KAT-5 , 10 mol%	75-86	12-18 h	ⁱ PrOH ^b	1:1:1,5

КАТ-6 , 10 mol%	82–92	4–10 h	^a PrOH ^b	1:1:1,5
КАТ-7 , 24 mmol%	85–94	30–50 мин.	H ₂ O	1:1:1,5
КАТ-8 , 20 mol%	84–96	2–50 мин.	без растварања, 70°C	1:1:1
КАТ-9 , 10 mol%	74–98	3,5–5 мин. (MW) ^b	H ₂ O	1:1:1
	68–94	90–120 мин. (US) ^c		

^aМолски однос: алдехид: 1,3-дикарбонил: (тио)уреа;

^bрефлукс

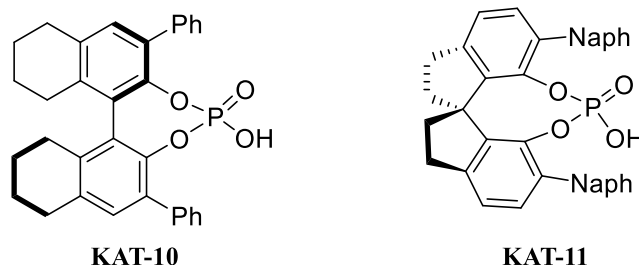
^cMW:Микроталасно загревање;

^dUS:Ултразвук.

Borik и сарадници⁷⁴ су доказали да сулфанилна киселина (**КАТ-9**) има каталитички ефекат у Biginelli-јевој реакцији приликом примене микроталаса или ултразвука (**Табела 1**). Коришћење ултразвука обично даје циљане производе у нешто већим приносима од оних добијених применом микроталаса. Обе технике су биле ефикасне и код алдехида који имају електрон-донорске и код оних који имају електрон-акцепторске супституенте. Синтезе у условима конвенционалног загревања дале су одговарајуће производе у веома ниским приносима (мањим од 12%) и захтевале су дуже време реакције (обично 6 до 8 сати).

За прву енантиселективну кисело катализовану Biginelli-јеву реакцију, Chen и сарадници су користили хиралну фосфорну киселину добијену из (*R*)-1,1'-би-2-нафтола (BINOL). Од свих испитаних катализатора, **КАТ-10** се показао као најбољи, дајући енантиомерни вишак већи од 88% *ee* и добар принос (51–86%) у реакцијама са ароматичним алдехидима. У случају алифатичних алдехида, добијени су производи са већим енантиомерним вишком (88–92% *ee*), али уз ниже приносе (40–44%).⁷⁵

Ху и сарадници⁷⁵ су објавили рад у коме су користили различите (*S*)-1,1'-спиро-би-индан-7,7'-диоле (SPINOL) фосфорне киселине за хиралну индукцију Biginelli-јеве реакције (**Табела 2**). Аутори су испитали шест хиралних катализатора који су имали различите супституенте на ароматичном прстену. Међу коришћеним катализаторима, **КАТ-11** се показао као најефикаснији. **КАТ-11** је дао производе у добрим приносима (>80%) и у одличном енантиомерном вишку (91–99% *ee*). Према овим ауторима присуство 1-нафтил група у *орто*-положају на ароматичном прстену катализатора побољшало је енантиселективност услед стерних ефеката. Међутим, утврђено је да су алифатични алдехиди лоши супстрати за реакције катализоване **КАТ-11** (принос 40–44%; 88–92% *ee*).



Слика 3. Структуре катализатора коришћених у асиметричној синтези.

Табела 2. Утицај различитих катализатора на принос реакције при датим условима.

Катализатор	Принос [%]	Време	Растварач	Молски однос ^a
КАТ-10, 10 mol%	40–86	4 дана	DCM ^b	1:1,2:5
КАТ-11, 5 mol%	80–98	3 дана	Ксилен, 50°C	1:1,2:3
КАТ-12, 15 mol%	79–90	7 h	MeCN ^b	1:1:1,5
КАТ-13, 42 mol%	50–90	6 h	EtOH ^b	1:1,1:1,5
КАТ-14, 10 mol%	80–87	24 h	THF ^b	0,2:1:1,2

^aМолски однос: алдехид: 1,3-дикарбонил: (тио)уреа;^bрефлукс

Борна киселина и њени деривати су ефикасни катализатори у органским трансформацијама, као што су Мукајама алдолна кондензација или синтеза амида из карбоксилних киселина. Ове киселине су посебно занимљиве за синтетичке модификације због могућности употребе хиралних деривата, као што су ацилоксиборани и алкилдихлороборани. Они су успешно примењени у асиметричној Diels–Alder-овој реакцији циклоадиције и у енантиселективној алилној реакцији.⁷⁶ Фенилборонска киселина (РВА), је комерцијално доступан, нетоксичан и економичан реагенс који се користи као катализатор у Biginelli-јевој синтези.⁷⁷ Оптимизовани реакциони услови (етил ацетоацетат / алдехид / уреа / РВА = 1 : 1 : 1,5 : 0,1) у ацетонитрилу као растварачу, уз рефлукс, дали су добре резултате како код ароматичних алдехида са електрон-донорским, тако и са електрон-акцепторским супституентима. Поред тога, примена алдехида осетљивих на киселу средину, као што је тиофен-2-карбалдехид, довела је до доброг приноса (82%), без формирања споредних производа. Тиоуреа је такође дала жељене производе.

Хетерогени катализатори на бази органских киселина такође се користе у Biginelli-јевим реакцијама. Испробани су различити чврсти носачи, а већина њих може да се рециклира. Најчешће су то полимери, зеолити и силицијум диоксид. Тајбахш и сарадници⁷⁸ су показали да употреба *S*-сулфонске киселине која је адсорбована на силицијум даје тетрахидропиримидине у добрим приносима (71–93%). Ароматични алдехиди дају одговарајуће производе у добрим приносима, док су приноси мањи код алифатичних алдехида, док су уреа и тиоуреа дале готово исте приносе. Добри приноси су такође остварени када су коришћена циклична 1,3-дикарбонилна једињења. Овај катализатор је рециклиран више од четири пута без икаквог значајног губитка у каталитичкој активности.

Nandi и сарадници су, у оквиру истраживања усмереног на проналажење одговарајућег катализатора, испитали једињења имобилизована на чврстом носачу. У ту сврху користили су сумпорну киселину имобилизовану на SiO₂ у етанолу као растварачу. Овај катализатор представља термички стабилан, кисео реагенс који истовремено испољава својства Lewis-ове киселине и дехидратационог средства. Може се рециклирати без губитка активности током најмање три узастопна реакциона циклуса. Поред тога, успешно су заменили 1,3-дикарбонилна једињења β-оксодитиоестрима, чиме су постигли приносе у опсегу од 65% до 85%.⁷⁹

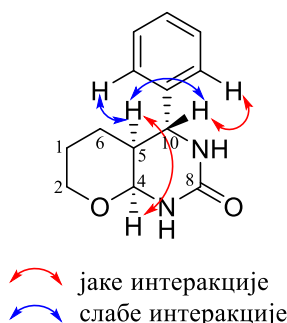
Реакције на чврстом носачу привукле су пажњу Narahari-ја и сарадника.⁸⁰ Они су први описали примену перхлорне киселине адсорбоване на SiO₂ у уделу од 5%. Утврђено

је да су приноси реакције значајно виши у присуству $\text{HClO}_4\text{-SiO}_2$ (90–95%) у односу на реакције које се изводе искључиво у присуству перхлорне киселине, што указује на значај улоге чврстог носача у формирању тетрахидропиримидина.

Ковалентне органске мреже (енг. *covalent organic frameworks*, COFs)^{81,82} представљају класу кристалних порозних полимера који омогућавају атомски прецизну интеграцију органских јединица у проширене структуре. Одликују се високом хемијском стабилношћу, што их чини погодним за примену у хетерогеној органокатализи. Помоћу *in situ* Povarov-љеве реакције синтетисан је нови COFs систем (хинолин + имидазол), након чега су у његову структуру инкорпорирани сулфонска киселина и јонска течност. Овим поступком добијен је високо активан хетерогени катализатор на бази Brønsted-ове киселине, који је успешно примењен у Biginelli-јевој реакцији.⁸³

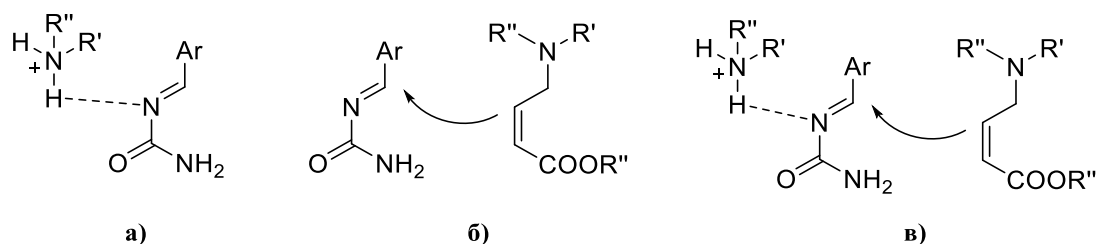
1.4.1.2. Аминокиселине као катализатори у Biginelli-јевој реакцији

L-Пролин и његови деривати се често користе као стереоселективни катализатори у Biginelli-јевим реакцијама. Ова аминокиселина доводи до стварања енамина, кључних интермедијара за формирање Biginelli-јевих адуката (Табела 2). Pandey и сарадници су користили L-пролин (КАТ-12) у комбинацији са трифлуоросирћетном киселином (TFA) у Biginelli-јевим реакцијама (Табела 2). Производи су добијени са dobrim приносима (>79%) и са *cis* релативном конфигурацијом, како је утврђено NOESY (енг. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*) експериментима (Слика 3). У овим експериментима је показано да је протон H4 у *cis* положају у односу на H5 и у *trans* положају према протону H10 (Слика 4).⁸⁴ Chohamarani и Zamani су у својим експериментима користили L-пролин на силикагелу (КАТ-13). Добијени су производи у dobrim приносима (>80%) са ароматичним алдехидима, а тиоуреа је дала слабе приносе (50%, Табела 2).⁸⁵ Sohn и сарадници су испитивали реакције са естрима L-пролина (КАТ-14) и механизам енантио-селективне катализе.⁸⁶



Слика 4. NOESY експеримент Pandey-а и сарадника.⁸⁴

Предложена су три могућа механизма деловања која утичу на енантиселективност. Један од њих укључује кондензацију алдехида са уреом што доводи до формирања хиралног ацил имида. У том смислу, катализатор делује као хирална Brønsted-ова киселина (Слика 5а). У другом могућем механизму је ацил имин стереоселективно нападнут хиралним β -кетоестром како би се формирао хирални енамин (Слика 5б). Обе реакције могу да се одиграју у једном кораку (Слика 5в).



Слика 5. Предложени механизми деловања енантиселективног катализатора.

Соли естара L-пролина (једињења типа I; Слика 6) показале су високу ефикасност у Biginelli-јевој реакцији, дајући адукте са високим приносима (>80%) и значајним енантиомерним вишком. Енантиселективност је била у корелацији са порастом волуминозности R1 групе присутне у овим катализаторима.⁸⁶ Насупрот томе, једињења типа II (Слика 6), која не доводе до формирања енаминских интермедијера, давала су производе у нижим приносима и без изражене енантиселективности. Ови резултати потврђују хипотезу да је примећена енантиселективност у првој реакцији последица учешћа енаминског интермедијера у реакцији. Када је као катализатор коришћен D-пролин, добијени су реверзни енантиомери.⁸⁶



R₁ (R/S) = MeO (58:42); ^tPrO (61:39); R₃ (R/S) = Me (49,8:50,2); ^tBu (49,3:50,7)
^tBuO (70:30)
R₂ = H
R₁ и R₂ (R/S) = ^tBuo (50:50)

Слика 6. Катализатори које су Sohn и сарадници⁸⁶ применили у Biginelli-јевој реакцији. Вредности приказане у загради одговарају моларном односу рацемске смеше.

1.4.1.3. Ензими и други биокатализатори у Biginelli-јевој реакцији

Пекарски квасац (лат. *Saccharomyces cerevisiae*) се дуго користи као катализатор код редукције кетона у оптички активне алкоhole⁸⁷ као и код редукције β-кетоестара у β-хидрокси естре. Такође се успешно користи за редукције двоструких угљеник-угљеник веза и за оксидације тиола до дисулфида.⁸⁸⁻⁹² Због тога не чуди интересовање и за његову примену у Biginelli-јевој реакцији. У краткој студији је показано да пекарски квасац ефикасно катализује трокомпонентну реакцију алдехида, β-кето естара и (тио)урее дајући производе у добрим до одличним приносима.⁹³ Пекарски квасац и D-глюкоза су мешани у фосфатном пуферу, а бензалдехид, етил ацетоацетат и уреа су додати након 12 h у ферментишући квасац и таква реакциона смеша је мешана још 24 h. Производ је изолован и прекристалисан из метанола. Каталитичка ефикасност пекарског квасца је потврђена упоређивањем приноса изолованог производа у реакцији без и са квасцем и то 7% и 47% изолованог тетрахидропиримидина, респективно.

Borse и сарадници су 2012. године развили методологију за Biginelli-јеву реакцију користећи липазу као катализатор.⁹⁴ Овај ензим је добијен и пречишћен из *Rhizopus oryzae*. Приметно је да је само 5 mol% липазе у смеси холин хлорида и урее било потребно да би се добили тетрахидропиримидини у одличним приносима. Липаза је

поново коришћена у најмање пет циклуса без значајног губитка ефикасности, док су производи изоловани у 20% мањем приносу у реакцијама без катализатора.

Ratil и сарадници су развили две методе за синтезу тетрахидропиримидина у којима су као катализаторе користили лимунов сок⁹⁵ и сок од ананаса.⁹⁶ Предности ових метода су бољи приноси и скраћено реакционо време. Наиме, у оба случаја реакције су изводили на собној температури, без растварача, уз додатак одговарајуће количине сока као катализатора. Време реакције у случају додатка лимуновог сока је било између сат и четири и по сата уз приносе 54–98%, док је у случају сока од ананаса било између два и пет и по сати. Оба сока имају ниску рН вредност (рН сока од ананаса је 3,70), па имају улогу киселог катализатора.

Кора нара (лат. *Punica granatum*) је као ефикасан хетерогени органокатализатор у условима без растварача употребљена за добијање тетрахидропиримидина. Катализатор је чак до седам пута поново употребљен без значајног смањења његове каталитичке ефикасности.⁹⁷ Кора нара је добро позната по својим адстрингентним својствима. Богата је елагитанинима (као што су пуникалагин и његови изомери), као и мањим количинама пуникалина, галагичне киселине, елагинске киселине и гликозидима елагинске киселине, као и антоцијанинима.

5-Супституисани-2-фурилдехиди добијени из угљених хидрата су употребљени као полазни реагенси за синтезу тетрахидропиримидина и тетрахидропиридина коришћењем воденог раствора глуконске киселине као катализатора. Употреба урее (или тиоурее) као реагенса дала је као производ тетрахидропиримидине, а амонијум-ацетат тетрахидропиридине, док су друга два полазна реагенса (тј. фурфурал и етил ацетоацетат) и реакциони услови били исти. Коришћењем општег синтетичког протокола под оптимизованим реакционим условима (60 °C, 3–6 h, 25 mol% кат.), сви деривати су добијени у добрим до одличним приносима.⁹⁸

Chidambaram и сарадници су у мултикомпонентној реакцији синтетисали деривате 2-пиримидин амина коришћењем Cu(II)-тирозиназе као катализатора. Оптимизацијом реакционог процеса добијени су производи у високим приносима. Испитана су ларвицидна и антихранљива својства синтетисаних деривата, који су показали већу инхибиторну активност у поређењу са контролним хидантоцидином. Ова запажања додатно су потврђена молекулским докингом, при чему су добијене енергије везивања износиле –9,6 kcal/mol у поређењу са –6,1 kcal/mol за контролу.⁹⁹

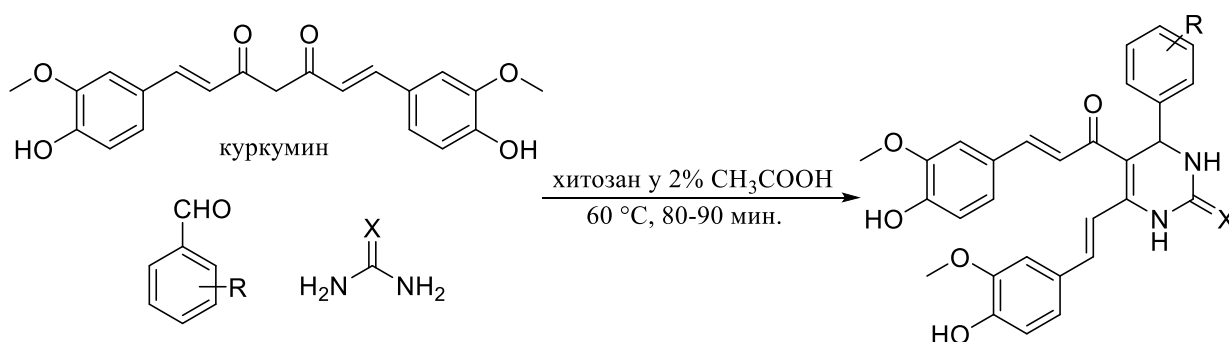


Схема 12. Катализа Biginelli-јеве реакције хитозаном.

Развијена је ефикасна процедура за синтезу куркумин-пиримидинона путем једноставне кондензације куркумина, ароматичних алдехида и урее/тиоурее уз примену хитозана као катализатора у 2% воденом раствору сирћетне киселине (Схема 12). Реакција се одвија на 60 °C током 80–90 минута. Хитозан је еколошки прихватљив, биоразградив и рециклабилан катализатор, који омогућава добијање куркумин-

пиримидинона у изузетно високом приносу (97%). Може се поновно користити без губитка каталитичке активности.¹⁰⁰

1.4.2. Јонске течности (IL) и дубоко еутектичке смеше (DES) у Biginelli-јевој реакцији

Јонске течности (енг. *ionic liquid*, IL) такође спадају у групу катализатора и/или растварача који се користе ради лакшег постизања благих реакционих услова уз што мање штетно деловање на околину. Јонске течности се дефинишу као соли које су течне испод 100 °C. Предности јонских течности у односу на конвенционалне раствараче су занемарљив напон паре,¹⁰¹ висока термичка стабилност,¹⁰² подједнако добро растварају и органска и неорганска једињења, могуће је дизајнирати јонске течности са жељеним хемијским особинама, солвофобичне интеракције у реакционој смеши знатно убрзавају реакције у поређењу на конвенционалне раствараче,¹⁰³ могуће је њихово рециклирање¹⁰⁴ итд. Њихова све чешћа примена у многим хемијским процесима, па тако и Biginelli-јевој реакцији, има циљ најпре да замени традиционалне неорганске киселине као што су сумпорна и хлороводична.^{53–55,58}

Један од објављених „зелених“ протокола је реакција у којој се као једна од полазних компоненти користи алкохол уместо алдехида.¹⁰⁵ 1-Метилимидазолијум хидрогенсулфат, [Hmim]HSO₄, катализује *in situ* оксидацију ароматичних алкохола у ароматичне алдехиде са NaNO₃ што је праћено њиховом циклокондензацијом са 1,3-дикарбонил једињењима и уреом при чему се добијају тетрахидропиримидини (**Схема 13**).

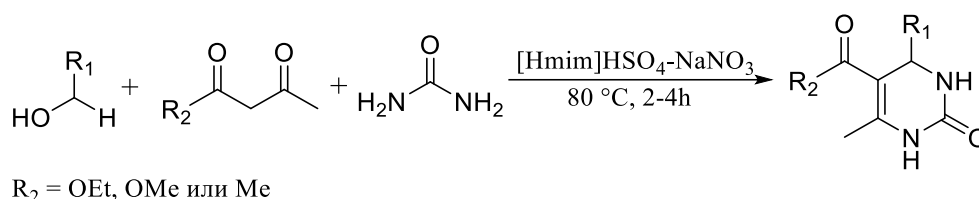
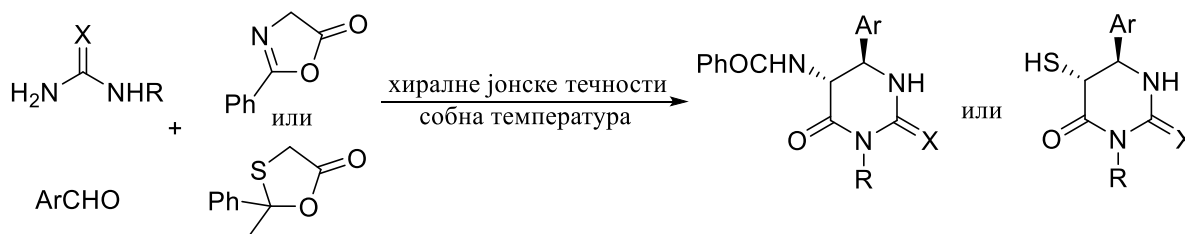


Схема 13. Синтеза тетрахидропиримидина уз [Hmim]HSO₄ као катализатор.

У литератури налазимо и на примену хиралних јонских течности,¹⁰⁶ и то L-пролинијум-сулфата (Pro₂SO₄), L-аланинијум-хексафлуорофосфата (AlaPF₆) и L-треонијум-нитрата (ThrNO₃). Асиметричном реакцијом су добијени енандио- и дијастереомерно чисти перхидропиримидини (**Схема 14**).



X = O, S; R = H, Et, Ph

Схема 14. Хиралне јонске течности у Biginelli-јевој реакцији.

Диизопропил-етил-амонијум-ацетатат (DIPEAc) је употребљен као катализатор у реакцији алдехида, етил цијаноацетата и тиоурее за добијање тетрахидропиримидина чија је антифунгална и антибактеријска активност испитана *in vitro* (Схема 15). Кључне предности ове методе укључују широку варијабилност функционалних група, кратко време реакције, једноставан поступак изолације производа, високе приносе, могућност рециклаже катализатора и извођење реакције у условима без растварача. Ови фактори доприносе економској исплативости процеса и смањеном утицају на животну средину.¹⁰⁷

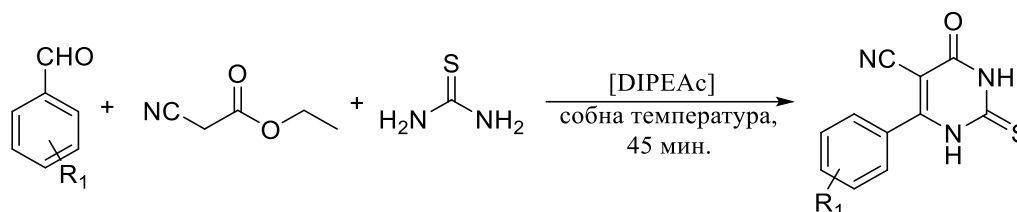
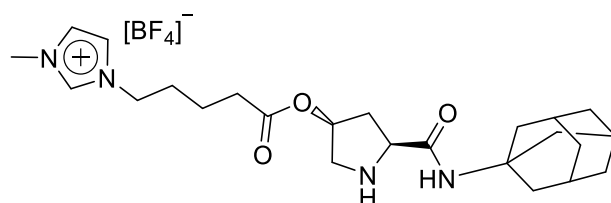


Схема 15. DIPEAc као катализатор у Biginelli-јевој реакцији.

Јонске течности које у својој структури имају L-пролинамидни и имидазолијумски фрагмент су синтетисане и коришћене као органокатализатори за асиметричну Biginelli-јеву реакцију бензалдехида, урее и β -кето естара. Синтетисане хиралне јонске течности су окарактерисане различитим техникама попут масене спектрометрије високе резолуције, термогравиметријском анализом и др. Хирална јонска течност (5 mol%) и *para*-толуенсулфонска киселина (PTSA; 5 mol%) су катализовале Biginelli-јеву реакцију дајући различите хиралне тетрахидропиримидине у приносу од 16–74% и 7–85% *ee* након 48 h на собној температури. Механизам реакције и прелазна стања или интермедијери су предложени и подржани нуклеарном магнетном резонансом и DFT прорачунима. Фаворизован је напад на иминску везу превасходно са горње стране тригонално-планарног центра (*Re* страна), што је резултирало формирањем производа са (*R*)-апсолутном конфигурацијом.¹⁰⁸



Слика 7. Структурна формула хиралне јонске течности која је коришћена у асиметричној синтези тетрахидропиримидина.

У литератури наилазимо на примену ниобимијумових једињења као катализатора у органским реакцијама, а између осталих и у Biginelli-јевој реакцији. Тако су ниобијум(V) хлорид и *n*-бутил-3-метилимидазолијум хлорид, [BMIm]Cl, мешани у различитим молским односима. Затим је праћено који јонски облици постоје у раствору, јер идентификација јонских врста пружа корисне информације о хемијској природи ниобијумског катализатора у Biginelli-јевој реакцији. У реакцији етил ацетоацетата, бензалдехида и урее у присуству NbCl₅ и смеше NbCl₅ са [BMIm]Cl у молским односима од 2 до 5 добијен је производ у приносу од 90%. То би значило да се јонски пар BMIm⁺ NbCl₆⁻ у реакцији понаша као Brønsted-ова киселина и на тај начин катализује реакцију.¹⁰⁹

У једној од новије оптимизованих синтеза јонска течност 1,3-бис(карбоксиметил)имидазолијум хлорид, [BOMIm]Cl, је у 5 mol% катализовала реакцију између различитих арил алдехида, супституисаних 1,3 дикарбонилних

једињења и урее/тиоурее на 80 °C дајући тетрахидропиримидине у приносу до 96% (**Схема 16**). Предности ове синтезе су широк обим супстрата, кратко време реакције, добијене производе није потребно хроматографски пречистити, док је катализатор [BCMIm]Cl могуће рециклирати и поново користити до шест пута без значајног губитка каталитичке ефикасности.¹¹⁰

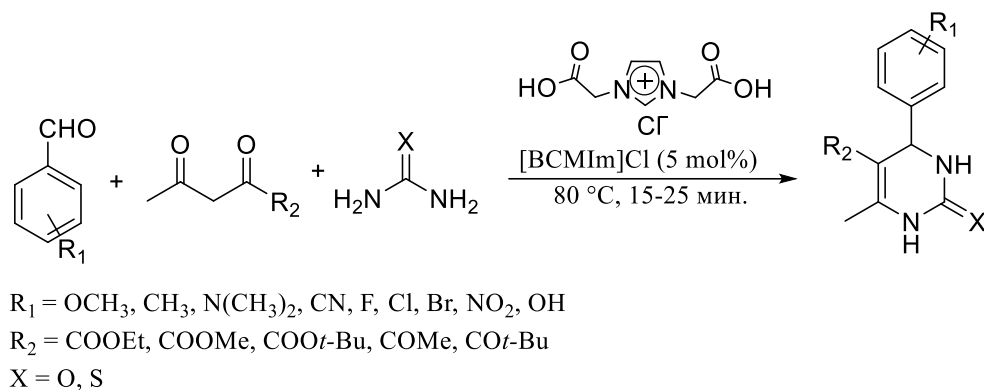


Схема 16. [BCMIm][Cl] као катализатор у синтези тетрахидропиримидина.

Нове јонске течности на бази 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундек-7-ена (DBU) и метилимидазола (MIm) су примењене као катализатори у модификованој Biginelli-јевој реакцији цинамалдехида, урее и 1,3-дикетона. Производи су добијени у високим приносима у присуству 10 mol% [DBU][Mim] на 90 °C за 45 минута. Оптимизован протокол синтезе је једноставан, одржив и поновљив (**Схема 17**).¹¹¹

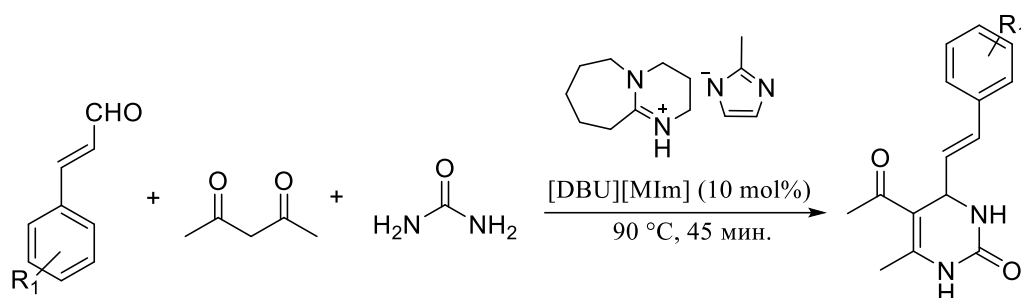


Схема 17. Примена [DBU][Mim] у модификованој реакцији Biginelli-јевог типа.

Patil и сарадници су развили ефикасан и одржив протокол за синтезу нове класе тетрахидропиримидина добијених из 2-хидрокси-1,4-нафтохинона користећи јонску течност *N*-метил-2-пиридионијум хидроген сулфат [HNMP]⁺[HSO₄]⁻ као растварач и катализатор (**Схема 18**).¹¹² Исте реакције су изводили и уз конвенционално грејање и уз ултразвучно загревање. Јонска течност је рециклирана до пет пута без губитка каталитичке ефикасности. Дисперзне боје на бази тетрахидропиримидина су коришћене за бојење хидрофобних влакана попут полиестера и најлона применом машина за бојење текстила које раде при високим температурама и притисцима. Обојене текстилне тканине су показале одличне особине попут постојаности боје.

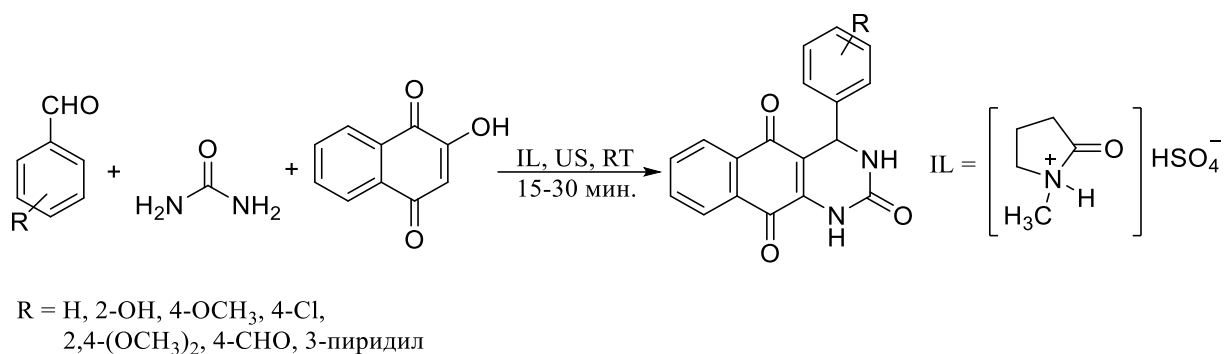


Схема 18. Синтеза тетрахидропиримидинских деривата за бојење тканине у IL.

Кључни недостаци јонских течности односе се пре свега на високу цену синтезе, отежано руковање и складиштење, као и на релативно висок ризик да доспеју у животну средину услед добре растворљивости у води.¹¹³ У циљу превазилажења ових ограничења, у последњим деценијама се интензивно развија нова класа зелених растварача, дубоко еутектичке смеше (енг. *deep eutectic solvent*, DES), које представљају проширени модел јонских течности. Сам термин „еутектички” означава смешу која има нижу тачку топљења од било које појединачне компоненте. За разлику од класичних јонских течности у којима доминирају електростатичке интеракције, еутектички растварачи се заснивају на формирању водоничних веза или специфичних интеракција са металним халогенидима. Еутектичка тачка одговара молском односу компоненти при којем смеша достиже најнижу температуру топљења. Уколико су компоненте оваквих система природни примарни метаболити (амино киселине, шећери, деривати холина, и др.), тада их називамо природним DES (енг. *natural DES* – *NaDES*).¹¹⁴

DES се у литератури најчешће класификују у пет типова. Тип I настаје комбиновањем анихидрованих металних халогенида (као што су ZnCl₂, SnCl₂ или FeCl₃) са кватернарним амонијумовим солима, при чему се добијају комплексни раствори са тачком мржњења испод 100 °C. Тип II је сличан, али уместо анихидрованих користе се хидратисани метални халогениди као анјонски комплексирајући агенси. Тип III, који је уједно и најзаступљенији у литератури, заснива се на употреби донора водоничних веза (поликарбоксилне киселине, полиамиди, полиалкохоли) у комбинацији са кватернарним амонијумовим солима. Ови системи се одликују великом стабилношћу, биодеградибилни су и имају способност да ефикасно смање интеракцију катјон–анјон, што резултира снижавањем температуре топљења. Тип IV обухвата комбинацију анихидрованих металних халогенида са донорима водоничних веза, при чему донор комплексира халогени анјон и слаби његову везу са металним центром. Тип V представља најновију класу DES-а, која се добија физичким мешањем чврстих, нејонских компонената и одликује се израженим негативним девијацијама од термодинамичке идеалности.

Gore и сарадници су објавили прву студију у којој су DES типа III употребили у Biginelli-јевој реакцији.²⁶ Улога DES у овом случају је била трострука: растварач, катализатор и реактант. Аутори су показали да смеша L-(+)-винске киселине и диметилуреа у односу 3:7 може катализовати реакцију различитих алдехида са 1,3-дикарбонилним једињењима под благим условима, при чему се добијају N,N-диметил тетрахидропиримидини у добрим до одличним приносима (Схема 19). Ово је уједно и прва реакција где је једна N,N-диалкилована уреа успешно употребљена као супстрат у Biginelli-јевој реакцији.

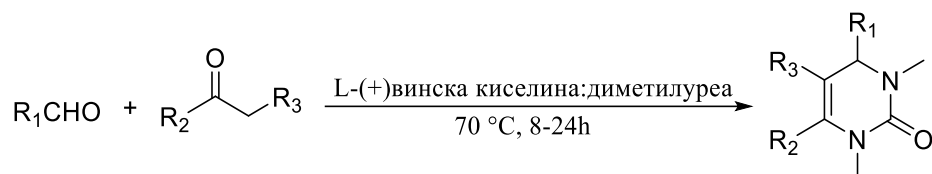


Схема 19. DES треће генерације у синтези тетрахидропиримидина.

Еутектичке смеше холин хлорида (ChCl) се често користе због једноставне синтезе. Azizi и сарадници су тестирали различите DES у синтези тетрахидропиримидина. На реакцији бензалдехида, урее и етил ацетоацетата су тестиране следеће смеше: ChCl-SnCl₂ (1:2), ChCl-urea (1:2), ChCl-ZnCl₂ (1:2), ChCl-ZnCl₂-SnCl₂ (1:1:1), ChCl-Gly (1:3). Производ се добија у приносу од 95% када се користи смеша ChCl-SnCl₂, те је управо она коришћена као катализатор за широк спектар 1,3-дикарбонилних једињења (етилацетоацетат, метилацетоацетат, пентан-2,4-дион, етил 3-оксо-3-фенилпропаноат, 5,5-диметил-1,3-циклохександион, 3-оксо-*N*-(2-хлорофенил) бутанамид) и за различите ароматичне и алифатичне алдехиде и уреу где су такође остварени високи приноси (74–95%). Осим тога, нису идентификовани нуспроизводи, а добијени производи су били високе чистоће и није било потребно даље пречишћавање након кристализације.¹¹⁵ На **Схеми 20** је приказана успешна примена NaDES на бази холин хлорида (ChCl) и урее као растварача и липазе као катализатора за синтезу тетрахидропиримидина у високим приносима.⁹⁴

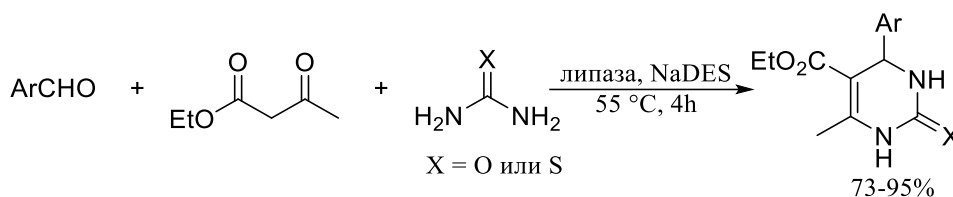


Схема 20. Употреба липазе и NaDES у синергији у Biginelli-јевој реакцији.

Смеша холин хлорида и урее у односу 1:2 и у присуству каталитичке количине HCl је као реакциони медијум успешно примењена у синтези тетрахидропиримидина чије је дејство испитано код неуродегенеративних поремећаја.¹¹⁶ Како и карбоксилне киселине могу да буду донори водоничне везе у DES са холин хлоридом, управо је смеша холин хлорида и хлоросирћетне киселине, која игра двоструку улогу као растварач и као ефикасан катализатор, коришћена у синтези тетрахидропиримидина.¹¹⁷

Такође, неколико DES на бази холин хлорида са различитим типовима донора водоничне везе: *para*-толуенсулфонска киселина, трихлоросирћетна киселина, моноклоросирћетна киселина, пропионска киселина и етилен гликол је употребљено са улогом растварача и катализатора у реакцији бензалдехида са етил ацетоацетатом и уреом на 70 °C. После 40 минута, постигнут је принос од 88% финалног производа у присуству [ChCl][PTSA]₂.¹¹⁸ Након оптимизације услова, уочено је да је однос од 0,6 mmol DES на 2,0 mmol алдехида и етил ацетоацетата, био оптималан за добијање највећих приноса. Када се количина DES-а повећа, принос се смањи, вероватно због високе киселости катализатора. Реакција је погодна за широк спектар ароматичних алдехида, различитих β-дикето естара и урее или тиоурее дајући тетрахидропиримидине у високим приносима (78–92%). Рециклирање [ChCl][PTSA]₂ анализирано је на примеру реакције бензалдехида, етил ацетата и урее на 70 °C, уз испаравање растварача након сваке фазе и поновно коришћење DES-а за следећи циклус (**Схема 21**).

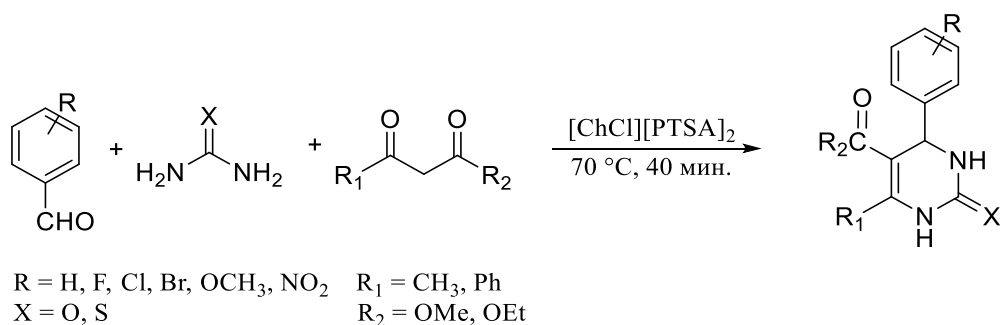


Схема 21. $[ChCl][PTSA]_2$ као растварач и катализатор у синтези тетрахидропиримидина.

Применом еутектичких растварача, добијених из хидратисаних хлорида метала и донора водоничних веза, испитивана је њихова каталитичка активност у Biginelli-јевој реакцији на собној температури. Најефикаснији катализатор био је $ZrOCl_2 \times 8H_2O$ у комбинацији са етиленгликолом у молском односу 1:2. Висока активност овог катализатора може се објаснити његовом способношћу формирања водоничних веза и ниском вискозношћу, што је допринело његовој ефективности као катализатора у овој реакцији. Поред тога, катализатор је успешно рециклиран и поново употребљен у четири узастопна циклуса без значајног губитка активности.¹¹⁹

Еутектичка смеша холин хлорида и фенола као донора водоничне везе је као растварач употребљена за синтезу бензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидина. Кондензацијом 2-аминобензимидазола, етил ацетоацетата и алдехида под благим реакционим условима су добијени жељени производи у умереном до добром приносу (49–79%).¹²⁰

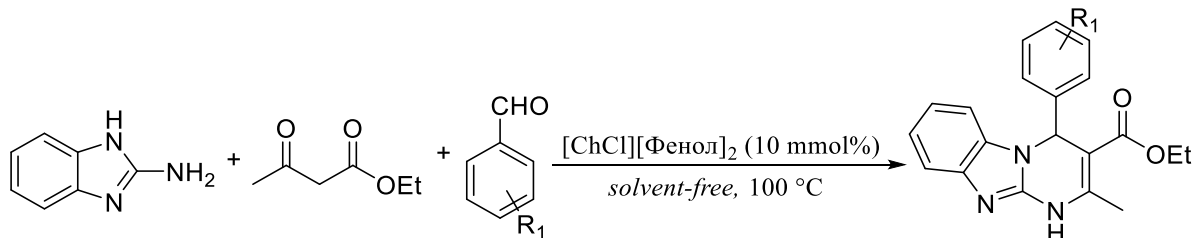


Схема 22. Синтеза бензо[4,5]имидазо[1,2-*a*]пиримидина у $[ChCl][фенол]_2$.

Нова еутектичка смеша припремљена у молском односу 1:1 метилтрифенил-фосфонијум бромида (МТРРВr) и 3,4-дихидроксибензојеве (протокатехуинске) киселине (РСАТ) је коришћена као катализатор за синтезу пиранопиримидина у реакцији Biginelli-јевог типа. Реакција кондензација барбитурне киселине, 4-хидроксикумарина и ароматичних алдехида у благим условима и кратким реакционим временима даје производе у високим приносима (**Схема 23**).¹²¹ Смеша K_2CO_3 и глицерола у молском односу 1:5 је примењена као катализатор и растварач за синтезу тетрахидропиримидина.¹²²

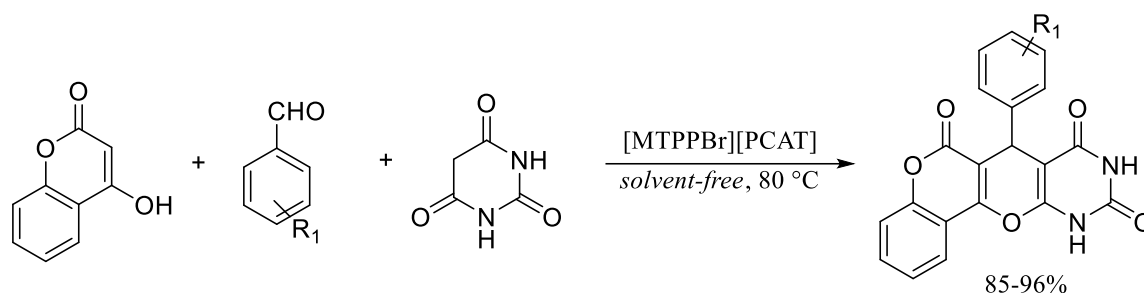


Схема 23. Синтеза пиранопиримидина уз примену DES-a.

У литератури наилазимо на неколико примера употребе растварача добијених из биомасе у Biginelli-јевој реакцији. Xu и сарадници су синтетисали тетрахидропиримидине у етил лактату добијеном из биомасе уз триметилсилил хлорид као катализатор са добрим до одличним приносима.¹²³ Изненађујуће је да и поред многобројних радова који се баве Biginelli-јевом хемијом постоји врло мали број у којима се говори о улози растварача у овој реакцији. Clark и сарадници су доказали да ефикасност Biginelli-јеве реакције зависи од способности растварача да помера равнотежу β -кето естра у енолну форму која је потребна за реакцију. У свом раду су показали да *para*-цимен подстиче настанак енолне форме β -кето естра дајући производе у добрим приносима.¹²⁴ Једна од новије објављених студија бавила се врло занимљивом применом биљних уља у синтези тетрахидропиримидина.¹²⁵ Показано је да је палмино уље изузетно ефикасан зелени растварач у поређењу са растварачима добијеним прерадом нафте, као што је циклохексан, при чему су постигнути упоредиви приноси у Biginelli-јевој реакцији урее, бензалдехида и метил 3-оксобутаноата, од 74% и 73%, респективно. Поред тога могуће је да се палмино уље поново користи најмање четири пута без губитка ефикасности. Девичанско палмино уље доприноси побољшаној растворљивости супстрата и поспешује настанак енолне форме што доводи до повећане продуктивности реакције у поређењу са претходним резултатима оствареним употребом *para*-цимена и етил лактата.

Jagatap и сарадници су објавили Biginelli-јеву синтезу у којој су користили биоотпадну сирну воду као катализатор и растварач. Присуство органских киселина у сирној води, попут млечне, доприноси киселости и на тај начин катализује реакцију урее, различитих алдехида и етил ацетоацетата на собној температури. Примењен је узастопни процес филтрирања за одвајање производа који се континуирано таложио. Предности ове методе су краће време реакције (2–3 h) и високи приноси (76–82%).¹²⁶

1.4.3. Вода као реакциони медијум

Не треба занемарити ни воду која се све више користи као замена органским растварачима у синтетичкој хемији.¹²⁷ Вода је описана као „најзеленији растварач“ који се може замислити, јер има високу чистоћу, исплатива је, лако се рециклира, нетоксична је и незапаљива.¹²⁸

Амонијум-карбонат је мање токсичан ($LD_{50} = 1497 \text{ mg/kg}$), ниско-топливи (58 °C) чврст извор амонијака који се користи и као средство за дизање теста. У воденој средини се разлаже, градећи два мола амонијака. Због тога су Tamaddon и сарадници оптимизовали Biginelli-јеву реакцију у води катализовану амонијум-карбонатом (**Схема 24**). Реакција је у условима без растварача дала знатно нижи принос због сублимације амонијум-карбоната. Употреба 0,5 еквивалената амонијум-карбоната није довела до значајних промена у резултатима. Овај тренд указује на то да водоничне везе, благо базна

средина и улога воде у разлагању $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ могу бити кључни фактори који доприносе катализи реакције.¹²⁹

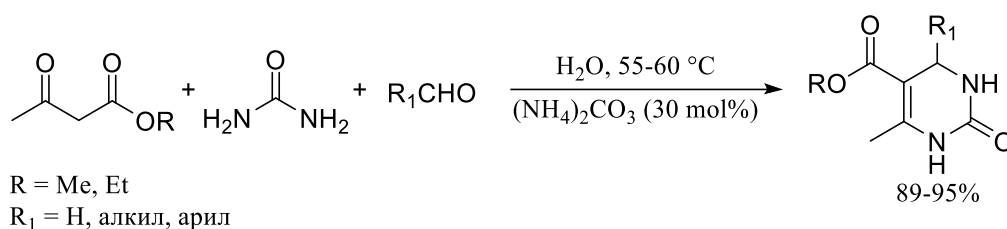


Схема 24. Амонијум карбонат у синтези тетрахидрпиримидина у води као растварачу.

Вода као растварач је успешно примењена у Biginelli-јевој реакцији у микроталасној пећници где је уреа замењена 2-аминобензимидазолом, а производи су добијени у високим приносима (**Схема 25**).¹³⁰

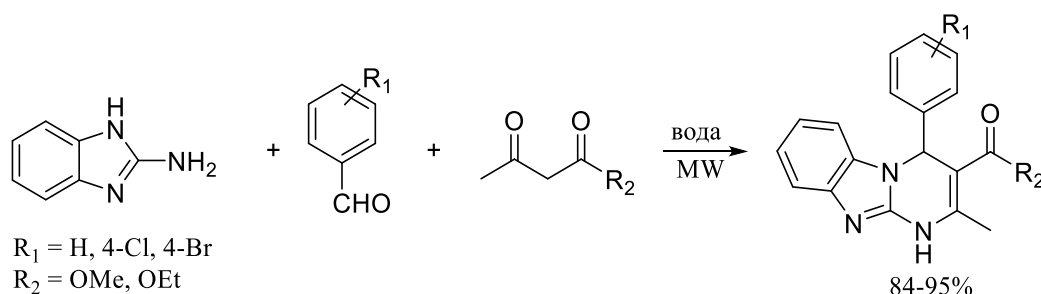


Схема 25. Biginelli-јева реакција уз микроталасно зрачење у води.

Такође, Polshettiwar и сарадници су оптимизовали реакционе услове за синтезу тетрахидропиримидина у води уз MW и присуство полистиренсулфонске киселине (PSSA) као катализатора.¹³¹ Помоћу трокомпонентне реакције циклокондензације цикличних 1,3-дикетона и *para*-толуенсулфонске (PTSA)¹³² или концентроване H_2SO_4 ¹³³ као катализатора, у води су синтетисани деривати тетрахидрохиназолинона. На основу приноса реакција, показало се да је вода у овом случају бољи растварач од ацетонитрила, етанола и толуена (**Схема 26**).

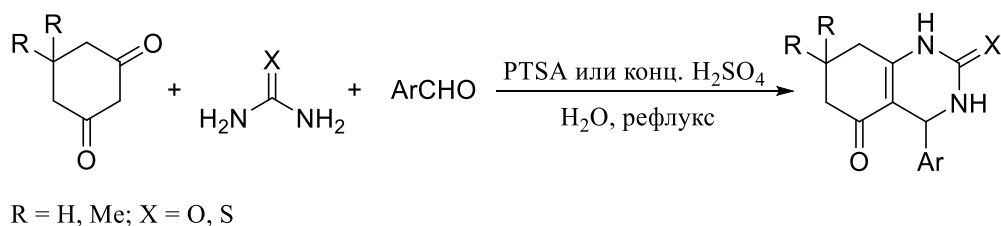


Схема 26. Кисело катализована реакција у води као медијуму.

Еколошки прихватљива метода за синтезу супституисаних тетрахидропиримидина у води са тиамин хидрохлоридом (витамин Б1) као катализатором је објављена од групе аутора. У овој студији је показано да је употреба комерцијално доступног витамина Б1 заједно са ултразвучним таласима играла важну улогу у синтези при чему је брзина реакције повећана, а време реакције скраћено. Након тестирања различитих растварача, утврђено је да је вода најбољи избор. Производи су изоловани не само у добром приносу већ и након кратког реакционог времена (принос

од 94% за 15 минута). Такође је испитивање утицаја ултразвука у свим коришћеним растварачима позитивно утицало на време реакције и принос. Количина катализатора такође игра важну улогу и најбоље резултате је дала употреба 5 mol%.¹³⁴

Као катализатори за синтезу *N,N'*-диметил-супституисаних и несупституисаних 4-арил-3,4-дихидропиримид(ти)она, као и њихових одговарајућих *bis*-аналога у воденој средини, коришћени су различити сулфати земноалкалних метала. Међу испитиваним солима, магнезијум-сулфат хептахидрат ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, познат као Епсомова со) показао се као одличан катализатор, који омогућава добру до одличну искоришћеност полазних супстрата (Схема 27). Овај катализатор пружа могућност синтезе широког спектра једињења, нарочито *N,N'*-диметил-супституисаних тетрахидропиримидона, чија је синтеза ретко забележена у литератури. Процена реакције на различитим супстратима извршена је применом метрике зелене хемије, при чему је утврђена изузетна корелација резултата, што додатно потврђује ефикасност и еколошку прихватљивост предложене методологије.¹³⁵

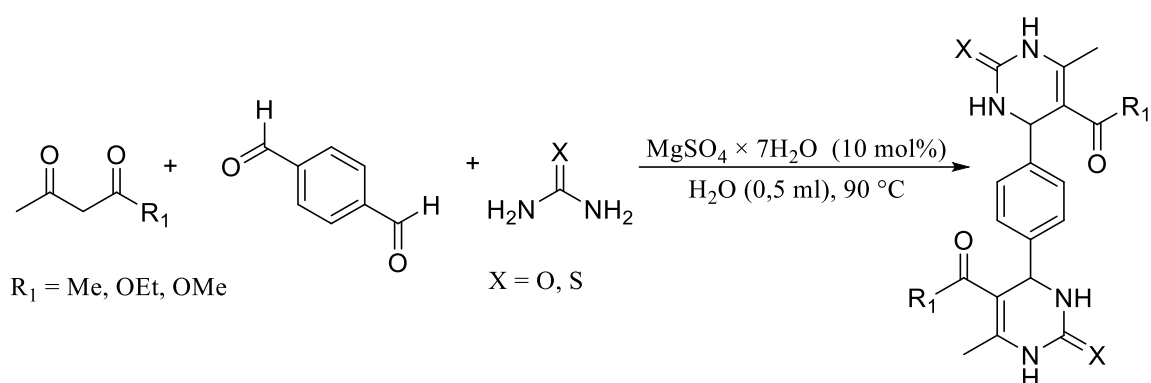


Схема 27. $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ као катализатор у реакцији добијања *bis*-аналога тетрахидропиримидина.

2-Јодокси бензоева киселина се користи као ефикасан катализатор за синтезу тетрахидропиримидина у води. Катализатор може лако да се рециклира једноставном филтрацијом и да се поново користи без значајног смањења каталитичке активности.¹³⁶ Већина до сада објављених радова описује синтезу на милимолској скали, те су Bose и сарадници оптимизовали Biginelli-јеву реакцију са циљем да нова процедура буде погодна за добијање једињења на мултиграмској скали.¹³⁷ Применили су следећи разрађени поступак двофазне синтезе за егзотермне процесе у води који се састоји од следећих корака:

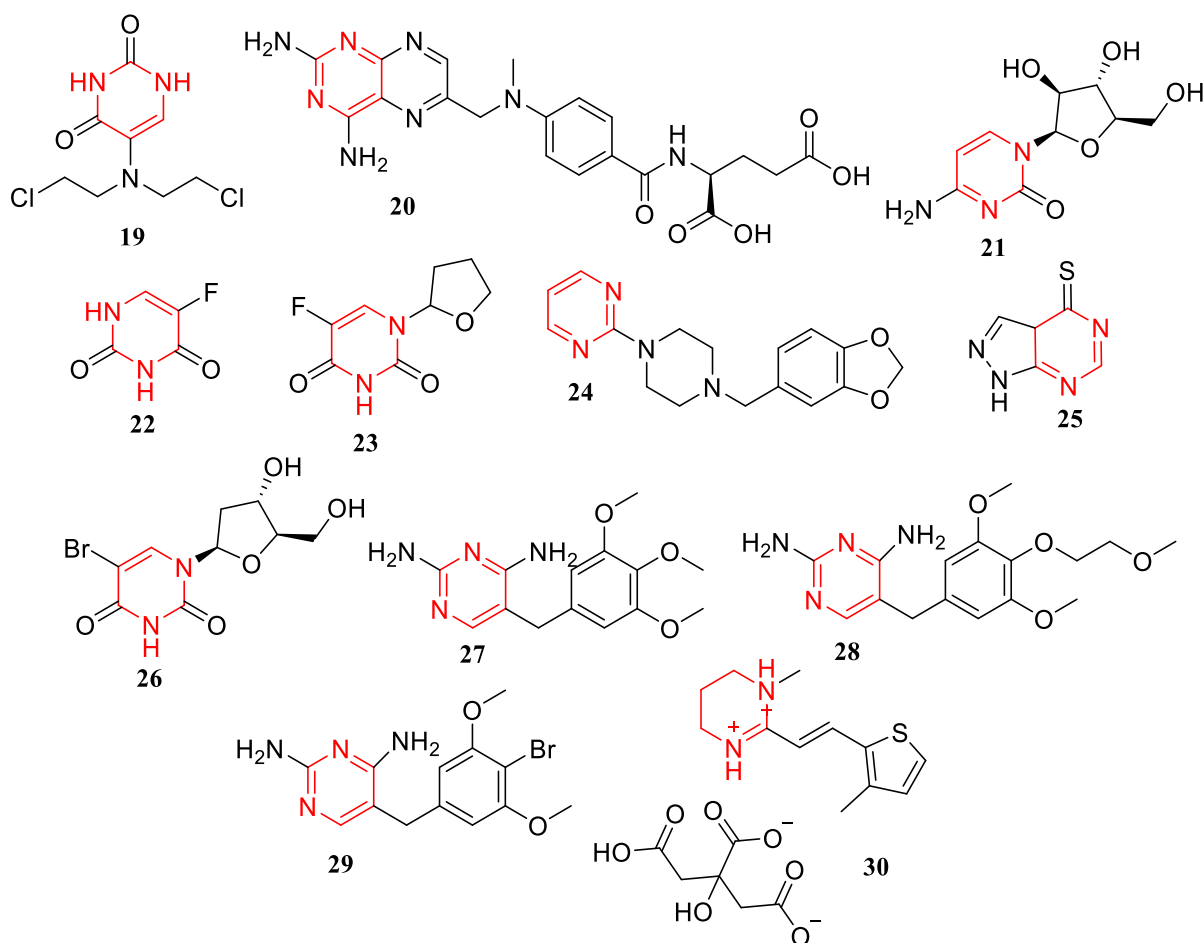
1. у велику запремину воде се додају органски реагенси који се не мешају са водом;
2. ефикасна механичка мешалица се затим користи за енергично мешање два одвојена слоја;
3. одговарајући (кисели или базни) катализатор, ако је потребан за реакцију, се додаје у двофазну смешу.

Како се мешање наставља, температура реакционе смеше расте што указује на почетак егзотермне реакције. Ако је пораст температуре пребрз, може да се дода хладна вода или уситњени лед да би се температура реакционе смеше одржала на жељеном ниском нивоу (обично 50 °C или ниже да би се испаравање svelo на минимум). За почетак су процедуру применили на скали од 50 mmol: помешали су бензалдехид (5,3 g), етил ацетоацетат (6,5 g) и уреу (100 mmol, 6 g, растворен у 15 mL воде) и добијену двофазну смешу су снажно мешали. Бела кристална чврста супстанца је почела да се издваја након пет минута мешања. Тако добијену чврсту супстанцу су процедили, испрали водом и осушили. Утврђено је да је производ чист тетрахидропиримидин у приносу од 93%. Овај

протокол је такође примењен на неколико других супституисаних бензалдехида. У свим случајевима су добијени одговарајући чисти *N*-хетероцикли у приносу већем од 90%. За даље тестирање протокола, Biginelli-јева реакција је успешно остварена полазећи од 250 g следећих алдехида: бензалдехид, салицилалдехид, *пара*-хлорбензалдехид, *пара*-нитробензалдехид и *орто*-хлорбензалдехид. За ове реакције коришћено је око 100 mL воде, док је реакција завршена за мање од 30 мин. Полазна количина од 0,5 kg бензалдехида је такође дала производ у веома задовољавајућем приносу од 93%.¹³⁷

1.5. Биолошка активност деривата тетрахидропиримидина

Тетрахидропиримидинима се приписују бројне биолошке активности, укључујући антипролиферативну, антитуморску, антивирусну, антимикуробну, антиинфламаторну, антиоксидативну, као и инхибицију калцијумских канала. Развојем Biginelli-јеве реакције, број нових деривата тетрахидропиримидина је значајно проширен, што је довело до открића широког спектра фармаколошких својстава. Многи од ових деривата су показали антиепилептично, антималаријско, антихипергликемијско, антихипертензивно и аналгетско дејство, уз бројна друга биолошка дејства.^{138,139} Према подацима са SciFinder-a, више од 70.000 различитих тетрахидропиримидина са неким биолошким дејством је објављено до сада, док је на тржишту доступан велики број лекова који у својој структури садрже пиримидински прстен, а неке од ових структура су приказане на **Слици 8**.



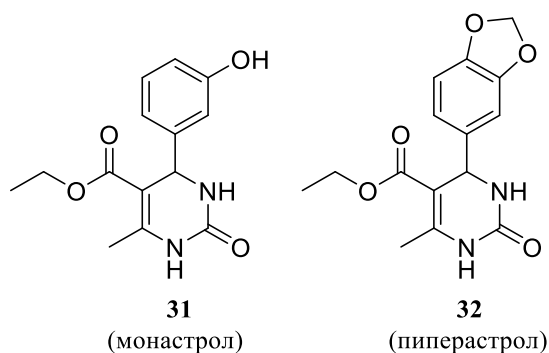
Слика 8. Лекови који у својој структури садрже пиримидински фрагмент доступни на тржишту.

1.5.1. Антитуморска и антипролиферативна активност

Канцер је један од водећих узрочника смрти у свету, а према подацима Светске здравствене организације скоро 10 милиона људи је умрло од неког облика канцера у 2020. години.¹⁴⁰ Појам канцер се односи на све врсте малигних тј. злоћудних тумора, док се појам карцином односи на врсту канцера који се развија од епителних ћелија. Најчешћи дијагностиковани карциноми су карцином дојке, плућа и простате.¹⁴⁰ Иако се у литератури често појмови антипролиферативна и антитуморска односно антиканцерогена активност користе као синоними, ови појмови означавају различите начине деловања. Наиме, антипролиферативна активност се дефинише као способност неког агенса да заустави раст ћелија тј. да заустави њихову деобу, док се антитуморска активност односи на цитотоксичност неке супстанце тј. њену особину да уништава ћелије на неки одређени начин (обично је реч о апоптози).

Након открића монастрола (Слика 9) и објављивања првог рада 1999. године¹⁴¹ који се бавио дејством монастрола на малигне туморске ћелије, започела је експанзија у синтези сличних једињења. Откривено је да монастрол прекида митозу тако што инхибира моторну активност кинезина Eg5, протеина који спада у групу моторних протеина и од виталног је значаја за формирање деобеног вретена. Данас се многобројне истраживачке групе баве синтезом аналога монастрола и испитивањем њихове антиканцерогене активности.

Russowsky и сарадници¹⁴² су синтетисали оксо-монастрол и друге оксо- и тио-деривате од којих се пиперастрол показао као најбољи аналог из те серије на основу концентрације овог једињења потребне да инхибира активност туморских ћелија за 50% (енг. *Inhibitory Concentration*, IC₅₀). Наиме, пиперастрол је према испитаним малигним ћелијама испољио цитотоксично дејство са следећим IC₅₀ вредностима: MCF-7 ћелијска линија карцинома дојке (1,9 µg/mL), 786-О ћелијска линија карцинома бубрега (2,0 µg/mL), HT-29 ћелијска линија колоректалног аденокарцинома (2,5 µg/mL), UACC-62 ћелијска линија меланома (6,0 µg/mL) и OVCAR-3 ћелијска линија серозног карцинома јајника (6,6 µg/mL).

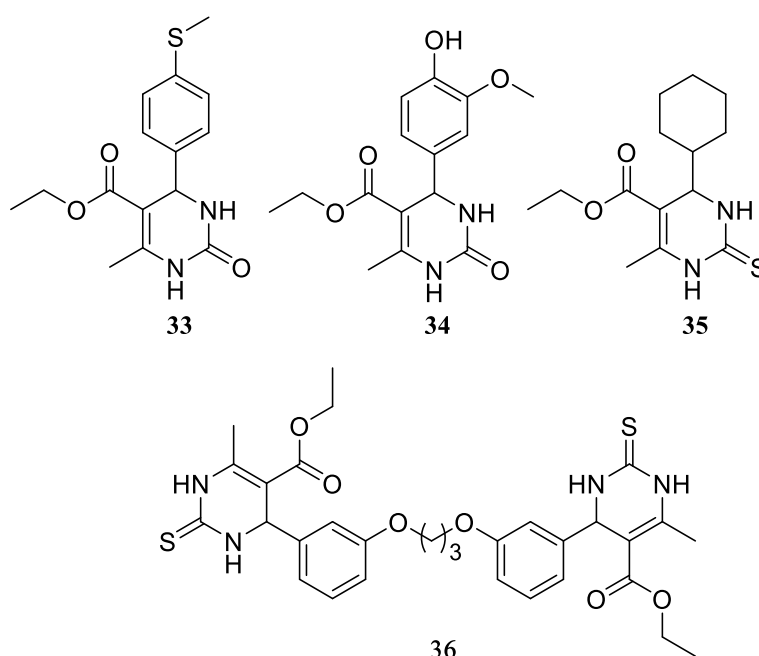


Слика 9. Молекулске структуре монастрола и пиперастрола.

Da Silva и сарадници су 2012. године објавили рад у коме су описали синтезу 26 нових тетрахидропиримидина, од тога 16 аналога монастрола и испитали њихову активност на следећим ћелијским линијама: U251 (глиобластом), NCI-ADR/RES (мулти-лек-резистентни карцином јајника), 786-О, NCI-H460 (неситноћелијски карцином плућа), PC-3 (аденокарцином простате), OVCAR-3 и HT-29 (колоректални аденокарцином).¹⁴³ За тестове цитотоксичности коришћен је агенс сулфородамин Б, а доксорубицин као позитивна контрола, док су концентрације једињења изражене као GI₅₀ вредности (концентрација при којој је раст ћелија инхибиран за 50%; енг. *Growth*

Inhibition). Ћелијске линије U251, NCI-ADR/RES, PC-3 и OVCAR-3 су биле најосетљивије на дејство већине испитиваних једињења при вредностима $GI_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$, док је једињење **33** било једино које је показало цитотоксично дејство на свим туморским ћелијским линијама у концентрацијама нижим од $10 \mu\text{g/mL}$. Најмање су два једињења била активнија од монастрола на свим испитиваним малигним ћелијским линијама, док су једињења **34** и **35** показала исту активност као и референтни лек доксорубицин на ћелијским линијама NCI-ADR/RES и PC-3. Ова група синтетисаних монастролових структурних аналога се показала као активнија од претходно објављених у раду Russowsky-ог и сарадника,¹⁴² премда активност умногоме зависи од хистолошког порекла ћелијских линија.

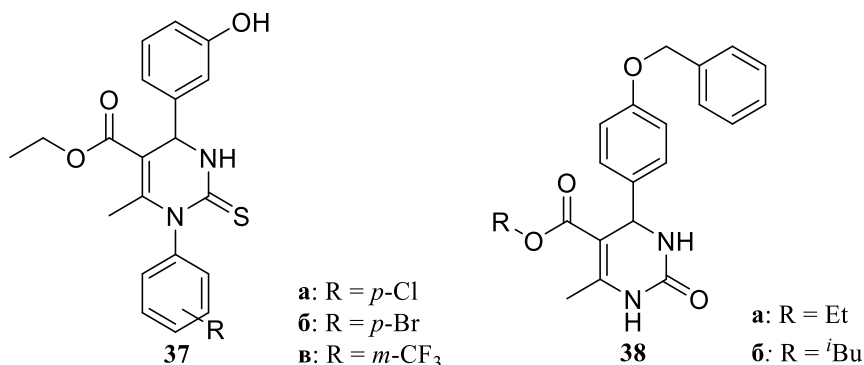
Димери монастрола нису показали импресивну активност на одабраним малигним ћелијским линијама, сем једињења **36** које има алкил мост од три угљеника и естарску групу на позицији C5 пиримидинског прстена (Слика 10). То једињење је према MCF-7 ћелијској линији карцинома дојке испољило цитотоксично дејство са IC_{50} вредношћу од $16 \mu\text{g/mL}$.¹⁴⁴



Слика 10. Деривати монастрола за које је испитана антитуморска активност.

Токсиколошки *in vivo* тестови представљају важан корак у медицинској хемији за потврду селективног дејства нових једињења према малигним ћелијама. У ту сврху се користе *Caenorhabditis elegans* у алтернативној *in vivo* методи за лако и брзо токсиколошко испитивање у почетним фазама развоја лека.¹⁴⁵ *C. elegans* је слободна жива нематода, која може да пружи врло важне податке повезане са акутном или хроничном токсичношћу нових једињења. Gonçalves и сарадници се у својим истраживањима баве синтезом тетрахидропиримидина, посебно оних који би се показали као добри инхибитори кинезина Eg5, те су испитали цитотоксично дејство N1 супституисаних деривата монастрола према U138 и T24 ћелијској линији, као и деловање на *C. elegans* моделу *in vivo*.¹⁴⁶ Деривати који имају *para*-хлорофенил (**37a**), *para*-бромофенил (**37b**) и *meta*-трифлуорометилфенил (**37c**) фрагменте у N1 положају су показали бољу активност од монастрола на испитиваним ћелијским линијама. Једињење **37c** је најактивније ($IC_{50} = 18.52 \pm 7.83 \mu\text{M}$ према T24), а такође је показало и најбољу антиоксидативну активност (Слика 11). Нематодe *C. elegans* су третиране са ова три најактивнија једињења током

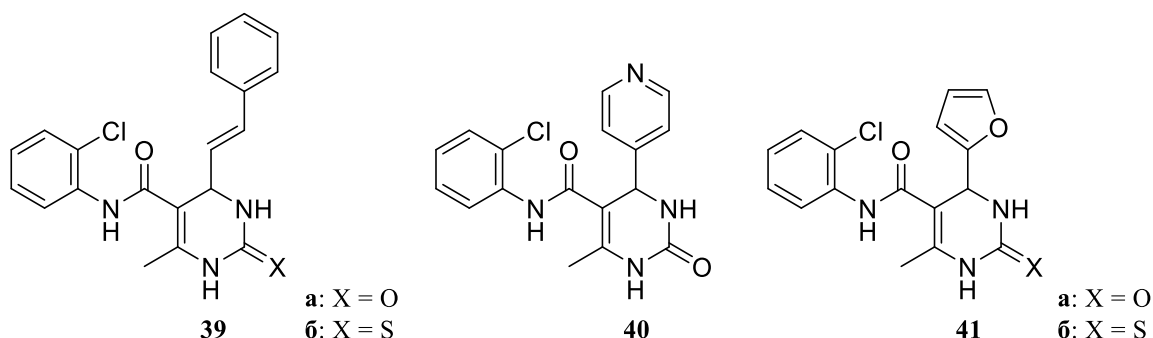
48h и одређена је акутна токсичност (стопа преживљавања), процена нормалног развоја (површина тела) и мерење стварања реактивних кисеоничних врста (ROS). Сва три једињења су се показала као безбедна са високим вредностима латентних доза.



Слика 11. 3-Хидрокси и 4-бензил деривати са значајном антипролиферативном активношћу.

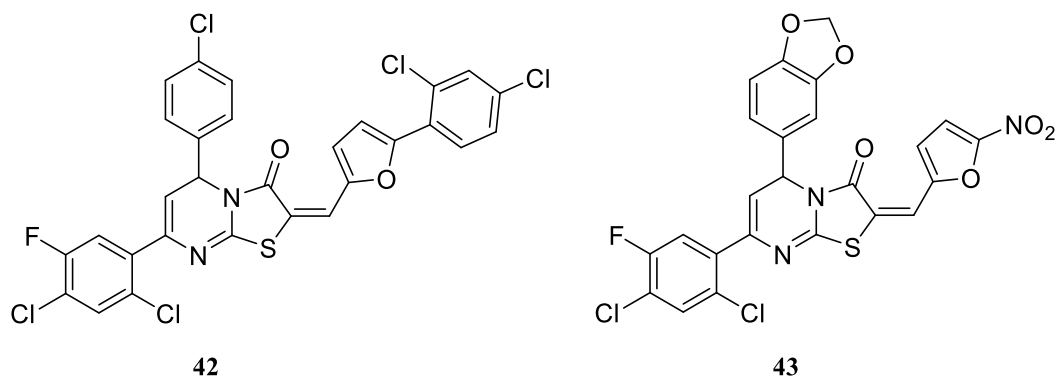
Vala и сарадници су синтетисали бензилокси деривате тетрахидропиримидина и испитали њихову антипролиферативну активност на шест хуманих туморских ћелијских линија: WiDr (аденокарцином дебелог црева), HBL100 и T-47D (карцином дојке), HeLa (карцином грлића материце), A549 и SV1573 (аденокарцином плућа). Користили су цисплатину као референтно једињење и од испитиваних једињења шест је показало значајно антипролиферативно дејство са вредностима GI₅₀ мањим од 5 μ M. Једињења **38a** и **38b** су била најактивнија (Слика 11). На основу анализе односа структуре и активности (енг. *Quantitative Structure–Activity Relationship*, QSAR), закључили су да ацетил група на C5 положају пиримидиноног прстена смањује активност, док присуство *para*-бензилокси фенил групе на пиримидиноном прстену повећава антипролиферативно дејство.¹⁴⁷ С друге стране, супституција са амидном или алкилокси функционалном групом повећава антипролиферативни ефекат. Посебно је присуство изобутоксигрупе имало повољан утицај на повећану ефикасност.

Тетрахидропиримидини који у својој структури садрже цинамоил (**39a** и **39b**), пиридин-4-ил (**40**) и фуран-2-ил (**41a** и **41b**) фрагменте су показали цитотоксично дејство према MCF-7 ћелијској линији карцинома дојке, где су у концентрацији од 50 μ g/mL спречили раст туморских ћелија за најмање 70% (Слика 12).¹⁴⁸



Слика 12. Цинамоил, пиридин-4-ил и фуран-2-ил деривати који су показали значајно цитотоксично дејство на MCF-7 туморској ћелијској линији.

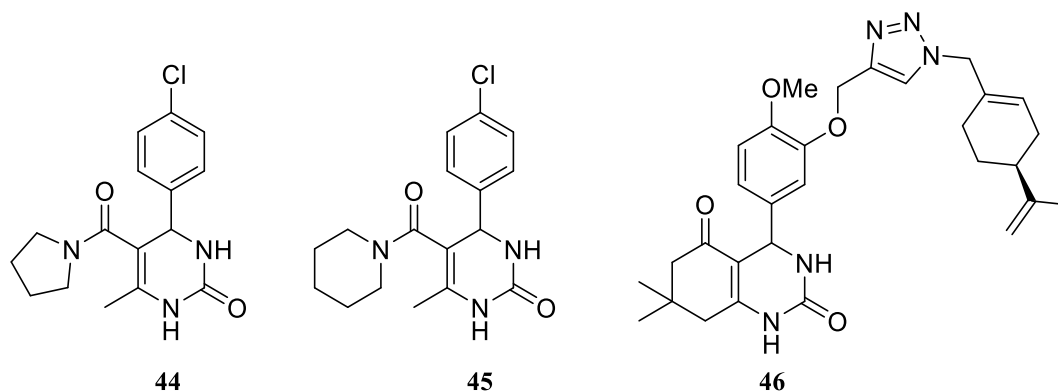
Holla и сарадници су користећи *one-pot** приступ синтетисали тиазолопиримидине кондензацијом халкон тиоурее у етанолу уз КОН. Серија једињења је подвргнута *in vitro* скринингу антитуморске активности на 60 ћелијских линија, које потичу из различитих типова карцинома: плућа, дебелог црева, јајника, простате, дојке, бубрега, централног нервног система, као и леукемије и меланома. Једињења **42** и **43** (Слика 13) са 4-хлорфенил групом и 5-нитро-2-фурфурил остатком показала су најбољу антипролиферативну активност без знакова цитотоксичности при највишој тестираној концентрацији.¹⁴⁹



Слика 13. Тиазолопиримидински деривати.

Soumyanarayanan и сарадници су такође синтетисали деривате монастрола за које су користећи МТТ тест испитали цитотоксичност у *in vitro* условима на HeLa и HepG2 (хепатоцелуларни карцином). Једињења **44** и **45** (Слика 14) су се показала као најактивнија са вредностима IC₅₀ од 124,46 и 120,62 µg/mL према HepG2, респективно. SAR анализа и студије молекулског докинга показале су да положај донора/акцептора водоничне везе на фенилном прстену везаном за пиримидинско језгро има највећи утицај на инхибицију ензима Eg5, што резултира испољавањем антиканцерогене активности. За разлику од монастрола, ова једињења не формирају водоничне везе са аминокиселинским остатком Glu118, вероватно услед одсуства водоник-донорских група на фенилном прстену. Једињење **44** показало је највећу активност према HepG2 ћелијама, док је једињење **45** било најактивније према HeLa ћелијама, са енергијама везивања од -7,54 kcal/mol и -8,67 kcal/mol, респективно. Ове вредности указују на повољно уклапање унутар активног места протеина Eg5 и у сагласности је са експериментално добијеним резултатима.¹⁵⁰

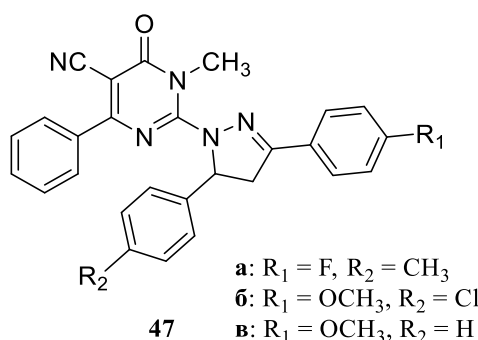
*Код тзв. *one-pot* реакција или реакција у једном суду, сви реактанти ступају у узастопне хемијске реакције без потребе да се настали међупроизводи изолују и пречишћавају.



Слика 14. C5 деривати монастрола.

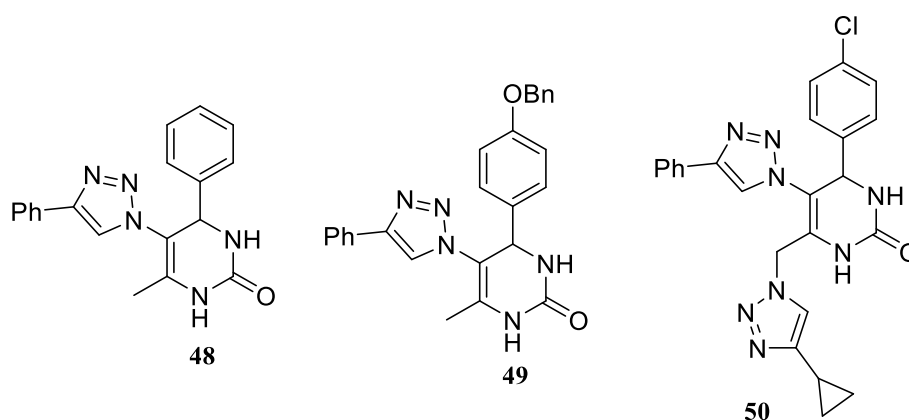
Vendrusculo и сарадници су, користећи комбинацију мултикомпонентне реакције и Huisgen-ове „клик“ реакције, синтетисали 15 хибридних једињења тетрахидропиримидинона. Вођени стратегијом „једно једињење, а више мета“, имали су за циљ да синтетишу библиотеку хибридних тетрахидропиримидина који су преко 1,2,3-триазолног линкера повезани са (*S*)-перилил алкохолом. За синтетисана једињења је испитано антипролиферативно дејство према следећим ћелијама: U251 (глиобластом), MCF-7 (карцином дојке), NCI-ADR/RES (мулти-лек-резистентни рак јајника), UACC-62 (меланом), NCI-H460 (неситноћелијски карцином плућа), 786-O (карцином бубрега), OVCAR-3 (серозни карцином јајника), PC-3 (аденокарцином простате) и HT-29 (колоректални аденокарцином), а доксорубицин је служио као контрола. Резултати активности су изражени као концентрација потребна да потпуно инхибира раст ћелија (енг. *Total Growth Inhibition*, TGI), а четири једињења су показала обећавајуће антитуморско деловање према UACC-62, U251 и OVCAR-3 ћелијама са вредностима TGI испод 10 μM . Седам других једињења показало је антипролиферативно деловање против истих ћелијских линија, са вредностима TGI у распону између 10 и 20 μM . Једињење **46** (Слика 14) је показало високе вредности TGI на здравој ћелијској линији хуманих кератиноцита (HaCaT), која је указивала на селективност према малигним туморским ћелијама са вредностима TGI од 436,18 до 507,82 μM . Ови прелиминарни резултати су обећавајући и захтевају даљу анализу механизма деловања.¹⁵¹

Awadallah и сарадници су синтетисали две нове серије деривата пиразолинил пиримидина реакцијом циклокондензације и испитали њихову потенцијалну антитуморну активност. Кроз варијације у супституентима на два фенил прстена пиразолинског дела, испитан је однос између електронских и липофилних карактеристика једињења. За ова једињења је испитана антипролиферативна активност према следећим туморским ћелијским линијама: HT-29 ћелијска линија колоректалног аденокарцинома, MCF-7 ћелијска линија карцинома дојке, MDA-MB 231 ћелијска линија агресивног трипло-негативног рака дојке и A549 ћелијска линија аденокарцинома плућа. Једињења **47a** и **47b** су показала значајну активност према три од горе поменутих ћелијских линија. Најактивније једињење, **47b** (Слика 15), показало је вредност IC₅₀ од 1,76 μM на A549 ћелијској линији. Једињења **47a** и **47b**, која су показала значајну активност су изабрана за даљу оптимизацију у будућим студијама.¹⁵²



Слика 15. Пиразолински деривати као потенцијални антипролиферативни агенси.

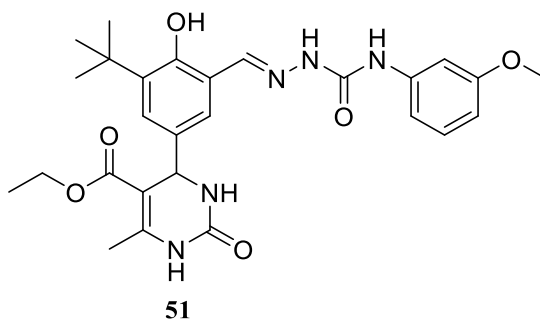
У 2020. години, Carreiro је са сарадницима синтетисао деривате триазол хидропиримидонона за које је испитана антитуморска активност. Из групе од 21 деривата, за осам једињења је урађена детаљнија анализа антипролиферативне ефикасности у *in vitro* условима на шест хуманих туморских ћелијских линија: WiDr ћелијска линија аденокарцинома дебелог црева, HBL-100 и T-47D ћелијске линије рака дојке, A549 и SV1573 ћелијске линије аденокарцинома плућа и HeLa ћелијска линија карцинома грлића материце. Једињења **48**, **49** и **50** су показала значајну антипролиферативну активност према неситноћелијском карциному плућа SV1573, са IC₅₀ вредностима од 17 μ M, 14 μ M и 15 μ M, респективно. Једињење **49** је показало активност и према ћелијским линијама A549 и HeLa, док је једињење **50** било активно на A549, HBL-100 и WiDr што указује на њихов потенцијал за даља испитивања. Структуре поменутих једињења су приказане на **Слици 16**.¹⁵³



Слика 16. Тетрахидропиримидини који садрже фрагмент триазола са антипролиферативним дејством.

Лигазе дезоксирибонуклеинске киселине (ДНК) играју кључну улогу у процесима репликације, поправке и рекомбинације ДНК. Све ДНК лигазе садрже очуван каталитички центар, који омогућава грађење нових хемијских веза. Међу њима, хумана лигаза 1 (енг. *human ligase 1*, hLig1) је главни репликативни ензим који учествује у спајању Оказакі фрагмената током ДНК репликације. Поред тога, повишени нивои hLig1 пронађени су у различитим типовима карцинома, укључујући рак дојке, плућа и јајника. Последњих година откривен је велики број терапеутских агенаса усмерених ка деловању на репликацију ДНК у лечењу малигних тумора. Водећи се тиме, синтетисана је серија нових хибридних једињења тетрахиdropиримидина и семикарбазона применом региоселективне вишекомпонентне реакције за које је испитана инхибиција hLig1. За сва синтетисана једињења испитана је способност инхибиције hLig1 при чему је већина

показала добру до умерену активност. Од тестираних деривата, једињење **51** је показало селективну и дозно зависну антипролиферативну активност на HepG2 ћелијској линији са IC_{50} вредношћу $10,07 \pm 1,2 \mu M$. Такође је деловањем једињења **51** преживљавање ћелија било смањено при концентрацији $\leq 20 \mu M$. Анализа лизата третираних HepG2 ћелија помоћу вестерн блот теста показала је повећане нивое $\gamma H2AX$ и повећање p53, што је довело до апоптозе. *In silico* резултати су показали да се једињење **51** везује за ДНК у домен ензима hLig1 и на тај начин спречава његову активност затварања уреза. Поред тога, повољна фармакокинетичка својства сугеришу да нова класа hLig1 инхибитора има потенцијала за даљи развој лекова (Слика 17).¹⁵⁴



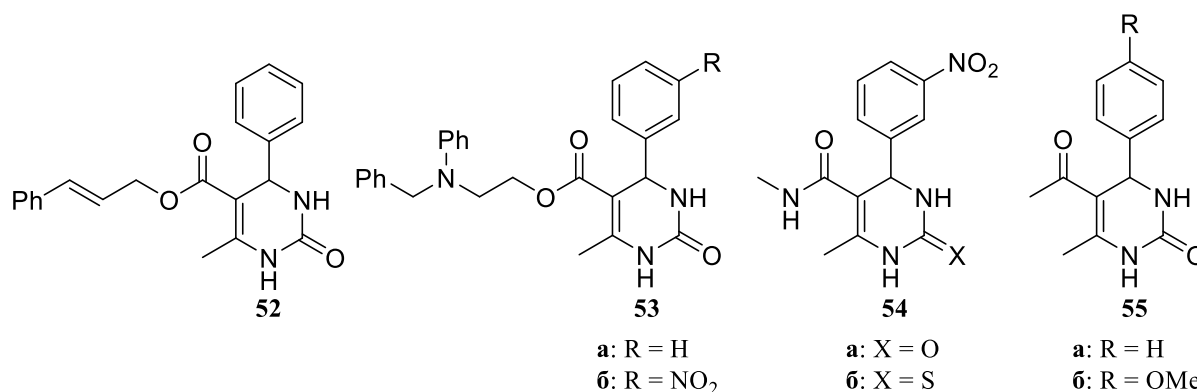
Слика 17. Инхибитор hLig1.

1.5.2. Антиоксидативна активност

Реактивне кисеоничне врсте (ROS) и реактивне азотове врсте (енг. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) се у организму стварају у физиолошким условима процесом оксидативне фосфорилације у митохондријама тј. током ћелијског дисања, затим током оксидоредукције у присуству метала са промењивом валенцом, аутооксидације малих молекула, код инфламација и болести (аутоимуне болести, неуродегенеративне, малигне, кардиоваскуларне и др.), биотрансформацијом ксенобиотика, при појачаној физичкој активности, при тровањима, итд. Како ROS и RNS веома брзо ступају у интеракције са свим типовима биомолекула из окружења (липиди, протеини и ДНК), прекомерна производња ових реактивних врста има за последицу свеукупно оштећење ћелијске функције када ћелијски антиоксидативни систем није у стању да ефикасно врати нормалне нивое, што на крају може довести до болести.

Први рад који се бавио антиоксидативним својствима Biginelli-јевих једињења објављен је 2006. године. У том истраживању испитивана је способност ових молекула да инхибирају формирање ROS и спрече липидну пероксидацију код одраслих мужјака *Wistar* албино пацова.¹⁵⁵ Stefani и сарадници су проучавали антиоксидативни потенцијал новосинтетисаних једињења добијених применом ултразвучног зрачења. Сва испитивана једињења испољила су одређени степен антиоксидативне активности. Једињења **52** и **53a** су показала највећи потенцијал у редукцији нивоа ROS, док су аналози **53a** и **53b** показали изразиту активност у инхибицији липидне пероксидације изазване Fe^{2+} -EDTA системом. Аутори су закључили да антиоксидативна активност потиче од амино групе у бочном ланцу естара, док на ефикасност у смањењу нивоа ROS утиче присуство нитро групе у ароматичном прстену.¹⁵⁵

Kumar и сарадници су поред антиканцерогеног потенцијала, испитивали и *in vitro* антиоксидативни профил новосинтетисаних тетрахидропиримидина помоћу 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) методе.¹⁴⁸ Међу 32 једињења, једињења **54a** и **54b** са 3-нитро групом на ароматичном прстену везаном за пиримидинско језгро су показала добру антиоксидативну активност са IC_{50} вредношћу од 58 и 63 $\mu g/mL$ (Слика 18).



Слика 18. Једињења која су показала значајну антиоксидативну активност.

Vasconcelos и сарадници су помоћу Biginelli-јеве реакције синтетисали тетрахидропиримидине користећи винску или лимунску киселину као катализаторе, у етанолу као растварачу. За изабрана једињења из серије је процењен антиоксидативни капацитет коришћењем DPPH теста и методе за одређивање тиобарбитурна киселина реагујуће супстанце (TBARS). Једињења **55a** и **55b** су при концентрацији од 200 и 300 μ M показала смањену пероксидацију липида и антиоксидативну активност.¹⁵⁶ Jayanthi и сарадници су испитали антиоксидативни, антифунгални и антибактеријски потенцијал тетрахидропиримидина добијених помоћу *para*-толуенсулфонске киселине као катализатора. Једињења која у положају C4 пиримидинског прстена садрже индолски фрагмент су показала добре антиоксидативне способности у поређењу са аскорбинском киселином која је коришћена као позитивна контрола.¹⁵⁷

Gangwar и сарадници су показали да оксална киселина катализује Biginelli-јеву реакцију чак и у веома малој количини (2 mol%), док су антиоксидативна својства испитиваних једињења процењена применом три комплементарне методе: одређивањем редукционог потенцијала, способношћу неутралисања DPPH радикала, и способношћу хелације Fe²⁺ јона. Једињења која имају OH групу су показала потенцијал уклањања DPPH радикала као стандардна једињења.¹⁵⁸ Такође, једињења која у структури садрже фурил фрагмент на C4 позицији пиримидинског језгра су дала добре резултате DPPH теста.¹⁵⁹

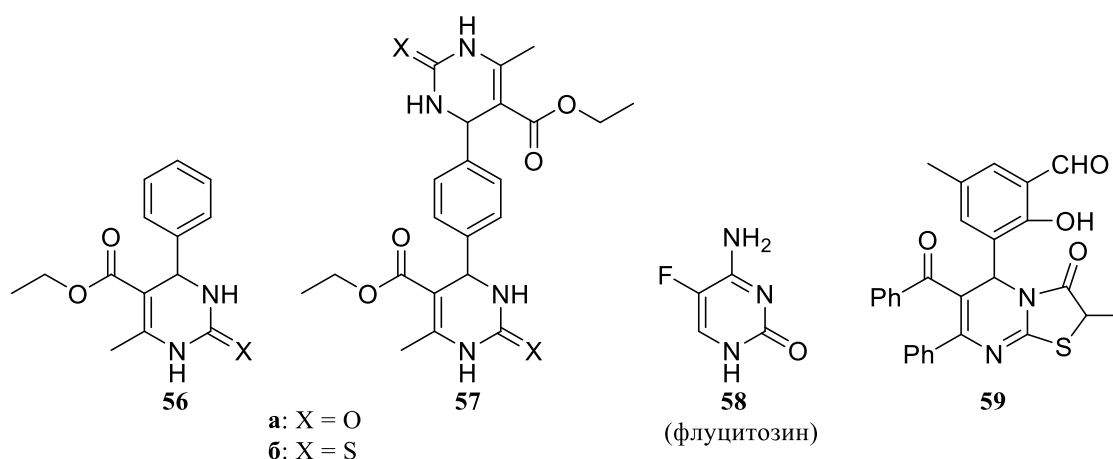
1.5.3. Антимикробна активност

Светска здравствена организација (СЗО) прогласила је антимикробну резистенцију једном од десет највећих глобалних здравствених претњи. Гљивичне инфекције су један од најчешћих узрока инфекција у свету и погађају милијарде људи годишње. Инвазивне гљивичне инфекције могу бити опасне по живот, а у 2020. години је забележено 1,7 милиона смртних случајева проузрокованих гљивичним болестима, док се за бактеријску резистенцију процењује да је директно одговорна за 1,27 милиона смртних случајева у 2019. години, док је допринела смрти 4,95 милиона људи на глобалном нивоу.¹⁶⁰ Антимикробна резистенција настаје када бактерије, вируси, гљивице и паразити више не реагују на антимикробне лекове. Као резултат резистенције на лекове, антибиотици и други антимикробни лекови постају неефикасни, а инфекције постају тешке или немогуће за лечење, повећавајући на тај начин ризик од ширења болести, тешке болести, инвалидитета и смрти. Антимикробна резистенција је природни процес који се дешава током времена кроз генетске промене у патогенима. Међутим, људска активност, углавном злоупотребом и прекомерном употребом антимикробних средстава за лечење, превенцију или контролу инфекција код људи, животиња и биљака

узрокује знатно бржу појаву резистенције. Антимикробна резистенција представља сложен проблем који захтева циљане активности у секторима здравства, производње хране, узгоја животиња и заштите животне средине, као и координисан приступ између ових области. Поред осмишљавања и спровођења програма, политика, законских мера и истраживања у циљу ублажавања антимикробне резистенције и постизања бољих здравствених и економских исхода, потреба за новим и ефикасним антибиотикима и антимикотикима постаје све израженија. Ово је нарочито важно имајући у виду ограничен број антифунгалних и антибактеријских агенаса који су тренутно доступни на тржишту, посебно за одређене врсте патогена.¹⁶¹

1.5.3.1. Антифунгална активност

Wani и сарадници су због доказано добре стратегије у којој се дериватизовањем већ познатих лекова добијају ефикаснија једињења, синтетисали структурне аналоге флуцитозина **58** (енг. *flucytosine*), који је одобрен од стране FDA и користи се у лечењу инфекција узрокованих гљивицима из рода *Candida* и *Cryptococcus* (Слика 19).¹⁶² За све новосинтетисане деривате из те студије је испитана антифунгална активност појединачно и у комбинацији са два најчешће коришћена антимикотика, амфотерицина Б и флуконазола, на различитим сојевима *Candida albicans* који су изоловани од HIV позитивних пацијената Академске болнице *Charlotte Maxeke* у Јоханесбургу.



Слика 19. Једињења која показују антигљивично дејство према гљивицима из рода *Candida*.

Дианалози су били активнији од њихових одговарајућих моноаналога, те можемо да кажемо да присуство више сличних биоактивних прстенова побољшава биолошки профил једињења. Једињење **57б** је било најактивније према свим коришћеним сојевима са минималном инхибиторном концентрацијом (енг. *minimal inhibitory concentration*, MIC) од 1 до 32 $\mu\text{g/mL}$. Једињење **59** које је дериват тиазолопиримидина, је показало добру активност према тестираним сојевима квасца (*Candida albicans* ATCC 14053, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258) са MIC вредностима од 40 до 80 $\mu\text{g/mL}$, док су сва једињења из серије показала умерену активност према сојевима бактерија.¹⁶³

Rajanarendar и сарадници су објавили *one-pot* Biginelli-јеву реакцију 2-хлоробензалдехида, етил ацетоацетата и 1-(5-метилизоксазол-3-ил)-3-фенил тиоуреа у присуству 10 mol% амонијум-хексанитратоцерат(IV) у метанолу на 80 °C током 3 h, при чему су добили изоксазол-тетрахидропиримидин-тион карбоксилате (**60**) у приносу од 80–90%. Загревањем добијеног једињења са 3-амино-5-метилизоксазолом током 10 h у

дифенил етру, на 200 °C у атмосфери азота, дошло је до нове циклизације при којој настају 2-тиоксо-2,3,6,10b-тетрахидропиримидо[5,4-с]хинолин-5(1H)-он једињења (**61**).¹⁶⁴ Једињења која имају *para*-толил и *para*-метоксифенил групу везану за азотов атом у пиримидинском прстену су у значајној мери инхибирала раст свих пет сојева испитиваних гљивица (*Aspergillus niger* MTCC 282, *Chrysosporium tropicum* MTCC 2821, *Rhizopus oryzae* MTCC 262, *Fusarium moniliformae* MTCC 1848, и *Curvularia lunata* MTCC 2030).

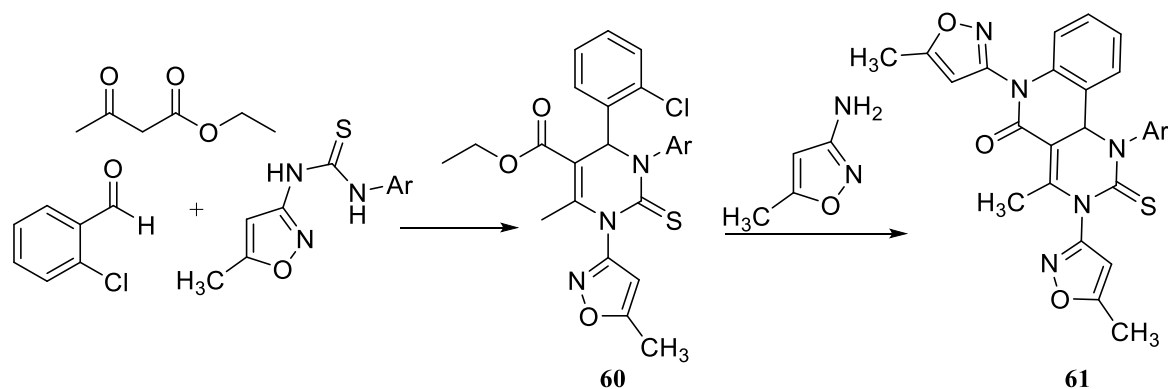


Схема 28. Тетрахидропиримидохинолини **61** као потенцијални антимиотици.

Chitra и сарадници су испитивали антимиотички потенцијал једињења добијених у Biginelli-јевој реакцији алдехида, изопропил ацетоацетата и урее/тиоурее у етанолу и стронцијум хлорида хексахидрата као катализатора (Схема 29).¹⁶⁵ Једињења типа **62** су била ефикаснија од лека амфотерицина Б, који је коришћен као контрола код свих тестираних гљивица: *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Rhizopus* и *Mucor*. Једињења која имају супституенте у 4-арил положају су најактивнија.

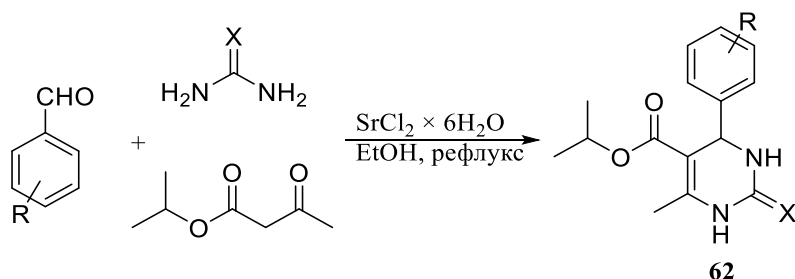
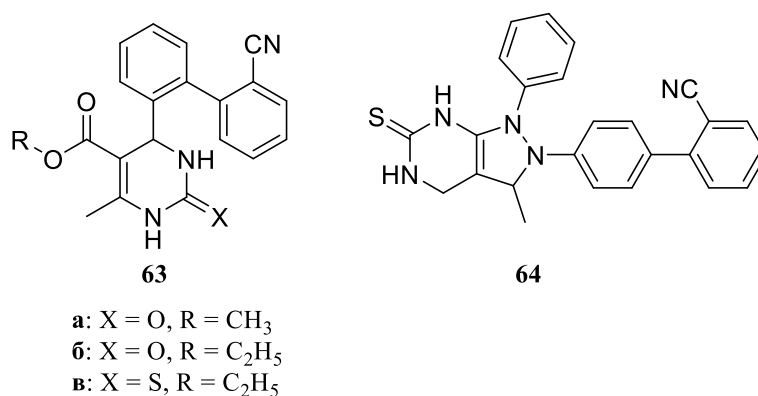


Схема 29. Синтеза тетрахидропиримидина са антимиотичким дејством.

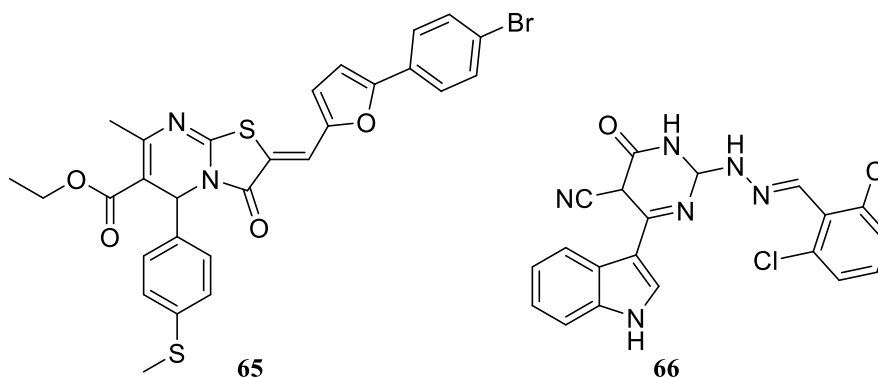
1.5.3.2. Антибактеријска активност

Маkwана и сарадници су 2019. године синтетисали серију од четрнаест нових деривата тетрахидропиримидина који садрже цијано групу. Користећи дилуциону методу су одредили минималне инхибиторне концентрације синтетисаних једињења *in vitro*. Резултати су показали да су једињења **63a** и **63b** веома активна против Грам-позитивних бактерија *S. aureus* и *B. Megaterium*, док су једињења **63v** и **64** изузетно активна против Грам-негативних бактерија *P. fluorescens* и *S. Marcensus* (Слика 20).¹⁶⁶



Слика 20. Цијано деривати тетрахидропиримидина.

Тиазолопиримидини су показали обећавајуће резултате и као антифунгални и као антибактеријски агенси. Нарочито се једињење **65** истакло као најактивније према сојевима гљивица [*Aspergillus flavus* (NCIM No. 524), *Aspergillus fumigatus* (NCIM No. 902), *Candida albicans* (NCIM No. 3100) и *Penicillium marneffei*] и на сојевима бактерија [*Escherichia coli* (ATCC-25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) и *Klebsiella pneumoniae*] са MIC вредностима у рангу стандардних једињења при концентрацији од 10 µg/mL.¹⁶⁷



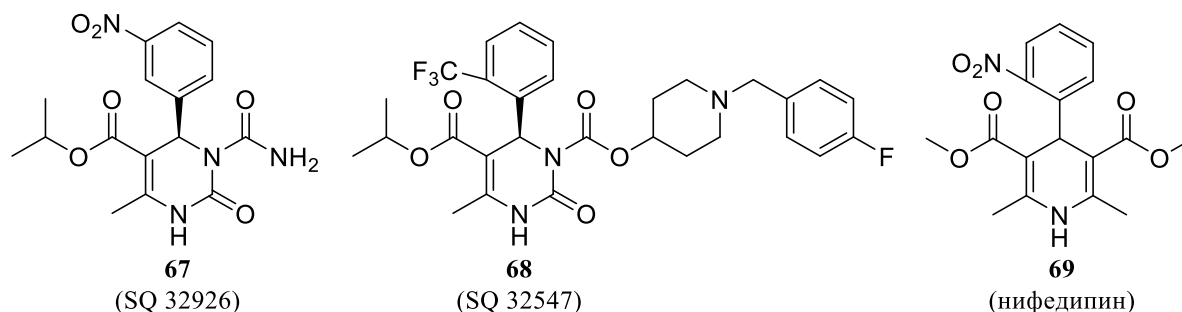
Слика 21. Потенцијални антимикробни агенси.

Развој терапеутика са дуалним дејством се све чешће примењује, а тетрахидропиримидини са индолским фрагментом су се показали као потенцијални ефикасни антиинфламаторни и антимикробни агенси.¹⁶⁸ Једињење **66** је показало 71,14% инхибиције едема и 12,5 µg/mL MIC против сојева бактерија и гљивица (Слика 21).

1.5.4. Тетрахидропиримидини као блокатори калцијумових канала

Калцијумови канали су јонски канали који регулишу улазак јона калцијума у многа екситабилна ткива. Идентификоване су различите изоформе калцијумових канала и показано је да посредују у специјализованим ћелијским функцијама и деле се у две велике групе: лиганд-зависни и волтажно-зависни калцијумови канали. Због своје фундаменталне природе, они се сматрају важним метама у терапији хипертензије и можданог удара, али и код лечења хроничног бола и епилепсије.¹⁶⁹ Група дихидропиридинских деривата нифедипинског типа, користи се од 80-их година прошлог века за лечење високог крвног притиска и кардиоваскуларних обољења. Од тада су синтетисани многи аналози нифедипина који би се користили за лечење хипертензије,

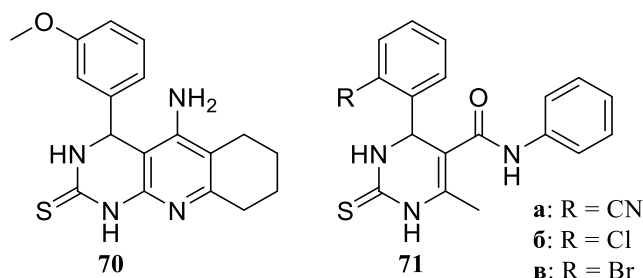
али и других болести повезаних са Ca^{2+} каналима. N3-Ацил супституисани аналози **67** (SQ 32926) и **68** (SQ 32547) су идентификовани као моћни орално активни антихипертензивни агенси. Поред тога, помажу у превенцији или ублажавању исхемије.^{170,171} Њихова активност је испитана кроз инхибицију индукованих контракција аорте пацова, при чему су вредности биле 5,5 nM за **68** (SQ 32547) и 8,1 nM за **67** (SQ 32926), док је референтни лек, нифедипин, имао вредност од 2,9 nM (Слика 22).



Слика 22. *In vivo* испитани инхибитори Ca^{2+} канала (SQ 32926 и SQ 32547) и структура нифедипина.

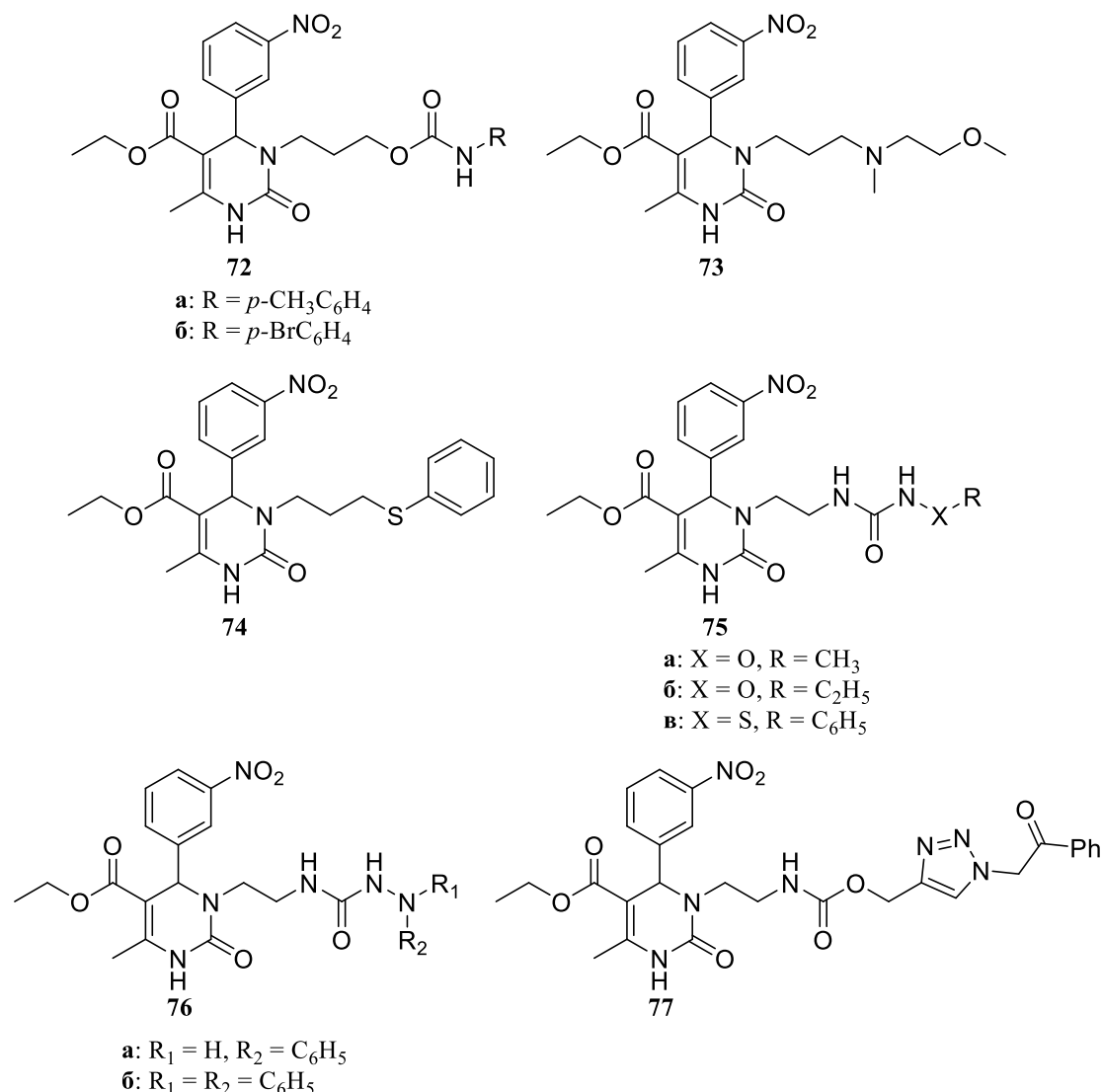
Chioua и сарадници су истраживали вишециљни терапијски приступ за лечење Алцхајмерове болести, који обухвата инхибицију хумане холинестеразе (енг. *human cholinesterase*, hChEs) и блокаду Ca^{2+} канала. Синтетисали су једињења која у својој структури садрже пиримидин и хинолин и која су означена као такрипиримидини, будући да су структурно сродна такрину, познатом инхибитору холинестераза.¹⁷² Активности испитиваних једињења поређене су са стандардним леком нимодипином. Кроз свеобухватне *in vitro* и *in silico* анализе, утврђено је да се биолошка активност може модификовати заменом ароматичног прстена на позицији C4. Аналози са халогеним супституентима на тој позицији показали су највећи инхибиторни потенцијал према хуманим холинестеразама, док је присуство диметиламино групе такође значајно допринело активности. Међу свим синтетисаним дериватима, једињење **70** (Слика 23) се издвојило као снажан инхибитор и Ca^{2+} канала и hChEs. Показало је одличну оралну апсорпцију и пролазак кроз крвно-мождану баријеру, без индикација значајне хепатотоксичности.

Mahgoub и сарадници су 2021. године објавили рад о синтези нових биоизостера пиримидина, за које су испитивали способност инхибиције калцијумових канала са додатним инхибиторним дејством на ангиотензин-конвертујући ензим 2 (ACE2). Коришћењем нифедипина као референтног лека, анализирана су антихипертензивна својства свих једињења, као и њихова способност блокаде калцијумових канала. За испитивање антиинфламаторне активности коришћене су ћелије хуманог моноцитног порекла стимулисане липополисахаридом, као модел инфламације. Продукција С-реактивног протеина и интерлеукина-6 коришћена је као индикатор степена упалног одговора. Међу свим једињењима, **71a**, **71b** и **71v** су имала најзначајнију антихипертензивну активност у поређењу са нифедипином (Слика 23).¹⁷³



Слика 23. Инхибитор hChEs (**70**) и инхибитори ензима ACE2 (**71а–в**).

За тетрахидропиримидине који носе различите липофилне фармакофоре на положају 3, испитивано је да ли могу да блокирају калцијумове канале.¹⁷⁴ Међу различитим блокаторима калцијумових канала, блокатори Т-типа (CaV3) су се показали као потенцијални терапеутски агенси за различите неуропсихијатријске поремећаје као што су хронични бол, епилепсија, Паркинсонова болест, аутизам, зависност и анксиозност.^{169,175} Активност калцијумових канала Т-типа је такође неопходна за функцију кардиоваскуларног система, због чега су канали овог типа важан таргет у развоју нових антихипертензивних лекова.^{176,177} Кардиоваскуларни агенси који се данас користе углавном циљају изоформу L-типа (CaV1.2), коју препоручују Европско друштво за хипертензију и Европско кардиолошко друштво у ESC/ESH смерницама за лечење артеријске хипертензије из 2018. године.¹⁷⁸ С обзиром на наведено, за новосинтетисана једињења је испитана способност блокирања CaV1.2 и CaV3.2 канала применом електрофизиолошке технике при концентрацији од 10 μ M. Седам једињења (**72a**, **72б**, **73**, **74**, **75a**, **75в** и **76a**) је успешно блокирало оба типа калцијумових канала, док су три једињења (**75б**, **76б** и **77**) показала селективност према CaV3.2. Рачунарска предвиђања указују да ова једињења имају добре физичко-хемијске особине и повољне фармакокинетичке параметре, што их чини dobrim кандидатима за даља испитивања.¹⁷⁴ Bryzgalov и сарадници су синтетисали деривате **78a–д** и **79** (Слика 24) коришћењем α -нитроацетофенона као активне метиленске компоненте у Biginelli-јевој реакцији. Испитивано је дејство једињења **78a–д** и **79** на пацовима код којих су аритмије изазване калцијум-хлоридом и епинефрин-хидрохлоридом. Показано је да ова једињења имају израженије антиаритмијско дејство у односу на лидокаин и кинидин.¹⁷⁹ Тест интравенске примене на пацовима показао је да једињења **78в** и **78д** испољавају најизраженији антиаритмијски ефекат. Насупрот томе, дериват **78д** са 2-тиокарбонилном групом имао је најнижи ниво активности, што указује да је присуство 2-карбонилне групе од кључне важности за постизање жељеног фармаколошког ефекта. Занимљиво је да испитивани тетрахидропиримидински деривати нису показали значајан утицај на артеријски притисак, што их разликује од класичних нифедипинских блокатора калцијумових канала.¹⁸⁰

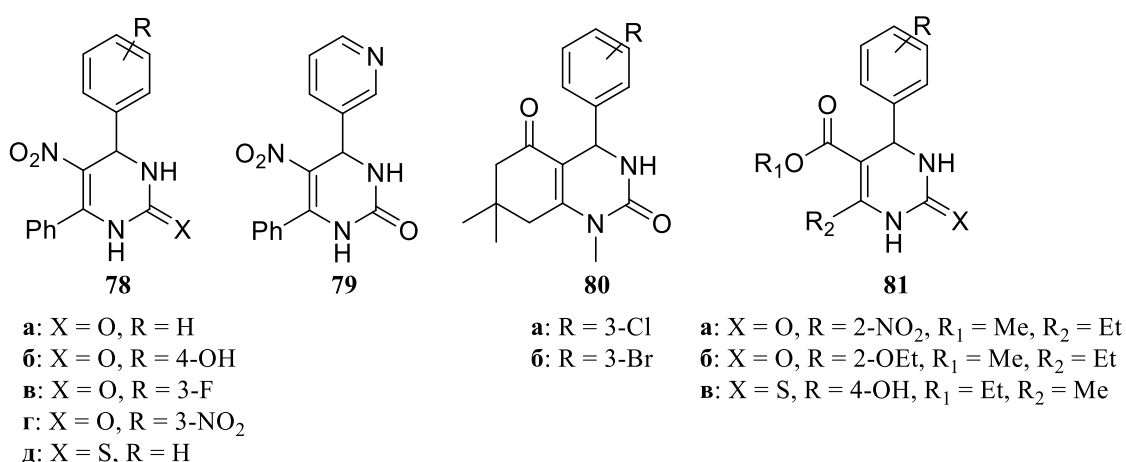


Слика 24. *N*3-derivati тетрахидропиримидина са значајном способношћу блокирања Ca²⁺ канала.

Међу 25 испитиваних аналога, једињења **80a** и **80б** показала су најизраженију биолошку активност. При концентрацији од 10⁻⁴ M, једињење **80a** изазвало је релаксацију изолованог илеума пацова у процентима од 68,67 ± 4,50%, док је једињење **80б** постигло релаксацију од 62,33 ± 6,77%. Штавише, једињење **80a** испољило је релаксантни ефекат од 38,83 ± 5,84% на изолованој каротидној артерији јагњета, што је премашило ефекат референтног лека никардипина (35,50 ± 4,16%). Иста истраживачка група синтетисала је даље једињења из класе тетрахидропиримидина и испитивала њихову способност блокирања калцијумових канала. Међу новим дериватима, једињења **81a** и **81б** показала су најзначајније ефекте. При концентрацији никардипина од 10⁻⁵ M, која је довела до 100% инхибиције контракција, једињења **81a** и **81б** инхибирала су контракције изазване BaCl₂ у илеуму пацова са вредностима од 95,50 ± 2,07% и 87,50 ± 1,50%, респективно. Истовремено, једињење **81б** је инхибирало контракције изазване KCl у торакалној аорти пацова у вредности од 19,33 ± 6,59%, што је било упоредиво са ефектом никардипина (20,50 ± 2,89%).¹⁸¹

Студија коју су спровели Sujatha и сарадници показала је да тетрахидропиримидини делују позитивно на одређене срчане болести. Међу испитиваним једињењима са варијацијама у положају 4, једињење **81в**, са 4-

хидроксифенилном групом у С4 положају пиримидинског језгра, показало је већу активност у поређењу са дигоксином, који је коришћен као референтни лек.¹⁸² Са друге стране, Singh и сарадници су синтетисали класу рацемских и енантиомерно чистих тетрахидропиримидина са алифатичним низом у С4 положају. Испитивали су њихов потенцијал као блокатора калцијумових канала на основу способности да инхибирају контракције глатких мишића крвних судова изазвану деполаризацијом мембране у каротидним артеријама свиња.¹⁸³ Нова једињења, заједно са нифедипином, тестирана су у опсегу концентрација од 1 μM до 30 mM. Нифедипин је потпуно инхибирао контракције изазване KCl, са вредностима IC_{50} реда величина 10 μM . Насупрот томе, испитивана тетрахидропиримидинска једињења су максимално смањила контракције за само 40%, са IC_{50} вредностима у распону од 100–300 μM . Поређење активности једињења са алифатичним низом у С4 положају у односу на једињења која у истом положају имају арил супституенте, није указало на значајно побољшање биолошке активности.



Слика 25. Деривати који се потенцијално могу користити у лечењу кардиоваскуларних обољења.

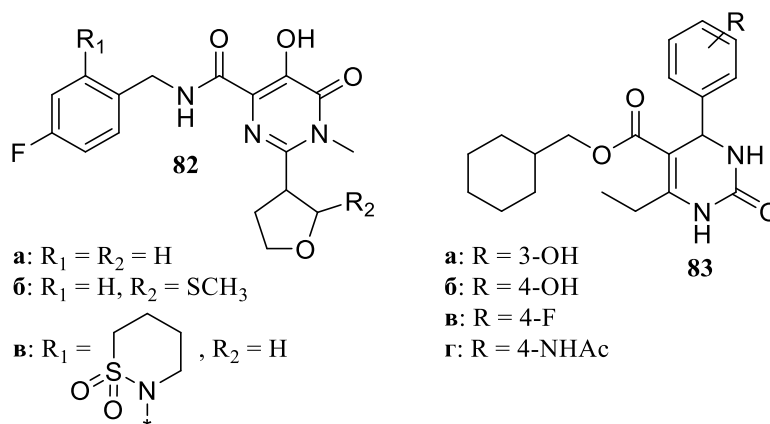
1.5.5. Антивирусна активност

Иако представљају кључну компоненту људског микробиома и ширег екосистема, вируси су најчешће препознати као узрочници различитих болести. У циљу контроле вирусних инфекција, развијени су бројни антивирусни лекови, који заједно са постојећим вакцинама доприносе сузбијању болести које изазивају вируси. Антивирусни лекови су одобрени за лечење инфекција проузрокованих вирусима као што су варичела-зостер, хумани цитомегаловирус, вирус хумане имунодефицијенције (енг. *human immunodeficiency virus*, HIV), хумани папилома вирус (енг. *human papilloma virus*, HPV), респираторни синцицијски вирус (енг. *respiratory syncytial virus*, RSV), херпес симплекс вирус (енг. *herpes simplex virus*, HSV), као и вируси хепатитиса В и С и инфлуенце. Антивирусни лекови делују тако што директно нападају вирусе или инхибирају ћелијске процесе неопходне за њихов животни циклус, као што су улазак у ћелије, размотавање и репликација генетичког материјала вируса, активност интеграза и протеаза, или ослобађање вируса из ћелије. Растући проблем представља антивирусна резистенција, која настаје као резултат мутација у вирусном геному, што мења структуре које су мета лекова. Комбинована терапија више лекова показује добре резултате у спречавању развоја резистенције. Брзи напредак науке и технологије доприноси откривању нових антивирусних лекова и механизма њиховог деловања, чиме се, уз вакцинацију, стварају моћни алати за борбу против вирусних инфекција и потенцијалних пандемија.

Тетрахидропиримидини су до сада показали значајан потенцијал у лечењу HIV инфекција као и других вирусних обољења. До сада се постојећи лекови против HIV инфекције категоришу у пет различитих група: нуклеозидни инхибитори реверзне транскриптазе, нуклеотидни инхибитори реверзне транскриптазе, ненуклеозидни инхибитори реверзне транскриптазе, протеазни инхибитори и инхибитори уласка (фузије), а већина испитиваних деривата тетрахидропиримидина испољава активност као ненуклеозидни инхибитори реверзне транскриптазе.

Једињења која се испитују за лечење пацијената оболелих од HIV инфекције циљају специфичне вирусне протеине. Стандардни третман за AIDS (енг. *acquired immune deficiency syndrome*) обухвата комбиновану терапију која минимизира токсичност и смањује ризик од развоја резистенције, али изискује велики број таблета, због чега постоји све већа потреба за коришћењем једне дневне дозе анти-HIV лекова ради смањења трошкова лечења.¹⁸⁴

Naidu и сарадници су 2014. године су испитивали пиримидинон 4-карбоксамиде као инхибиторе HIV интегразе.¹⁸⁵ Синтетисали су серију једињења која су у C2 положају пиримидинског прстена имала тетра hidroфуран-3-ил или тетра hidroпиран-4-ил фрагмент како би испитали утицај ових супституената на антивирусну активност. Како је раније утврђено да везивање испитиваних једињења за хумани серум албумин (енг. *human serum albumin*, HSA) може значајно да утиче на њихову антивирусну активност, испитали су како једињења делују на HIV интегразу и у присуству HSA. Добијени резултати су указивали да једињења која у *орто*-положају имају поларне групе, показују побољшану активност и присуство HSA не умањује њихово дејство. Даље су та једињења селектована за испитивање у *in vivo* условима на пацовима, при чему су једињења **82a–в** показала низак клиренс,[†] добру оралну дистрибуцију и биорасположивост.



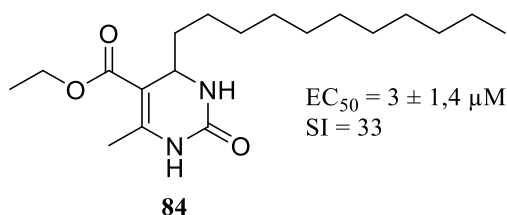
Слика 26. Анти-HIV агенси.

Kim и сарадници су 2011. године синтетисали деривате тетрахидропиримидина који инхибирају репликацију HIV-1. Серија једињења подвргнута је селекцији и дериватизацији на основу теста репликације HIV-1 коришћењем репортерских ћелија које експримирају зелени флуоресцентни протеин. Након тога, за сва синтетисана једињења је процењен инхибиторни ефекат на репликацију HIV-1 у хуманим Т-лимфоцитима, при чему је немирапин служио као позитивна контрола. Међу дериватима, једињења **83a–г** (Слика 26) су показала значајну инхибиторну активност. Занимљиво је да су резултати показали да је само (*S*)-енантиомер деривата **83a** показао антивирусну активност, док су (*R*)-енантиомери остали потпуно неактивни до концентрације од 10

[†] У медицини, клиренс је мера реналне екскреционе способности, капацитета организма да се ослободи лека у јединици времена.

μМ. Хирално раздвајање енантиомера показало је да је *S*-конфигурација на позицији С4 унутар тетрахидропимидинског прстена била кључна за антивирусну ефикасност. Сваки енантиомер се могао пажљиво одвојити фракционом кристализацијом. Као резултат тога, истраживачки тим је идентификовао једно једињење са највећим потенцијалом, а даљим истраживањем његовог начина деловања и оптимизацијом се може добити фармакофора са још бољим резултатима.¹⁸⁶

За серију 4-супституисаних тетрахидропиримидина је *in vitro* испитана антивирусна активност на широки спектра ДНК и РНК вируса, заједно са антитуморским потенцијалом према различитим туморским ћелијским линијама. Утврђено је да је једињење **84** са липофилним бочним низом од 11 угљеникових атома, снажан и селективан инхибитор вируса *Punta Toro* из фамилије *Bunyaviridae*, док су тетрахидропиримидини који у положају С4 имају арил остатак са халогеном супституцијом показала значајну цитотоксичност према МТ4 ћелијама (Слика 27).¹⁸⁷

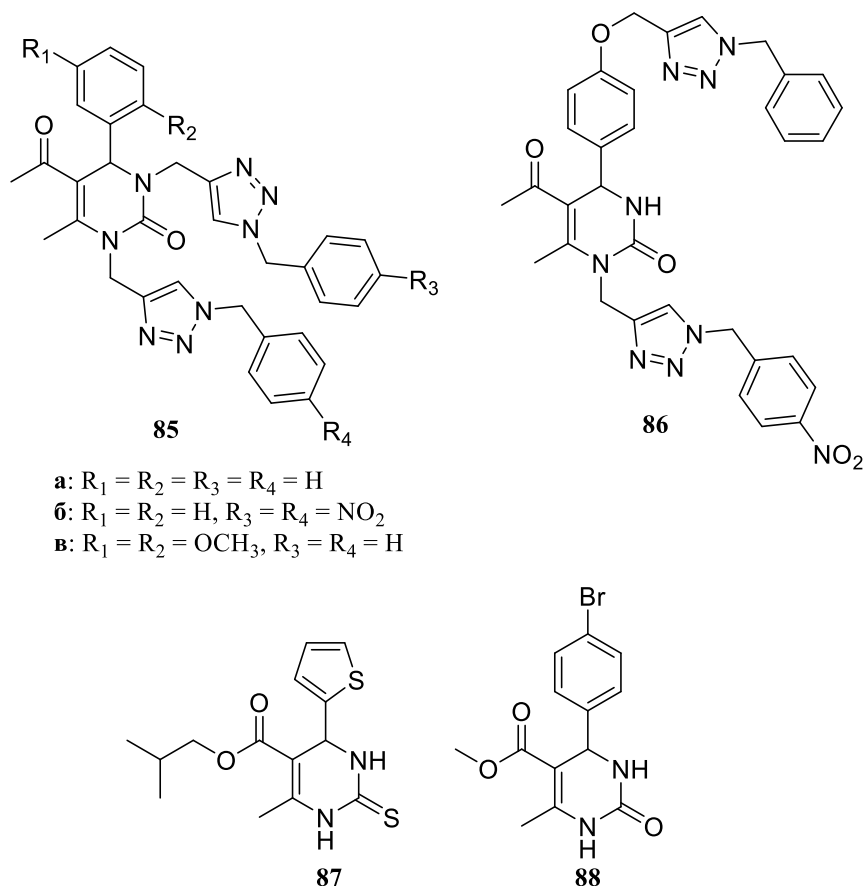


Слика 27. Структура и активност једињења **84** према вирусу *Punta Toro* на *Vero* ћелијској култури.

Каоукаби и сарадници су спојили две фармакофоре: тетрахидропиримидински структурни мотив и 1,2,3-триазол. Антивирусни потенцијал 18 новосинтетисаних једињења испитан је на варичела зостер вирусу и то на оба типа: природни (стандардни) сој и тимидин-киназа-дефицијентни (ТК⁻) сој. Антивирусна активност једињења процењивана је на основу способности да инхибирају цитопатски ефекат вируса или формирање плакова. Из групе испитиваних једињења, четири једињења **85a–v** и **86** (Слика 28) су се издвојила показујући бољу ефикасност од референтних лекова са EC_{50} у распону од 3,6 до 11,3 μМ на тимидин-киназа-дефицијентном (ТК⁻) соју без значајне цитотоксичности. Примећено је да су једињења која садрже два триазолнил фрагмента активнија од оних која садрже један или три таква супституента. Сва испитивана једињења тестирана су и против цитомегаловируса у ћелијама хуманих ембрионских плућа (енг. *Human Embryonic Lung cells*, HEL), користећи AD-169 и Davis сојева. Међутим, ниједно од тестираних једињења није испољило значајну антивирусну активност против цитомегаловируса. Ови резултати, у поређењу са уоченом активношћу против варичела-зостер вируса, сугеришу да испитана хибридна једињења поседују одређену селективност према вирусима из породице *Herpesviridae*, нарочито према варичела-зостер вирусу. С обзиром на то да ТК⁻ сој развија резистенцију на постојеће антивирусне лекове, хибридни молекули тетрахидропиримидина и 1,2,3-триазола су обећавајућа алтернатива у терапији.¹⁸⁸

У једној од студија о тетрахидропиримидинима, једињења **87** ($IC_{50} = 1,8 \mu M$) и **88** ($IC_{50} = 0,9 \mu M$) показала су обећавајући антивирусни потенцијал против херпес симплекс вируса (HSV-KOS сој). Значајно је да је једињење **88** показало занемарљиву токсичност према тестираним ћелијама сисара, што указује на његову високу селективност према вирусу HSV. Такође је спроведена анализа временског утицаја додавања (енг. *time-of-addition study*), која је показала да примена једињења **88** на ћелије 2 и 4 сата након инокулације вирусом значајно инхибира његову репликацију. Штавише, недостатак ефекта на адхезију вируса и/или улазак у ћелије указује да једињење **88** делује на касне

фазе вирусне репликације. За једињење **88** израчунат је и терапеутски индекс, који је изузетно висок (111), што указује да је једињење веома безбедно за употребу.¹⁸⁹



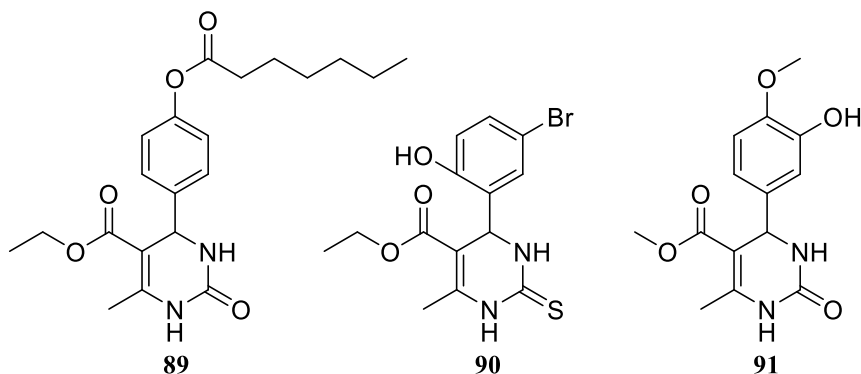
Слика 28. Потенцијални антивирусни агенси.

1.5.6. Остала значајна биолошка дејства

Дериват тетрахидропиримидина, етил 4-[4'-(хептаноилокси)фенил]-6-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (**89**), показао је значајно антикоагулантно дејство како у *in vitro*, тако и у *in vivo* условима (Слика 29).¹⁹⁰ Испитивање антикоагулантног потенцијала обухватало је мерење инхибиције агрегације тромбоцита изазване аденозин дифосфатом (енг. *adenosine diphosphate*, ADP), колагеном и тромбином, као и анализу способности блокирања калцијумових канала и активације синтазе азот-оксида (енг. *nitric oxide synthase*, NOS). Одређене вредности IC_{50} за *in vitro* инхибицију агрегације тромбоцита биле су: $98,2 \pm 2,1 \mu M$ (ADP), $74,5 \pm 2,3 \mu M$ (колаген) и $180,7 \pm 3,4 \mu M$ (тромбин). У *in vivo* условима, једињење је при дози од $52,0 \pm 0,02 \text{ mg/kg}$ (133 mmol/kg) ефикасно инхибирало ADP-индуковану агрегацију тромбоцита. Даље анализе показале су да је ниво азот-оксида био и до девет пута виши у тромбоцитима третираним једињењем *in vitro*, односно осам пута виши код пацова третираних *in vivo*, у поређењу са контролом. У моделу тромбофилије изазване липополисахаридом, у хомогенату аорте пацова испитиван је утицај једињења на ниво цикличног гуанозин монофосфата (сGMP) и експресију ендотелне NOS. Третирани пацови су показали способност супресије патолошких промена, уз нормализацију повишеног нивоа сGMP и смањење експресије NOS.

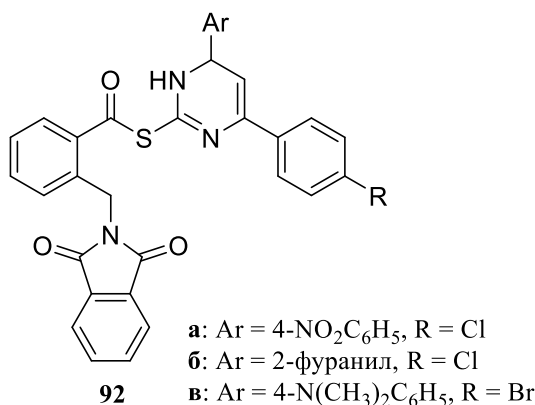
Вагаги и сарадници су такође синтетисали тетрахидропиримидинске деривате за које су коришћењем модела дијабетеса код пацова изазваног стрептозотоцином,

проценили њихову ефикасност у смањењу нивоа глукозе у крви. Просечно процентуално смањење нивоа глукозе у крви експерименталних животиња добијено за гликлазид који је коришћен као контрола је било 47,9%, док је за **90** и **91** било 18,06% и 20,64%, респективно (Слика 29).¹⁹¹



Слика 29. Тетрахидропиримидини са антикоагулантним (**89**) и антидијабетским (**90** и **91**) дејством.

Нова серија хибридних једињења тетрахидропиримидина и фталимида је показала инхибиторну активност и селективност према дипептидилној пептидази 4 (енг. *Dipeptidyl peptidase 4*, DPP-4) *in vitro* и *in vivo*. Резултати *in vitro* испитивања показали су да синтетисана једињења инхибирају активност ензима DPP-4 ефикасније од алоглиптина који је коришћен као стандард. Додатно, *in vivo* експерименти су показали да једињења **92a** и **92b** (Слика 30) испољавају најјаче и најдуготрајније инхибиторно дејство на DPP-4 у крви у односу на алоглиптин. Код пацова са дијабетесом типа 2, једињења **92a–в** су значајно побољшали регулацију гликемије у поређењу са алоглиптином, а овај ефекат је додатно појачан применом метформина што поменута једињења чини потенцијалним агенсима за лечење дијабетеса типа 2.¹⁹²



Слика 30. Инхибитори ензима DPP-4.

Испитана је антиинфламаторна активност тетрахидропиримидина применом методе карагенански изазваног едема шапе задњег екстремитета. Једињења су тестирана при ефективној дози од 30 mg/kg. Сва тестирана једињења показала су протективну способност против инфламације изазване карагенаном код пацова у наведеној концентрацији након 3 h. Антиинфламаторна активност једињења кретала се у распону од 30,77 до 53,85%, док је стандардни лек диклофенак показао 86,32% инхибиције након

нових функционалних полимера. Полимери намењени биомедицинским применама показали су антиоксидативна и антиканцерогена својства, као и потенцијал за коришћење у техникама биолошког снимања (енг. *bioimaging*).

Biginelli-јева реакција се показала као изузетно ефикасна у хемији полимера из следећих разлога:

- омогућава високу ефикасност и принос, што резултира добијањем квалитетних полимера,
- трокомпоненте реакције могу имати велику структурну разноликост, што повећава могућност развоја бројних производа,
- реакција је успешно примењива у различитим реакционим условима и компатибилна са великим бројем функционалних група,
- могуће је коришћење широког опсега реакционих температура, различитих растварача и катализатора, што омогућава прилагођавање специфичним захтевима у синтези полимера.

У поређењу са органским антиоксидансима на бази малих молекула који имају ограничене клиничке ефекте у лечењу оксидативног стреса,²⁰² полимерни антиоксиданси имају побољшану *in vivo* стабилност, добру растворљивост у води и повећану биодоступност.^{203,204} Тао и сарадници су развили нову стратегију за добијање антиоксидативних полимера увођењем тиоуреа и/или фенола у полимере.²⁰⁵ Комбиновањем ултрабрзе реверзибилно адиционо-фрагментационе трансфер (енг. *Reversible Addition–Fragmentation Chain-Transfer*, RAFT) полимеризације и Biginelli-јеве реакције и применом методологије високопропусног скрининга (енг. *High-Throughput Screening*, HTS) успели су да синтетишу библиотеку од 60 полимера који садрже различите тетрахидропиримидинске фрагменте у бочним ланцима. Ови полимери су, на основу DPPH теста, показали задовољавајућу антиоксидативну активност. С обзиром на то да је ултраљубичасто зрачење (енг. *ultraviolet*, UV) један од главних узрочника оксидативног стреса, иста истраживачка група је, полазећи од претходно добијених резултата о антиоксидативном потенцијалу тетрахидропиримидинских полимера, испитала њихову способност да спрече оштећења изазвана UV радијацијом.²⁰⁶ Синтетисали су 25 мономера користећи екстракте етеричних уља, деривате (тио)уреа и комерцијално доступан β -кето естар, (2-ацетоацетокси)етил метакрилат (ААЕМА). Полимеризација је затим иницирана слободним радикалима, што је довело до добијања циљаних полимера са добром растворљивошћу у води и UV заштитним својствима. Надаље, применом Biginelli-јеве реакције, синтетисани су и полимери са фeroценским фрагментом,²⁰⁴ узимајући у обзир способност фeroцена да делује као неутрализатор слободних радикала у комбинацији са другим фармакофорама.²⁰⁷

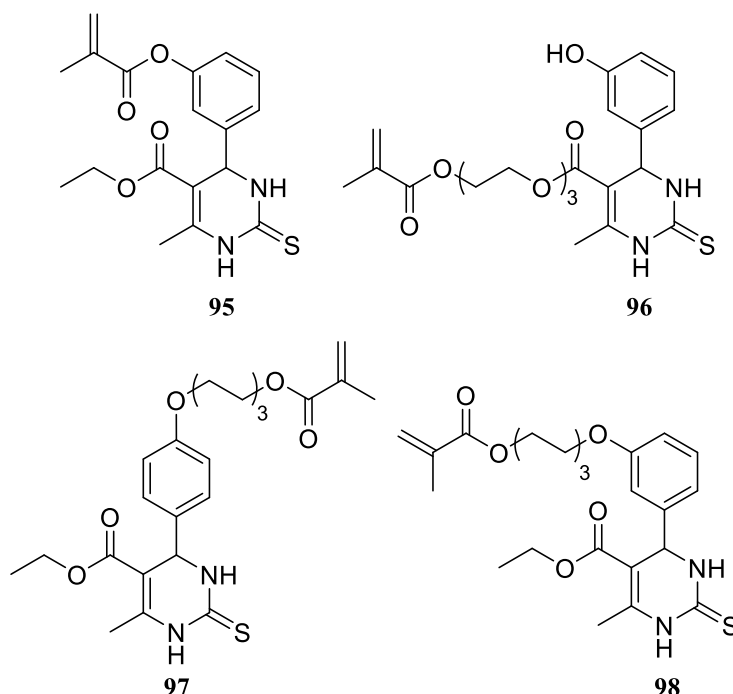
Већ постојећи полимери послужили су као одличан полазни материјал за синтезу нових функционалних полимера који у својој структури садрже тетрахидропиримидински фрагмент.²⁰⁸ Комерцијално доступан мономер са β -кето-естарском групом коришћен је као активно метиленско једињење у Biginelli-јевој реакцији за добијање нових полимерних лепкова. Синтетисани полимерни лепкови растворљиви у води показали су механичка својства упоредива са комерцијалним лепковима (~7,55 МПа на месингаој подлози). Посебно је значајно што је кополимер који садржи структурни мотив фенилборонске киселине (РВА) показао не само изузетну адхезивност на различитим типовима супстрата (метал, пластика, кост), већ и добру биокompatibilност након *in vivo* тестирања, што га чини потенцијално применљивим у медицини.

Тао и сарадници су, у настојању да синтетишу мултифункционални полимер, успешно конструисали антиоксидативни и самообнављајући хидрогел применом Biginelli-јеве реакције.²⁰⁹ Припремили су мономер који садржи РВА и

тетрахидропиримидински фрагмент, а затим га кополимеризовали са полиетилен гликол метакрилатом (PEGMA). Добијени полимер брзо умрежава поливинил алкохол (PVA), формирајући хидрогел под благим условима ($\text{pH} = 7,4$; $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Захваљујући динамичким боратним естарским везама између PBA и диолних група у PVA, хидрогел поседује способност саморегенерације. Осим што се самообнавља и показује антиоксидативна својства, овај хидрогел се одликује ниском цитотоксичношћу и успешно је примењен као матрица за 3D ћелијске културе. Такође, испитивања *in vivo* на пацовима потврдила су његову безбедност. Ови резултати указују на потенцијал овог новоразвијеног хидрогела за примену у биомедицинским имплантатима.

Поред полимера са антиоксидативним потенцијалом, помоћу Biginelli-јеве реакције синтетисани су и полимери са антиканцерогеним дејством,²¹⁰ са циљем да се превазиђу проблеми лоше растворљивости у води и слабе биорасположивости малих органских молекула.²¹¹ Полимеризација представља ефикасан приступ за побољшање растворљивости и биорасположивости лекова. Хемијским конјуговањем са хидрофилним полимерима или енкапсулацијом у полимерне носаче, лекови се могу боље растворити у воденим медијумима и заштитити од прераног метаболизма. Осим тога, полимерни системи омогућавају контролисано ослобађање активних супстанци, што продужава њихово дејство и повећава ефективну биорасположивост.

Четири различита тетрахидропиримидинска мономера, **95-98**, (Слика 33) кополимеризована су са PEGMA како би се добили полимери растворљиви у води. Добијени полимери су биокompatibilни и могу се директно користити за сузбијање пролиферације различитих туморских ћелија без ослобађања малих молекула, а њихово инхибиторско дејство је слично монастролу. Додатни експерименти са ћелијама су потврдили да су тестирани полимери ефикасни у инхибицији митозе у различитим туморским ћелијама.



Слика 33. Полазни мономери у синтези антиканцерогених полимера.

Како се Biginelli-јева реакција показала као врло ефикасна у полимеризацији, коришћена је и за синтезу биокompatibilних полимера са својствима емисије изазване агрегацијом (енг. *Aggregation-Induced Emission*, AIE). Једињења са AIE особинама имају

широку примену у биотехнологији, укључујући генетско секвенцирање, приказивање ћелија и ткива, као и у бројним функционалним материјалима у којима флуоресценција игра кључну улогу.

Комбиновањем RAFT полимеризације и Biginelli-јеве реакције, Zhang и сарадници су синтетисали нове умрежене АЕ наночестице за визуелизацију ћелија (Схема 30).²¹² Кополимеризовали су PEGMA и 2-аминоетилметакрилат (АЕМА), након чега су за умрежавање полимера коришћени АЕ-активни молекул, СНО-ТРЕ-СНО и уреа. Добијени амфипатски полимер имао је релативно ниску критичну концентрацију мицела (0,016 mg/mL) и самоорганизовао се у воденом раствору формирајући сферичне наночестице са високом растворљивошћу и интензивном зеленом флуоресценцијом на 510 nm (λ_{ex} = 379 nm). Флуоресцентне наночестице показале су добру биокомпатибилност и локализовале су се у цитоплазми и једру, што указује на њихов потенцијал као реагенса за флуоресцентно означавање ћелија и ткива.

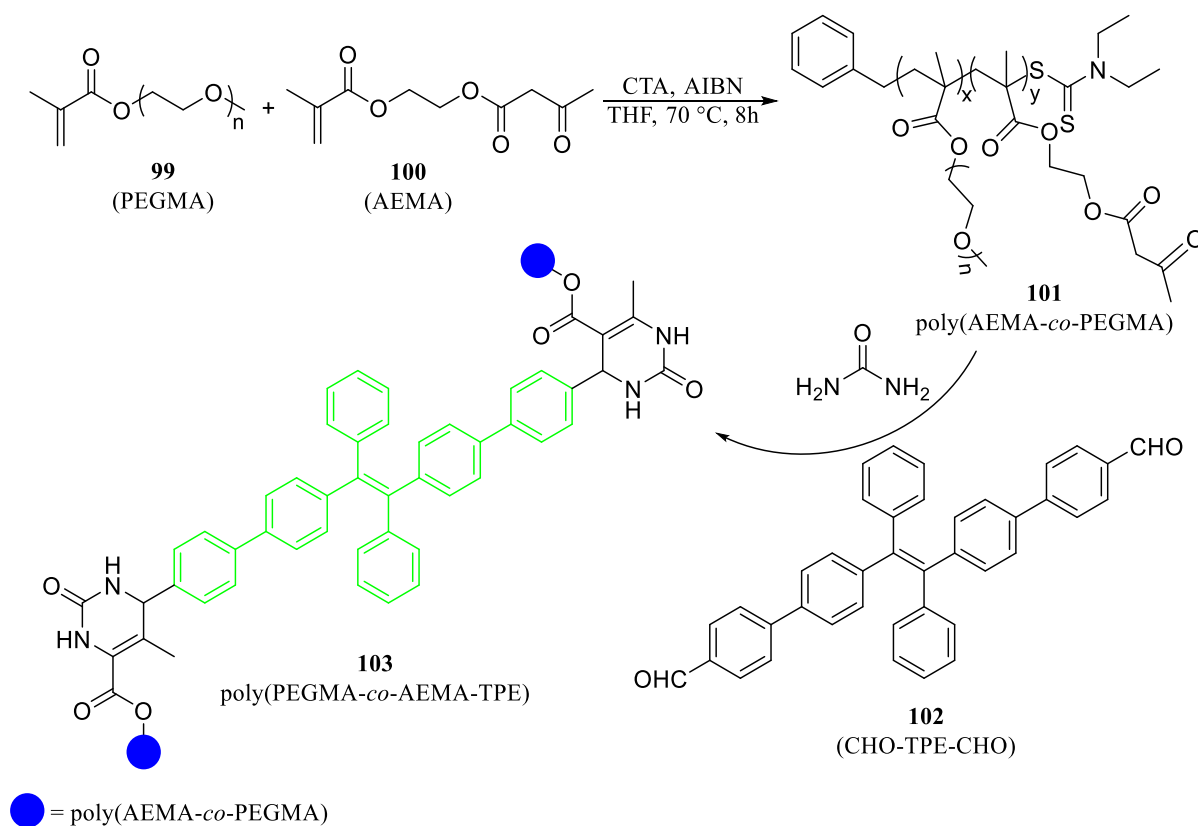


Схема 30. Синтеза Biginelli-јевих полимера за флуоресцентно обележавање ћелија и ткива. Реагенс за пренос ланаца (енг. *chain transfer agent*, CTA): бензил диетилдитиокарбамат; AIBN: азобисизобутиронитрил; СНО-ТРЕ-СНО: 4',4''-(1,2-дифенилетен-1,2-диил)bis([1,10-бифенил]-4-карбалдехид).

1.7. Пријављени патенти

Због широког спектра фармаколошких својстава, тетрахидропиримидини су постали кључни за развој терапијских агенаса у лечењу различитих болести. Напредак у синтези ових деривата, уз њихову биолошку активност, довео је до бројних патената, што указује на значај и потенцијал ових једињења у фармацеутској индустрији. У наставку се налази листа пријављених патената у протеклих 20 година (Слика 34).

TW202000652A Овај патент се односи на једињења која садрже засићене кондензоване дихидропиримидиноне или дихидротриазиноне (или њихове фармацеутски прихватљиве соли), а која делују као антагонисти нуклеарног рецептора и транскрипционог фактора ROR γ (енг. *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma*), укљученог у регулацију имунолошког одговора. Поред тога, обухваћене су и фармацеутске формулације које садрже ова једињења, као и њихова примена у медицини. Једињења представљају саставни део фармацеутских формулација намењених лечењу инфламаторних и аутоимунних поремећаја, укључујући упале плућа и респираторног тракта. Њихова примена може бити од значаја у терапији различитих болести повезаних са имунолошким одговором.

BR112015017929A8 Овај патент обухвата супституисане бицикличне дихидропиримидиноне, као и фармацеутске агенсе који их садрже. Ова једињења показују инхибиторну активност према неутрофилној еластази и могу се користити у лечењу и/или превенцији различитих болести. Могуће области примене укључују лечење болести плућа, гастроинтестиналног тракта и генитоуринарног система, као и инфламаторна обољења коже и очију. Поред тога, ове супстанце могу бити корисне у лечењу аутоимунних и алергијских поремећаја, одбацивања алографта и одређених онколошких болести.

CN110201714A Овај патент се односи на синтезу и катализу добијања тетрахидропиримидинона који имају широк спектар биолошких активности. Као катализатори су коришћене активирани форми силика гела (амино-дериватизовани и са додатком органских киселина). Једињења добијена овом синтезом показују антиканцерогена, антиоксидативна, антимикробна, антиинфламаторна, анти-HIV-1, антималаријска, антихипертензивна и антитуберкулозна својства.

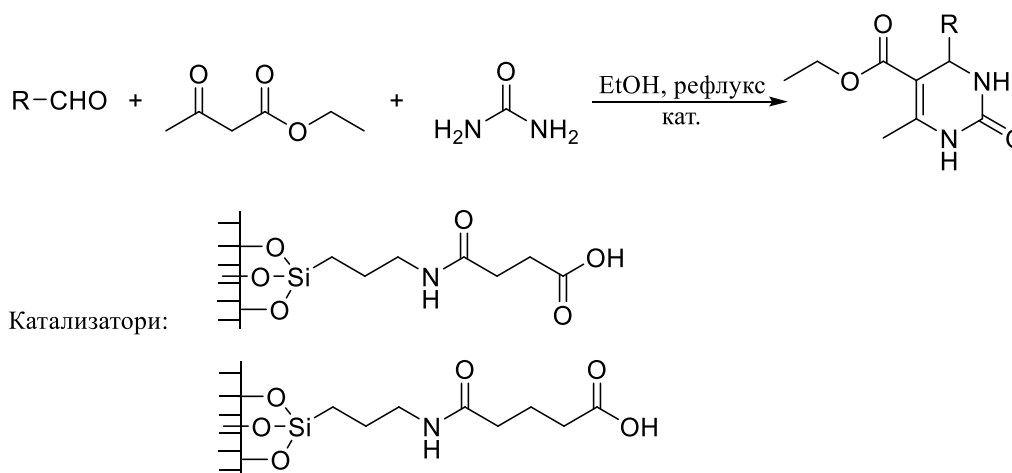
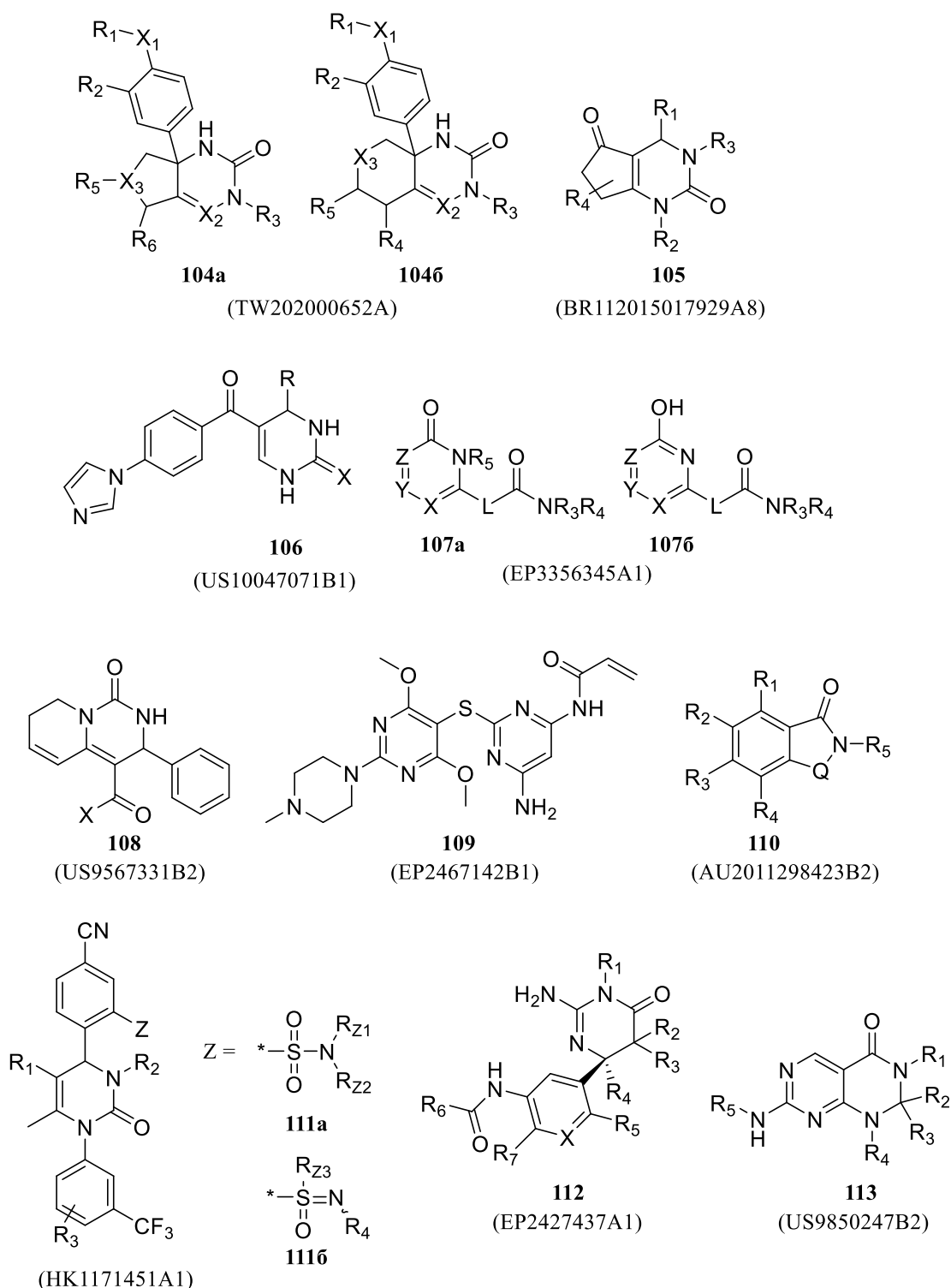


Схема 31. Патентирана метода за синтезу тетрахидропиримидина применом дериватизованог силика гела као катализатора.

US10047071B1 Овај патент се односи на деривате дихидропиримидинона, а посебно на 5-[4-(1H-имидазол-1-ил)бензоил]-4-супституисане фенил-3,4-дихидропиримидин-2(1H)-оне, који показују значајну активност као антитуморска, антивирусна и антибактеријска средства. Једињења добијена из ових деривата могу се користити у терапији канцера, вирусних инфекција и бактеријских болести, представљајући потенцијалну основу за развој нових лекова за лечење ових озбиљних здравствених стања.

EP3356345A1 је патент који се односи на хетероарил деривате као инхибиторе ензима сепиаптерин редуктазе (SPR). Сепиаптерин редуктаза је кључни ензим у биосинтези

тетрахидробиоптерина, који представља важан кофактор у метаболизму азот-оксида и одређених аминокиселина. Инхибиторна активност ових деривата може имати значајне терапеутске импликације, нарочито у лечењу инфламаторних и аутоимунних обољења.



Слика 34. Опште формуле једињења из патената и њихови бројеви.

US9567331B2 Пиридопиримидинони представљају класу једињења која је показала потенцијал у инхибицији вирусних инфекција, укључујући ортопоксвирусе и HIV. Инхибитор **108** блокира експресију вирусних гена у касним фазама инфекције, без

утицаја на репликацију вирусног генома. Овај инхибитор је показао широк спектар антивирусне активности против различитих ортопоксвируса, што указује на његов потенцијал као терапијског агенса за лечење ових инфекција.

Патент **AU2011298423B2** из 2015. године описује употребу 1,3-диазина и њихових хидрогенизованих деривата као средства за побољшање отпорности биљака на абиотски стрес. Ови једињења се користе за јачање раста биљака и повећање њиховог приноса, што указује на потенцијалну примену у агрономији и пољопривреди.

HK1171451A1 Ова пријава се односи на нове деривате 1,4-диарил-дихидропиримидин-2-она, супституисане сулфонским амидима или сулфоксиминима, поступке за њихову синтезу, као и њихову примену, појединачно или у комбинацији, у лечењу и/или превенцији различитих болести. Посебно се наглашава њихова употреба у производњи лекова за лечење и превенцију кардиоваскуларних болести.

EP2427437A1 Овај патент описује синтезу једињења опште формуле **112**, као и фармацеутске формулације које их садрже и њихову употребу као лекова. Једињења формуле **112** су инхибитори base2 (β -секретаза 2). Овај ензим има улогу у регулацији метаболизма глукозе и масти, што може бити од значаја у лечењу метаболичких поремећаја, као што су дијабетес и гојазност због чега поменута једињења могу да се користе за лечење дијабетеса типа 2.

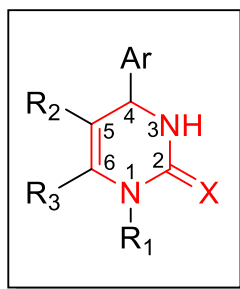
US9850247B2 Пиримидопиримидинони као инхибитори Wee-1 киназе, фармацеутске формулације које их садрже и њихов примена у лечењу карцинома који су значајни из разлога што Wee-1 киназа игра кључну улогу у сигналној каскади која регулише G2 контролну тачку и наставак митозе када су детектована ДНК оштећења.

2. Резултати и дискусија

2.1. Увод

Узимајући у обзир значај тетрахидропиримидинског фрагмента у медицинској хемији, циљ ове докторске дисертације је био синтеза и карактеризација његових деривата и испитивање њиховог биолошког потенцијала. Применом Biginelli-јеве реакције синтетисано је 12 једињења у серији **A**, која су производ модификације тетрахидропиримидина на С6 атому, као и 32 једињења у серијама **B** и **V** (Слика 35). Сва једињења су окарактерисана NMR и IR спектроскопским методама, као и ESI-MS, док је за погодна једињења урађена и кристалографска анализа.

За сва добијена једињења је испитана *in vitro* цитотоксичност према различитим туморским ћелијским линијама. Активност једињења серије **A** тестирана је на карциному грлића материце (HeLa), епителном карциному плућа (A549) и колоректалном аденокарциному (LS174), док је за једињења серија **B** и **V** испитана цитотоксичност према HeLa, K562 (хронична мијелоидна леукемија) и MDA-MB-231 (троструко негативни карцином дојке) малигним ћелијским линијама. Поред тога, за сва једињења је испитана цитотоксичност и према нормалној ћелијској линији феталних фибробласта плућа (MRC-5). За одабрана једињења серије **B** испитана је антимикуробна активност према одабраним бактеријама (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*) и гљивицама (*Trichophyton mentagrophytes*, *Mucor mucedo*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*). Експерименталним и компјутерским методама је испитана природа везивања одабраних једињења за биомакромолекуле (ДНК и серум албумини). Развојем 3D-QSAR модела су описане интеракције које позитивно и негативно утичу на антипролиферативну активност и *in silico* су предвиђене класе ензима које би потенцијално могле да буду мета за једињења серије **A**. Једињење **B18** је изабрано за испитивање активности у *in vivo* условима. Одрасли мужјаци албино пацова соја Wistar су третирани поменути једињењем како би се испитала акутна орална токсичност, као и способност једињења **B18** да испољи антигенотоксичне особине. Поред тога, одређени су и значајни биохемијски и антиоксидативни параметри из серума експерименталних животиња.

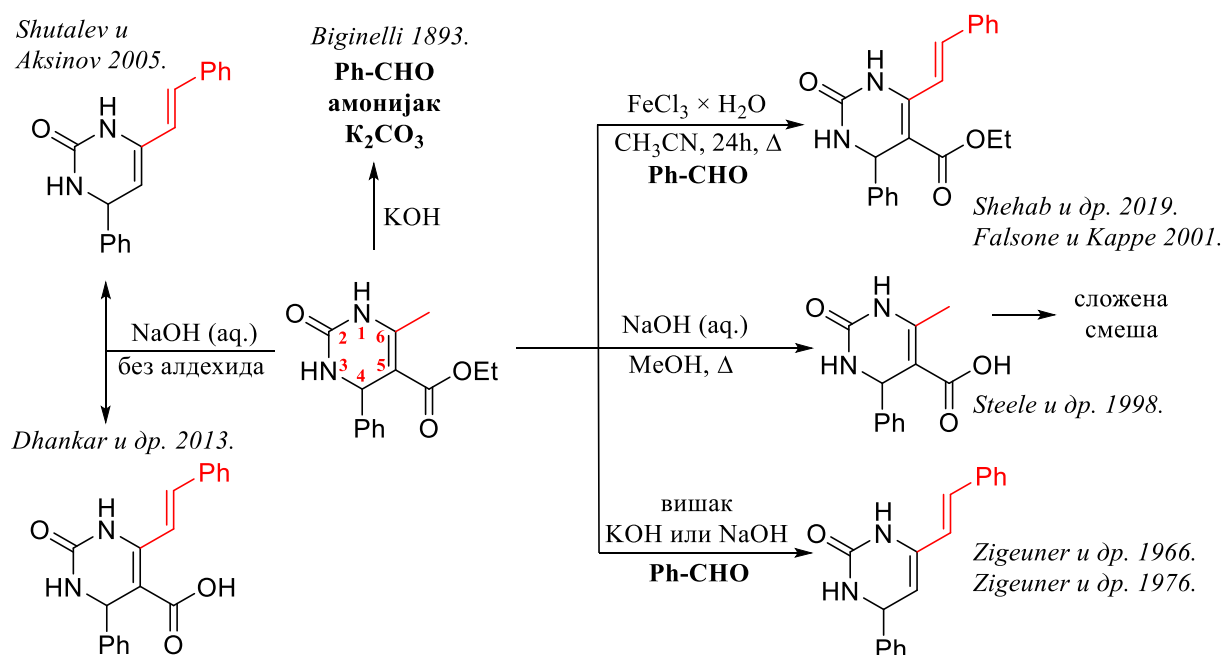


серија **A**: X = O, R₁ = R₂ = -H, R₃ = , Ar
 серија **B**: X = S, R₁ = R₃ = -CH₃, R₂ = -COOMe
 серија **V**: X = O, R₁ = -H или -CH₃, R₂ = -COOEt, R₃ = -CH₂Cl

Слика 35. Серије нових деривата тетрахидропиримидина.

2.2. Једињења серије А

Као што је већ више пута истакнуто, Biginelli-јева реакција има изузетан значај и са структурног аспекта, будући да супституенти на тетрахидропиримидинском прстену могу релативно једноставно да се трансформишу у различите функционалне групе. Иако теоријски постоји шест положаја у молекулу који су погодни за дериватизацију (N1, C2, N3, C4, C5 и C6), положај C6 се издваја као најинтересантнији и најпогоднији. Супституција метил групе на положају C6 бромом омогућава добијање 6-бромометил и 6-дибромометил тетрахидропиримидинских деривата.^{213,214} Алтернативни приступ подразумева каталитичку редукцију метил групе на C6 атому у присуству бензалдехида, при високим температурама, у органским растварачима и у присуству катализатора. Ово је додатно мотивисало хемичаре да испитају понашања тетрахидропиримидинског језгра у хидролитичким условима, као што је приказано на **Слици 36**.^{215–219} Pietro Biginelli је први закључио да се у присуству калијум-хидроксида (KOH) у воденој средини, на рефлуксу, тетрахидропиримидинско језгро распада на бензалдехид, амонијак и калијум-карбонат.⁵ Насупрот томе, Zigeuner је показао да једињења која нису супституисани на N1 положају не показују реактивност у истим условима (5% KOH, рефлукс).^{218,219} Прегледом литературе се наилази на то да тетрахидропиримидин може да реагује са вишком бензалдехида и KOH у кључалом 70% етанолу, при чему се одговарајући производ добија у умереном приносу (<50%). Деривати тетрахидропиримидина који нису супституисани на N1 положају подложни су хидролизи и декарбоксилацији, при чему се добија сложена смеша производа.²¹⁶



Слика 36. Преглед литературних података: дериватизација тетрахидропиримидина на положају C6.

Међутим, одређене контрадикције између радова Dhankar-а и Shutalev-а указују на недоследност резултата, иако су реакције изведене у готово идентичним условима (**Слика 36**). Shutalev и Aksinov су добили производ **I** (**Слика 36**) рефлуковањем два еквивалента тетрахидропиримидина у 2,5% воденом раствору натријум-хидроксида, без додатка алдехида.²¹⁷ Насупрот томе, Dhankar је користио јачу базу (5% и 10% водени раствор NaOH) што је довело до настајања производа **II**.²¹⁵ Истовремено, Карпе је указао

на слабу реактивност естарске групе тетрахидропиримидина према хидролизи.²²⁰ У светлу ових контрадикторности и ограничених експерименталних података о овој теми, испитана је реактивност положаја С6 у пиримидинском прстену у реакцијама са различитим ароматичним алдехидима.

2.2.1. Синтеза и карактеризација једињења серије А и предложени механизам реакције

Истраживање је започето успостављањем најоптималнијих реакционих услова на примеру реакције тетрахидропиримидина **ТХПМ1** (1 еквивалент), бензалдехида **АЛД1** (1 еквивалент) и два еквивалента (екв.) различитих база: литијум-хидроксида (LiOH), натријум-хидроксида (NaOH), калијум-хидроксида (KOH), калијум-карбоната (K₂CO₃), литијум-карбоната (Li₂CO₃) и цезијум-карбоната (Cs₂CO₃) у тзв. *on water* условима и у одсуству растварача (**Табела 3**). Код примене свих база на собној температури производи су добијени у траговима без обзира да ли је реакција била извођена у условима без растварача или *on water*. Међутим, при загревању (70 °C) су све базе дале боље приносе при *on water* условима.

Табела 3. Оптимизација реакционих услова за синтезу серије А.

База	Принос [%]	
	<i>on water</i>	<i>без растварача</i>
LiOH	47	/
NaOH	84	<10
KOH	77	<10
K₂CO₃	51	/
Li₂CO₃	<10	/
Cs₂CO₃	<10	/

Уз NaOH (84%), KOH (77%) или K₂CO₃ (51%) током четири сата на температури од 70 °C су постигнути најбољи приноси. Како је употребом натријум-хидроксида добијен најбољи принос, следећи корак је био усмерен ка истраживању утицаја количине ове базе на ток и принос реакције, те је реакција испитана у присуству великог вишка базе (10 и 20 екв. NaOH). Постигнути резултати су показали да велики вишак натријум хидроксида нема значајан утицај на принос. Такође је испитана и синтеза производа при десет пута нижој концентрацији воденог раствора натријум хидроксида где је принос очекивано био значајно мањи (42%). Закључак је да пресудан утицај на принос реакције имају концентрација примењене базе и температура при којој се реакција изводи. Поред утицаја базе на ток и принос реакције, испитан је утицај употребе различитих полазних тетрахидропиримидина (**Схема 32**). Метил дериват **ТХПМ1** је дао највеће приносе због чега су метил деривати коришћени као полазни супстрати за синтезу целе серије А (**Схема 33**).

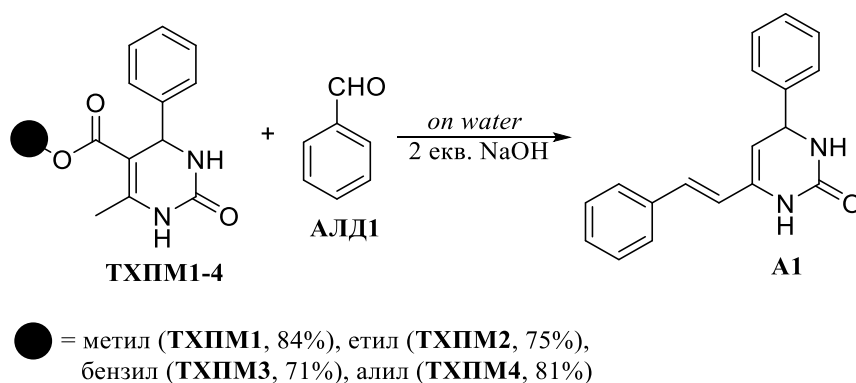
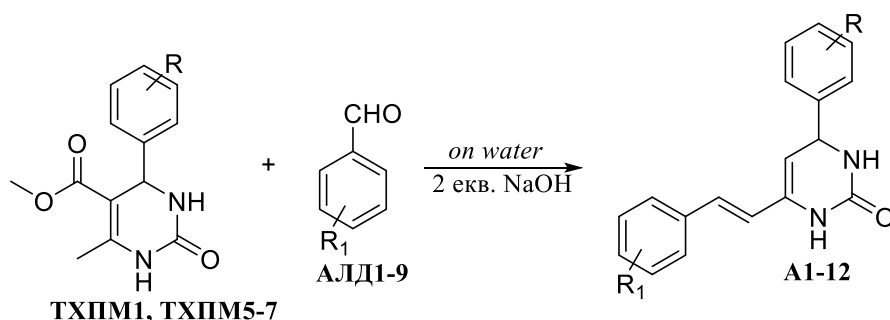


Схема 32. Утицај различитих полазних тетрахидропиримидина (ТХПМ1–4) на принос реакције.

Резултати оптимизације реакционих услова били су следећи: одговарајући тетрахидропиримидин (5 mmol), 1 екв. алдехида (5 mmol) и 2 екв. NaOH (10 mmol, 7,5% водени раствор) *on water* при температури од 70 °C током 4 сата. Након једноставне обраде (*Експериментални део*), новосинтетисани производи **A1–12** су изоловани и окарактерисани ^1H и ^{13}C NMR и ESI-MS методама. Остварени су добри до одлични приноси, док је једињење **A4** изоловано у највећем приносу.



ТХПМ1, АЛД1, A1: R = R ₁ = H	ТХПМ1, АЛД7, A7: R = H; R ₁ = 3,4-(OCH ₃) ₂
ТХПМ1, АЛД2, A2: R = H; R ₁ = 3-Cl	ТХПМ1, АЛД8, A8: R = H; R ₁ = 3,4,5-(OCH ₃) ₃
ТХПМ1, АЛД3, A3: R = H; R ₁ = 4-Cl	ТХПМ1, АЛД9, A9: R = H; R ₁ = 4-CHO
ТХПМ1, АЛД4, A4: R = H; R ₁ = 4-NO ₂	ТХПМ5, АЛД1, A10: R = 3,4-(OCH ₃) ₂ ; R ₁ = H
ТХПМ1, АЛД5, A5: R = H; R ₁ = 4-SCH ₃	ТХПМ6, АЛД1, A11: R = 4-Cl; R ₁ = H
ТХПМ1, АЛД6, A6: R = H; R ₁ = 4-OCH ₃	ТХПМ7, АЛД1, A12: R = 4-OCH ₂ Ph; R ₁ = H

Схема 33. Синтеза једињења серије A.

У ^1H NMR спектру се сигнали протона везаних за C3 и C4 атом преклапају, тако да се у спектру виде као мултиплет у области око 5 ppm, док два дублета на δ 6,60 и 7,08 одговарају винилним протонима из стирил фрагмента, а високе вредности константи купловања (~16 Hz) нам указују на *trans* конфигурацију. Мултиплети у области 7–7,5 ppm одговарају протонима из ароматичних прстена као и протонима из N–H веза.

Узимајући у обзир да су реакције извођене *on water*, испитивање утицаја водониковог атома из молекула воде било је очекиван корак.²²¹ У ту сврху за реакцију је коришћена смеша деутерисаног натријум хидроксида (NaOD) и деутеро воде (D₂O). Деутеро-производ **A1-d₂** је изолован у добром приносу (82%) што је био један од главних показатеља да протони из воде имају значајну улогу у механизму реакције (**Схема 34**). Исти резултати су остварени и применом смеше NaOH/D₂O. Сигнали два протона и

сигнали њихових одговарајући угљеника су изостали из NMR спектра услед изотопске измене (Слика 37 и Слика 38). Због присуства деутерона у молекулу **A1-d₂**, сигнали суседних протона (бензил и бензилиден) су поједностављени па се у спектру налазе у облику синглета. Претпоставља се да се H/D измена догодила између **A1** и D₂O на додирној површини органског слоја и воде. Како бисмо искључили изотопску измену, већ добијеном производу **A1** је додата NaOD/D₂O смеша али у том случају није изолован производ **A1-d₂**.

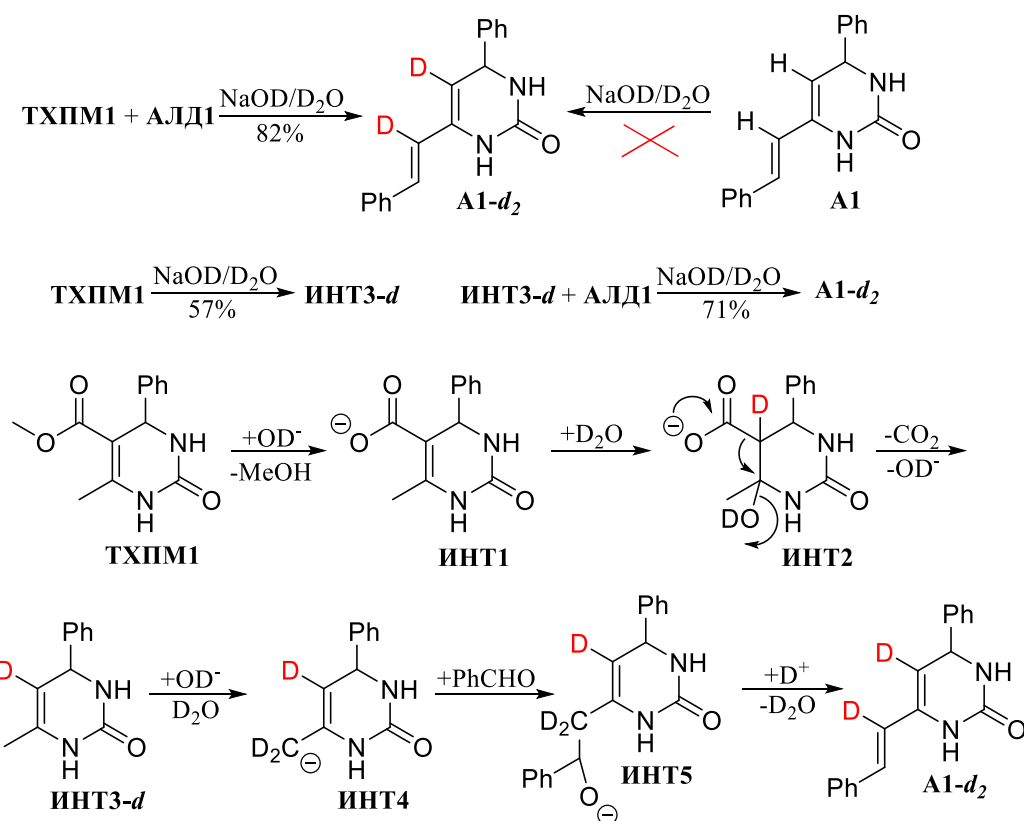
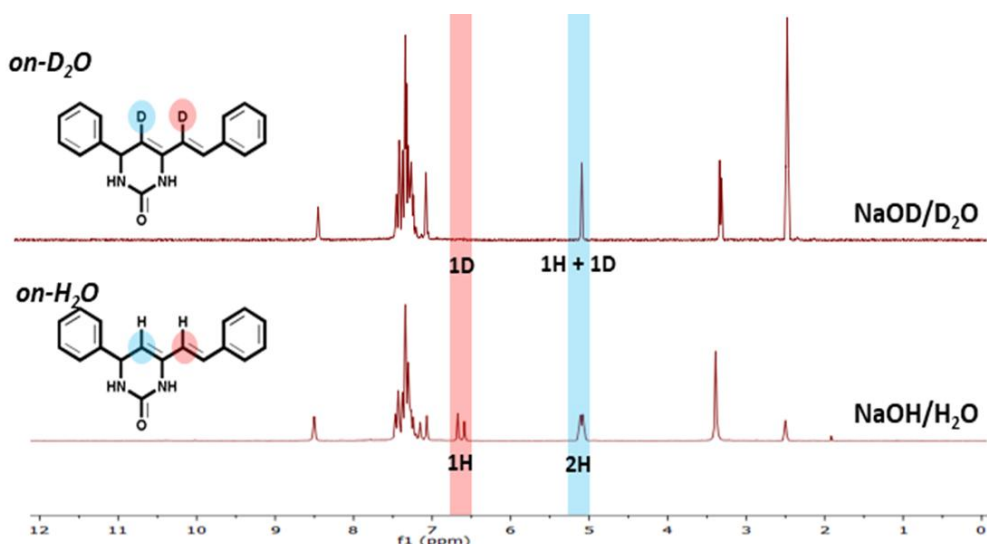
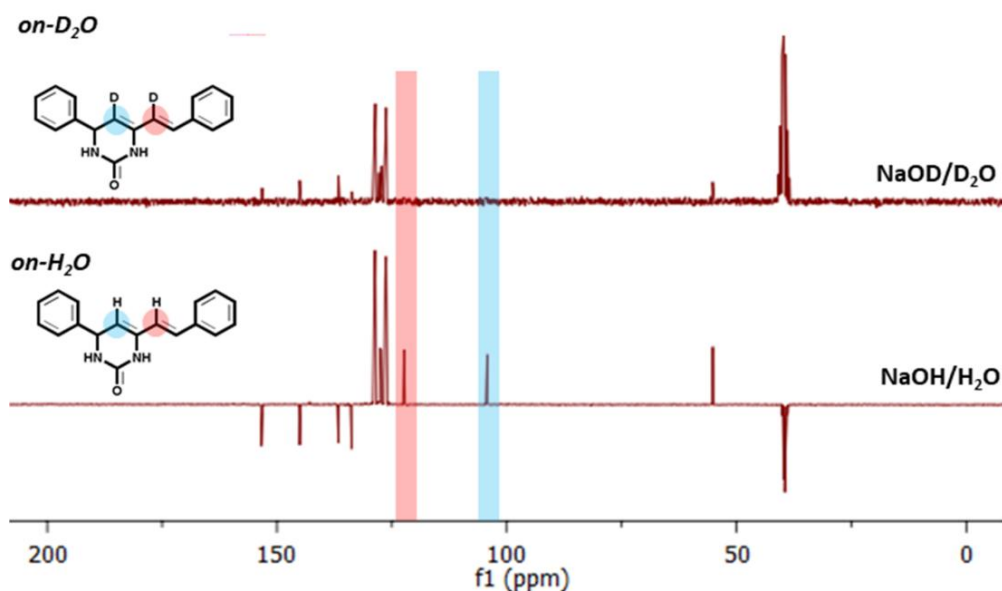


Схема 34. Предложени механизам реакције. Деутерони су означени црвеном бојом.

Претпоставља се да до изотопске измене долази највероватније током формирања интермедијера који настају током реакције. Како је недеутерисани интермедијер **ИНТ3** успешно изолован, покушано је са добијањем интермедијера **ИНТ3-d** за који се претпоставља да настаје у у смеси NaOD/D₂O. Током рефлуksа у CD₃OD и при додатку NaOD/D₂O добијена је смеша деутерисаног и недеутерисаног производа у веома малим приносима. Наведене чињенице и постигнути резултати указују на то да се реакција тетрахидропиримидина са NaOH одвија само у *on water* условима и у одсуству органских растварача. Такође, присуство деутерона у коначном производу указује на то да је реакција вероватно укључивала међуфазни трансфер протона из воде у интермедијер (**ИНТ3-d**), а затим у производ (**A1-d₂**) на додирној површини органског слоја и воде. Узимајући у обзир експериментална испитивања и резултате, предложен механизам реакције је приказан на Схеми 34. У првом кораку, **TXPM1** је подвргнут хидролизи до стварања **ИНТ1**. Затим се интермедијер **ИНТ1** декарбоксиљује преко **ИНТ2**, дајући интермедијер **ИНТ3-d**. На крају, **ИНТ3-d** формира карбанјон **ИНТ4**, који у реакцији са карбонилном групом из алдехида даје **ИНТ5** који се дехидратише до производа **A1-d₂**.



Слика 37. Поређење ^1H NMR спектра једињења **A1** и **A1- d_2** .

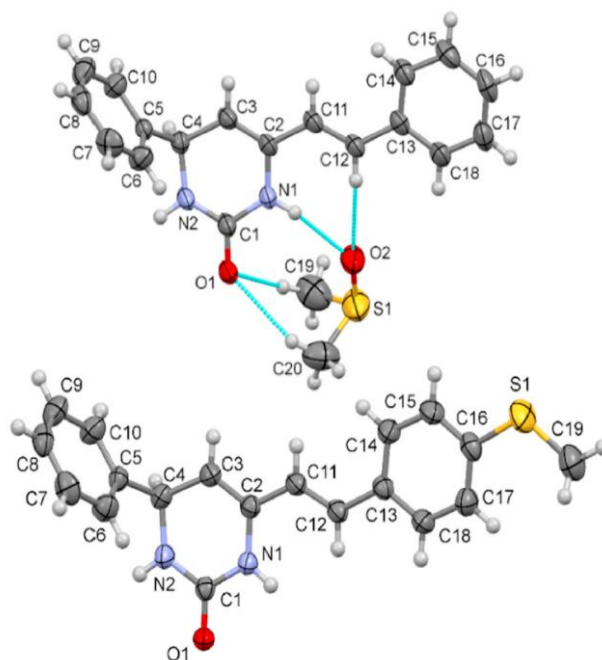


Слика 38. Поређење ^{13}C NMR спектра једињења **A1** и **A1- d_2** .

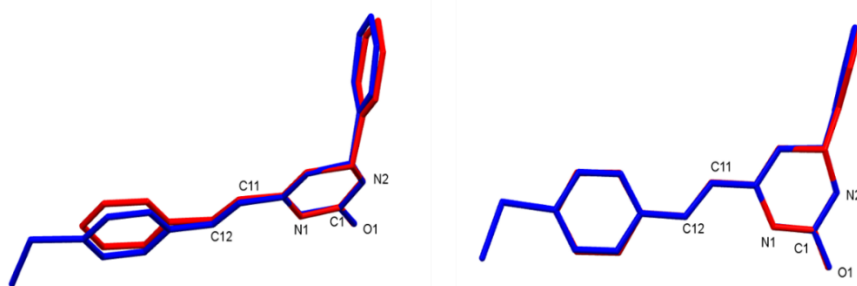
2.2.2. Кристалографска анализа једињења **A1** и **A5**

Једињења **A1** и **A5** добијена су у кристалној форми погодној за рендгенску структурну анализу (Слика 39). Оба једињења кристалишу у триклиничном кристалном систему (просторној групи $P\bar{1}$), али се само код једињења **A1** у оквиру асиметричне јединичне ћелије налази један молекул диметил сулфоксида (DMSO). Без обзира на ову структурну разлику у кристалу и чињеницу да DMSO формира релативно јаку $\text{N1-H}\cdots\text{O2}$ водоничну везу са **A1** молекулом (Слика 41 и Табела 5), оба једињења показују сличну конформацију (Слика 40). Наиме, сви атоми у **A1** и **A5** су смештени у две равни. Мања раван је дефинисана фенилним прстеном C5-C10 , док остали атоми дефинишу другу раван. Ова два дела молекула су међусобно повезана преко C4-C5 везе која је најдужа C-C веза у обе кристалне структуре (Табела 4). Просторна оријентација C5-C10

фенилног прстена у односу на шесточлани хетероциклични прстен је веома слична у оба једињења (**Слика 40**). Тако је торзиони угао C3-C4-C5-C6 $-84,0(3)$ и $-84,5(2)^\circ$ у **A1** и **A5** готово исти. Кристалографска анализа је такође потврдила да C11-C12 веза [$1,333(4)$ и $1,327(3)$ Å у **A1** и **A5** респективно] има карактер двоструке везе у обе структуре. Одговарајуће N-C везе (N1-C1 наспрам N2-C1 и N1-C2 наспрам N2-C4) у два молекула показују неке разлике у дужинама везе (**Табела 4**) и то се може објаснити утицајем C4 који је једини sp^3 хибридисован атом. Оба једињења формирају центросиметричне димере у кристалној решетки са два молекула међусобно повезана преко две релативно јаке N-H...O1 водоничне везе (**Табела 5**). Главна разлика између ова два молекула је у томе што различите N-H групе учествују у водоничној вези унутар димера (**Слика 41**). Геометријски параметри свих водоничних веза дати су у **Табели 5**.



Слика 39. Кристална структура са нумерисаним атомима једињења **A1** (горе) и **A5** (доле). Водоничне везе између молекула **A1** и DMSO су приказане светлоплавим тачкастим линијама.



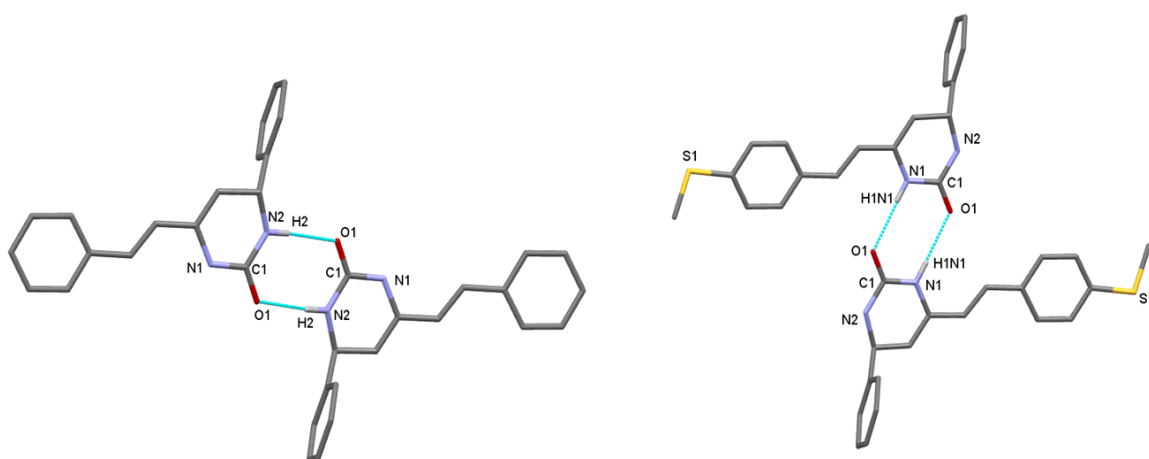
Слика 40. Преклопљени молекули **A1** (црвено) и **A5** (плаво). Преклапање је изведено методом најмањих квадрата на хетероцикличном прстену и приказане су две пројекције.

Табела 4. Дужине веза [Å] у кристалним структурама молекула **A1** и **A5**.

	A1	A5
O1–C1	1,232(3)	1,234(2)
N1–C1	1,368(3)	1,357(2)
N1–C2	1,397(3)	1,405(3)
N2–C1	1,339(3)	1,343(3)
N2–C4	1,456(3)	1,458(3)
C2–C3	1,330(4)	1,331(3)
C2–C11	1,460(3)	1,454(3)
C3–C4	1,500(3)	1,494(3)
C4–C5	1,520(3)	1,523(3)
C11–C12	1,333(4)	1,327(3)
C12–C13	1,470(3)	1,466(3)

Табела 5. Геометрија водоничних веза у кристалним структурама **A1** и **A5**.

<i>D–H⋯A</i>	<i>D–H</i> [Å]	<i>D⋯A</i> [Å]	<i>H⋯A</i> [Å]	<i>D–H⋯A</i> [°]	Кодови симетрије
N1–H1⋯O2	0,86	2,932(4)	2,08	170	<i>x,y,z</i>
N2–H2⋯O1	0,86	2,855(4)	2,00	173	$-x+2, -y+1, -z+1$
C12–H12⋯O2	0,93	3,268(5)	2,36	166	<i>x,y,z</i>
C19–H19⋯O1	0,96	3,457(5)	2,58	152	<i>x,y,z</i>
C20–H20⋯O1	0,96	3,401(5)	2,52	152	<i>x,y,z</i>
N1–H1⋯O1	0,81(3)	2,907(3)	2,10(3)	178(3)	$-x+2, -y+1, -z+1$
C12–H12⋯O1	0,93	3,314(2)	2,39	172	$-x+1, -y+2, -z+2$

Слика 41. Једињења **A1** (лево) и **A5** (десно) међусобно повезана у центросиметричне димере водоничним везама. Сви водоникови атоми који не учествују у формирању водоничне везе су изостављени ради прегледности, а водоничне везе су приказане светлоплавим испрекиданим линијама.

2.2.3. Цитотоксична активност једињења серије А и SAR анализа

Резултати цитотоксичности једињења серије А које су одређене МТТ тестом у *in vitro* условима су приказани у Табели 6 као IC₅₀ вредности. Резултати показују да сва једињења поседују умерену цитотоксичну активност према свим испитиваним туморским ћелијским линијама.

Табела 6. Цитотоксична активност једињења серије А.

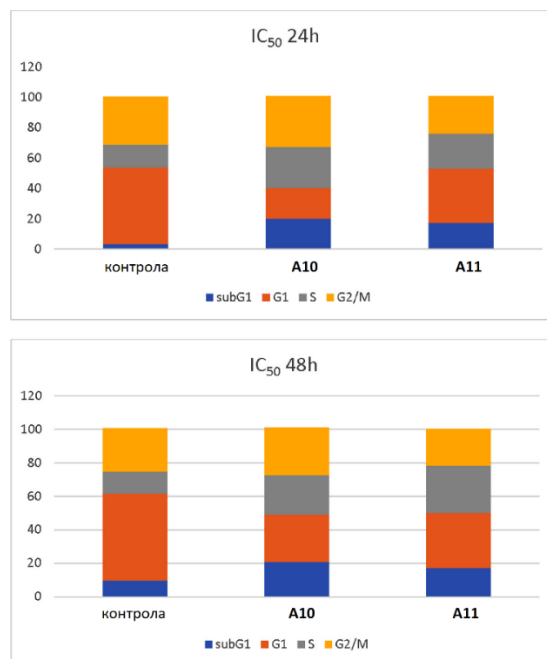
Једињење	HeLa	A549	LS174	MRC-5
	IC ₅₀ ± С.Д. [μM]*			
A1	14,69 ± 0,87	33,95 ± 5,36	35,91 ± 0,45	17,44 ± 2,41
A2	51,76 ± 15,07	81,12 ± 3,72	150,85 ± 1,02	59,89 ± 0,72
A3	16,13 ± 0,12	35,23 ± 2,45	31,59 ± 1,30	17,29 ± 3,01
A4	33,18 ± 9,75	55,22 ± 8,84	50,22 ± 1,87	23,15 ± 1,74
A5	14,21 ± 1,19	69,59 ± 0,51	40,00 ± 1,43	16,83 ± 0,31
A6	17,75 ± 1,40	46,88 ± 0,85	52,64 ± 13,90	21,97 ± 0,88
A7	19,16 ± 0,93	34,54 ± 3,60	40,87 ± 1,78	27,04 ± 5,35
A8	16,52 ± 2,02	40,07 ± 1,85	32,89 ± 4,74	14,99 ± 3,05
A9	67,73 ± 4,69	90,63 ± 3,61	>200	69,52 ± 0,42
A10	15,13 ± 5,55	29,57 ± 5,70	33,94 ± 0,87	23,02 ± 6,11
A11	10,36 ± 1,04	49,05 ± 5,49	53,10 ± 2,10	24,60 ± 0,27
A12	17,82 ± 4,95	69,37 ± 1,91	95,43 ± 6,42	24,63 ± 2,30
A1-d ₂	34,60 ± 10,34	68,94 ± 8,59	64,16 ± 3,06	39,18 ± 3,40
цисплатина	4,91 ± 0,74	13,21 ± 0,89	4,83 ± 0,35	9,35 ± 1,29

*Резултати представљају средње вредности ± стандарда девијација (С.Д.) добијене из три независна експеримента.

Редослед осетљивости ћелијских линија на основу IC₅₀ вредности је следећи: LS174 < A549 < HeLa. Једињења A10 и A11 су најактивнија са вредностима IC₅₀ у опсегу од 15,13–33,94 и 10,36–53,10 μM на свим ћелијским линијама. Интересантно је истаћи да једињења A2, A3 и A11 (Схема 33) садрже хлор као супституент, али на различитим позицијама у ароматичном језгру због чега показују значајне разлике у добијеним IC₅₀ вредностима. Код једињења A2 хлор се налази у *мета* положају, док се код једињења A3 налази у *пара* положају у стирил-фрагменту, а код једињења A11 на другом бензеновом прстену. Као последица ових структурних варијација, поменута једињења су показала различите цитотоксичне активности на HeLa ћелијској линији (A2, IC₅₀ = 51,76 ± 15,07; A3, IC₅₀ = 16,13 ± 0,12 и A11 IC₅₀ = 10,36 ± 1,04 μM), што сугерише да је за активност у овом случају врло важно у ком положају се налази хлор. На основу IC₅₀ вредности можемо да закључимо да присуство хлора у *мета* положају код једињења A2 негативно утиче на цитотоксичну активност, док када је он у *пара* положају, независно да ли у стирил или фенил делу, активност је значајно већа са мањим варијација између та два једињења. Такође је веома значајно истаћи разлику у цитотоксичној активности коју показују недеутерисани производ A1 и деутерисани A1-d₂. Једина структурна разлика између ова два молекула је присуство два деутерона у једињењу A1-d₂ у односу на једињење A1 које у истом положају има протоне. Та разлика је довела до тога да су у поређењу са A1, код A1-d₂ забележене двоструко слабије цитотоксичне активности за све ћелијске линије.

2.2.3.1. Ефекти одабраних једињења на ћелијски циклус

Како су једињења **A10** и **A11** показала најбоље IC_{50} вредности, испитан је њихов утицај на фазе ћелијског циклуса помоћу проточне цитометрије. На **Слици 42** је приказана дистрибуција фаза ћелијског циклуса HeLa ћелија након 24 и 48 сати инкубације при концентрацији IC_{50} испитиваних једињења. Резултати показују да је дејство једињења **A10** и **A11** на HeLa ћелије довело до значајног, али временски независног повећања subG1 ћелија у поређењу са контролом. Ова значајна акумулација ћелија у subG1 фази указује да ефекат једињења доводи до апоптозе која може бити резултат деградације или фрагментације генетског материјала. Такође је повећан и проценат ћелија у S-фази што иницира прекид ћелијске деобе.



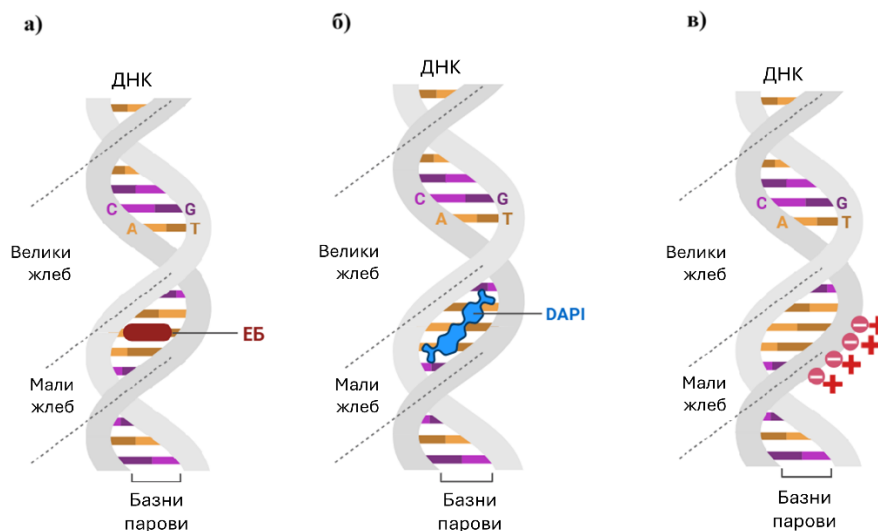
Слика 42. Промене дистрибуције HeLa ћелија у току фаза ћелијског циклуса (subG1, G1, S или G2/M) настале деловањем једињења **A10** и **A11** након 24 сати (горе) или 48 сати (доле) инкубације.

2.2.4. Интеракције са биомолекулама

Многи антиканцерогени и антибактеријски лекови циљају специфичне регионе ДНК који су укључени у есенцијалне активности као што су експресија гена, транскрипција гена, мутагенеза, карциногенеза и ћелијска смрт.²²² Стога је проучавање интеракције лекова са ДНК од суштинског значаја за фармакологију и има велики утицај на синтезу нових лекова који циљају ДНК, јер начин и афинитет везивања одређују ефикасност лека. Постоје три могућа начина реверзибилног (нековалентног) везивања молекула за двоструко спиралну ДНК: (а) интеркалација између базних парова ДНК, (б) интеракције са жлебовима ДНК – већим или мањим, (в) електростатичке интеракције дуж фосфатне кичме ДНК. Многа једињења имају више начина интеракције са ДНК, у зависности од структурних карактеристика молекула и ДНК.²²³ Ипак, јаке интеракције спадају у две категорије: интеркалација и специфичне интеракције водоничног везивања у жлебовима ДНК (**Слика 43**).

Методe које се користе за испитивање интеракција једињења и ДНК су многобројне, али се најчешће код испитивања интеракција малих молекула користе

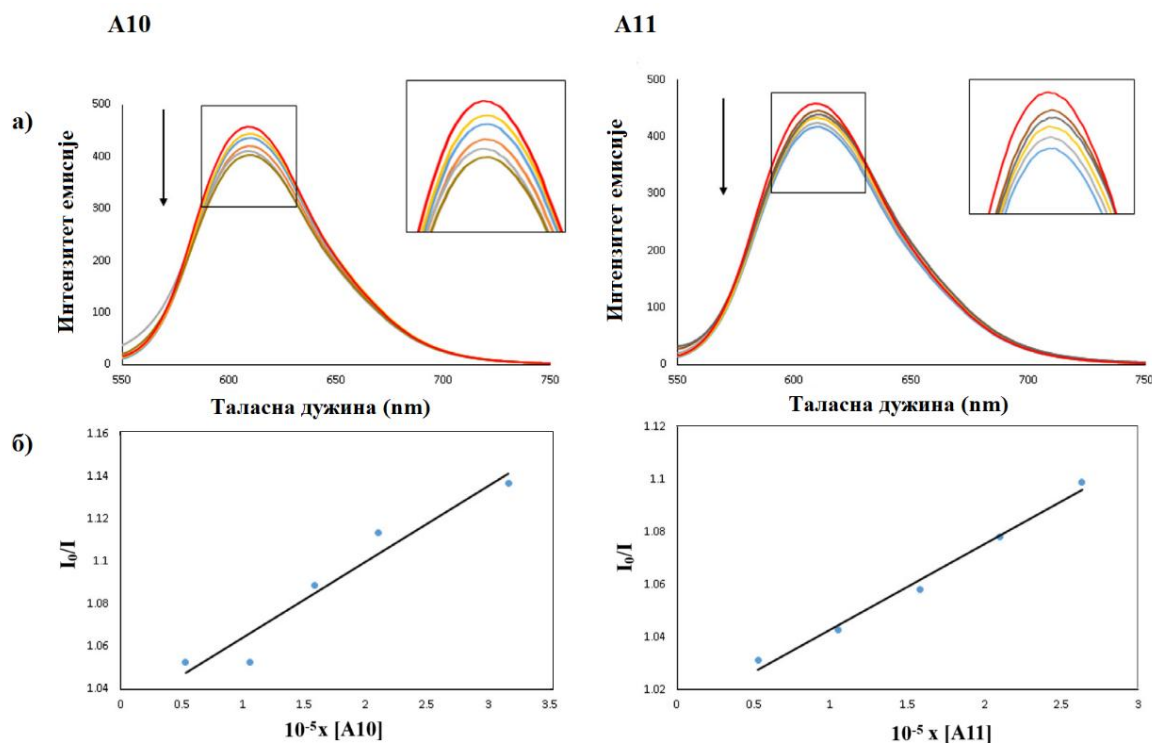
спектрофотометријске и електрохемијске методе.²²⁴ Код флуориметријске анализе се користе и флуоресцентни маркери као што су етидијум бромид (ЕБ) који представља типичан интеркалатор великог жлеба ДНК (енг. *major groove*), док се 4',6-диамидино-2-фенилиндол (енг. *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI), Hoechst 33258 и 33342 користе као маркери који се везују за мали жлеб (енг. *minor groove*). Поред тога, корисне информације о начину везивања малих молекула за ДНК се могу добити и праћењем стабилности ДНК хеликса приликом температурних промена.



Слика 43. Шематски приказ нековалентног везивања: а) интеркалација, б) везивање у малом жлебу и в) електростатичке интеракције. Слика је креирана помоћу BioRender.com.

Интеракције одабраних једињења са биомолекулима (ДНК и серум албумин) испитиване су помоћу флуоресцентне спектроскопије. У овом случају је испитано да ли једињења **A10** и **A11** могу да истисну ЕБ из претходно формираног кластера ЕБ–ДНК. Етидијум бромид се везује за ДНК тако што се интеркалира између нуклеотидних база и на тај начин гради стабилан комплекс. Како би се доказало да ли једињења **A10** и **A11** имају тенденцију да се вежу за ДНК на исти начин као ЕБ, прати се промена емисије флуоресценције у раствору фосфатног пуфера (PBS) у опсегу од 550 до 750 nm и то прављењем серија раствора унапред задатих концентрација. Емисиони спектри су приказани на **Слици 44**. Интензитет емисије ЕБ–ДНК опада како се повећава концентрација једињења **A10** или **A11** без већих варијација у таласној дужини максималне емисије. Јачина везивања једињења **A10** и **A11** за ДНК је одређена применом Stern-Volmer-ове једначине (1) и израчунавањем Stern-Volmer-ове константе (K_{SV}), где су I_0 и I интензитети емисије пре и након додатка лиганда, а $[Q]$ концентрација лиганда (mol/dm^3), у овом случају концентрације једињења **[A10]** или **[A11]**. Константе су израчунате из одговарајуће зависности I_0/I од концентрације лиганда. Добијене мање вредности константи од очекиваних (**Табела 7**) сугеришу да једињења **A10** и **A11** не могу потпуно да истисну ЕБ из ЕБ–ДНК комплекса. На основу вредности константи се може закључити да поменута једињења имају тенденцију да се делимично интеркалирају, али да формирају и водоничне везе у једном од жлебова ДНК или остварују неке врсте електростатичких интеракција, што нам говори о томе да су интеракције мешовитог типа.²²⁵

$$I_0/I = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$



Слика 44. а) Емисиони спектри ЕБ–ДНК у одсуству (црвене линије) и присуству **A10** или **A11**; б) зависност I_0/I од концентрације лиганда **A10** или **A11**.

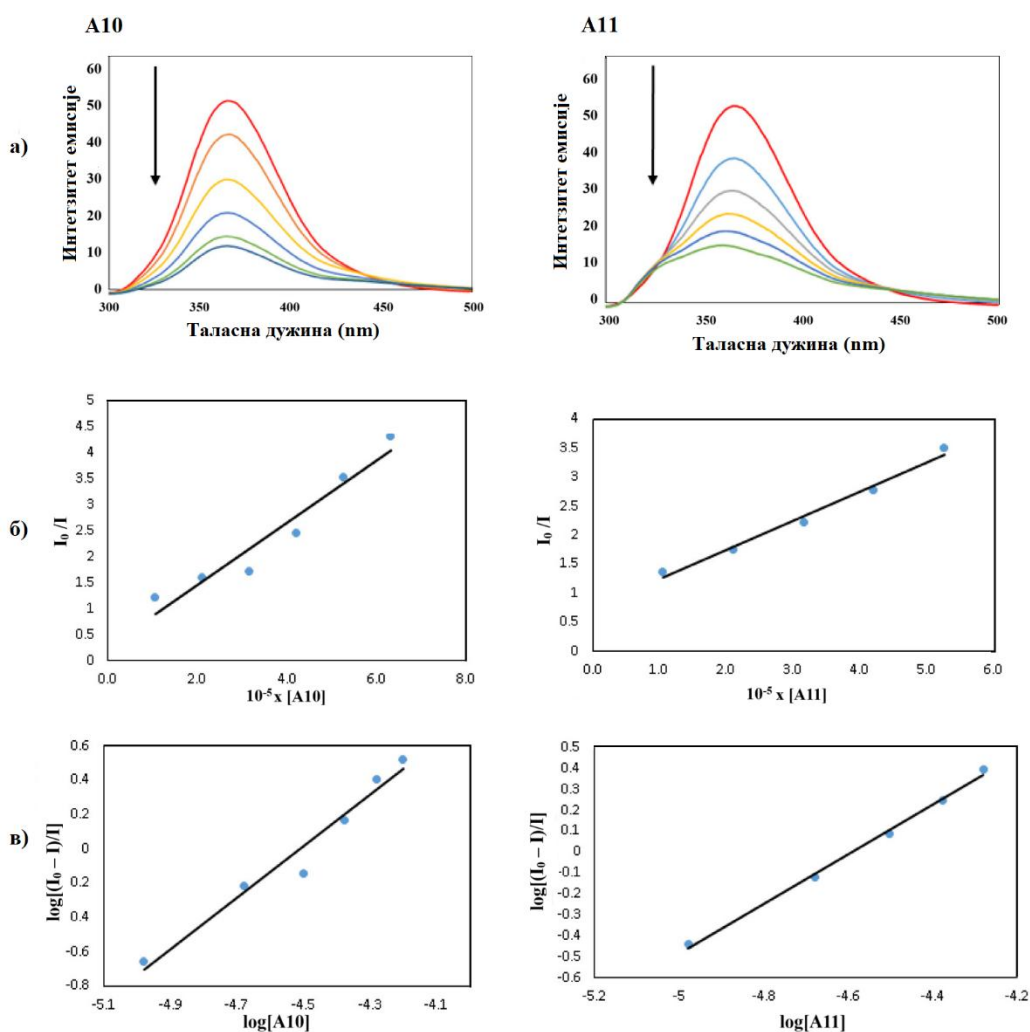
Серум албумини су транспортни протеини који су у великој мери одговорни за транспорт лекова до циљане ћелије. Многи лекови и други мали биоактивни молекули се реверзибилно везују за албумине и на тај начин транспортују.^{226,227} Говеђи серум албумин (енг. *bovine serum albumin*, BSA) и хумани серум албумин, (енг. *human serum albumin*, HSA) се најчешће користе у истраживањима, јер су њихове структуре познате и лако су доступни. У овим испитивањима је коришћен BSA и интеракције су испитане такође флуоресцентном спектроскопијом праћењем интензитета емисије раствора BSA по додатку растућих концентрација **A10** и **A11**. На Сlici 45а се види да интензитет емисије BSA опада при додатку **A10** и **A11**. Знајући животни век флуоресценције флуорофора пре гашења ($\tau_0 = 10^{-8}$ s), могуће је да се добије вредност k_q из једначине $K_{sv} = k_q \times \tau_0$, где је k_q константа брзине гашења, а K_{sv} Stern-Volmer-ова константа.²²⁸ Ако је вредност k_q приближна теоријској максималној вредности за дифузионо контролисано гашење емисије ($\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ у води), то указује на динамички механизам, док вредности k_q значајно ниже од ове границе указују на могућност статичког гашења или пак неког другог механизма. Како су у овом случају вредности $k_q = 3,25 \times 10^{11}$ и $3,58 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ за **A10** и **A11**, респективно, реч је о статичком механизму што указује да долази до формирања стабилног нефлуоресцентног комплекса између флуорофора и лиганда у основном стању и може се применити логаритамска једначина (2) за излучавање константе везивања.²²⁹

Добијене вредности за константе везивања и број везивних места (n) по молекулу BSA за тестирана једињења помоћу логаритамске једначине (2) и испитивањем зависности $\log [(I_0 - I)/I]$ у односу на $\log [Q]$ (Слика 45в) су приказане у Табели 7. Израчунате константе сугеришу да се **A10** и **A11** реверзибилно везују за BSA и да се због тога могу транспортовати до циљане ћелије, док нам број везивних места указује на то да се приближно један молекул **A10** или **A11** везује за један молекул BSA.

$$\log[(I_0 - I)/I] = \log K_a + n \log[Q] \quad (2)$$

Табела 7. Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) и константе гашења флуоресценције (k_q) за интеракције једињења **A10** и **A11** са ДНК као и K_{sv} , k_q и константе везивања (K_a) за интеракције са BSA.

Једињење	ДНК					
	k_q [M ⁻¹ s ⁻¹]	K_{sv} [M ⁻¹]	R			
A10	$3,25 \times 10^{11}$	$3,25 \times 10^3$	0,993			
A11	$3,58 \times 10^{11}$	$3,58 \times 10^3$	0,969			
Једињење	BSA					
	k_q [M ⁻¹ s ⁻¹]	K_{sv} [M ⁻¹]	R	K_a [M ⁻¹]	n	R
A10	$6,01 \times 10^{12}$	$6,01 \times 10^4$	0,966	$5,70 \times 10^6$	1,5	0,980
A11	$5,02 \times 10^{12}$	$5,02 \times 10^4$	0,993	$2,75 \times 10^5$	1,2	0,998



Слика 45. а) Емисиони спектри BSA у одсуству (црвене линије) и присуству **A10** или **A11**; б) зависност I_0/I од концентрације **A10** или **A11**; в) зависност $\log[(I_0 - I)/I]$ од $\log[Q]$.

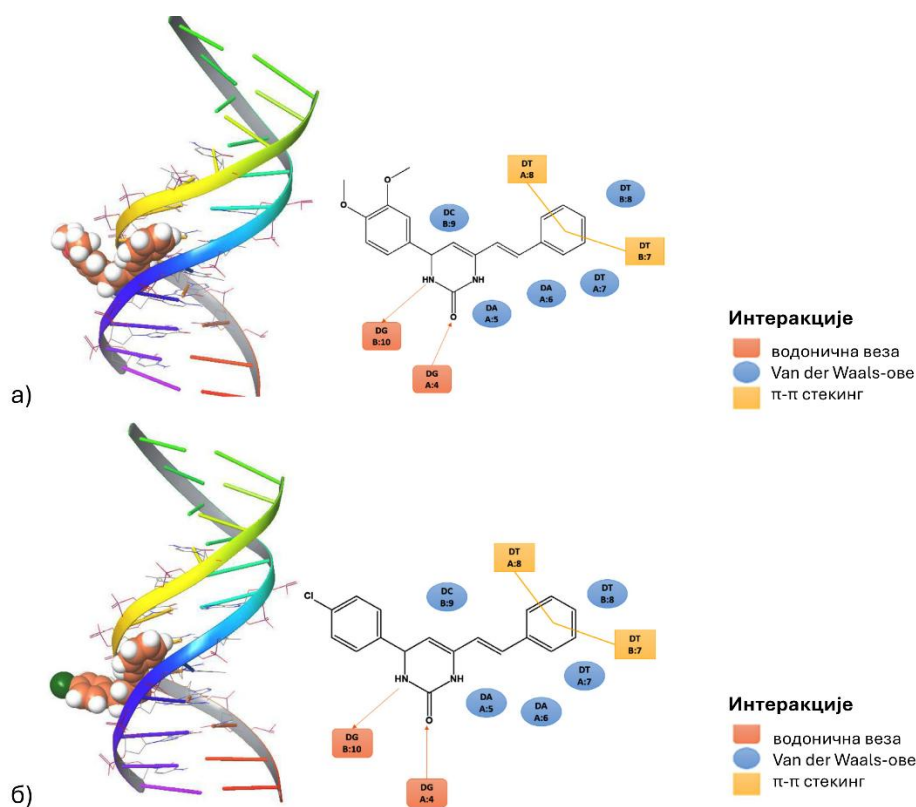
2.2.5. Молекулски докинг

Молекулски докинг је често коришћена рачунарска метода која има за циљ да предвиди геометрију и афинитет везивања испитиваних лиганата за активно место циљног макромолекула. Како би се употпунили експериментални резултати добијени флуоресцентном спектроскопијом, предвиђени су најповољнији начини везивања ових лиганата за ДНК и BSA помоћу молекулског докинга. Структуре лиганата и ДНК са најнижом енергијом везивања приказане су на **Слици 46**. Добијена енергија везивања и израчуната константа инхибиције дате су у **Табели 8**. Шематски приказ, као и резултати из **Табеле 8**, показали су да је начин везивања оба лиганда за ДНК готово идентичан. Наиме, **A10** и **A11** се везују за мањи жлеб ДНК, након чега следи интеркалација пиримидинског и несупституисаног бензеновог прстена (од ког потиче тренд опадања интензитета емисије EB–ДНК комплекса из претходних експеримента). Са друге стране, супституисани бензенов прстен може да се нађе изван ДНК хеликса и има занемарљив ефекат на афинитет везивања. Лиганди ступају у интеракцију са ДНК преко водоничних веза са гуанином (DG4 из А хеликса је донор протона за C=O, док је DG10 из В хеликса акцептор водоника из N–H). Афинитет везивања је додатно појачан кроз van der Waals-ове интеракције и π – π стекинг интеракције са паровима база тимина (DT8 из А хеликса и DT7 из В хеликса). Ова запажања су потврђена разликом у енергији везивања (**Табела 8**), која је мања од 0,2%.

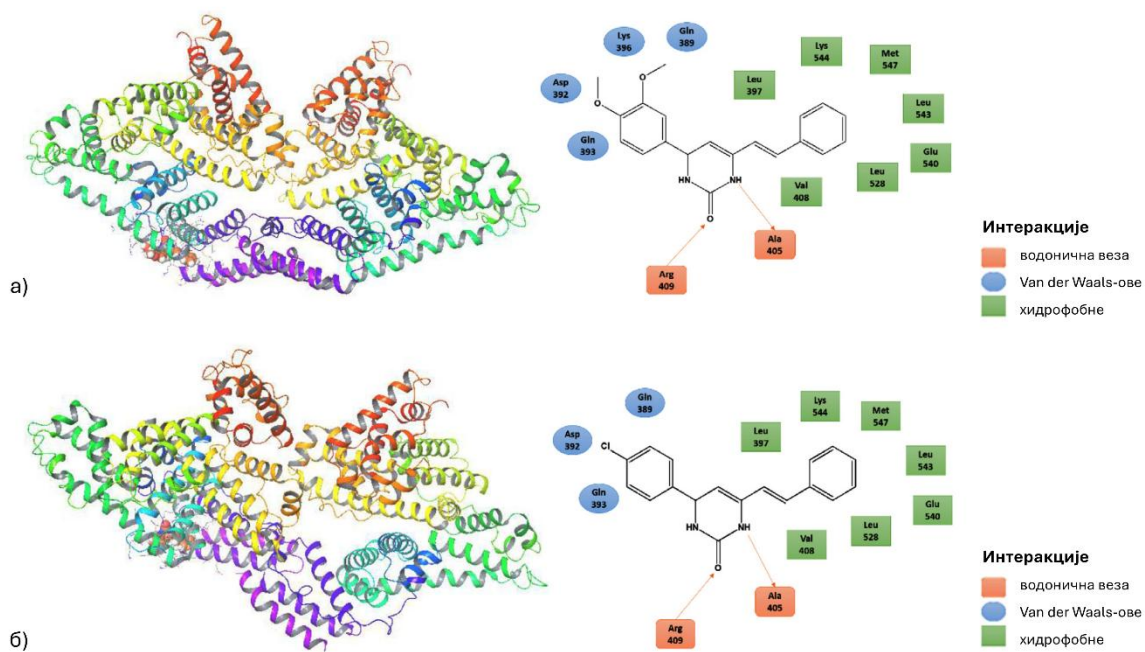
Табела 8. Параметри добијени молекулским докингом.

Лиганд	Докинг учинак	Енергија везивања [kcal mol ⁻¹]	Константа инхибиције [μ M]
		ДНК	
A10	–5,561	–5,301	128,83
A11	–5,547	–5,289	131,47
		BSA	
A10	–5,344	–5,627	74,27
A11	–5,140	–5,305	127,96

Са друге стране, везивање **A10** и **A11** за BSA показало је мале разлике узроковане присуством различитих супституената на бензеновом прстену. Окружење у месту везивања и 2D приказ се налазе на **Слици 47**. Оба лиганда се везују у истом региону, тачније на Sudlow-ом месту II BSA (под-домен IIIA).²³⁰ Несупституисани фенилни прстен се лако уклапа у хидрофобни цеп сачињен углавном од аминокиселинских остатака леуцина (Leu397, Leu528, Leu543). Интеракције испитиваних лиганата се углавном стабилизују формирањем водоничних веза са аминокиселинама Ala405 и Arg409. Главна разлика се може наћи у региону супституисаног бензеновог прстена, где се јављају van der Waals-ове интеракције. Лиганди **A10** и **A11** остварују интеракције са аминокиселинама Gln389, Gln393 и Asp392, док интеракција са Lys396 изостаје код једињења **A11**. Ова разлика сугерише да **A10** има већи афинитет да се везује за BSA. Израчунати резултати енергије везивања, који су представљени у **Табели 8**, такође сугеришу да су интеракције између **A10** и BSA јаче. Присуство две метокси групе на бензеновом прстену указује на могућност остваривања van der Waals-ових интеракција због којих једињење **A10** има већи афинитет према BSA.



Слика 46. Дводимензионални приказ интеракција A10 (а) и A11 (б) са ДНК добијен молекулским докингом.



Слика 47. Дводимензионални приказ интеракција A10 (а) и A11 (б) са BSA добијен молекулским докингом.

2.2.6. 3D-QSAR анализа

Повезаност структуре и одговарајућих особина неког биолошки активног једињења се анализира испитивањем квантитативног односа структуре и активности (енг. *Quantitative Structure–Activity Relationship*, QSAR). Овим студијама се помоћу математичких корелација објашњава повезаност између биолошке активности и израчунатих дескриптора испитиваних једињења. На основу карактеристика дескриптора извршена је подела на више типова QSAR студија попут 2D која не зависи од конформације молекула, затим 3D за коју су потребни подаци о положају атома у простору али и вишедимензионалне (4D, 5D и 6D) QSAR методе.²³¹ У циљу бољег разумевања кључних структурних детерминанти које су значајне за анти-HeLa активност анализираних једињења, направљен је 3D-QSAR модел. Поред једињења синтетисаних у оквиру ове докторске дисертације (A1–12), за формирање 3D-QSAR модела коришћени су и резултати за претходно синтетисана једињења у оквиру наше истраживачке групе (једињења A13–24, погледати поглавље 3.19.2. *Избор једињења за тренинг и тест сет*, Слика 88).²³²

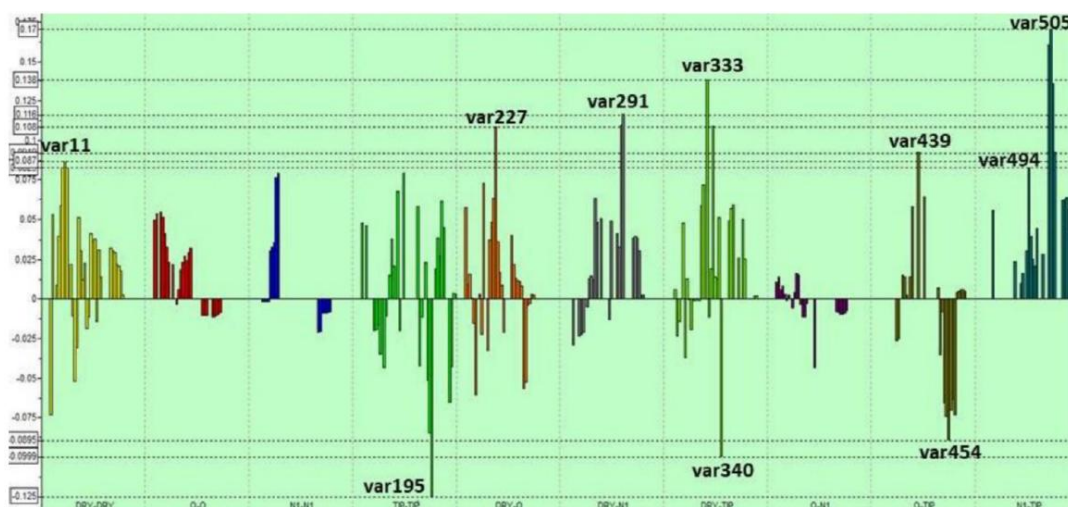
За формирање 3D-QSAR модела је примењена метода парцијалних најмањих квадрата (енг. *Partial Least Square*, PLS), а најважније варијабле су одабране методом фракционисаног факторског дизајна (енг. *Fractional Factorial Design*, FFD).²³³ Након смањења броја варијабли FFD методом (одабрано је 249 најзначајнијих варијабли), креиран је нови оптимални модел и израчунати су параметри за интерну и екстерну валидацију. Овај оптимални модел је састављен од четири компоненте (латентне варијабле), $LV = 4$. Израчунати параметри валидације показују да је развијени 3D-QSAR модел поуздан и да се може користити за предвиђање активности сродних једињења. То доказују параметри екстерне валидације ($R^2_{\text{pred}} = 0,804$, r^2_m , r_m^2 , $r_m^{1/2}$ су већи од 0,5 а Δr_m^2 је мање од 0,2).²³⁴ Примењивост креираног 3D-QSAR модела за предвиђање активности једињења одабраног тренинг сета је потврђена вредностима R^2 и Q^2 као што се може уочити из израчунатих вредности (Табела 9).

Табела 9. Резултати интерне и екстерне валидације 3D-QSAR модела и критеријуми валидације.

Интерни валидациони параметри				
	R^2	Q^2_{LOO}	PRESS	RMSEE
	0,992	0,51	0,016	0,032
Критеријум	>0,9	>0,5		
Екстерни валидациони параметри				
	R^2_{pred}	RMSEP	r_m^2	$r_m^{1/2}$
	0,804	0,079	0,547	0,655
Критеријум	>0,6		>0,5	>0,5
	$\overline{r_m^2}$	Δr_m^2	$(r^2 - r^{1/2}_0)/r^2$	k'
	0,601	0,108	0,009	0,996
Критеријум	>0,5	<0,2	<0,1	$0,85 \leq k' \leq 1,15$

Из хистограма добијеног за PLS модел заснован на дескрипторима независним од координатног система (енг. *GRIde-INdependent Descriptors*, GRIND) приказаног на Слици 48, издвојене су најзначајније варијабле које позитивно утичу на антипролиферативну

активност једињења: v11 (DRY–DRY), v227 (DRY–O), v291 (DRY–N1), v333 (DRY–TIP), v439 (O–TIP), v494 (N1–TIP) и v505 (N1–TIP). Такође су издвојене и варијабле које негативно утичу на активност једињења: v195 (TIP–TIP), v340 (DRY–TIP) и v454 (O–TIP).

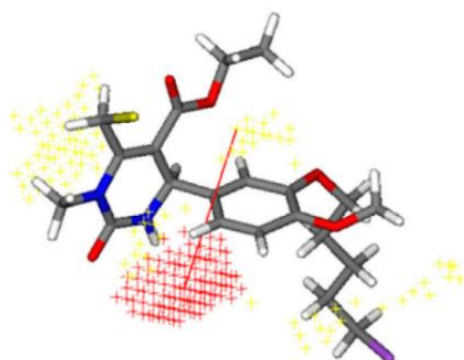


Слика 48. Приказ PLS коефицијената са назначеним најважнијим GRIND варијаблама.

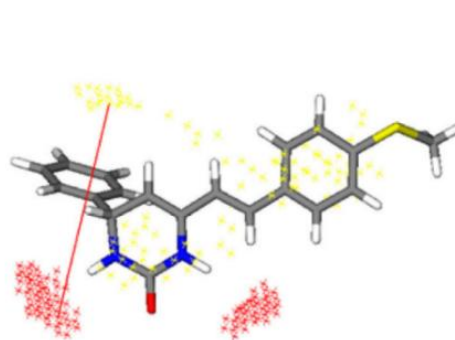
Позитивна варијабла v11: DRY–DRY варијабла је присутна код свих једињења осим код најмање активног једињења A14. Хидрофобни регион тетрахидропиримидинског прстена и хидрофобни центар око атома C4 се налазе на повољној удаљености од 4,4 до 4,8 Å која позитивно утиче на активност. Ова варијабла нам указује да присуство фенил супституента у положају C4 (Слика 35) и оптимална удаљеност од хидрофобног домена тетрахидропиримидинског прстена позитивно утичу на антипролиферативну активност једињења.

Позитивна варијабла v227: DRY–O варијабла је присутна код свих једињења тренинг сета укључујући и најактивнија једињења A10 и A11. Хидрофобни центар на положају C4 и доноси водоничне везе на тетрахидропиримидинском прстену (несупституисани водоници у обе класе деривата) се налазе на оптималној удаљености од 7,6 до 8 Å која позитивно утиче на анти-HeLa активност једињења (Слика 49).

A24



A5

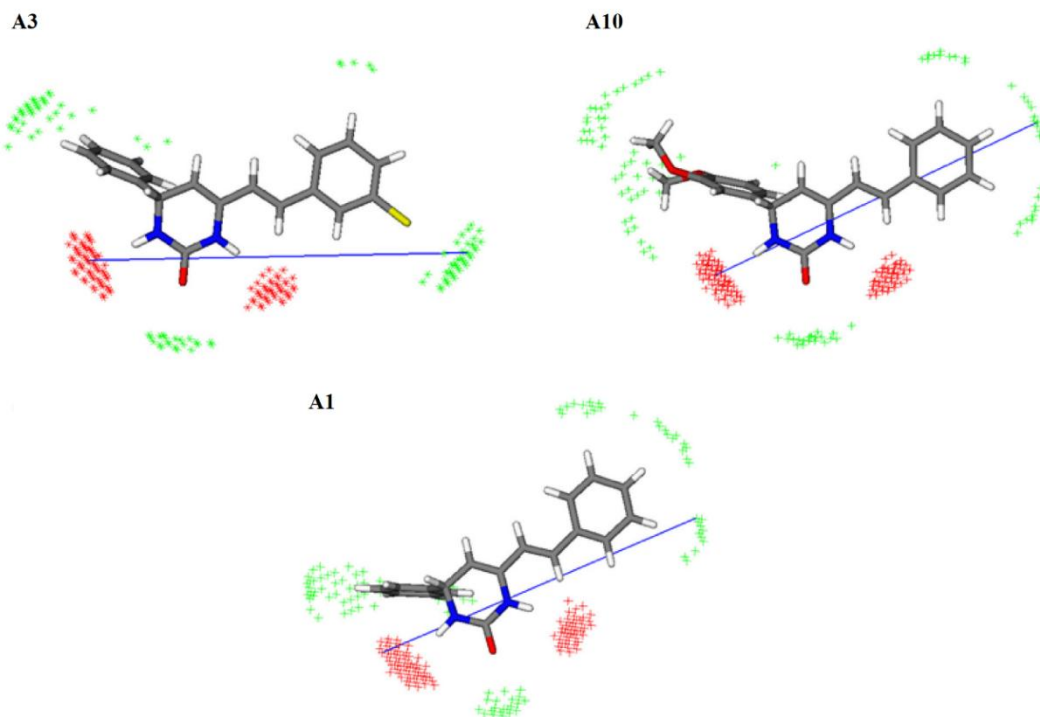


Слика 49. Var227: DRY–O варијабла код једињења A24 и A5. Хидрофобни региони (DRY) су обележени жутом, а доноси водоничне везе црвеном бојом.

Позитивна варијабла v291: DRY–N1 варијабла је присутна у неким од најактивнијих једињења као што су **A19**, **A20**, **A21** и **A24**. Ова варијабла је описана растојањем између хидрофобног региона тетрахидропиримидинског прстена и акцептора водоничне везе на положајима C3 или C4 бензеновог прстена чија је оптимална вредност 12,4–12,8 Å. DRY–N1 варијабла није присутна код мање активних једињења **A13** и **A14**, што може бити последица одсуства супституената који су акцептори водоничне везе. Стога се претпоставља да акцептори водоничне везе на положајима C3 или C4 позитивно утичу на активност.

Позитивна варијабла v439: O–TYP варијабла је присутна код свих једињења на растојању 9,2–9,6 Å. У једињењима која припадају групи претходно синтетисаних једињења (**A13–24**) ова варијабла представља растојање између стерног места етил естра на позицији C5 и донора водоничне групе у тетрахидропиримидинском прстену (N3). Код једињења **A1–12**, укључујући најактивнија једињења **A10** и **A11**, имамо позитивне интеракције између донора водоничне везе (N3) и стерног региона бензеновог прстена на позицији C4.

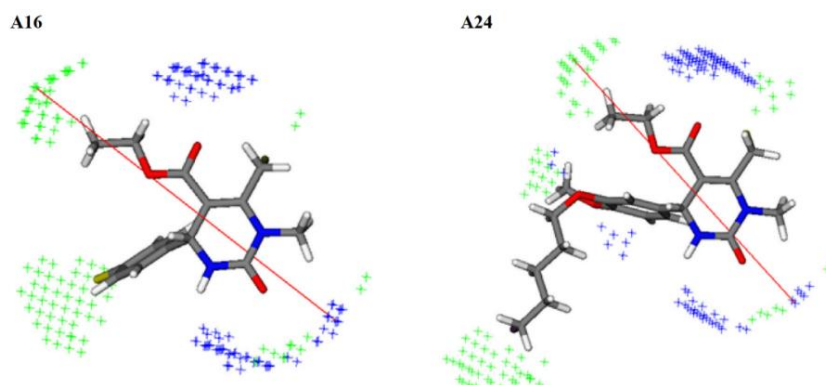
Негативна варијабла v454: У поређењу са варијаблом v439, O–TYP варијабла v454 се односи на растојање између донора водоничне везе (атом N3) и стерног центра стирил групе у положају C6 од 15,2–15,6 Å (**Слика 50**, структура **A10**). Ова варијабла је присутна код једињења **A1–12**, укључујући и најактивнија једињења **A10** и **A11**. Варијабла v454 (O–TYP) није присутна код једињења **A13–24**. Присуство ове варијабле негативно утиче на цитотоксичност једињења **A1–12**. Неповољне интеракције између терминалног фенилног прстена и NH групе у пиримидинском прстену код једињења **A13–24** су одговорне за нижу активност ових једињења.



Слика 50. Var454: O–TYP код једињења **A3**, **A10** и **A1**. Донори водоничне везе су обележени црвеном, а стерни центри (TYP) зеленом бојом.

Према PLS графику коефицијената, варијабла v505 (N1–TYP) која се јавља на растојању 14,8–15,2 Å је идентификована као најзначајнији фактор који утиче на антипролиферативну активност већине испитиваних једињења. Ова варијабла није била

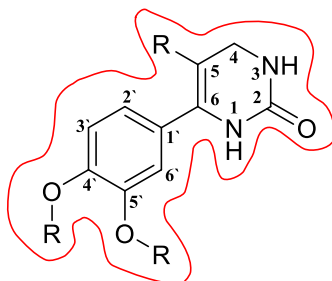
присутна код најмање активног једињења **A14**, што додатно иде у прилог њеном значају за активност. Варијабла Var505 се описује растојањем између акцептора водоничне везе и стерног региона, односно специфичних тачака просторне интеракције (Слика 51). У моделу се показало да овај пар нодова ступа у интеракцију са карбонилним кисеоником пиримидинског прстена и стерним местом етил естра на атому C5, што је уочено код једињења **A13**, **A16-18** и **A20-24**. Код једињења **A15** и **A19** су уочене повољне интеракције између карбонилног кисеоника естарске групе на атому C5 (**A15**, **A19**) и стерног региона (нафталенски прстен) код **A15**, односно супституента на C4 код једињења **A19**. Претпоставља се да остварене интеракције између стерног региона естарске групе на атому C5 и акцептора водоничне везе у пиримидинском језгру играју кључну улогу у биолошкој активности испитаних једињења.



Слика 51. Var505: N1–TIP код једињења **A16** и **A24**. Стерни центри (TIP) су обележени зеленом, а акцептори водоничне везе плавом бојом.

2.2.6.1. *In silico* идентификација потенцијалних мета за синтетисане тетрахидропиримидине

На основу добијених резултата из 3D-QSAR модела, структурне карактеристике важне за анти-HeLa активност су протон-акцепторске групе (карбонилни кисеоник) и протон-донорске групе (несупституисани азот) у тетрахидропиримидинском језгру, затим присуство хидрофобне фенил групе у положају C4 и присуство супституената (протон-акцепторске групе) у положају C4' или C5' на прстену као и присуство волуминозне групе у положају C5. Фармакофора заслужна за антипролиферативну активност приказана је на **Слици 52**.



Слика 52. Фармакофора одговорна за антипролиферативну активност.

Потенцијалне мете за синтетисана једињења могу да се предвиде помоћу онлајн алата SwissTargetPrediction.²³⁵ Рад овог алата заснива се на проналажењу структурних сличности у 2D и 3D приказу између нових једињења и познате библиотеке од 370 000

активних једињења.²³⁶ Резултати предвиђања су приказани у **Табели 10**, а таргетне класе за једињења **A10** и **A11** су приказане на **Слици 53**. *In silico* анализа потенцијалних мета указује на различите механизме антитуморског деловања испитиваних једињења. Једињење **A10** показује афинитет према ензимима и рецепторима који регулишу ћелијски циклус и пролиферацију што упућује на директан антипролиферативни ефекат. Добијени резултати за једињење **A11** сугеришу на могући имуно-модулациони и антиинфламаторни механизам деловања, док са друге стране, **A24** потенцијално делује преко ROR α и ADAM17 који учествују у регулацији апоптозе и сигнализацији раста тумора. Свеукупно, поменута једињења могу да испоље комплементарне механизме антитуморске активности што их чини добрим кандидатима за даља биолошка испитивања.

Табела 10. *In silico* предвиђени потенцијални таргети за једињења **A10**, **A11** и **A24** и њихове вероватноће (*P*).

Једињење		
A10	A11	A24
Циклин-зависна киназа 2/ циклин E1; <i>P</i> = 0,0972	Канабиноидни рецептор тип 2; <i>P</i> = 0,1115	RAR-сродни орфан рецептор алфа (ROR-алфа); <i>P</i> = 0,1145
Никотинамид фосфорибозилтрансфераза; <i>P</i> = 0,0972	Епоксидна хидратаза; <i>P</i> = 0,1115	Протеин за транспорт масних киселина 4; <i>P</i> = 0,1062
Рецептор инсулину сличног фактора раста 1; <i>P</i> = 0,0972	Протеинска киназа C гама; <i>P</i> = 0,1115	PRRP, пролактин- ослобађајући хормонски рецептор; <i>P</i> = 0,1062
Инсулински рецептор; <i>P</i> = 0,0972	Глукокортикоидни рецептор; <i>P</i> = 0,1115	Метаботропни глутаматни рецептор 5; <i>P</i> = 0,1062
Рецептор епидермалног фактора раста erB1; <i>P</i> = 0,0972	Епоксидна хидролаза 1; <i>P</i> = 0,1115	ADAM17; <i>P</i> = 0,1062

На основу приказаних дијаграма на **Слици 53** може се уочити да се за испитивана једињења разликују потенцијални биолошки таргети. За једињење **A10** доминирају киназе (73,3%) што указује на могућу усмереност ка метама које регулишу ћелијски циклус, пролиферацију и сигналне путеве раста тумора. У мањем проценту се јављају ензими, протеазе и G протеин спрегнути рецептори класе C, што указује на ограничен, али функционално релевантан број секундарних мета. Насупрот томе, једињење **A11** показује већу разноврсност таргета при чему највећи удео имају G протеин спрегнути рецептори класе A и протеазе, док остале групе учествују са скоро подједнаким уделом (6,7–13,3%). Добијени резултати указују да једињење **A10** делује специфичније, док једињење **A11** показује мултитаргетни профил који може бити значајан за комплексне механизме антитуморског дејства.



Слика 53. Класе ензима као предвиђене мете за једињења A10 (а) и A11 (б).

2.3. Синтеза и карактеризација једињења серије Б

У оквиру серије **Б** синтетисано је 21 ново једињење док је једињење **B1** синтетисано и окарактерисано у оквиру ранијих истраживања,²³⁷ али је ради поређења резултата обухваћено испитивањима у оквиру ове докторске дисертације. На **Схеми 36** су приказане структуре свих једињења серије **Б**. На примеру синтезе једињења **B1** су испитани оптимални реакциони услови применом различитих киселих катализатора. Као растварачи коришћени су метанол, *n*-бутанол и 1,4-диоксан. Класична Biginelli-јева реакција са хлороводоничном киселином као катализатором резултирала је нижим приносом од очекиваног, без обзира на примењени растварач. Увођењем амидосулфонске киселине као катализатора, принос **B1** је варирао између 35% и 50% у различитим растварачима, при чему је највећи принос постигнут у 1,4-диоксану. Међутим, упркос побољшању приноса, реакција није у потпуности доведена до краја, а на собној температури принос је додатно опао. Како би овај проблем био превазиђен, примењена је двостепена синтеза. У првој фази алдехид је реаговао са *N*-метилтиоуреом уз каталитичку количину концентроване HCl, у смеси 1,4-диоксана и хлороформа на собној температури. Упоредном танкослојном хроматографијом је потврђено формирање иминског интермедијера након једног сата, након чега су у реакциону смешу додати метил ацетоацетат и 2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиол (енг. *2-Amino-1-(4-nitrophenyl)propane-1,3-diol*, ANP). Након овако модификоване реакције, једињење **B1** је изоловано у приносу од 63%. Контролна реакција без 2-амино-1,3-пропандиола довела је искључиво до формирања иминског интермедијера, без настајања тетрахидропиримидина као крајњег производа, што указује на кључну улогу ове компоненте у реакцији.

Након оптимизације реакционих услова, први корак је обухватао синтезу алдехида коришћених за добијање тетрахидропиримидина (**Схема 35**). Алдехиди **АЛД14–19** и **АЛД31** добијени су од одговарајућег полазног алдехида (ванилина, 5-нитрованилина, 3-етокси-2-хидроксибензалдехида и 4-хидрокси-5-метокси-изофталалдехида) ациловањем фенолне групе помоћу одговарајућих ацил хлорида или анхидрида сирћетне киселине у присуству триетиламина у тетрахидрофурану. Алдехиди **АЛД20–30** су добијени алкиловањем фенолне групе ванилина помоћу различитих алкил халогенида у присуству K₂CO₃ као базе у *N,N*-диметилформамиду (DMF) у микроталасној пећници. Ванилин (**АЛД10**), етоксис-2-хидроксибензалдехид и 4-хидрокси-5-метоксиизофталалдехид набављени су од комерцијалног дистрибутера.

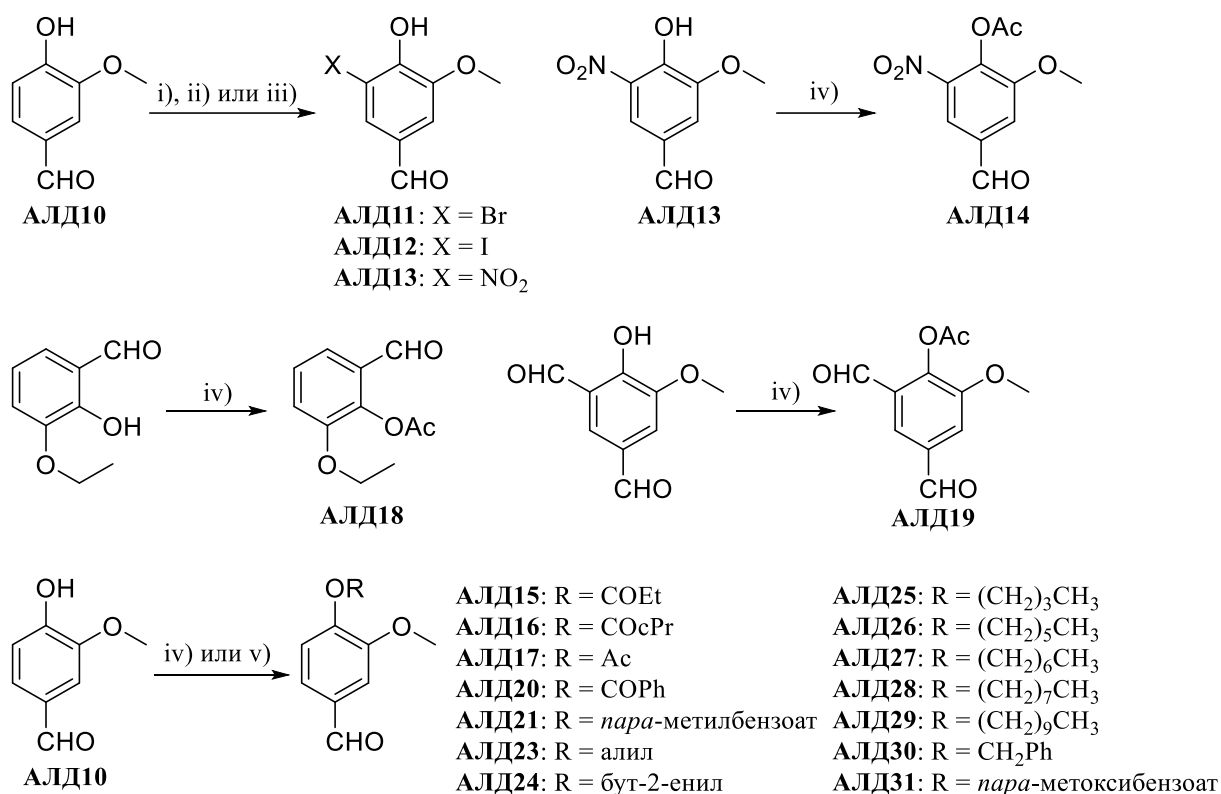


Схема 35. Синтеза алдехида **АЛД10–31**. Реагенси и услови: i) I₂, NaOH, 90 °C за **АЛД11**; ii) Br₂, MeOH, 0 °C за **АЛД12**; iii) конц. HNO₃, DCM, 5–10 °C за **АЛД13**; iv) ацил хлорид или анхидрид сирћетне киселине, Et₃N, THF; v) алкил халогенид, K₂CO₃, PEG 1000, DMF, MW.

Структуре изолованих тетрахидропиримидина (**Б1–22**) потврђене су IR и NMR спектроскопијом и ESI-MS масеном спектрометријом, док су једињења **Б11** и **Б16** била погодна за кристалографску анализу. У IR спектрима се у области око 3200–3300 cm⁻¹ јавља широка трака која потиче од N–H вибрација, док се у области 1700–1710 cm⁻¹ јавља оштра трака од валенционих вибрација C=O естарске групе, а сигнал амидне C=O групе се налази на нешто нижем таласном броју (1600–1640 cm⁻¹).

У ¹H NMR спектрима свих једињења су приметна бар четири синглета чији сигнали потичу од метил група. У области око 2,50 ppm се налази сигнал од метил групе која је директно везана за хетероциклични прстен (C6), затим се на померању од око 3,50 налази сигнал од *N*-метил протона, док се протони из естарске групе и метокси групе ванилина налазе у области 3,6–3,7 ppm. Сигнал бензилног протона се јавља као дублет у области 5,10–5,40 ppm и главни је показатељ успешног купловања. Сигнали протона везаних за бензенов прстен се налазе у очекиваној ароматичној области NMR спектра (6–7 ppm). Сигнал протона тиоамида и одговарајући сигнал угљеника су детектовани на око 10 ppm, односно 178 ppm. Карбонилни C атом је на померању од 166 ppm, док се остали сигнали налазе на очекиваним померањима.

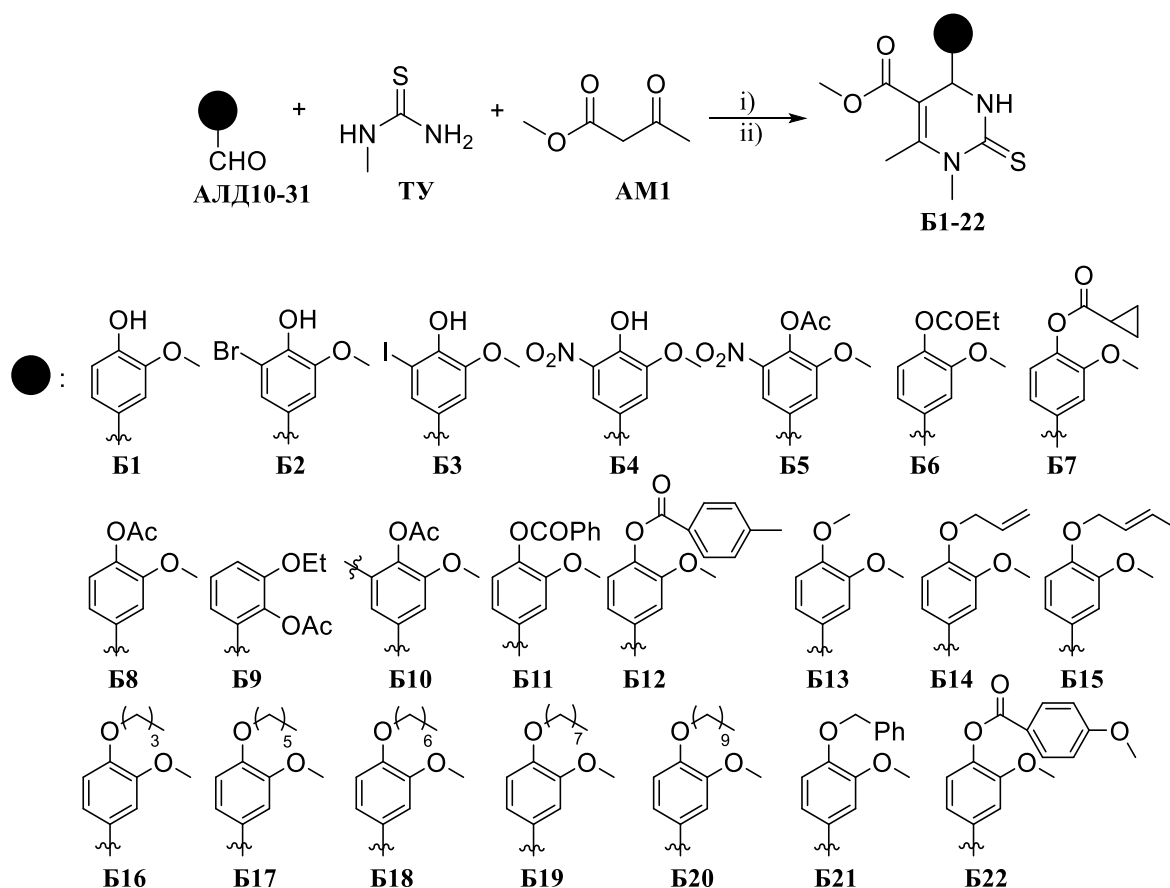
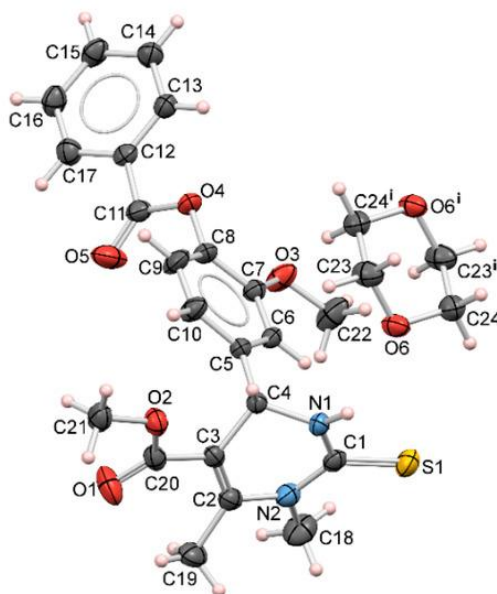


Схема 36. Синтеза једињења серије **Б**. Реагенси и услови: i) каталитичка количина конц. HCl, 1 h, с.т.; ii) ANP, 12 h, с.т.

2.3.1. Кристалографска анализа једињења **Б11** и **Б16**

2.3.1.1. Кристална структура једињења **Б11**

На **Слици 54** се налази кристална структура једињења **Б11** са нумерисаним атомима. Дужине и углови веза као и торзиони углови, су приказани у **Табели 11**. Асиметрична јединична ћелија једињења **Б11** се састоји од два дела: један молекул **Б11** и половина молекула 1,4-диоксана. Конформацију **Б11** најбоље дефинишу торзиони углови $\angle \text{C11-O4-C8-C7} = 103,7(2)^\circ$, $\angle \text{C11-O4-C8-C9} = -80,8(3)^\circ$, $\angle \text{C10-C5-C4-C3} = 81,9(2)^\circ$, и $\angle \text{C6-C5-C4-C3} = -97,22(18)^\circ$. Две фенилне групе налазе се у готово гош (*gauche*) положају, при чему је угао између средњих равни обе фенилне групе $69,63(10)^\circ$. Са друге стране, оба фенилна прстена су скоро нормално (под правим углом) оријентисана у односу на пиримидински прстен, при чему је угао између равни добијених методом најмањих квадрата кроз атоме N1/C1/N2 и C5/C6/C7/C8/C9/C10 $88,67(19)^\circ$, а кроз N1/C1/N2 и C12/C13/C14/C15/C16/C17 износи $82,8(2)^\circ$.



Слика 54. Приказ кристалне структуре једињења **B11** са нумерисаним атомима добијен у програму MERCURY.²³⁸ Елипсоиди померања су приказани са вероватноћом од 30%. Код симетрије: (i) $-x, -y+1, -z+2$.

Табела 11. Дужине веза, углови веза и торзиони углови у кристалној структури једињења **B11**.

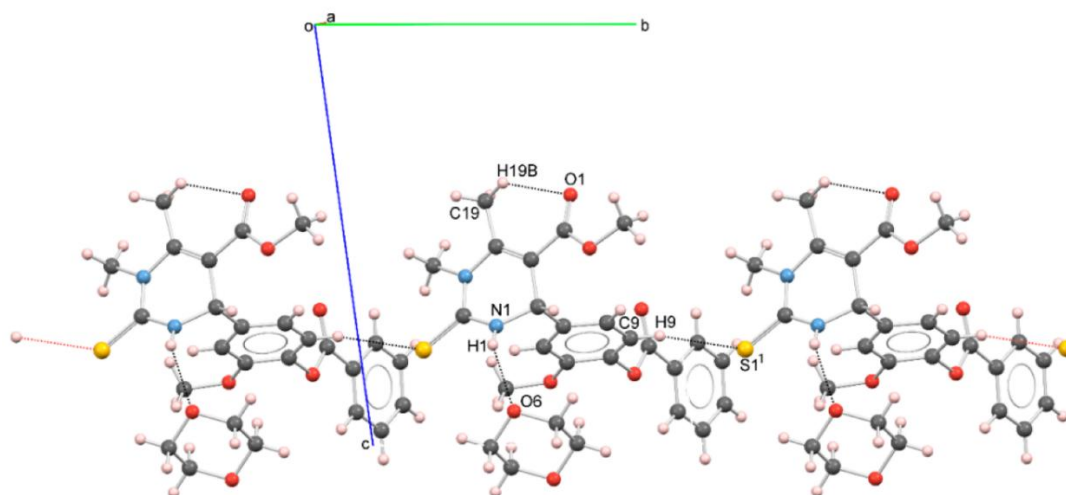
Дужине веза [Å]			
O1–C20	1,203(3)	N1–C1	1,339(2)
O2–C20	1,334(3)	N1–C4	1,453(2)
O2–C21	1,442(2)	N2–C1	1,373(3)
O3–C7	1,354(2)	N2–C2	1,410(3)
O3–C22	1,424(3)	N2–C18	1,472(3)
O4–C11	1,354(2)	C3–C2	1,336(3)
O4–C8	1,402(2)	C4–C3	1,517(2)
O5–C11	1,196(3)	S1–C1	1,6733(19)
O6–C24	1,423(3)	O6–C23	1,425(3)
Углови веза [°]			
C11–O4–C8	116,71(15)	C1–N1–C4	122,60(14)
C24–O6–C23	110,08(16)	N1–C1–N2	115,90(16)
C20–O2–C21	116,98(17)	N1–C1–S1	120,25(14)
Торзиони углови [°]			
C4–N1–C1–N2	–23,7(2)	C2–C3–C20–O1	–19,9(3)
N1–C4–C3–C2	–31,1(2)	C4–C3–C20–O1	157,6(2)
C2–N2–C1–N1	–10,4(2)	C2–C3–C20–O2	162,28(16)
N1–C4–C3–C20	151,29(15)	C4–C3–C20–O2	–20,2(2)
C18–N2–C1–S1	–8,3(3)	O3–C7–C8–O4	–3,0(3)
C2–N2–C1–S1	20,2(3)	C11–O4–C8–C9	–80,8(3)
C1–N2–C2–C3	169,09(13)	C11–O4–C8–C7	103,7(2)
C5–C4–C3–C2	92,44(18)	C17–C12–C11–O5	9,3(3)

Конформација молекулске структуре једињења **B11** стабилизована је водоничном везом N–H $\cdots$ O и интеракцијама типа C–H $\cdots$ O (Табела 12 и Слика 55). Молекулско паковање у кристалној структури једињења **B11** одређено је мрежом интеракција типа C–H $\cdots$ S и C–H $\cdots$ O, које се организују у „глава-према-репу“ оријентацији. Интеракције типа C–H $\cdots$ S формирају пут повезивања у [010] правцу, градећи нит унутар кристалне решетке (Слика 55). Поред тога, молекули су повезани slabим C–H $\cdots$ O интеракцијама, при чему метил групе атома C21 и C22 делују као доноси, а естарски атом O5 ($x-1, y, z$) и атом диоксана O6 ($x+1, y, z$) као акцептори у овим повезивањима у [100] правцу (Слика 56).

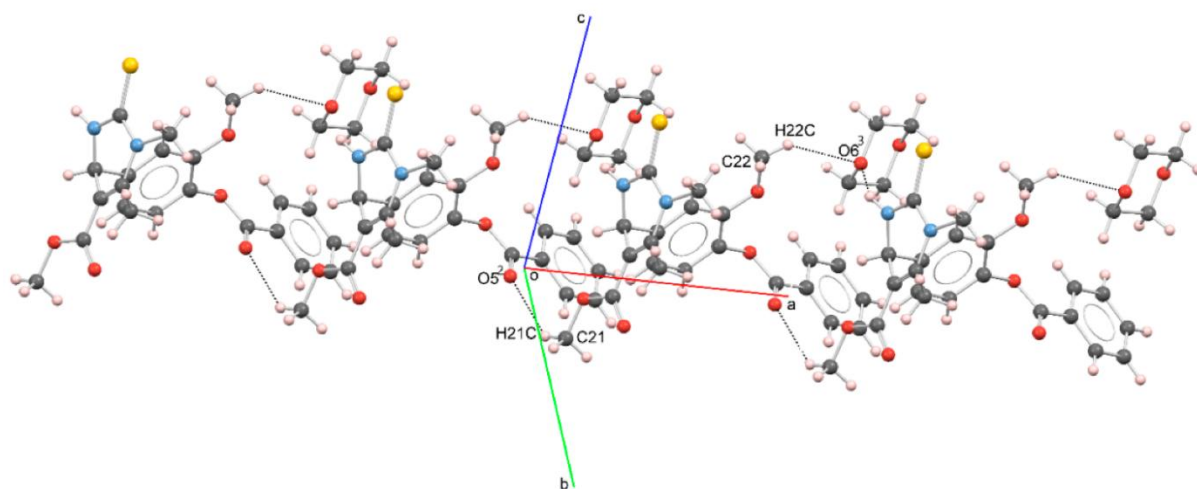
Табела 12. Параметри интрамолекулских и интермолекулских интеракција у кристалној структури једињења **B11**.

<i>D</i> –H $\cdots$ A	<i>D</i> –H	H $\cdots$ A	<i>D</i> $\cdots$ A	<i>D</i> –H $\cdots$ A
N1–H1 $\cdots$ O6	0,86	2,23	2,897(2)	134,9
C19–H19B $\cdots$ O1	0,93	2,95	3,809(2)	154,0
C9–H9 $\cdots$ S1 ¹	0,96	2,61	3,363(3)	135,7
C21–H21C $\cdots$ O5 ²	0,96	2,61	3,363(3)	135,7
C22–H22C $\cdots$ O6 ³	0,96	2,62	3,407(3)	139,5

Кодови симетрије: ¹ $x, y+1, z$; ² $x-1, y, z$; ³ $x+1, y, z$.



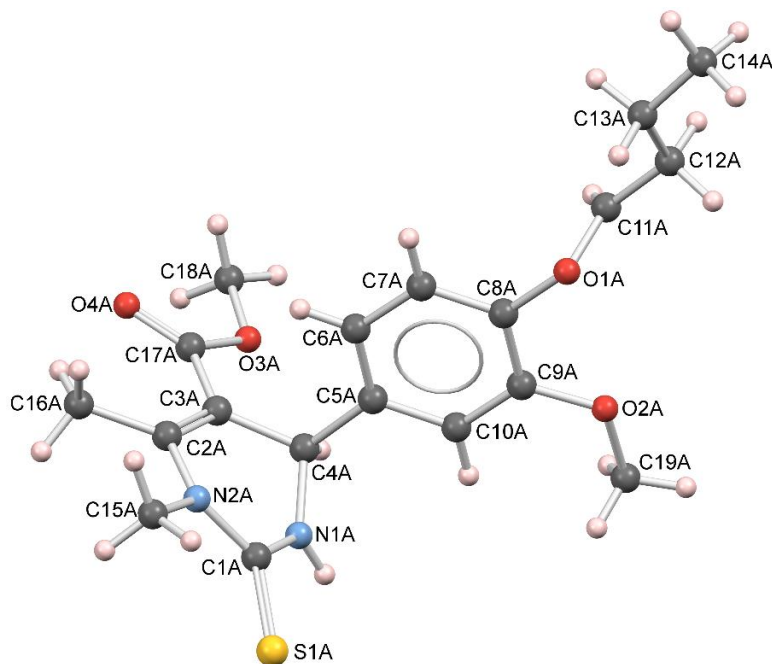
Слика 55. Приказ кристалног паковања **B11** посматран дуж *a* осе добијен у програму MERCURY.²³⁸ Интрамолекулске N–H $\cdots$ O и C–H $\cdots$ O везе су приказане као испрекидане линије. Интермолекулске интеракције C9–H9 $\cdots$ S1¹($x, y+1, z$) (испрекидана линија) повезују молекуле дуж *b* осе.



Слика 56. Приказ кристалног паковања **B11** где се види интермолекуларна C–H...O везу (испрекидана линија) која повезује молекуле дуж *a* осе добијен у програму MERCURY.²³⁸ Кодови симетрије: ²: $x-l, y, z$; ³: $x+l, y, z$.

2.3.1.2. Кристална структура једињења B16

Приказ кристалне структуре једињења **B16** са шемом нумерисања атома се налази на **Слици 57**. Значајне дужине веза, углови веза и торзиони углови су наведени у **Табели 13**. Једињење **B16** кристалисало је из раствора DMSO-а у који је вода дифундовала.



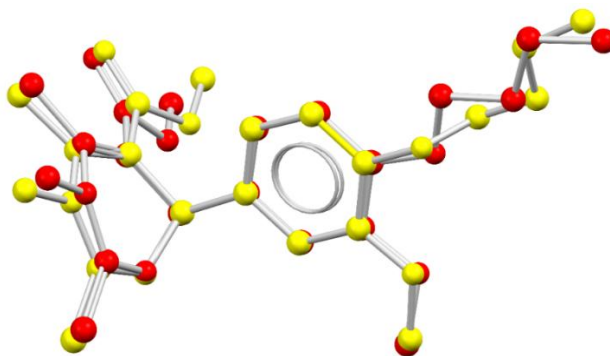
Слика 57. Приказ кристалне структуре једињења **B16** са нумерисаним атомима добијен у програму MERCURY.²³⁸ Ради прегледности приказан је само молекул A.

Табела 13. Дужине веза, углови веза и торзиони углови у кристалној структури једињења **Б16**.

Дужине веза [Å]			
Молекул А		Молекул В	
S1A–C1A	1,684(2)	S1B–C1B	1,685(2)
N1A–C1A	1,324(3)	N1B–C1B	1,329(3)
N1A–C4A	1,455(3)	N1B–C4B	1,463(3)
N2A–C1A	1,378(3)	N2B–C1B	1,373(3)
N2A–C2A	1,410(3)	N2B–C2B	1,411(3)
N2A–C15A	1,473(3)	N2B–C15B	1,472(3)
O1A–C8A	1,376(3)	O1B–C8B	1,368(3)
O1A–C11A	1,366(5)	O1B–C11B	1,413(3)
O2A–C9A	1,364(3)	O2B–C9B	1,370(3)
O2A–C19A	1,419(4)	O2B–C19B	1,415(3)
O3A–C17A	1,333(3)	O3B–C17B	1,334(4)
O3A–C18A	1,445(3)	O3B–C18B	1,447(4)
C2A–C3A	1,350(3)	C2B–C3B	1,347(3)
C12A–C11A	1,435(5)	C12B–C11B	1,503(4)
C12A–C13A	1,409(7)	C12B–C13B	1,496(4)
C14A–C13A	1,464(7)	C13B–C14B	1,515(5)
Углови веза [°]			
C1A–N1A–C4A	122,91(19)	C1B–N1B–C4B	121,70(19)
C1A–N2A–C2A	120,01(18)	C1B–N2B–C2B	120,07(18)
N1A–C1A–S1A	121,47(18)	N1B–C1B–S1B	121,31(18)
C11A–O1A–C8A	116,0(3)	C8B–O1B–C11B	118,2(2)
C13A–C12A–C11A	117,1(6)	C13B–C12B–C11B	113,4(3)
C12A–C13A–C14A	120,7(6)	C12B–C13B–C14B	112,8(3)
O1A–C11A–C12A	115,9(4)	O1B–C11B–C12B	107,7(2)
Торзиони углови [°]			
C1A–N1A–C4A–C3A	–43,9(3)	C1B–N1B–C4B–C3B	–45,8(3)
C1A–N1A–C4A–C5A	81,9(2)	C1B–N1B–C4B–C5B	78,6(2)
N2A–C2A–C3A–C4A	–3,4(3)	N2B–C2B–C3B–C4B	–6,4(3)
C2A–N2A–C1A–S1A	–159,58(17)	C2B–N2B–C1B–S1B	–156,90(17)
C11A–O1A–C8A–C7A	–90,8(5)	C11B–O1B–C8B–C7B	14,4(4)
C11A–O1A–C8A–C9A	90,2(5)	C11B–O1B–C8B–C9B	–166,4(2)
C13A–C12A–C11A–O1A	–63,5(9)	C13B–C12B–C11B–O1B	177,0(3)
C11A–C12A–C13A–C14A	–175,9(6)	C11B–C12B–C13B–C14B	–176,6(3)

Једињење **Б16** кристалише у орторомбичном кристалном систему и $\overline{P}1$ просторној групи где се свака асиметрична јединица састоји од два симетрично независна молекула (молекул А и молекул В). Тетрахидропиримидински прстенови у молекулима А и В имају конформацију чамца. Параметри набирања²³⁹ су $Q = 0,420(2)$ Å, $\theta = 103,1(3)^\circ$, $\varphi(2) = 129,5(3)^\circ$ и $Q = 0,455(2)$ Å, $\theta = 103,2(3)^\circ$, $\varphi(2) = 125,8(3)^\circ$ у А и В молекулу, респективно. Одступања атома N2A и C4A у молекулу А од средње равни која пролази кроз остале

атоми прстена износе 0,194(2) Å и 0,272(2) Å, редом. Иста одступања у молекулу В износе 0,212(2) Å и 0,297(3) Å. Фенил супституент у оба молекула А и В има аксијалну оријентацију у односу на пиримидински прстен, што потврђују и вредности углова између равни добијених методом најмањих квадрата кроз фенилну и пиримидинску јединицу: 82,20(2)° у молекулу А и 87,52(3)° у молекулу В. Поређење вредности торзионих углова (Табела 14) у молекулима А и В доводи до закључка да ова два молекула имају различите конформације, нарочито у региону бутокси супституента ($\angle C11A-O1A-C8A-C7A = -90,8(5)^\circ$, $\angle C11B-O1B-C8B-C7B = 14,4(4)^\circ$). Визуелно, ово је приказано на Слици 58, која даје преклапање молекула А и В једињења **B16**.

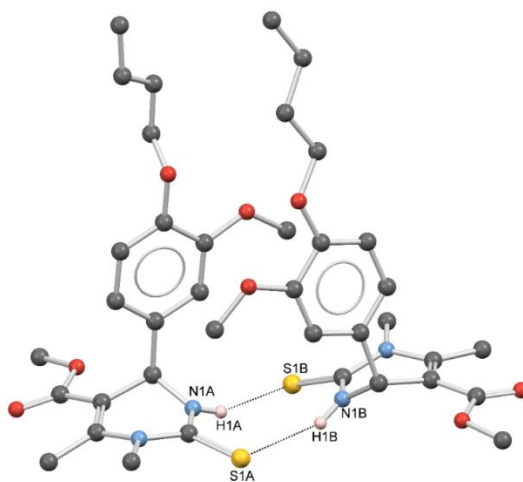


Слика 58. Преклапање два независна молекула у једињењу **B16**: А (жуто) и В (црвено). Атоми водоника су изостављени због прегледности.

Конформација молекулске структуре једињења **B16** додатно је стабилизована димерним водоничним везама N–H···S између молекула А и В (Табела 14 и Слика 59).

Табела 14. Параметри интрамолекулских и интермолекулских интеракција у кристалној структури једињења **B16**.

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
N1B–H1B···S1A	0,86	2,73	3,490(2)	148,5
N1A–H1A···S1B	0,86	2,54	3,341(2)	155,8



Слика 59. Приказ интрамолекулске N–H···S водоничне везе димера (црна испрекидана линија) које повезују молекуле А и В једињења **B16** добијен у програму MERCURY.²³⁸

2.3.2. Цитотоксична активност једињења серије Б

Цитотоксична активност једињења серије Б испитана је *in vitro* на три туморске ћелијске линије: HeLa, K562 и MDA-MB-231, као и на нормалној ћелијској линији MRC-5. Добијене вредности IC₅₀ приказане су у Табели 15. На основу добијених вредности се може закључити да су једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** најактивнија у оквиру ове серије. Она су показала цитотоксичност према свим испитиваним туморским ћелијским линијама, са IC₅₀ вредностима у распону од 9,20 µM до 33,41 µM, као и умерену селективност према MRC-5 ћелијама. За једињења **Б19** и **Б20**, активност на здравим MRC-5 ћелијама била је двоструко мања у односу на активност према K562 и MDA-MB-231 туморским ћелијама. Значајно је истаћи да су једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** била активнија од цисплатине на K562 ћелијској линији. Поред ових, једињење **Б17** је показало значајну активност на K562 и MDA-MB-231 ћелијским линијама (IC₅₀ = 16,17 и 19,43 µM, респективно), док је на HeLa ћелијској линији испољило умерену активност (IC₅₀ = 40,96 µM). Једињења **Б12**, **Б15**, **Б16** и **Б22** такође су се истакла умереном активношћу на K562 линији, са сличним IC₅₀ вредностима. Остала једињења серије показала су нешто слабију активност, нарочито она која у својој структури садрже фрагмент 4-ацил деривата ванилина или ванилине који су супституисани у положају C5.

Табела 15. Цитотоксична активност једињења серије Б.

Једињење	HeLa	K562	MDA-MB-231	MRC-5
	IC ₅₀ ± С.Д. [µM] *			
Б1	78,28±3,26	130,48±3,13	>200	57,17±1,18
Б2	97,40 ± 5,40	78,98 ± 7,49	144,50 ± 8,29	186,92 ± 4,66
Б3	52,59 ± 4,45	76,83 ± 5,01	115,65 ± 8,71	111,87 ± 10,85
Б4	>200	180,21 ± 9,15	>200	195,83 ± 5,89
Б5	>200	164,66 ± 8,50	>200	192,71 ± 10,32
Б6	197,22 ± 3,93	149,08 ± 5,74	>200	127,98 ± 3,20
Б7	135,34 ± 9,32	122,91 ± 8,52	161,29 ± 9,69	196,08 ± 5,54
Б8	197,49 ± 3,55	152,68 ± 2,58	>200	193,22 ± 9,59
Б9	120,85 ± 9,96	79,94 ± 6,73	114,02 ± 12,86	77,82 ± 2,57
Б10	169,06 ± 4,12	99,36 ± 9,38	>200	152,34 ± 10,15
Б11	78,11 ± 5,78	67,97 ± 6,53	122,61 ± 2,19	104,17 ± 8,61
Б12	43,63 ± 1,49	39,11 ± 2,90	74,12 ± 1,25	87,23 ± 7,31
Б13	130,86 ± 1,68	100,00 ± 2,83	>200	192,90 ± 10,05
Б14	79,63 ± 3,40	55,86 ± 3,98	141,53 ± 4,11	63,20 ± 0,21
Б15	47,23 ± 3,91	33,19 ± 0,05	112,37 ± 11,70	30,76 ± 1,51
Б16	64,53 ± 2,20	49,04 ± 2,21	74,66 ± 6,07	44,51 ± 0,83
Б17	40,96 ± 4,70	16,17 ± 2,67	19,43 ± 2,28	15,47 ± 1,44
Б18	33,41 ± 1,68	12,76 ± 1,93	9,20 ± 0,14	14,03 ± 1,38
Б19	29,01 ± 3,72	10,65 ± 1,73	11,53 ± 1,37	22,28 ± 3,85
Б20	37,38 ± 2,97	10,70 ± 1,56	10,99 ± 1,42	21,46 ± 0,84
Б21	49,91 ± 0,12	34,98 ± 2,79	48,69 ± 1,85	21,86 ± 2,31
Б22	164,64 ± 7,20	46,80 ± 3,28	99,74 ± 0,37	74,52 ± 8,41
цисплатина	4,91 ± 0,74	6,89 ± 0,21	14,74 ± 0,36	9,35 ± 1,29

*Резултати представљају средње вредности ± С.Д. добијене из три независна експеримента.

2.3.3. SAR анализа

Анализа односа структуре једињења и њихове цитотоксичне активности, указује на значајан утицај природе супституената на ванилинском делу тетрахидропиримидина на биолошку активност испитиваних деривата. Од 22 тестирана једињења, само је једињење **B1** добијено директно из ванилина, док су остала синтетисана полазећи од ванилинских алдехида, пре свега *O*-супституисаних у *C4'* положају. Уопштено, супституенти овог типа значајно доприносе порасту активности, што се огледа у већој цитотоксичности једињења која садрже *O*-алкил групе у наведеном положају, у поређењу са осталим дериватима.

Једињење **B1** показује минималну активност према HeLa и K562 ћелијским линијама и потпуну неактивност према MDA-MB-231, што додатно истиче значај супституције. У том контексту, упоређивање једињења **B2** и **B3**, са различитим халогеним атомима у *C5'* положају (бром код **B2** и јод код **B3**), указује на ефекат величине и електронских особина супституената. **B3** показује бољу активност на HeLa линији (52,59 μM у односу на 97,40 μM), што се може приписати нижој електронегативности и већој поларизабилности јода, као и његовом већем атомском радијусу, која потенцијално омогућава боље хидрофобне и van der Waalsov-е интеракције у таргетном окружењу. Упркос разлици у структури, односно присуству додатне ацетил групе у *C4'* положају код једињења **B5**, једињења **B4** и **B5**, код којих се нитро супституент налази у *C5'* положају, показују врло ниску цитотоксичност са незнатним разликама (за HeLa и MDA-MB-231 ћелијске линије преко 200 μM). Ово указује да су електроакцепторске групе у овим положајима заслужне за изостанак активности. С друге стране, увођење две метокси групе у *мета* и *пара* положаје, као код **B13**, смањује активност према свим тестираним ћелијским линијама, што сугерише да и јаке електрон-донорске групе имају негативан утицај. Међутим, замена *пара*-метокси групе са *O*-алкил супституентом дужег низа доводи до повећане активности, највероватније због пораста липофилности и смањеног електрон-донорског ефекта. Посебно се издвајају једињења **B16–B20**, у којима се број угљеникових атома у *O*-алкил низу креће од 3 до 10. Најбољу активност показују деривати са 7, 8 и 10 C атома, што указује на повољан баланс липофилности и стерног уклапања. Једињења **B14** и **B15** која имају алил и кротил групе, нису показала добру активност, што нас наводи на закључак да присуство незасићења у бочном остатку не утиче позитивно на активност јер је ригидност тог дела молекула већа. Такође, увођење волуминозних супституената, као што је бензоил, *пара*-метилбензоил или *пара*-метоксибензоил код једињења **B11**, **B12** и **B22** или *O*-бензил код једињења **B21**, резултира значајним смањењем активности. Ипак, и овде се јављају разлике код измерених IC_{50} вредности. Занимљиво је истаћи да упркос малим разликама у волуминозности супституента код једињења **B11** и **B12**, једињење **B12** је активније према свим ћелијским линијама, сугеришући да и даљински електронски ефекти имају утицаја на активност и да у овом случају стерни ефекти нису пресудни. За једињења **B6**, **B7** и **B8** која имају ацетил, пропаноил и циклопропаноил групу у *C4'* положају, су измерене IC_{50} вредности у распону од 122,91 μM до >200 μM према свим ћелијским линијама. Уочени слаб интензитет активности може да се доведе у везу са електрон-акцепторским ефектима супституената који су лоше утицали на остваривање повољних интеракција са циљаним ћелијама. Једињење **B10** је готово неактивно, те можемо рећи да присуство дианалога тетрахидропиримидина има негативан утицај на цитотоксичност.

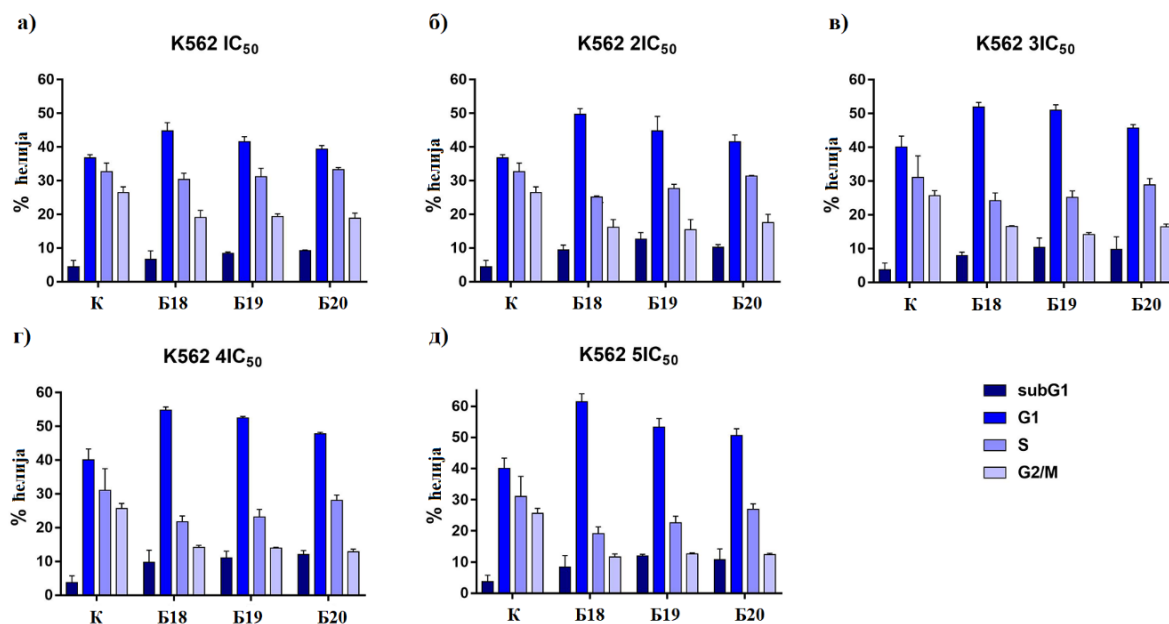
Општи закључак је да је за задовољавајућу активност потребна синергија умерених електронских и стерних ефеката, али и да повећана липофилност итекако доприноси цитотоксичном ефекту. Резултати указују на значај рационалног дизајна супституената са балансираним електронским и стерним својствима, као и на потенцијал

даљег модификовања *O*-алкил низа у циљу оптимизације липофилности и побољшања селективности према малигним ћелијама.

2.3.4. Ефекти одабраних једињења на ћелијски циклус

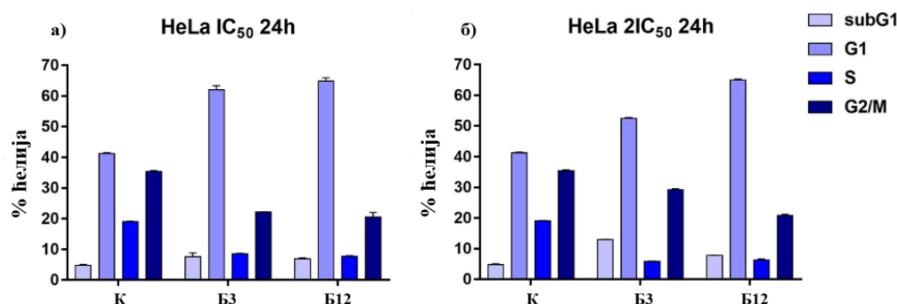
Једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** су одабрана да за испитивање њиховог утицаја на фазе ћелијског циклуса K562 ћелија, док је за једињења **Б3** и **Б12** испитан утицај на фазе ћелијског циклуса HeLa ћелија. Селекција је извршена тако да за најактивнија једињења подробније буде испитан механизам деловања, али да се обухвате и једињења која немају *O*-алкил супституенте у ванилинском фрагменту (**Б3** и **Б12**). Такође, изабрана једињења су показала различиту осетљивост према коришћеним ћелијским линијама, па је и то утицало на избор ћелијских линија за испитивање промена током ћелијског циклуса.

За једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** је испитана дистрибуција у фазама ћелијског циклуса K562 ћелија након 24 сата инкубације при IC_{50} , $2 \times IC_{50}$, $3 \times IC_{50}$, $4 \times IC_{50}$ и $5 \times IC_{50}$ концентрацијама (Слика 60). Забележено је значајно повећање процента ћелија у subG1 фази ћелијског циклуса у односу на контролу, што указује на активацију апоптозе. Истовремено, дошло је до пораста удела ћелија у G1 фази у функцији од повећања дозе, нарочито код једињења **Б18** и **Б19** при свим тестираним концентрацијама, као и код једињења **Б20** при концентрацијама $3 \times IC_{50}$ и вишим. Ове промене пратило је смањење процената ћелија у S и G2/M фазама, при чему је смањење у S фази било умереније при нижим дозама. Анализа садржаја ДНК указала је да се цитотоксични ефекти ових једињења могу приписати индукцији апоптозе и заустављању ћелијског циклуса у G1 фази. Док је прекид циклуса у G1 фази био израженији при већим концентрацијама, пораст броја subG1 ћелија није пратио исти дозно-зависни образац, осим при IC_{50} и $2 \times IC_{50}$ концентрацијама.



Слика 60. Фазна дистрибуција ћелијског циклуса контролних ћелија K562 и ћелија K562 при IC_{50} (а), $2 \times IC_{50}$ (б), $3 \times IC_{50}$ (в), $4 \times IC_{50}$ (г) и $5 \times IC_{50}$ (д) концентрацијама једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** током 24 сата. Приказани подаци представљају средње вредности $\pm$ С.Д. добијене из три независна експеримента.

Слични ефекти уочени су и код HeLa ћелија након 24 сата инкубације са једињењима **Б3** и **Б12** при концентрацијама IC_{50} и $2 \times IC_{50}$. Забележен је пораст процента ћелија у subG1 и G1 фазама, уз пратеће смањење у S и G2/M фазама. Једињење **Б3** је показало јасно дозно-зависно дејство, док је **Б12** испољило стабилан ефекат на ћелијски циклус при обе тестиране концентрације. Добијени резултати указују да ова једињења делују кроз два комплементарна механизма, индукцију апоптозе и прекид циклуса у G1 фази (Слика 61).



Слика 61. Фазна дистрибуција ћелијског циклуса контролних HeLa ћелија и HeLa ћелија при IC_{50} (а) и $2 \times IC_{50}$ (б) концентрацијама једињења **Б3** и **Б12** током 24 сата. Приказани подаци представљају средње вредности $\pm$ С.Д. добијене из три независна експеримента.

Добијени резултати указују да испитивана тетрахидропиримидинска једињења, у зависности од своје структуре и ћелијске линије, делују кроз индукцију апоптозе и/или заустављање ћелијског циклуса у G1 фази, што доприноси њиховом антипролиферативном потенцијалу. Разлике у интензитету и дозне зависности ових ефеката додатно подржавају важност супституената и типова ћелија приликом одређивања механизма дејства.

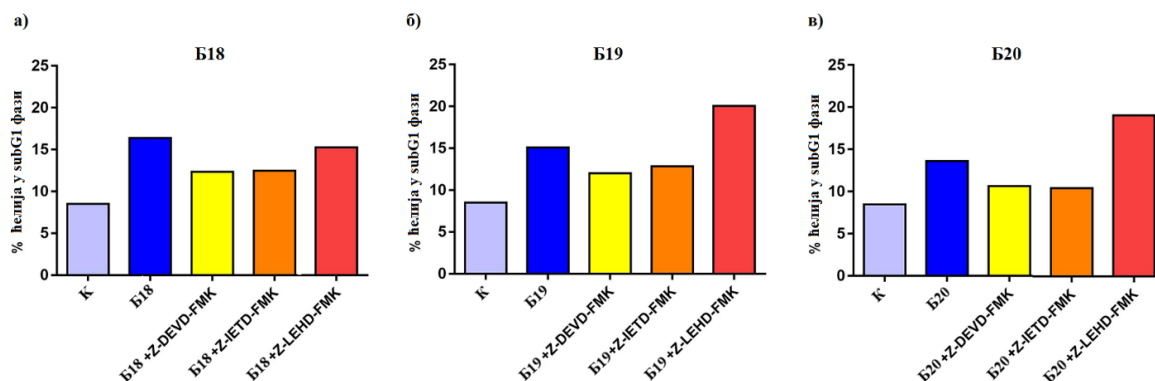
2.3.5. Ефекти претходног третмана специфичним инхибиторима каспазе на K562 ћелије у subG1 фази

У циљу бољег разумевања механизма цитотоксичног дејства једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** на K562 ћелије, након утврђених промена у расподели популација ћелија у фазама ћелијског циклуса, спроведена је додатна анализа усмерена на идентификацију типа ћелијске смрти. Посебна пажња посвећена је испитивању улоге апоптотичких путева, с обзиром да је уочен пораст процента ћелија у subG1 фази, карактеристичан за апоптотске промене. У ту сврху примењени су специфични пептидни инхибитори кључних ензима ћелијске смрти-каспаза и то: ефекторске каспазе-3 и иницијаторских каспаза-8 и -9, како би се утврдило да ли се испитивана једињења ослањају на каспаза-зависне путеве апоптозе и који од њих је преовлађујући.

Да би се истражио механизам ћелијске смрти проузроковане једињењима **Б18**, **Б19** и **Б20** при концентрацији $2 \times IC_{50}$, K562 ћелије су претходно третиране специфичним пептидним инхибиторима каспазе-3, -8 и -9. Ефекти инхибитора на проценат ћелија у subG1 фази ћелијског циклуса приказани су на Слици 62. За сва три испитивана једињења, предтретман инхибитором каспазе-3 или каспазе-8 довео је до смањења удела ћелија у subG1 фази. Насупрот томе, претходно излагање инхибитору каспазе-9 резултирало је повећањем процента subG1 ћелија у узорцима третираним једињењима **Б19** и **Б20**, док такав ефекат није уочен код једињења **Б18**.

Ови резултати указују да једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** индукују апоптозу у K562 ћелијама, делимично преко активације ефекторске каспазе-3 и иницијаторске каспазе-8,

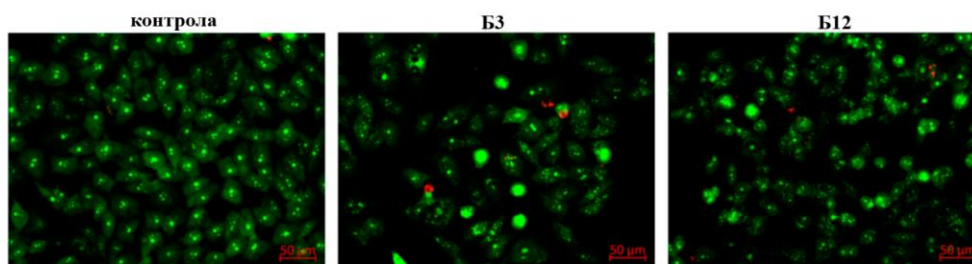
што упућује на активацију екстерног апоптотичког пута. Смањење процента subG1 ћелија након инкубације са инхибиторима каспазе-3 и каспазе-8 додатно потврђује њихову улогу у апоптотичком одговору. Међутим, промењена осетљивост на инхибицију каспазе-9, као и одсуство смањења subG1 популације у неким случајевима, могу указивати и на укљученост алтернативних, неапоптотичних механизма ћелијске смрти.



Слика 62. Ефекти специфичних инхибитора каспазе (Z-DEVD-FMK – инхибитор каспазе-3; Z-IETD-FMK – инхибитор каспазе-8; Z-LEHD-FMK – инхибитор каспазе-9) на проценат K562 ћелија у subG1 фази након 24 сата инкубације при $2IC_{50}$ концентрацијама једињења **B18** (а), **B19** (б), и **B20** (в). Приказани су резултати једног репрезентативног експеримента.

2.3.6. Морфолошка анализа ћелијске смрти HeLa ћелија

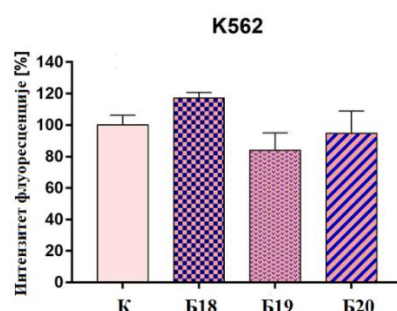
Морфолошка анализа ћелијске смрти извршена је прегледом ћелија обојених акридин оранжом и етидијум бромидом на флуоресцентном микроскопу, чиме је омогућена визуелна диференцијација између виталних, апоптотских и некротичних ћелија. HeLa ћелије третиране једињењима **B3** и **B12** при $2 \times IC_{50}$ концентрацијама, као и контролни узорак, након 24 сата инкубације и бојења акридин оранжом и етидијум бромидом, приказане су на **Слици 63**. У узорцима третираним једињењем **B3** доминирају зелене округле ћелије са кондензованим хроматином и редукованим једром, што указује на рану апоптозу, као и наранџасто-црвене ћелије са израженом кондензацијом, карактеристичне за касније фазе апоптозе. Сличан ефекат уочен је и код ћелија третираних једињењем **B12**, али у мањој мери. Проапоптотски потенцијал једињења **B3** био је израженији, што је потврђено и већим процентом subG1 ћелија забележених проточном цитометријом након третмана овим једињењем.



Слика 63. Репрезентативни фотомикрографи контролних HeLa ћелија и HeLa ћелија инкубираних 24 часа са једињењима **B3** и **B12** при концентрацијама $2 \times IC_{50}$, обојени акридин наранџастим и етидијум бромидом (увећање $20 \times$).

2.3.7. Ефекти одабраних једињења на интерцелуларни ниво ROS у K562 ћелијама

У циљу бољег разумевања потенцијалних механизма цитотоксичности једињења **Б18**, **Б19** и **Б20**, испитани су њихови ефекти на продукцију реактивних кисеоничних врста (ROS) у K562 ћелијама након инкубације од 24 сата при IC₅₀ концентрацијама (Слика 64). Резултати показују да деловање једињења **Б18** на K562 ћелије доводи до умереног пораста интрацелуларног нивоа ROS (приближно 17%) у односу на контролни, нетретирани узорак, што указује да би индукција оксидативног стреса могла бити повезана са његовим цитотоксичним дејством. Насупрот томе, једињење **Б19** изазвало је смањење нивоа ROS за приближно 16%, што може указивати на антиоксидативна својства овог једињења. Блаже смањење ROS је забележено и у ћелијама третираним једињењем **Б20**, што такође може указивати на одсуство оксидативног стреса као доминантног механизма његовог дејства.



Слика 64. Ефекти 24 h третмана K562 ћелија са IC₅₀ концентрацијама једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** на интрацелуларне нивое ROS. Приказани подаци представљају средњу вредност $\pm$ С.Д. три независна експеримента.

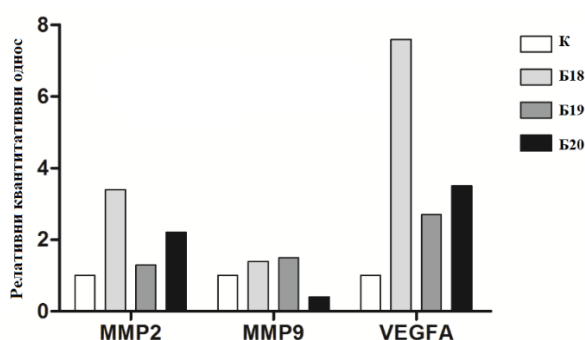
Из приложеног се види да се механизми цитотоксичности једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** разликују у погледу њиховог утицаја на оксидативни статус ћелија. Док се за **Б18** може претпоставити да делује делимично кроз индукцију оксидативног стреса, **Б19** и **Б20** не изазивају пораст ROS, што сугерише да њихова цитотоксичност није посредована преко оксидативног оштећења. Штавише, уочено смањење ROS, посебно код **Б19**, може указивати и на његов потенцијал као антиоксиданса. Ови резултати доприносе разумевању различитих механизма дејства ових једињења и указују на могућност њихове селективне примене у зависности од оксидативног статуса циљних ћелија.

2.3.8. Ефекти одабраних једињења на нивое експресије гена и микроРНК

Како би се додатно објаснио механизам цитотоксичног дејства, испитани су ефекти једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** на нивое експресије одабраних гена у ћелијама K562 који су укључени у активацију инвазије и метастазе и индукцију ангиогенезе: *MMP2*, *MMP9*, *VEGFA*. Гени *MMP2* и *MMP9* кодирају матриксне металопроtease-2 и -9, док је *VEGFA* задужен за кодирање васкуларног ендотелијалног фактора раста А (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF-A). Матриксне металопроtease су протеолитички ензими задужени за разградњу компоненти ванћелијског матрикса. У готово свим туморским ћелијама је забележена прекомерна продукција матриксних металопроteaseа које уништавају матриксне баријере и на тај начин омогућавају раст тумора и његово ширење

у околна ткива. VEGF-A је са друге стране ензим који утиче на раст и деобу ендотелних ћелија, а како потпомаже туморским ћелијама да формирају крвне судове, омогућава њихов бржи раст и метастазу. Због свега наведеног, експресија ових гена се често прати у истраживањима која се баве цитотоксичним дејством.

Резултати анализе експресије гена у контролној и K562 ћелијама након инкубације од 24 сата са одабраним једињењима представљени су на Слици 65. Дејство једињења **B20** на ћелије K562 значајно је смањило нивое експресије *MMP9* микроРНК у поређењу са контролним ћелијама K562, што указује на супресивни ефекат овог једињења на миграцију ћелија леукемије, инвазију и метастазе. С друге стране, деловање једињења **B18** и **B19** је индуковало повећање нивоа *MMP9* микроРНК у K562 ћелијама у поређењу са контролним ћелијама K562. Свако од три тестирана једињења изазвало је повећање нивоа *MMP2* микроРНК у K562 ћелијама у поређењу са нивоом у контролним нетретираним ћелијама. Такође је уочено повећање нивоа *VEGFA* микроРНК у ћелијама K562 третираним током 24 сата једињењима **B18**, **B19** и **B20**.



Слика 65. Релативни нивои експресије гена *MMP2*, *MMP9* и *VEGFA* нормализовани на референтни *GAPDH* ген у контролним ћелијама K562 и ћелијама K562 третираним једињењима **B18**, **B19** и **B20** током 24 сата. Приказани су резултати једног репрезентативног експеримента.

2.3.9. Антимикробна активност одабраних једињења серије Б

Првобитна замисао и идеја је била да се испита да ли тетрахидропиримидински фрагменти показују дуално дејство (цитотоксично и антимикробно), јер су последњих година све актуелније употребе агенаса који би могли да се истовремено користе у лечењу различитих обољења. Међутим, једињења **B2–12** су испољила нешто слабију антипролиферативну активност, а испитано је њихово дејство на пет изабраних сојева бактерија (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*) и пет изабраних сојева гљива (*Trichophyton mentagrophytes*, *Mucor mucedo*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*). Резултати су представљени као минималне инхибиторне концентрације (MIC) у Табели 16. Из приказаних резултата се види да су испитиване супстанце испољиле релативно јаку антимикробну ефикасност. Ова једињења су инхибирала раст свих одабраних микроорганизама, осим једињења **B6** које је деловало селективно (ово једињење није имало инхибиторни ефекат на *Proteus mirabilis*). Измерене MIC вредности за тестирана једињења на свим сојевима коришћених бактерија и гљивица кретале су се од 0,20 до 3,25 mg/mL. Максималну антимикробну активност су показала једињења **B6**, **B7** и **B12** према *Trichophyton mentagrophytes* (вредност MIC је била 0,20 mg/mL). Најјачи антибактеријски ефекат су показала једињења **B3** и **B5**, док су једињења **B7** и **B12** показала најбољи антифунгални ефекат. Најосетљивији микроорганизам према свим једињењима био је *Trichophyton mentagrophytes*.

Табела 16. Антимикробна активност једињења Б2–12.

Једињење	MIC [mg/mL]									
	Бактерије					Гљивице				
	<i>S. a.</i>	<i>B. s.</i>	<i>K. o.</i>	<i>P. m.</i>	<i>E. c.</i>	<i>T. m.</i>	<i>M. m.</i>	<i>P. i.</i>	<i>A. f.</i>	<i>A. n.</i>
Б2	1,62	3,25	1,62	0,81	1,62	0,40	1,62	1,62	1,62	1,62
Б3	1,62	3,25	1,62	0,81	1,62	0,40	1,62	1,62	1,62	0,81
Б4	1,62	3,25	1,62	1,62	1,62	0,40	1,62	1,62	0,40	0,81
Б5	0,81	3,25	1,62	0,81	1,62	0,40	1,62	1,62	1,62	1,62
Б6	3,25	3,25	3,25	/	1,62	0,20	1,62	1,62	1,62	1,62
Б7	3,25	3,25	3,25	1,62	3,25	0,20	1,62	1,62	1,62	0,81
Б8	3,25	3,25	1,62	0,81	1,62	0,40	1,62	1,62	1,62	1,62
Б9	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	0,81	1,62	1,62	1,62	1,62
Б10	3,25	3,25	1,62	1,62	1,62	0,81	1,62	1,62	1,62	1,62
Б11	3,25	3,25	3,25	1,62	3,25	0,40	1,62	1,62	1,62	1,62
Б12	3,25	3,25	3,25	3,25	3,25	0,20	1,62	1,62	0,81	1,62
Стрептомицин	0,031	0,016	0,008	0,062	0,062	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Флуконазол	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	0,25	1	1	1	0,5

н.о. – није одређивано; *S. a.* – *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *B. s.* – *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *K. o.* – *Klebsiella oxytoca* (ATCC 8724), *P. m.* – *Proteus mirabilis* (ATCC 29906), *E. c.* – *Escherichia coli* (ATCC 25922), *T. m.* – *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533), *M. m.* – *Mucor mucedo* (ATCC 20094), *P. i.* – *Penicillium italicum* (ATCC 10454), *A. f.* – *Aspergillus flavus* (ATCC 9170), *A. n.* – *Aspergillus niger* (ATCC 16888).

2.3.10. Инхибиција α -глюкозидазе

Испитана једињења Б2–12 су показала способност да инхибирају ензимску активност α -глюкозидазе, са изузетком једињења Б4 и Б11, што се може видети у Табели 17. Добијене вредности IC₅₀ биле су у опсегу од 191,80 μ M до 1121,91 μ M. Међу тестираним једињењима, једињење Б8 је показало најбољу инхибиторну активност α -глюкозидазе са IC₅₀ вредношћу од 191,80 μ M. Његова активност је била јача од активности антидијабетског лека акарбозе са IC₅₀ вредношћу од 304,21 μ M. Једињења Б2 и Б3 су показала инхибиторне активности сличне акарбози. Инхибиторни ефекти осталих испитиваних једињења на ензимску активност α -глюкозидазе били су слабији у поређењу са дејством акарбозе.

Табела 17. Антиглюкозидна активност једињења Б2–12.

Једињење	IC ₅₀ [μ M]	Једињење	IC ₅₀ [μ M]
Б2	312,91 $\pm$ 7,73	Б8	191,80 $\pm$ 5,95
Б3	291,77 $\pm$ 6,67	Б9	932,75 $\pm$ 25,16
Б4	н.д.	Б10	418,02 $\pm$ 5,68
Б5	1121,91 $\pm$ 20,59	Б11	н.д.
Б6	674,81 $\pm$ 5,65	Б12	1083,41 $\pm$ 54,54
Б7	767,91 $\pm$ 5,91	акарбоза	304,21 $\pm$ 14,62

н.д. – није детектовано

2.3.11. Одређивање фармакокинетичких дескриптора

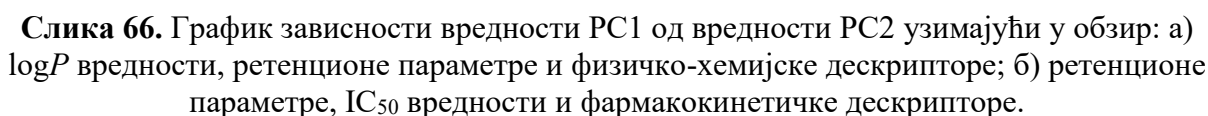
Фармакокинетички и фармакодинамички процеси било ког терапеутика зависе од способности молекула да остварују интеракције са неводеном средином (ћелијска мембрана) и воденом средином (унутрашњост ћелије и међућелијски простор). Способност супстанце да ступа у интеракцију са обе средине назива се липофилност и то је једна од кључних особина молекула у фармацеутској индустрији. Обично се липофилност одређује као мера расподеле молекула лека између органске фазе (*n*-октанол) и водене фазе и изражава се као партициони коефицијент (*P*) или у облику његовог логаритма ($\log P$). Међутим, када се изражава мера расподеле јонизујећег молекула при одређеној рН, користи се коефицијент дистрибуције ($\log D$).

Липофилност и хидрофобност се често користе као синоними, међутим иако је реч о сличним особинама, постоје битне разлике. Наиме, хидрофобност описује интеракцију молекула лека и воде, док се липофилност односи на интеракцију са липидима. Због тога се хидрофобност описује као компонента липофилности (липофилност = хидрофобност – поларност). Липофилност је такође уско повезана са величином (запремином) и поларношћу (способност формирања водоничних веза и диполарност/поларизабилност) молекула. Хидрофобност исто зависи од величине молекула, али је липофилност ипак сложенији појам који укључује и поларност молекула и додатно зависи од липидног окружења.

За потребе хеометријске анализе примењена је анализа главних компоненти (енг. *Principal Component Analysis*, PCA) коришћењем OriginPro 2016 софтвера за статистичку процену како би се разумела веза између партиционих коефицијента, физичко-хемијских дескриптора и хроматографског понашања (**Слика 66а**) са једне стране и односа између ретенционих параметара, фармакокинетичких својстава и антитуморске активности испитиваних једињења са друге стране (**Слика 66б**).

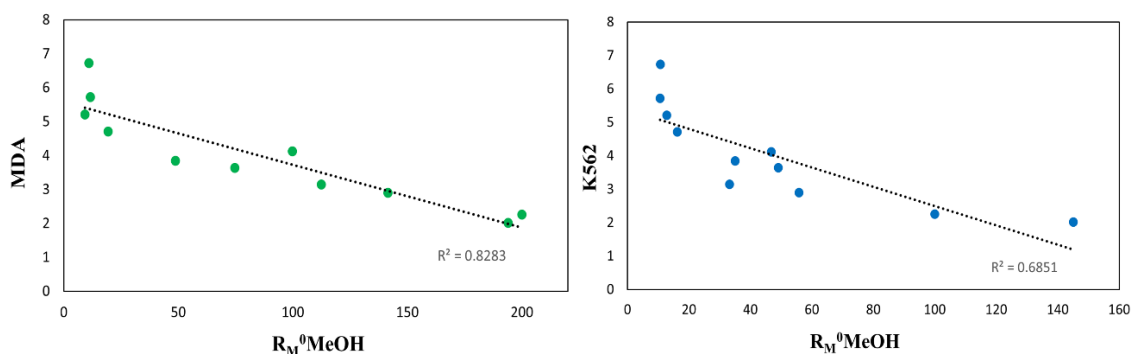
Први PCA модел се заснива на физичко-хемијским особинама испитиваних једињења. Физичко-хемијски молекулски дескриптори описују електронске, хидрофобне и стерне ефекте, а молекулски дескриптори обухваћени у овом моделу су: запремина молекула (*V*), молекулска маса (*M_w*), van der Waals-ова површина (*vdW*), поларизабилност (*POL*), рефракција (*REF*), укупна површина која је доступна растварачу (енг. *Accessible Surface Area*, *ASA*), површина свих хидрофобних атома доступна растварачу (*ASAH*), површина свих атома са негативним парцијалним наелектрисањем доступна растварачу (*ASAmminus*), површина свих поларних атома доступна растварачу (*ASAP*), површина свих атома са позитивним парцијалним наелектрисањем доступна растварачу (*ASApplus*). Развијени модел покрива 93,82% укупне варијансе. Из графика представљеног на **Слици 66а** се види да су једињења равномерно распоређена између PC1 и PC2 осе. Сви укључени физичко-хемијски дескриптори имају снажан утицај на PC1, само *ASAP* снажно утиче на PC2 и показују мањи утицај на PC1 осу. Такође се може приметити да на липофилност молекула (експерименталне и израчунате вредности) снажно утичу молекулски дескриптори који се односе на величину молекула (*V* и *M_w*) и његову поларност (*vdW*, *ASAH*, *ASApplus*, *POL* и *REF*).

Други модел PCA обухвата 82,07% укупне варијансе. На **Слици 66б** приказана је вредност скорова, односно њихова узајамна пројекција за прве две главне компоненте. Овај графички приказ у PC1-PC2 дводимензионалном простору указује на сличности и разлике између испитиваних података. Експериментално добијени подаци (*IC₅₀* вредности за HeLa, K562, MDA-MB-231 и MRC-5 ћелијске линије) имају позитиван утицај на PC1. Фармакокинетички дескриптори обухваћени овом анализом су логаритам проласка лека кроз крвно-мождану баријеру ($\log BB$), фракција невезаних једињења (*FU*), проценат интестиналне апсорпције (*HIA*), пропустљивост ћелија аденоарцинома колона



Липофилност утиче на јачину дејства лека и на фармакокинетичке параметре као што су пермеабилност у гастроинтестиналном тракту, пролазак кроз крвно-мождану баријеру, афинитет према ензимима, протеинима и рефлукс пумпама. Добра корелација између својстава адсорпције, дистрибуције, метаболизма и екскреције (енг. *Adsorption, Distribution, Metabolism, and Excretion*, ADME) и липофилности се често може приметити барем у оквиру конгенеричког низа једињења, али се сама липофилност не може користити у предвиђању ADME параметара за структурно различита једињења.²⁴⁰ На **Слици 67** је приказана линеарна корелација између липофилности (R_M^0) и антитуморске активности (IC_{50}) једињења серије **Б** према туморским ћелијским линијама MDA-MB-231 и K562 са $R^2 = 0,82$ и $0,68$.

У циљу бољег разумевања утицаја супституената везаних за бензенов прстен у положају С4 (где је једињење **B1** несупституисано) на ретенционе параметре, анализирани су доприноси сваког појединачног супституената, а резултати су приказани у **Табели 18**.



Слика 67. Корелација између експериментално добијених ретенционих параметара и IC_{50} вредности за MDA-MB-231 (лево) и K562 (десно) ћелијске линије.

Ниво промене липофилности молекула услед увођења новог супституента може се проценити на основу Hansch-ове константе (π) која представља допринос који посматрани атом (функционална група) даје укупној липофилности једињења. Вредност π константе је израчуната за систем расподеле n -октанол-вода, тако што се пореди разлика у $\log P$ вредностима (израчунатим помоћу Molinspiration софтвера) за једињење **B1** са $\log P$ вредностима других једињења која имају супституенте. ΔR_M^0 (MeOH и MeCN) су израчунати на исти начин, али коришћењем експериментално добијених података применом реверзно-фазне танкослојне хроматографије (енг. *Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography*, RP-TLC), како би се проценио утицај супституената на ретенционе параметре. Прорачун је извршен по једначини:

$$\Delta R_M^0 = R_M^0 (\text{једињење } n) - R_M^0 (\text{једињење B1}) \quad (3)$$

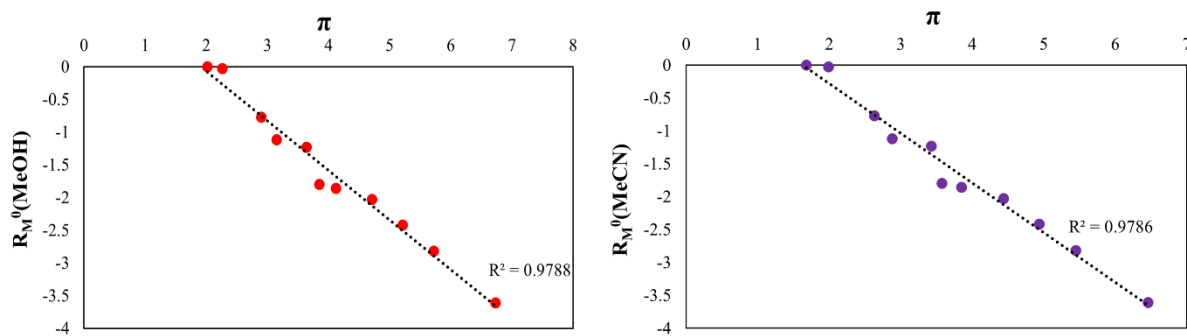
Табела 18. Утицај супституената на ретенционе параметре испитиваних молекула добијених коришћењем RP-TLC, у поређењу са несупституисаним молекулом (**B1**), и липофилна константа супституента (π) израчуната на основу њихових $\log P$ података.

Једињење	супституент	$\Delta R_M^0(\text{MeOH})$	$\Delta R_M^0(\text{MeCN})$	π
B1	–H	0	0	0
B13	–CH ₃	0,1	0,31	0,03
B14	–CH ₂ CH=CH ₂	0,63	0,95	0,77
B15	–CH ₂ CH=CHCH ₃	1,18	1,2	1,12
B16	–(CH ₂) ₃ CH ₃	1,43	1,75	1,23
B17	–(CH ₂) ₅ CH ₃	2,69	2,76	2,03
B18	–(CH ₂) ₆ CH ₃	3,2	3,26	2,42
B19	–(CH ₂) ₇ CH ₃	3,67	3,77	2,82
B20	–(CH ₂) ₉ CH ₃	4,26	4,78	3,61
B21	–CH ₂ Ph	1,54	1,9	1,8
B22	– <i>пара</i> -метоксибензоил	2,11	2,17	1,86

Позитивне вредности π константи указују да испитани супституенти доприносе повећању липофилности једињења, док негативне вредности указују на супротни ефекат. У испитиваној серији, сви супституенти позитивно утичу на липофилност молекула. Највеће вредности ретенционих параметара су добијене за једињења **B18**, **B19** и **B20**. Управо ова једињења имају алкил супституенте са 7, 8 и 10 C атома у ванилинском фрагменту. Поредећи IC_{50} вредности и параметре који описују липофилност, закључује се да продужење алкил низа има позитиван утицај на антитуморску активност молекула,

али само ако број С атома није већи од седам. Иако једињење **Б18** није најлипофилније, показало се као најактивније, што указује на постојање додатних структурних фактора који утичу на активност.

На основу SAR анализе, биоизостеричне замене представљају потенцијално ефикасан приступ у дизајнирању нових деривата тетрахидропиримидина са побољшаним антиканцерогеним деловањем. Резултати приказани на **Слици 68** указују на јасну линеарну зависност између експериментално добијених ретенционих параметара и π константи (**Табела 18**), при чему је вредност коефицијента детерминације висока за обе параметрисане ретенционе вредности ($R^2 = 0,98$).



Слика 68. Корелација π константи и ретенционих параметара добијених применом RP-TLC.

2.3.12. Молекулски докинг

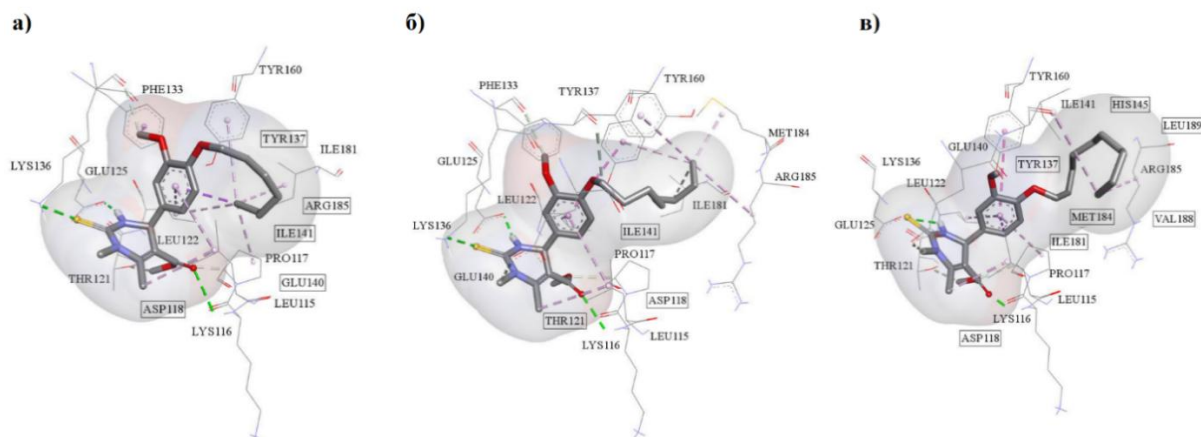
За најактивнија једињења из серије, **Б18**, **Б19** и **Б20**, је испитан афинитет везивања за BSA и ДНК молекулским докингом. Добијени резултати су показали да лиганд **Б19** поседује нижу слободну енергију везивања за BSA и константу инхибиције у поређењу са **Б18** и **Б20**, што указује на његов јачи афинитет везивања за овај транспортни протеин (**Табела 19**).

Табела 19. Параметри добијени молекулским докингом код везивање једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** за BSA.

Лиганд	Слободна енергија везивања [kcal/mol]	Константа инхибиције [μ M]
Б18	-7,38	3,88
Б19	-7,95	1,49
Б20	-7,63	2,54

Као што је приказано на **Слика 69**, код сва три лиганда се формира водонична веза између карбонилног кисеоника и Lys116, као и између $-NH$ групе и Glu125. Лиганди **Б18** и **Б19** формирају додатну водоничну везу са Lys136 (**Слика 69а** и **б**). Раније је нађено да су ове интеракције важне за стабилност лиганда у комплексу са BSA.²³² Примећено је да аминокиселински остаци као што су Pro117, Phe133, Tyr137 и Glu140 формирају нетипичне водоничне везе преко угљеника са лигандом **Б19** (**Слика 69б**). Такође је утврђено да **Б18** и **Б20** остварују исте интеракције али само са три аминокиселинска остатка (**Слика 69а** и **в**). Анализом начина везивања смо дошли до закључка да једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** заузимају хидрофобни цеп BSA и остварују интеракције са следећим аминокиселинским остацима: Leu115, Asp118, Leu122, Ile141, Tyr160, Ile181, Met184 и

Arg185, док су код децил групе једињења **Б20** остварене и додатне van der Waals-ове интеракције са His145, Val188 и Leu189.



Слика 69. Начини везивања једињења **Б18** (а), **Б19** (б) и **Б20** (в) за BSA.

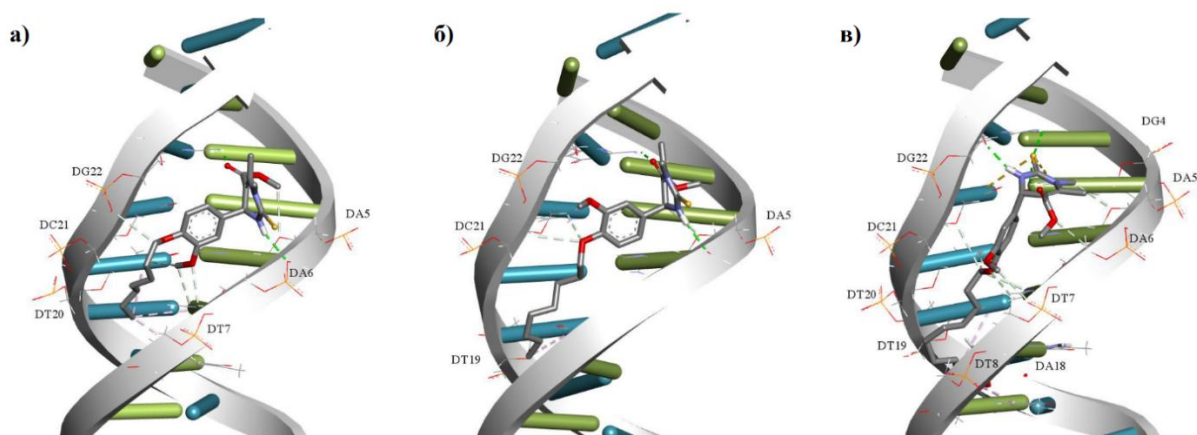
π - δ , π - π , π -алкил и алкил-алкил интеракције су означене љубичастом бојом, класичне водоничне везе су обележене зеленом бојом, а C-H водоничне везе сивом. Уоквирене аминокиселине остварују van der Waals-ове интеракције.

Израчунате енергије везивања, као и процењена константа инхибиције су приказани у **Табела 20**, док су најповољнији положаји једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** у комплексу са ДНК приказани на **Слици 70**.

Табела 20. Параметри добијени молекулским докингом код везивање једињења **Б18**, **Б19** и **Б20** за ДНК.

Лиганд	Слободна енергија везивања [kcal/mol]	Константа инхибиције [μ M]
Б18	-6,79	10,59
Б19	-8,04	1,27
Б20	-7,65	2,46

Анализа добијених резултата показује да се сва три лиганда везују за ДНК на истом месту. На **Слици 70в** се може видети да лиганд **Б20** остварује интеракције π -сумпор и формира водоничне везе између атома сумпора и нуклеотида DG:A4, DG:B22 и DC:B21. Код сва три лиганда -NH из тетрахидропиримидинског прстена формира водоничне везе са нуклеотидима ДНК, DA:A6 (**Б18**), DA:A5 (**Б19**) или DG:B22 (**Б20**). Лиганди **Б18** и **Б19** формирају додатну водоничну везу са DG:B22 (**Слика 70а и б**). Упркос формирању нетипичних водоничних веза преко угљеника углавном са DT:A7 и DC:B21, алкил ланци лиганада такође остварују хидрофобне, π -алкил интеракције са базним паровима ДНК. Лиганд **Б18** остварује хидрофобне интеракције са DA:A6, DT:A7 и DT:B20 (**Слика 70а**), лиганд **Б20** са DT:A8, DA:B18 и DT:B19 (**Слика 70в**), док **Б19** интерагује само са DT:B19 (**Слика 70б**). Иако лиганд **Б19** остварује мање интеракција у поређењу са осталима, ипак има најнижу слободну енергију везивања што сугерише да његово геометријско прилагођавање више утиче на његов афинитет везивања.

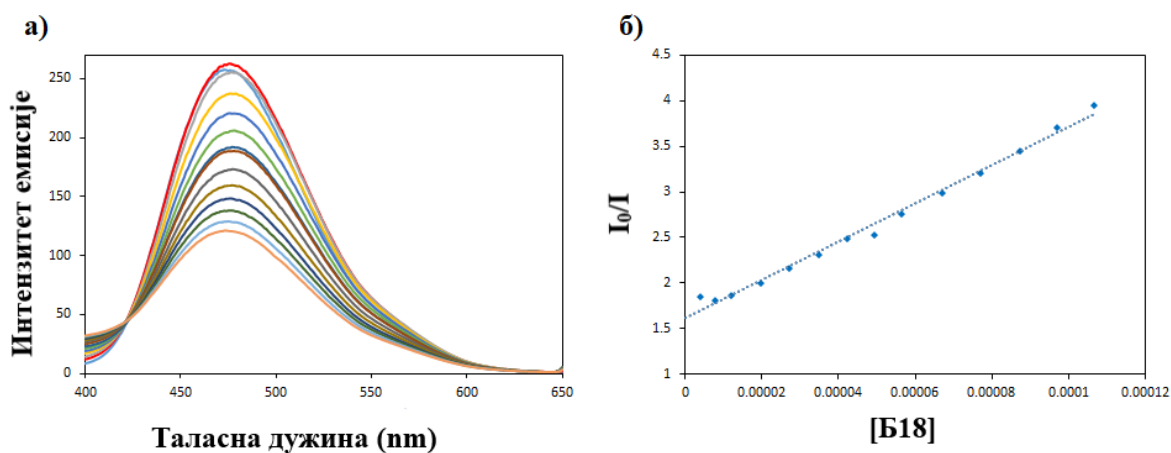


Слика 70. Начини везивања **B18** (а), **B19** (б) и **B20** (в) за ДНК. Уобичајена водонична веза је обележена зеленом бојом, нетипична С–Н водонична веза сивом, док су хидрофобне π –алкил интеракције обележене љубичасто.

2.3.13. Интеракције са ДНК

2.3.13.1. Флуоресцентна титрација

Након молекулског докинга, природа везивања једињења **B18** за ДНК је испитана и флуоресцентном спектроскопијом. Применом флуоресцентне титрације праћен је интензитет емисије ЕБ–ДНК адукта при додатку растућих концентрација једињења **B18**. Како се интензитет флуоресценције није мењао, дошли смо до закључка да се једињење **B18** не интеркалира у велики жлеб ДНК. Експерименти су поновљени са бојом Hoechst 33342 (НОЕ), која се селективно везује за мали жлеб ДНК. На **Слици 71а**, где су приказани емисиони спектри, уочава се да интензитет флуоресценције НОЕ–ДНК адукта опада са повећањем концентрације једињења **B18** без видљивих промена у облику и положају емисионих трака.

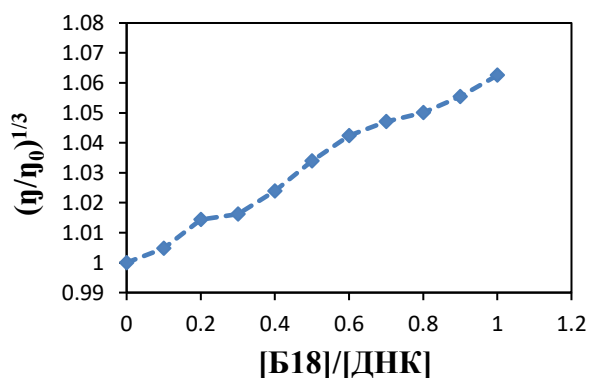


Слика 71. а) Флуоресцентни спектри НОЕ–ДНК адукта по додатку растуће концентрације једињења **B18** у 10 mM PBS пуферу; б) Stern-Volmer-ов график НОЕ–ДНК за једињење **B18**.

Вредност Stern-Volmer-ове константе (K_{sv}) је израчуната применом једначине (2) и одговарајуће зависности I_0/I од концентрације једињења [Б18]. Израчуната Stern-Volmer-ова константа ($K_{sv} = 2,09 \times 10^4$, $R = 0,996$) указује на умерено везивање за мали жлеб ДНК. Ово се може објаснити особинама једињења Б18 које је мање и флексибилније од класичног интеркалатора ЕБ, па је стога компатибилније за везивање у мањем жлебу.²⁴¹

2.3.13.2. Вискозност

Познато је да се вискозност ДНК мења при додатку неког једињења у зависности од начина на који се испитивано једињење везује за ДНК. Стога су у даљем истраживању праћене промене вискозности ДНК у присуству различитих концентрација једињења Б18. Након додавања интеркалатора у ДНК раствор, вискозност ДНК ће се повећати услед интеркалирања испитиваног молекула у хеликс које води ка раздвајању базних парова, и ка продужетку ДНК због прилагођавања везаном лиганду.²⁴² Код једињења која се жлебно везују и код некласичних интеркалатора, нема ефекта на промене или се незнатно мења вискозност ДНК,²⁴³ док се аксијална дужина двоструке спирале скраћује када се једињења као што је цисплатина²⁴⁴ ковалентно вежу и то води ка смањењу релативне вискозности. У приказаним резултатима, релативна вискозност ДНК благо расте са порастом концентрација једињења Б18 (Слика 72). Из литературних података је нађено да је апсолутна промена вискозности ($\Delta\eta$) раствора ДНК након додатка ЕБ већа од 0,6, док код једињења која се везују у малом жлебу та промена није већа од 0,3.^{245,246} У случају испитиваног једињења Б18 је $\Delta\eta = 0,06$, што се може сматрати занемаривом променом, тако да се интеркалација као мод везивања може искључити. На основу тога, може се закључити да се једињење Б18 везује и остварује погодне интеракције са ДНК претежно у мањем жлебу двоструког хеликса.



Слика 72. График релативне специфичне вискозности у функцији моларних односа једињења Б18 и ДНК.

2.3.13.3. Диференцијална скенирајућа калориметрија (DSC)

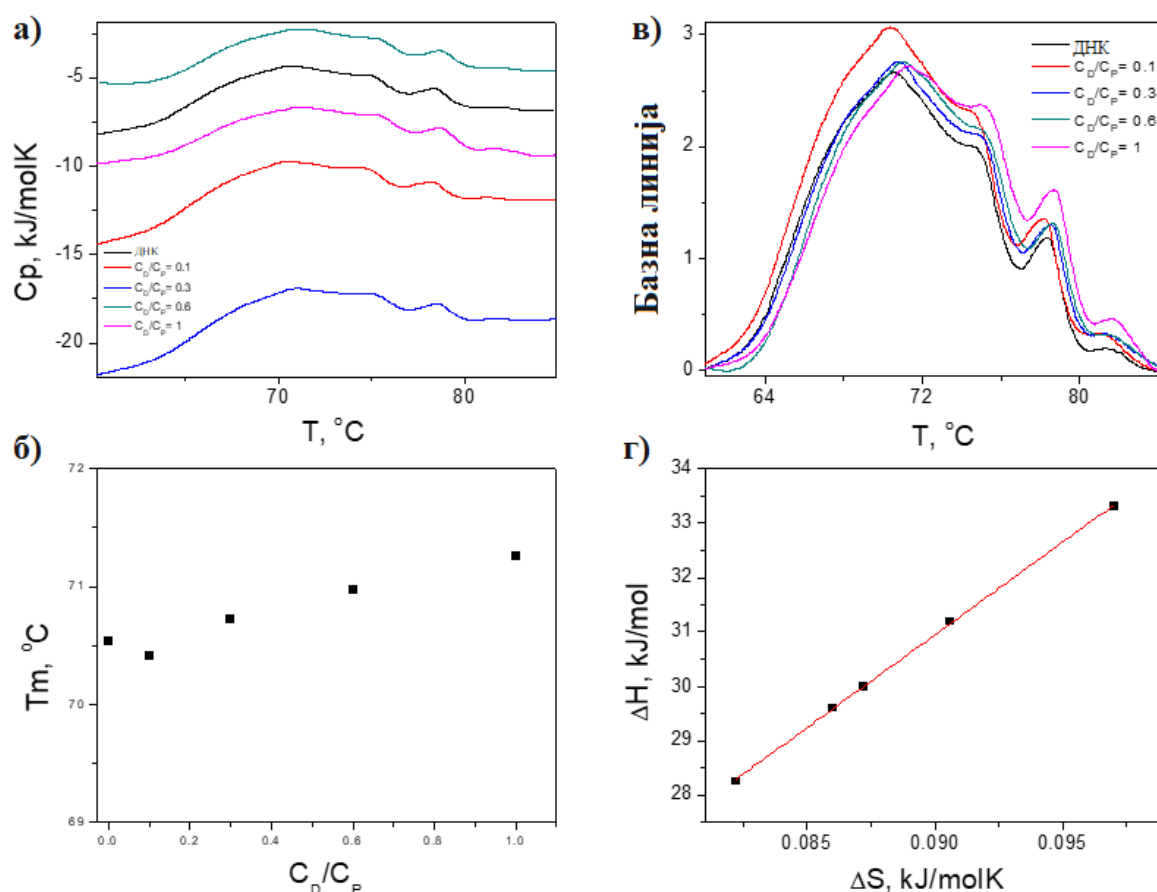
Природа везивања једињења Б18 за ДНК додатно је испитана када је термичка денатурација комплекса Б18/ДНК праћена диференцијалном скенирајућом калориметријом (енг. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC). Температура на којој се половина дволанчане ДНК денатурише у једноланчану форму се назива температура топљења (енг. *melting point*, T_m) и приликом тог процеса се ослобађа топлота. Уколико једињење делује као интеркалатор, дволанчана ДНК се стабилизује што доводи до померања T_m ка вишим температурама.²⁴⁷ За једињење Б18 су добијени термограми анализирани помоћу софтвера NanoAnalyse и калориметријски параметри су приказани у Табели 21.

Табела 21. Калориметријски параметри одређени праћењем термичке денатурације ДНК при додатку различитих концентрација једињења **B18**.

C_D/C_P	T_m [°C]	ΔH , [kJ/mol]	ΔS , [kJ/molK]
0,00	70,54	28,2497	0,0822
0,1	70,41	33,3100	0,0970
0,3	70,73	29,9960	0,0872
0,6	70,97	29,6021	0,0860
1	71,26	31,1926	0,0906

C_D – концентрација једињења **B18**; C_P – концентрација ДНК.

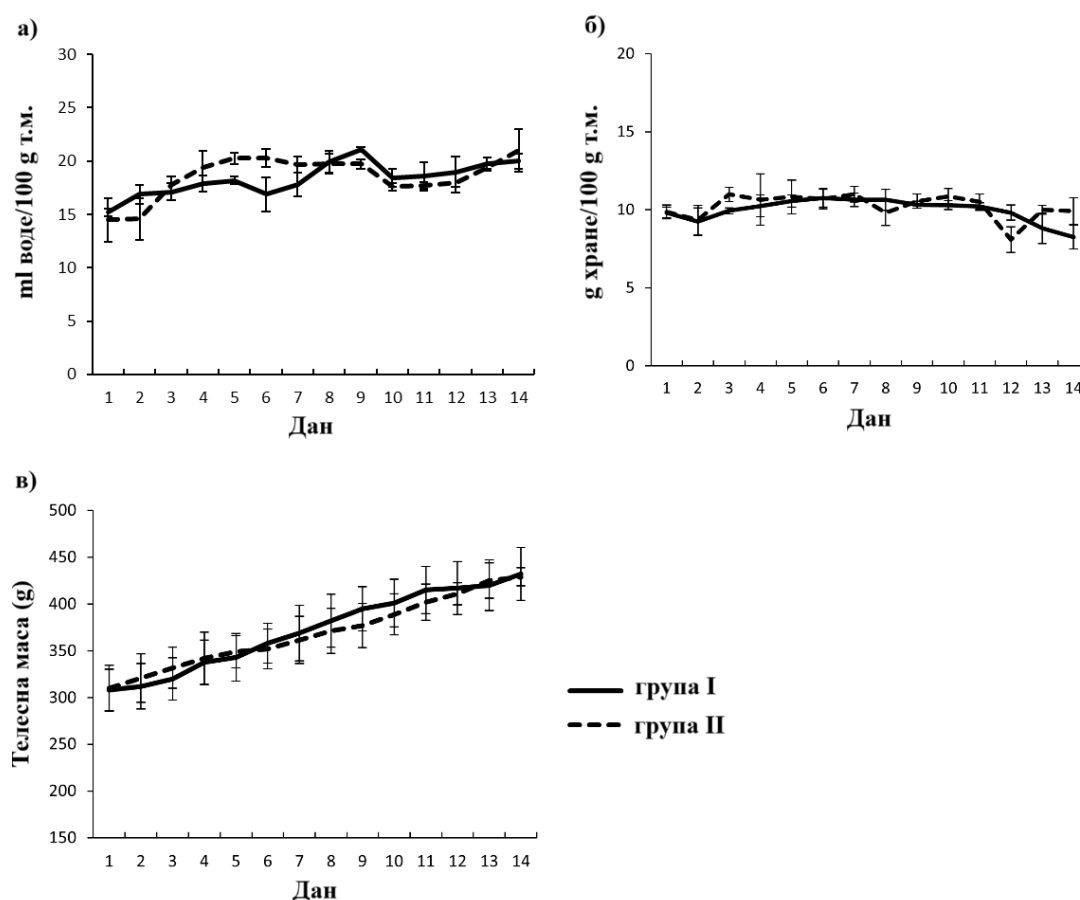
Интеркалациони начин везивања се може одбацити пошто није примећена значајна термичка стабилизација двоструке спирале ДНК у присуству једињења **B18**. Нису примећени трендови у варијацији енталпије и ентропије како се концентрација лиганда повећава. Из линеарне регресије израчунатих енталпија и ентропија (**Слика 73в**), изокинетичка температура, односно температура на којој су све брзине хемијске реакције једнаке, износи 68,37 °C и $\Delta G^0 = 0,211$ kJ/mol.



Слика 73. а) Добијене DSC криве изражене као моларни топлотни капацитет (C_p) у зависности од температуре; б) Температура топљења (T_m) као функција C_D/C_P односа; в) Резултујући термограми након одузимања базне линије и г) Графички приказ зависности енталпије у односу на ентропију и линија линеарне регресије (црвена линија). $C_P = 0,4$ mM, $I = 0,01$ M, pH = 7,4, брзина скенирања 1 °C/мин и $P = 3$ atm.

2.3.14. Студија акутне оралне токсичности

Акутна орална токсичност се односи на штетне ефекте који се јављају након примене једнократне дозе испитиване супстанце или након неколико добијених доза током 24 сата. Да бисмо установили да ли једињење **B18** има штетно дејство, албино пацови из соја Wistar су праћени 14 дана. Током периода праћења давана им је доза од 50 mg/kg т.м. једињења **B18** и у том периоду није дошло до смрти животиња и нису примећени симптоми токсичности као што су летаргија, појава агресивности, дрхтање, промене у мокрењу или конзистенцији фекалија и др. Такође, изостале су промене карактеристика физичког изгледа (изглед коже, крзна, очију и слузокоже). Унос хране и воде, као и повећање телесне масе током периода праћења приказани су на **Слици 74**. Унос хране и воде код пацова који су добијали дозу једињења **B18** (група II) у поређењу са контролном групом, тј. групом која је третирана 1% DMSO (група I), је без значајних разлика. Дошло је до постепеног повећања телесне масе у физиолошком опсегу код свих животиња током студије. Овај маркер је од великог клиничког значаја јер се губитак телесне тежине за више од 20% сматра критичним и указује на озбиљне нежељене ефекте изазване лековима. На основу добијених резултата можемо да закључимо да примена једињења **B18** није негативно утицала на раст животиња. Након периода праћења, животиње су жртвоване и израчуната је релативна маса органа. Она се није значајно разликовала између нетретираних пацова и пацова који су третирани једињењем **B18** (**Табела 22**). Добијени резултати показују да примена једињења **B18** у наведеној дози није изазвала смрт или знаке тровања који су повезани са применом истог.



Слика 74. (а) Унос хране, (б) унос воде и (в) телесна маса пацова групе I третиране 1% DMSO и групе II третиране једињењем **B18**.

Табела 22. Релативна маса органа (g) експерименталних животиња које су третиране 1% DMSO (група I) и једињењем **B18** (група II).

Орган	Релативна маса органа [g] ^a	
	Група I	Група II
Бубрег	0,38 ± 0,01	0,32 ± 0,03*
Срце	0,43 ± 0,04	0,40 ± 0,03
Јетра	3,21 ± 0,21	2,98 ± 0,24*
Желудац	0,51 ± 0,07	0,60 ± 0,04**

^aРезултати су представљени као средња вредност ± С.Д.* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ у поређењу са контролном групом.

2.3.15. Генотоксично и антигенотоксично деловање једињења **B18**

Помоћу алкалног Комет теста је испитана способност једињења **B18** да смањи оштећења ДНК настала деловањем угљен-тетрахлорида (CCl₄) у јетри експерименталних животиња. Резултати су приказани у класама „комета“ које су означене бројевима од 0 до 4, при чему 0 означава ДНК без оштећења, 1 минимална оштећења, 2 средња, а 3 и 4 максимална оштећења ДНК.

Резултати Комет теста за одвојени и симултани третман једињењем **B18** са CCl₄ приказани су у Табели 23. Албино пацови из соја Wistar су третирани једињењем **B18** у дозама од 5, 10 и 20 mg/kg телесне масе (т.м.) у маслиновом уљу. Примењена доза CCl₄, коришћена као позитивна контрола, доводи до значајног оштећења ДНК у јетри пацова у поређењу са негативном контролном групом (6,55 пута већа вредност код II групе у односу на I групу).

Табела 23. Резултати Комет теста у односу на телесну масу (т.м.) пацова третираних једињењем **B18** у три различите концентрације и угљен-тетрахлоридом (CCl₄).

Групе	Ниво оштећења ДНК					Укупан скор ^[a]	%R ^[b]
	0	1	2	3	4		
I	70,40 ± 0,81	29,60 ± 0,32	/	/	/	29,60 ± 0,72 [†]	/
II	/	41,70 ± 0,84	33,13 ± 0,51	14,84 ± 0,80	10,33 ± 0,84	193,80 ± 0,94*	/
III	72,60 ± 0,62	21,60 ± 0,25	5,80 ± 0,50	/	/	33,20 ± 0,90 [†]	/
IV	34,33 ± 1,22	59,13 ± 1,00	6,54 ± 0,19	/	/	72,21 ± 0,24* [†]	/
V	28,09 ± 0,34	49,06 ± 0,27	18,24 ± 0,32	4,61 ± 0,54	/	99,37 ± 0,82* [†]	/
VI	39,61 ± 0,38	56,15 ± 0,81	4,24 ± 0,41	/	/	64,63 ± 0,32* [†]	78,7
VII	18,20 ± 0,51	62,61 ± 0,91	17,14 ± 0,17	2,05 ± 0,28	/	103,04 ± 0,28* [†]	55,3
VIII	/	69,61 ± 0,41	23,80 ± 0,32	4,14 ± 0,74	2,45 ± 0,54	139,43 ± 0,92* [†]	33,1

[a] Резултати су изражени као средња вредност ± С.Д., $n = 5$ животиња у групи;[b] %R, проценат редукције оштећења ДНК; I – Негативна контролна група; II – CCl₄ 1 ml/kg т.м., 1:1 смеша у маслиновом уљу; III – **B18** 5 mg/kg т.м.; IV – **B18** 10 mg/kg т.м.; V – **B18** 20 mg/kg т.м.; VI – **B18** 5 mg/kg т.м. + CCl₄; VII – **B18** 10 mg/kg т.м. + CCl₄; VIII – **B18** 20 mg/kg т.м. + CCl₄;* $p < 0,05$ у поређењу са негативном контролном групом;† $p < 0,05$ у поређењу са позитивном контролном групом (CCl₄).

При условима коришћеним за Комет тест није примећено значајно повећање укупног скорa у ткивима јетре код животиња које су третиране само најнижом концентрацијом једињења (5 mg/kg т.м.) у поређењу са негативном контролом. Међутим,

у односу на негативну контролну групу, дошло је до извесног повећања укупног скорa у јетри пацова који су третирани средњом и највишом концентрацијом (2,44 и 3,36 пута веће вредности, IV и V групе у односу на I групу). У комбинованом третману, примена ниже концентрације од 5 mg/kg т.м. је показала значајан протективни ефекат од оштећења изазваних CCl₄, смањујући вредност укупног скорa у поређењу са позитивном контролом са $193,80 \pm 0,94$ на $64,63 \pm 0,32$, уз највећи проценат редукције оштећења од 78,7% и одсуство оштећења ДНК класе 3 и 4. У истовременом третману са CCl₄ и 10 mg/kg т.м. испитиваног једињења, нивои оштећења ДНК јетре су значајно смањени, што је доказано 1,88 пута мањим укупним скором у односу на I групу, са редукцијом оштећења од преко 50% и без оштећења ДНК класе 4. Примена једињења у дози од 20 mg/kg т.м. заједно са CCl₄ довела је до статистички значајног повећања укупног скорa у поређењу са негативном контролном групом и са редукцијом оштећења испод 50%, док су евидентирана ДНК оштећења у класама 3 и 4, без присуства неоштећене ДНК.

2.3.16. Биохемијски параметри у серуму експерименталних животиња

Од биохемијских параметра функционисања јетре одређена је количина укупних протеина (TP), ензимска активност аланин трансаминазе (ALT), аспартат трансаминазе (AST) и гама-глутамил трансферазе (γ -GT). Резултати нивоа биохемијских параметара у серуму испитиваних животиња третираним CCl₄ и једињењем **B18** приказани су у **Табели 24**. Интраперитонеална примена CCl₄ у позитивној контроли (група II) значајно је повећала садржај укупног протеина код ове групе животиња ($103,52 \text{ g/L}$) у поређењу са негативном контролном групом ($p < 0,001$). Слични резултати за укупне протеине ($p > 0,001$) примећени су у групи VIII третираној CCl₄ и највећом дозом једињења **B18** (20 mg/kg т.м.). Ниже дозе тестираног једињења, примењене заједно са CCl₄, показале су смањење укупног нивоа протеина, упоредиво или чак ниже од позитивне контролне групе. У групама третираним различитим концентрацијама **B18** (5, 10 и 20 mg/kg т.м.), нивои протеина су се повећали на дозно-зависан начин, што се значајно разликовало и од негативних и од позитивних контрола.

Табела 24. Биохемијски параметара у серуму након третмана једињењем **B18** и CCl₄ у три различите концентрације.

Групе	TP (g/L)	ALT (U/L)	AST (U/L)	γ -GT (U/L)
I	$68,64 \pm 1,51$ †††	$42,77 \pm 1,45$ †††	$66,11 \pm 2,76$ †††	$1,44 \pm 0,26$ †††
II	$103,52 \pm 1,08$ ***	$396,42 \pm 4,10$ ***	$276,04 \pm 4,87$ ***	$3,06 \pm 0,97$ ***
III	$63,50 \pm 0,84$ *, †††	$44,80 \pm 0,23$ †††	$62,34 \pm 2,15$ †††	$1,19 \pm 0,20$ †††
IV	$79,03 \pm 1,85$ ***, †††	$72,55 \pm 1,21$ ***, †††	$63,23 \pm 1,86$ †††	$1,98 \pm 0,41$ †††
V	$83,84 \pm 1,54$ ***, †††	$40,52 \pm 4,07$ †††	$67,61 \pm 0,67$ †††	$0,13 \pm 0,01$ †††
VI	$63,16 \pm 2,18$ **, †††	$47,44 \pm 2,06$ †††	$214,78 \pm 3,76$ ***, †††	$3,00 \pm 0,57$ ***
VII	$63,94 \pm 0,70$ †††	$80,46 \pm 4,24$ ***, †††	$353,93 \pm 7,31$ ***, †††	$2,46 \pm 0,68$ ***
VIII	$102,84 \pm 2,05$ ***	$101,85 \pm 5,71$ ***, †††	$143,69 \pm 4,01$ ***, †††	$3,12 \pm 0,18$ ***

[a] Резултати су изражени као средња вредност $\pm$ С.Д., $n = 5$ животиња у групи;

[b] I – Негативна контролна група; II – CCl₄ 1 ml/kg т.м., 1:1 смеша у маслиновом уљу; III – **B18** 5 mg/kg т.м.; IV – **B18** 10 mg/kg т.м.; V – **B18** 20 mg/kg т.м.; VI – **B18** 5 mg/kg т.м. + CCl₄; VII – **B18** 10 mg/kg т.м. + CCl₄; VIII – **B18** 20 mg/kg т.м. + CCl₄;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у поређењу са негативном контролном групом;

† $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, ††† $p < 0,001$ у поређењу са позитивном контролном групом (CCl₄).

Резултати групе третиране најнижом концентрацијом **B18** незнатно се разликују од негативне контролне групе ($p < 0,05$), док је примена виших концентрација изазвала

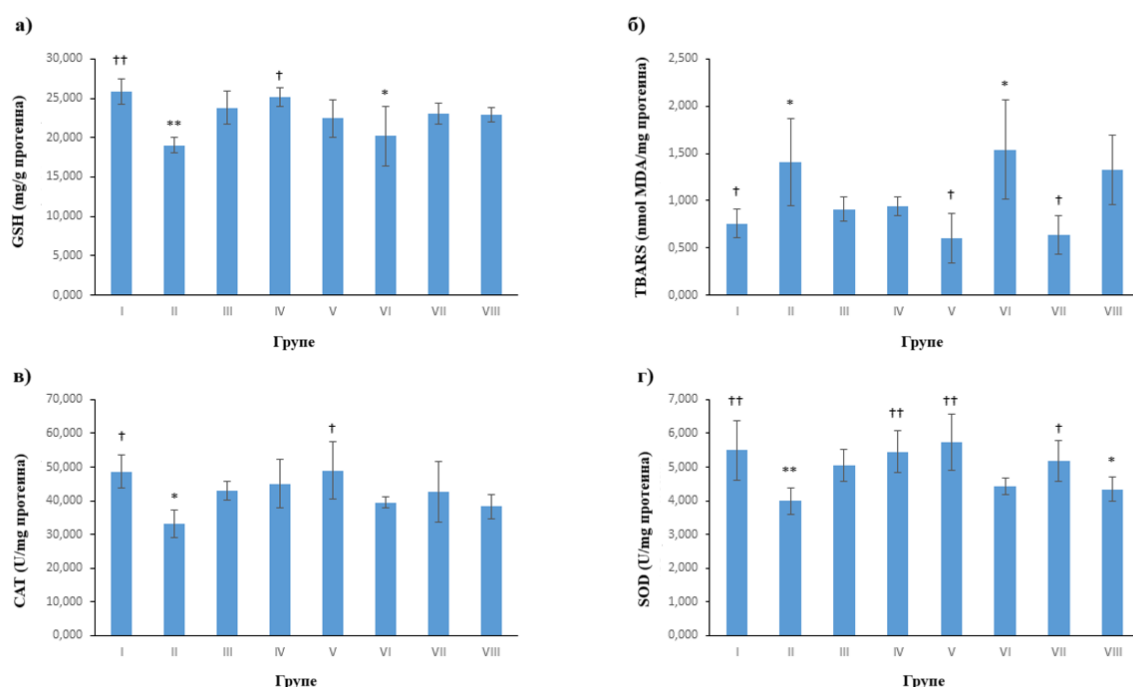
повећање нивоа серумских протеина. Нивои трансаминаза у серуму експерименталних животиња пратили су скоро аналоган тренд. Тачније, третман са CCl_4 је изазвао значајно повећање нивоа ALT и AST у серуму животиња из позитивне контролне групе (група II), статистички различите ($p < 0,001$) од нетретираних животиња у група I. Третман животиња^{248,249} са три различите концентрације **B18** углавном није повисио нивое обе трансаминазе у поређењу са негативном контролном групом ($p > 0,001$). Једини изузетак је забележен у групи третираној са **B18** у концентрацији од 10 mg/kg телесне масе (група IV) где је ниво ALT био виши од оних из негативне контроле, али и даље значајно смањен у поређењу са групом третираном CCl_4 ($p < 0,001$). Нивои ALT у групама које су симултано третиран и једињењем **B18** и CCl_4 су се повећали у извесној мери у групама третираним већим дозама, док је група третирана најнижом дозом показала сличне вредности ALT као негативна контрола. Треба нагласити да су виши нивои ALT у групама VII и VIII ипак били нижи и статистички различити у поређењу са групом третираном CCl_4 . С друге стране, значајно повећање нивоа AST примећено је у групама третираним и **B18** и CCl_4 . Овај тренд није зависио од дозе, што значи да је средња доза **B18** (10 mg/kg т.м.) заједно са CCl_4 изазвала највеће оштећење и највећи скок активности ензима AST у серуму третираних животиња (група VII), чак и више од групе где је само примењен CCl_4 ($p < 0,001$). Највећа доза **B18** је била у стању да спречи значајно повећање нивоа AST код животиња које су третиране угљен-тетрахлоридом у поређењу са позитивном контролном групом ($p < 0,001$).

Нивои другог биохемијског маркера активности јетре, гама-глутамил трансферазе (γ -GT), процењени су код свих животиња. Повећање каталитичке концентрације γ -GT је један од најосетљивијих индикатора оштећења јетре. Уочено је повећање вредности γ -GT у свим групама третираним CCl_4 , укључујући групе које су истовремено третиране једињењем **B18** у свим примењеним концентрацијама. Групе третиране са три различите концентрације једињења **B18** показале су много ниже нивое γ -GT активности у поређењу са позитивном контролном групом. Међутим, неуобичајено низак ниво овог ензима је примећен у V групи где су животиње третиране само највишом дозом једињења **B18**, у поређењу са негативном контролном групом.

Примећено је да је примена CCl_4 као штетног агенса резултирала значајним поремећајима у серолошком профилу животиња, показујући висок ниво оштећења јетре. Трансаминазе, ензими који су претежно локализовани у цитоплазми, служе као критични дијагностички маркери због њиховог ослобађања у системску циркулацију као последица оштећења ћелије, одражавајући на тај начин степен ћелијске инсултације и токсичности.²⁵⁰ Значајан пораст нивоа ALT и AST у серуму, заједно са другим ензимима повезаним са јетром γ -GT, квантификован је у групи која је третирана CCl_4 , што указује на значајну дисфункцију јетре. Резултати су показали да примена једињења **B18** у нижим концентрацијама, уз третман CCl_4 , може да одржи нивое укупних протеина и ALT, што значи да стабилност плазма мембране није значајно нарушена код ових група животиња. С друге стране, највећа доза једињења **B18** није била у стању да спречи оштећење јетре, већ је потенцијално чак допринела хепатотоксичном дејству угљен-тетрахлорида, вероватно путем ефекта на плазма мембрану хепатоцита. Сличан тренд је примећен у нивоима AST и γ -GT у свим групама истовремено третираним CCl_4 и једињењем **B18** у свим примењеним концентрацијама. Свеукупно поређење резултата добијених у групама третираним само једињењем **B18** у три различите концентрације са резултатима истовременог третмана са CCl_4 може довести до закључка да једињење **B18** није имало хепатопротективне ефекте на животиње са CCl_4 изазваним оштећењем јетре, у смислу биохемијских параметара серума, али такође није значајно допринело овом оштећењу.

2.3.17. Параметри оксидативног стреса код експерименталних животиња

Утицај једињења **Б18** на нивое параметара оксидативног стреса у хомогенатима ткива јетре експерименталних животиња приказан је на **Слици 75**. Очекивано, концентрација глутатиона (GSH) у позитивној контролној групи третираној CCl_4 била је значајно нижа ($p < 0,01$) у поређењу са негативном контролном групом (**Слика 75а**). Што се тиче група третираних искључиво једињењем **Б18**, концентрација GSH у јетри ових животиња била је виша него код групе третиране CCl_4 , али осим средње дозе (10 mg/kg т.м., $p < 0,05$), друге вредности се нису значајно разликовале од позитивне контроле. Ниво GSH у групи третираној најнижом концентрацијом једињења **Б18** статистички се разликовао од негативне контролне групе ($p < 0,05$) што указује да најнижа концентрација није успела да одржи ендогену антиоксидантну заштиту у ћелијама јетре током примене CCl_4 . Преостале две концентрације су биле знатно успешније у том процесу, али још увек недовољно да се количина GSH доведе на ниво негативне контроле.



Слика 75. Утицај једињења **Б18** на параметре оксидативног стреса у јетри третираних пацова; а) редуковани глутатион (GSH), б) параметри липидне пероксидације (TBARS), в) каталаза (CAT), и г) супероксид дисмутаза (SOD).

Резултати су изражени као средња вредност $\pm$ С.Д., $n = 5$ животиња у групи;

I – Негативна контролна група; II – CCl_4 1 ml/kg т.м., 1:1 смеша у маслиновом уљу; III – **Б18** 5 mg/kg т.м.; IV – **Б18** 10 mg/kg т.м.; V – **Б18** 20 mg/kg т.м.; VI – **Б18** 5 mg/kg т.м. + CCl_4 ; VII – **Б18** 10 mg/kg т.м. + CCl_4 ; VIII – **Б18** 20 mg/kg т.м. + CCl_4 ;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у поређењу са негативном контролном групом;

† $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, ††† $p < 0,001$ у поређењу са позитивном контролном групом (CCl_4).

Ниво липидне пероксидације у ткиву јетре одређен је на основу концентрације тиобарбитурна киселина реагујућих супстанци (TBARS) и изражен преко стандардне криве малондиалдехида (MDA) (**Слика 75б**). Као што се очекивало, примена CCl_4 изазвала је значајан пораст концентрације TBARS, што указује на значајно оштећење

тквива јетре узроковано оксидативним стресом. Неупоредиво ниже вредности забележене су у групама третираним само једињењем **B18**, где се само највећа примењена концентрација (20 mg/kg т.м.) статистички разликовала од позитивне контролне групе ($p < 0,05$). У групама третираним нижим концентрацијама једињења **B18**, концентрације TBARS су биле сличне онима код негативне контроле, али се у исто време нису статистички разликовале од групе третиране CCl_4 . С друге стране, у групама које су истовремено третиране једињењем **B18** и CCl_4 , добијени резултати су били прилично слаби. Било је јасно да најнижа примењена концентрација није у стању да заштити ткиво јетре од оксидације липида, али занимљиво је да је средња доза била много ефикаснија од највеће дозе. Показало се да је доза од 10 mg/kg телесне масе имала значајно бољи заштитни ефекат од осталих концентрација, док се количина TBARS није значајно разликовала у односу на негативну контролу ($p > 0,05$).

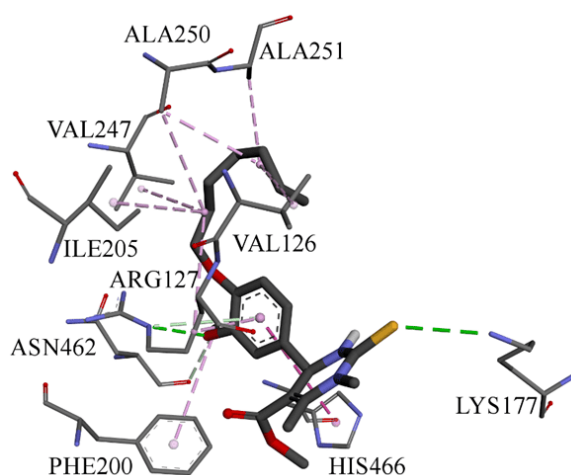
Праћене су и активности два ензима укључена у антиоксидативну заштиту организма, каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), у хомогенатима јетре испитиваних животиња (Слика 75в и г). За оба ензима, резултати су пратили сличан тренд. Применом CCl_4 значајно је смањена активност оба ензима (II група). Примена једињења **B18** одржавала је сличан ниво антиоксидативних ензима као код негативне контроле. Посебно су се истицале највеће концентрације овог једињења, које су одржавале активност CAT и SOD на највишем нивоу. Након примене CCl_4 на групе третиране испитиваним једињењем у различитим концентрацијама, приметно је значајно смањење активности оба праћена ензима.

Угљен-тетрахлорид је у овој студији коришћен као хепатотоксин, чије дејство доводи до патолошких промена карактеристичних за акутни хепатитис. Према литературним подацима, метаболизам CCl_4 се одвија претежно у јетри уз учешће ензимског система цитохрома P450 који катализује његову трансформацију у две реактивне врсте, трихлорометил и трихлорометил перокси радикале. Ови радикали иницирају ланчану реакцију липидне пероксидације полинезасићених масних киселина унутар ћелијских мембрана. Последице оштећење ћелија је додатно погоршано значајном ензимском дисфункцијом и порастом нивоа MDA који је због свега наведеног важан маркер оксидативног стреса.^{251,252} Као што се и очекивало, третман са CCl_4 индуковао је значајно повећање нивоа пероксидације липида у позитивној контролној групи, али и у групама третираним једињењем **B18**. Нивои CCl_4 изазваног оксидативног стреса су додатно повишени у односу на друге тестиране параметре, нивои CAT, SOD и GSH. Само једињење **B18** у све три примењене концентрације, није довело до значајног поремећаја равнотеже прооксиданата и антиоксидативне заштите у ткиву јетре. Ипак, када се примени заједно са CCl_4 , тестирано једињење није било у стању да испољи протективне ефекте у ткиву јетре, што је довело до тешких повреда ткива. На основу добијених резултата може се закључити да је само средња концентрација (10 mg/kg т.м.) делимично успешна у сузбијању штетних ефеката угљен-тетрахлоридом изазваног оксидативног стреса у ћелијама јетре.

2.3.18. Молекулски докинг: интеракције са ензимима CAT, GPx4 и SOD

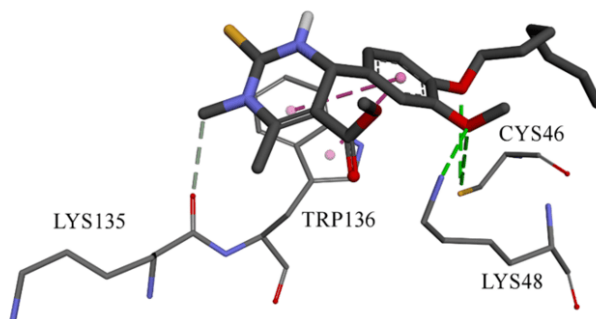
У недавним студијама примена молекулског докинга показала се веома ефикасном у предвиђању интеракција са ензимима попут каталазе (CAT),²⁵³ глутатион пероксидазе (GPx4)²⁵⁴ и супероксид дисмутазе (SOD).²⁵⁵ Због чега је у овом раду испитана интеракција једињења **B18** са наведеним ензимима, имајући у виду претходно утврђени антиоксидативни потенцијал.

Енергије везивања су (ΔE_b) израчунате помоћу AD4. Вредност добијене енергије везивања за CAT је ниска ($\Delta E_b = -6,60 \text{ kcal mol}^{-1}$), али конформација са најнижом енергијом није остварила интеракције са циљаним аминокиселинским остацима Ala117, Ala123 и Ser254. Међутим, остварене су интеракције са Val126 и Arg127. Такође су формиране и јаке водоничне везе између сумпора и Lys177 и између једног од кисеоника везаних за фенил групу и Arg7 (Слика 76). Друге стабилизујуће интеракције су интеракције алкил низа једињења **B18** са алифатичним остацима Val247, Ala250 и Ala251, и π - π „стакинг“ интеракције између ароматичних прстенова и His466.



Слика 76. Интеракције једињења **B18** са каталазом (CAT).

Даљим испитивањем је утврђено да једињење **B18** успоставља мањи број интеракција са GPx4 у односу на претходно анализиран ензим, што резултира мањим снижењем енергије приликом везивања ($\Delta E_b = -5,11 \text{ kcal mol}^{-1}$). Након циљања каталитичког центра кога чини тријада аминокиселина Cys46, Gln81 и Trp136, установљено је да једињење **B18** није показало интеракције само са Gln81 што је довољно да сугерише могућност инхибиције GPx4 ензима (Слика 77). Ароматични прстенови **B18** и Trp136 остварују π - π интеракције, док се водоничне везе формирају између кисеоника везаних за ароматични прстен једињења **B18** и поларних остатака Cys46 и Lys48. Испитивање везивања за SOD није дало никакве значајне резултате, с обзиром на високу енергију везивања ($\Delta E_b = -3,95 \text{ kcal mol}^{-1}$) и немогућност у проналажењу јаким интеракција у циљаном домену.



Слика 77. Интеракције једињења **B18** близу каталитичке тријаде глутатион пероксидазе (GPx4).

2.4. Једињења серије В

2.4.1. Синтеза и карактеризација једињења серије В

За синтезу једињења серије **В** примењене су две различите методе – реакција у глацијалној сирћетној киселини и реакција у условима без растварача (тзв. *solvent-free* реакција), уз примену различитих катализатора (**Схема 37**). Упоређивањем ова два приступа показало се да су за већину примењених алдехида били погоднији услови у глацијалној сирћетној киселини. Тетрахидропиримидини су добијени у високим приносима у глацијалној сирћетној киселини када су коришћени алдехиди који у ванилинском фрагменту имају $-OR_1$ супституенте. У том случају, глацијална сирћетна киселина је имала улогу растварача и катализатора. Насупрот томе, тетрахидропиримидини који садрже бром или ацетил групу као супституенте у ванилинском фрагменту, синтетисани су у добрим приносима када се синтеза одвијала у условима без растварача уз присутну каталитичку количину концентроване хлороводоничне киселине. Самим тим, можемо да закључимо да је ова метода ефикаснија када су као полазни алдехиди коришћени они који имају електрон-привлачне супституенте. Избор реакционих услова такође зависи и од β -кетоестара који се користе као полазни реагенси. Важно је напоменути да су блажи реакциони услови у овом случају били кључни за синтезу свих деривата, с обзиром на подложност етил 4-хлороацетоацетата разградњи у агресивнијим киселим условима и/или при повишеним температурама.

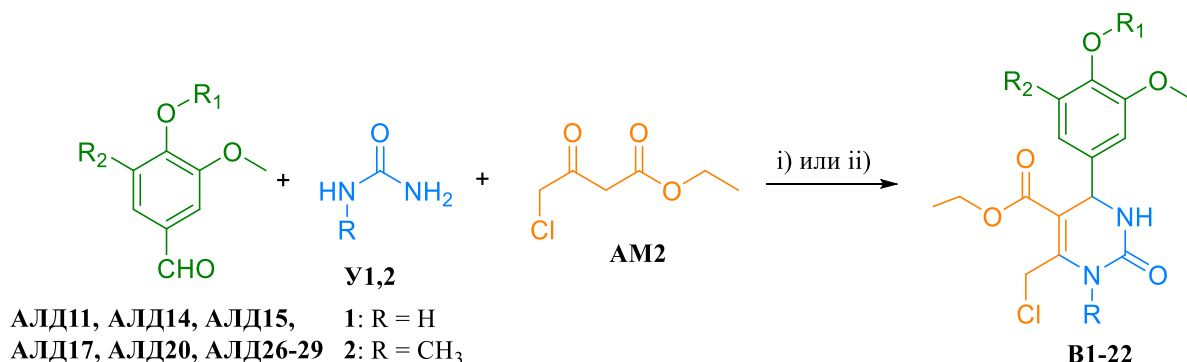


Схема 37. Синтеза деривата тетрахидропиримидина серије **В**. Реагенси и услови: i) без растварача, каталитичка количина конц. HCl, након 2 сата додат 96 % EtOH, рефлукс, 2 сата; ii) глацијална сирћетна киселина, 60 °C, 48 сати.

¹H и ¹³C NMR спектри свих једињења серије **В** снимљени су у DMSO-*d*₆. Карактеризација целе серије је објашњена на примеру једињења **B1** које је најједноставнији представник. У ¹H NMR спектру једињења **B1**, сигнал на 8,17 ppm потиче од протона везаног за атом азота, што је додатно потврђено помоћу ¹H-¹³C хетеронуклеарне корелационе спектроскопије, HSQC (**Слика П22** и **Слика П23**), док сигнали на 7,04 (*d*), 6,96 (*s*) и 6,79 (*d*) ppm одговарају протонима бензеновог прстена. Сигнал бензилног протона на положају C4 тетрахидропиримидинског прстена налази се на 5,19 ppm и представља јасан доказ да је кондензација била успешна. Сигнал на 5,09 ppm потиче од протона хлорометил групе на положају C6. Остали сигнали у ¹H NMR спектру су синглети који одговарају метокси, *N*-метил и ацетил групама на 3,27, 3,22 и 2,23 ppm, као и карактеристични квартет и триплет етил групе на 4,11 (*q*) и 1,15 (*t*) ppm. Сигнали угљеника на 169, 165 и 153 ppm потичу од три карбонилне групе, што је

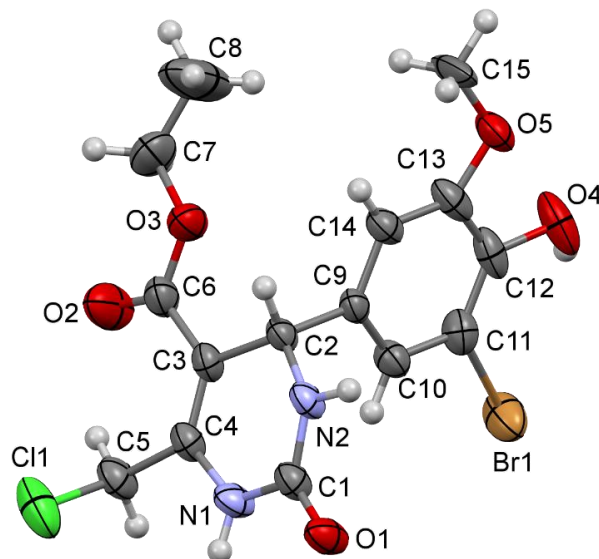
потврђено присутним корелацијама у НМВC спектру (**Слика П24**). Сви остали сигнали угљеника налазе се на очекиваним хемијским померањима, што је потврђено DEPT и HSQC експериментима.

Табела 25. Структуре једињења **B1–11**, реакциони услови и принос.

	R	R ₁	R ₂	Реакциони услови	Принос [%]
B1	–CH ₃	–Ac	–H	ii)	55
B2	–CH ₃	–H	–Br	ii)	49
B3	–H	–Ac	–H	ii)	50
B4	–H	–H	–Br	ii)	74
B5	–CH ₃	–H	–NO ₂	i)	67
B6	–CH ₃	–CH ₂ COOEt	–H	i)	41
B7	–CH ₃	–CH ₂ Ph	–H	i)	52
B8	–CH ₃	–(CH ₂) ₅ CH ₃	–H	i)	50
B9	–CH ₃	–(CH ₂) ₆ CH ₃	–H	i)	46
B10	–CH ₃	–(CH ₂) ₇ CH ₃	–H	i)	43
B11	–CH ₃	–(CH ₂) ₉ CH ₃	–H	i)	68

2.4.2. Рендгенска структурна анализа једињења **B4**

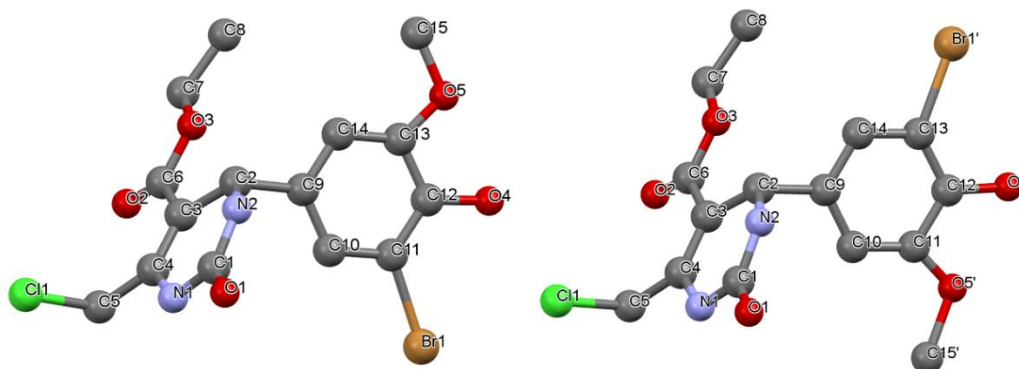
Кристали једињења **B4** су били погодни за рендгенско-структурну анализу. Добијена структура је приказана на **Слици 78**. Показано је да C9–C14 фенилни прстен постоји у два облика који се разликују по положају атома Br1 и O5–CH₃ фрагмента. Као што је приказано на **Слици 79**, оријентација самог прстена остаје непромењена, али се поменути супституенти смењују у заузимању исте кристалне позиције. Ова делимична неуређеност у распореду супституената присутна је у кристалној решетки у односу 3:2.



Слика 78. Кристална структура једињења **B4** са нумерисаним атомима.

Највећу структурну флексибилност показује хетероциклични прстен, чији је централни C2 атом sp² хибридован и омогућава ротацију око C2–C3 и C2–C9 веза. Овај атом учествује у формирању најдужих веза у молекулу: N2–C2 [1,446(6) Å], C2–C3 [1,529(6)

Å] и C2–C9 [1,526(6) Å] (**Табела 26**). Торзиони угао C1–N2–C2–C3 од 24,0(7)° потврђује извијеност прстена око N2–C2 везе. С друге стране, дужине веза унутар фрагмента C3–C4–N1–C1–N2 указују на π -делокализацију, што стабилизује ову структуру упркос торзији.

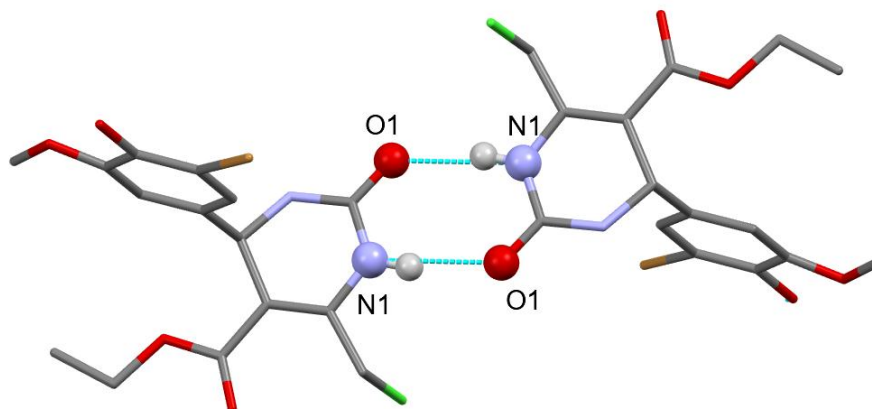


Слика 79. Фенилни прстен C9–C14 позициониран у две конформације. Ради прегледности, обе форме једињења **B4** су приказане без водоникових атома.

Табела 26. Одабране дужине веза у кристалној структури једињења **B4**.

Дужине веза [Å]	
N1–C1	1,368(6)
N1–C4	1,385(6)
N2–C1	1,343(6)
N2–C2	1,446(6)
O1–C1	1,237(6)
O2–C6	1,187(6)
O3–C6	1,321(6)
O3–C7	1,445(7)
O4–C12	1,363(6)
C2–C9	1,526(6)
C2–C3	1,529(6)
C3–C4	1,332(7)
C3–C6	1,480(7)
C4–C5	1,502(6)
C9–C10	1,379(7)
Cl1–C5	1,732(6)
Br1–C11	1,987(6)

Молекул **B4** поседује више донора и акцептора водоничних веза (N1–H, N2–H, O4–H, O1, O2, O4, Cl1, Br1), али су посебно значајне интеракције које доводе до формирања центросиметричног димера (**Слика 80**). Две интермолекулске N1–H $\cdots$ O1 водоничне везе повезују суседне молекуле [N1 $\cdots$ O1, 2,855(8) Å; N1–H, 0,86 Å; H $\cdots$ O1, 2,02 Å; N1–H $\cdots$ O1, 167°], што може имати утицаја на паковање у кристалној решетки и на стабилност кристалне структуре.



Слика 80. Молекули **B4** формирају димере формирајући две N1–H···O1 водоничне везе које повезују два молекула. Атоми који учествују у интеракцијама приказани су као сфере, док су протони који не учествују у грађењу водоничних веза изостављени ради прегледности.

2.4.3. Цитотоксична активност једињења серије В

Резултати МТТ теста приказани су као IC₅₀ вредности и налазе се у **Табели 27**. Сва испитивана једињења серије **В** испољила су изражену цитотоксичност према HeLa и K562 туморским ћелијским линијама, са IC₅₀ вредностима у распону од 1,66 до 6,12 µM.

Табела 27. Цитотоксичност једињења серије В.

Једињење	HeLa	K562	MCF7	MRC-5
	IC ₅₀ ± С.Д. [µM]*			
B1	5,35 ± 1,33	1,76 ± 0,09	59,07 ± 8,86	5,77 ± 0,97
B2	3,57 ± 0,21	1,66 ± 0,05	38,97 ± 4,26	5,66 ± 0,48
B3	3,79 ± 0,90	2,18 ± 0,35	85,37 ± 4,20	5,61 ± 0,92
B4	6,10 ± 1,41	4,42 ± 0,23	99,58 ± 3,50	5,67 ± 0,20
B5	5,04 ± 0,61	4,76 ± 0,19	107,63 ± 18,69	2,53 ± 0,44
B6	3,71 ± 0,40	4,18 ± 0,45	58,63 ± 2,60	10,08 ± 0,19
B7	4,93 ± 0,24	2,62 ± 0,42	35,76 ± 1,88	8,75 ± 1,61
B8	6,03 ± 1,07	5,42 ± 0,56	12,80 ± 0,78	8,52 ± 1,83
B9	6,01 ± 1,23	5,05 ± 0,48	39,50 ± 4,24	8,26 ± 1,03
B10	4,45 ± 0,98	4,20 ± 0,38	14,65 ± 1,13	10,73 ± 1,21
B11	5,38 ± 1,01	6,12 ± 0,63	17,52 ± 1,61	10,58 ± 1,56
цисплатина	4,91 ± 0,74	6,89 ± 0,21	17,82 ± 2,58	9,35 ± 1,29

*Резултати представљају средње вредности ± С.Д. добијене из три независна експеримента.

Највећу активност према K562 ћелијској линији показала су једињења **B1** и **B2** (IC₅₀ од 1,76 и 1,66 µM), док су једињења **B3** и **B7** такође била врло активна (IC₅₀ од 2,18 и 2,62 µM). HeLa ћелије биле су најосетљивије на дејство једињења **B2**, **B3** и **B6**, са IC₅₀ вредностима испод 4 µM. За неколико једињења (**B5**, **B6**, **B8**, **B10** и **B11**) забележена је

упоредива активност на обе ћелијске линије, док су остала показала већу ефикасност према K562. Цитотоксичност испитиваних деривата била је значајно нижа према MCF-7 ћелијској линији, са IC_{50} вредностима у распону од 12,80 до 107,63 μM . Једињења **B8**, **B10** и **B11** издвојила су се као најактивнија према овој ћелијској линији. Умерена активност примећена је и код једињења **B1**, **B7** и **B9**. Сви деривати су, међутим, показали релативно високу цитотоксичност и према нормалној MRC-5 ћелијској линији (IC_{50} од 2,53 до 10,73 μM).

Упркос томе, већина једињења је селективнија према ћелијама тумора у односу на здраве ћелије. Једињења **B1** и **B2** су показала 3,28 и 3,41 пута већу ефикасност према K562 ћелијама него према здравим MRC-5 ћелијама. Девет од једанаест једињења показало је израженију активност према HeLa у односу на нормалне ћелије, а једињење **B6** је као једно од најефикаснијих, било 2,7 пута активније према HeLa ћелијама у односу на здраве ћелије.

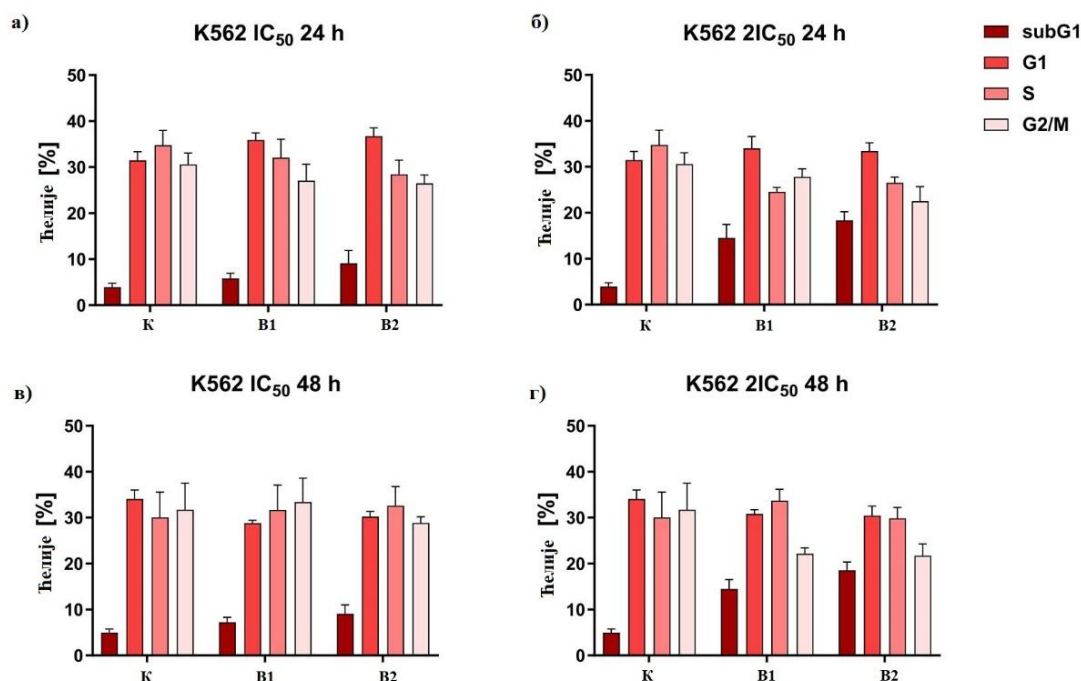
2.4.4. SAR анализа

Занимљиво је истаћи да су једињења **B1** и **B2** показала нешто ниже вредности IC_{50} на K562 ћелијама (1,76 и 1,66 μM у односу на 2,18 и 4,42 μM) у односу на једињења **B3** и **B4**. Поменути молекули се разликују од својих структурних аналога **B3** и **B4** искључиво по присуству метил групе уместо водоника на N1 атому. Ови резултати указују да метил група на том положају може играти важну улогу у механизму деловања. Једињења са алкокси групама (**B8–B11**) показала су сличну активност на свим испитиваним ћелијским линијама, уз минималне разлике. Међу њима, **B10**, са алкокси низом од осам угљеникових атома на позицији C4', испољило је најнижу IC_{50} вредност на K562 ћелијама. Такође, једињење **B7**, које садржи бензоил-фрагмент у ванилинском делу молекула, показало је снажну активност, што указује да волуминозни супституенти могу позитивно утицати на антипролиферативно дејство. Присуство дужих алкил низова код једињења **B8–B11** такође је у корелацији са повећаном активношћу према MCF-7 ћелијама. На основу добијених резултата, једињења **B1** и **B2** су издвојена као најперспективнија за даља испитивања.

2.4.5. Ефекти одабраних једињења на ћелијски циклус K562 ћелија

Како бисмо стекли увид у механизам цитотоксичне активности једињења **B1** и **B2**, испитан је њихов утицај на дистрибуцију фаза ћелијског циклуса K562 ћелија након 24 и 48 сати инкубације при IC_{50} и $2 \times IC_{50}$ концентрацијама једињења. Резултати анализе ћелијског циклуса приказани су на **Слици 81**.

Након инкубације дошло је до дозно-зависног повећања процента ћелија у subG1 фази ћелијског циклуса у поређењу са контролом. Међутим, није примећен временски зависни ефекат. Иако су примењене концентрације оба једињења биле сличне, проценти ћелија у subG1 фази били су већи у K562 ћелијама третираним једињењем **B2** у поређењу са оним које су третиране једињењем **B1** (9,12% према 5,80% и 9,04% према 7,24% за IC_{50} концентрације током 24 сата и 48 сати третмана; 18,37% према 14,51%, 18,57% наспрам 14,48% за концентрације $2 \times IC_{50}$ током 24 и 48 сати третмана). Повећање процента ћелија у subG1 фази било је праћено значајним смањењем процента ћелија у G2/M фази, посебно у узорцима ћелија при $2 \times IC_{50}$ концентрацији оба једињења након 48 сати инкубације. Благо повећање процента ћелија у G1 фази у поређењу са контролним ћелијама је примећено након 24 сати инкубације при IC_{50} концентрацијама.



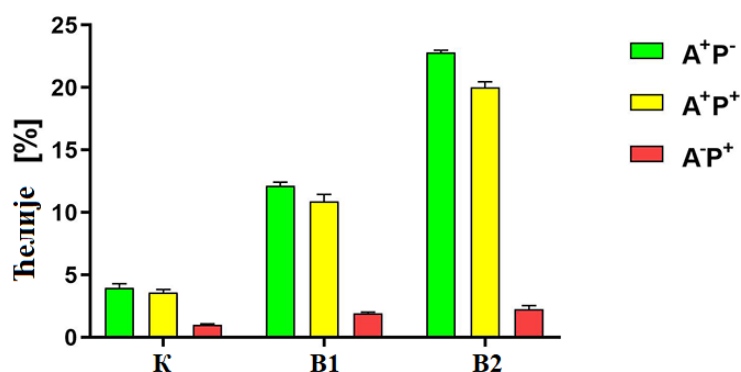
Слика 81. Промене у дистрибуцији фаза ћелијског циклуса K562 ћелија третираних једињењима **B1** и **B2** у концентрацијама IC₅₀ (а, б) и 2×IC₅₀ (в, г) после 24 и 48 сати. Приказани подаци представљају просечну вредност ± С.Д. три независна експеримента.

Анализа дистрибуције ћелија у фазама ћелијског циклуса након инкубације са овим једињењима показала је дозно-зависно повећање процента ћелија у subG1 фази, што је индикатор апоптозе. Једињење **B2** је испољило нешто јачи ефекат у поређењу са **B1**. Ови резултати су праћени смањењем процента ћелија у G2/M фази, што указује на инхибицију митозе, а такође је примећено и благо повећање процента ћелија у G1 фази након 24 сата инкубације. Како резултати указују да једињења **B1** и **B2** утичу на ћелијски циклус и да подстиче апоптозу у K562 ћелијама, то указује на њихов потенцијал за даља истраживања и могућу терапијску примену у лечењу леукемије.

2.4.6. Ефекти одабраних једињења на ћелијску смрт

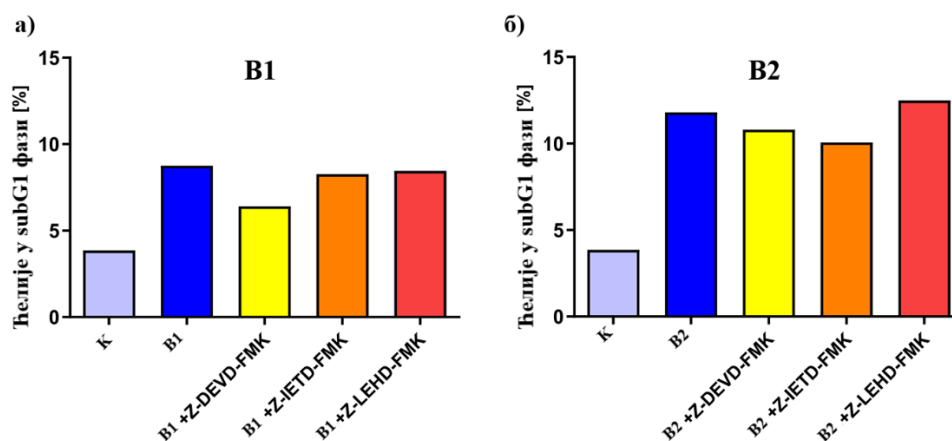
Методом проточне цитометрије анализирано је да ли једињења **B1** и **B2**, у концентрацијама 2×IC₅₀ током 24 сати инкубације, индукују ћелијску смрт у K562 ћелијама. У ту сврху је примењен FITC Annexin V/PI тест, који омогућава детекцију различитих стања ћелије у апоптотичком процесу засновану на способности анексина (FITC Annexin V) да препозна фосфатидилсерин који се у раној фази апоптозе транслоцира на спољашњу страну мембране, док пропидијум-јодид (PI) продире само у ћелије код којих је мембрана оштећена. Комбинацијом ова два маркера је могуће квантификовати проценат виталних, ћелија у раној и касној фази апоптозе као и некротичних ћелија. Резултати добијени анализом проточне цитометрије (Слика 82) указују на то да оба једињења доводе до значајног повећања процента апоптотичних ћелија у поређењу са контролом. Посебно је уочено повећање удела ћелија у раној фази апоптозе (Annexin V⁺/PI⁻), као и у касној фази апоптозе/секундарне некрозе (Annexin V⁺/PI⁺). Једињење **B2** је показало израженији проапоптотички ефекат у односу на **B1**, што је потврђено већим процентом раних апоптотичних ћелија (22,81% у односу на 12,13%) и касно апоптотичних/секундарно некротичних ћелија (20,01% у односу на 10,89%). Проценат мртвих ћелија које су биле позитивне само на пропидијум јодид (Annexin

V-/PI⁺) био је минималан и приближно једнак за оба једињења (2,25% за **B2** и 1,95% за **B1**), што указује да индукована ћелијска смрт није последица примарне некрозе, већ доминантно апоптозе.



Слика 82. Резултати FITC Annexin V/PI теста; A⁺P⁻ – ћелије у раној фази апоптозе, A⁺P⁺ – ћелије у касној фази апоптозе, A⁻P⁺ – некротичне ћелије. Приказани резултати представљају средњу вредност ± С.Д. три независна експеримента.

Након што је потврђено да једињења **B1** и **B2** индукују апоптозу у K562 ћелијама, даљом анализом испитани су потенцијални апоптотски путеви који стоје у основи њиховог деловања. Каспазе, које се синтетишу као неактивни прекурсори (прокаспазе), имају кључну улогу у регулацији и сигнализацији током апоптозе ћелије. Прокаспазе-8 и 9 се активирају када је спољашњи пут активиран, док се прокаспазе-3 активира у митохондријалном апоптотском путу. Због тога су ћелије пре инкубације са испитиваним једињењима третиране специфичним, иреверзибилним инхибиторима каспаза-3, 8 и 9. Да ли је апоптотски пут спољашњи или унутрашњи, испитано је анализом дистрибуција ћелијског циклуса методом проточне цитометрије, а резултати су приказани на **Слици 83**.



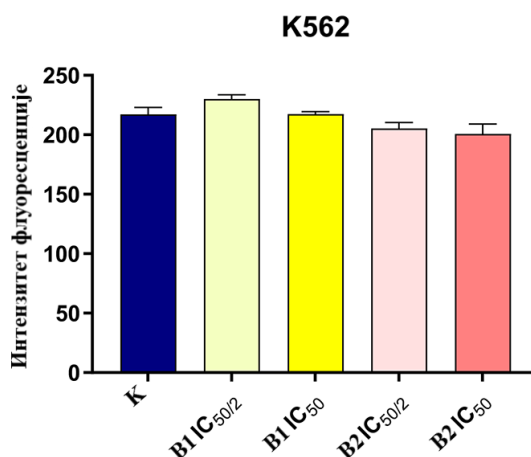
Слика 83. Ефекти специфичних инхибитора каспазе (Z-DEVD-FMK – инхибитор каспазе-3; Z-IETD-FMK – инхибитор каспазе-8; Z-LEHD-FMK – инхибитор каспазе-9) на проценат K562 ћелија у subG1 фази третираних са 2×IC₅₀ концентрацијама једињења **B1** (а) и **B2** (б) током 24 сата.

Узорци третирани једињењем **B2**, као и они који су претходно инкубирани са било којим од инхибитора каспаза пре додавања овог једињења, показали су сличне проценте ћелија у subG1 фази, што указује на одсуство значајног утицаја инхибиције каспаза на индуковану апоптозу. Сличан образац уочен је и у случају третмана једињењем **B1**, где прединкубација са инхибиторима каспазе-8 и -9 није утицала на проценат ћелија у subG1 фази у поређењу са ћелијама третираним само једињењем **B1**. Међутим, благ пад процента subG1 ћелија уочен је након примене инхибитора каспазе-3, што указује на могућу, али ограничену, улогу ове ефекторске каспазе у апоптотичком механизму изазваном дејством једињења **B1**.

Иако је очекивано да инхибиција специфичних каспаза доведе до смањења индуковане апоптозе, добијени резултати не показују јасну зависност апоптотичке активности од деловања ових ензима. Ово може указивати на неке друге механизме апоптозе који не зависе од каспаза или на недовољну ефикасност инхибиције под примењеним условима. Насупрот томе, претходни резултати FITC Annexin V/PI теста потврдили су присуство апоптотичних и касно апоптотичних/некротичних ћелија након третмана овим једињењима, што додатно указује на сложеност механизма дејства једињења **B1** и **B2** који доводе до ћелијске смрти у K562 ћелијама.

2.4.7. Ефекти одабраних једињења на интрацелуларни ниво ROS

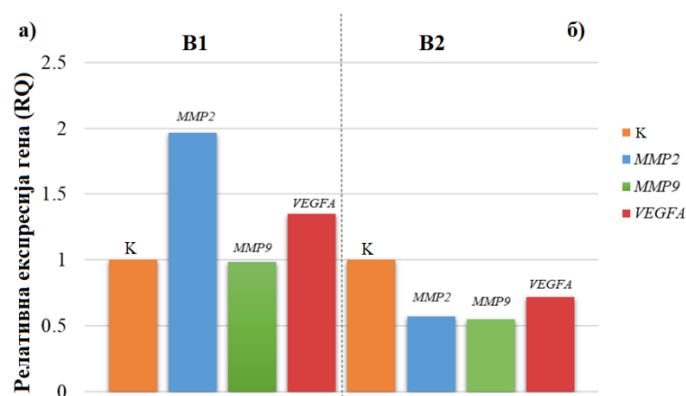
Ради испитивања могуће улоге оксидативног стреса у цитотоксичном дејству једињења **B1** и **B2**, одређени су интрацелуларни нивои ROS у K562 ћелијама након 24 сата инкубације при концентрацијама које одговарају $IC_{50/2}$ и IC_{50} вредностима. Резултати, приказани на **Слици 84**, показују да ниједно од испитиваних једињења није изазвало повећање нивоа ROS у односу на контролу. Насупрот томе, уочен је благи пад нивоа ROS у K562 ћелијама третираним једињењем **B2** (5,5% при $IC_{50/2}$ и 7,6% при IC_{50} концентрацији), што може указивати на присуство потенцијалног антиоксидативног ефекта, односно способности уклањања реактивних врста. Ови резултати сугеришу да механизам цитотоксичности једињења **B1** и **B2** није посредован индукцијом оксидативног стреса.



Слика 84. Ефекат на интрацелуларни ниво ROS у K562 ћелијама након третирања једињењима **B1** и **B2** при $IC_{50/2}$ и IC_{50} концентрацијама током 24 сата. Приказани резултати представљају средњу вредност ± С.Д. три независна експеримента.

2.4.8. Ефекти одабраних једињења на нивое експресије гена и микроРНК

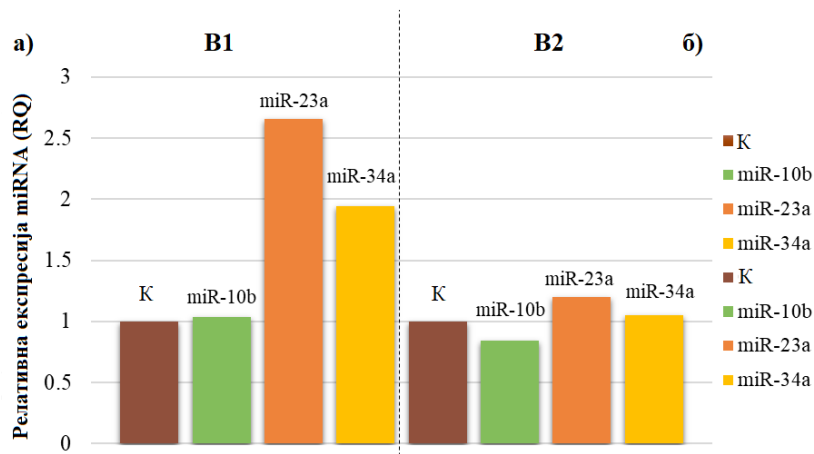
Како је већ у једном од претходних поглавља поменуто (2.3.8. *Ефекти одабраних једињења на нивое експресије гена и микроРНК*), бројна истраживања показују да одређена једињења могу утицати на експресију гена и микроРНК, чиме испољавају потенцијално антитуморско дејство. С обзиром на то да су једињења **B1** и **B2** показала најизраженије дејство према K562 ћелијској линији, испитано је њихово дејство на експресију гена *VEGFA*, *MMP2* и *MMP9*, као и на нивое изабраних микроРНК. Након деловања једињења **B1** дошло је до повећања експресије *MMP2* за приближно два пута и *VEGFA* за 35,1%, док проценат *MMP9* није био значајно промењен (Слика 85а). Насупрот томе, једињење **B2** показује супресивно дејство: ниво *MMP2* је смањен за 42,8%, *MMP9* за 41,3%, а *VEGFA* за 28,1% (Слика 85б).



Слика 85. Нивои експресије *MMP2*, *MMP9* и *VEGFA* у ћелијама K562 након третмана једињењима **B1** (а) и **B2** (б) у вредностима релативне експресије (RQ), калибрисани према нетретираној контроли (K), и нормализовани на GAPDH као ендегену контролу.

Када је реч о микроРНК, **B1** је значајно повећао експресију miR-23a и miR-34a (2,657 и 1,947 пута, респективно), док је miR-10b остао непромењен (Слика 86а). Једињење **B2** изазвало је благо смањење miR-10b (15,6%), као и умерено повећање miR-23a (20%) и miR-34a (5%) што се види на Слици 86б.

На основу добијених резултата се може закључити да је једињење **B2** показало повољнији профил, јер је његово деловање смањило експресију гена који се повезују са прогресијом леукемије (*MMP2*, *MMP9*, *VEGFA*), док је истовремено умерено повећало нивое miR-23a и miR-34a, што би могло указивати на активирање туморсупресивних механизма. Благо смањење нивоа miR-10b додатно подржава могућност да једињење **B2** делује на ћелије леукемије. С друге стране, **B1** изазива значајније повећање *VEGFA* и *MMP2*, што би могло бити повезано са онкогеним ефектима. Иако стимулише експресију miR-23a и miR-34a, његов профил деловања указује на потенцијални двоструки ефекат, где се активација туморски повољних и неповољних фактора јавља паралелно.



Слика 86. Нивои молекула miR-10b, miR-23a, и miR-34a у K562 ћелијама након третмана једињењима **B1** (а) и **B2** (б) изражени као релативни ниво експресија (RQ), калибрисани у односу на нетретирани контролни узорак (K) и нормирани у односу на RNU6B као ендогену контролу.

Треба узети у обзир да се свака микроРНК кодира од стране специфичних гена,²⁵⁶ тако да свако неуравнотежено или неконтролисано смањење експресије микроРНК може неповољно да утиче на одређени део транскриптома. Једињење **B2** утиче на благо повећање miR-34a и miR-23a који делују на тумор супресорне гене. Показало се да је ниво miR-23a код неких леукемија повећан, док је код других смањен. Нивои miR-23a зависе од стадијума леукемије и могу да утичу на исход терапије. Молекул miR-23a утиче на микроокружење тумора путем имунолошке модулације и ангиогенезе.²⁰⁸ Код мијелоидне леукемије је ниво miR-23a дерегулисан и повезан је са резистенцијом на хемиотерапију.²⁵⁷

3. Експериментални део

3.1. Опште напомене, хемикалије и реагенси

Тачке топљења су одређене на Mel-Temp апарату и нису кориговане. IR спектри су снимани на Perkin Elmer Spectrum One FT-IR спектрофотометру са KBr диском и на Perkin-Elmer Spectrum 3 FT-IR/FIR спектрофотометру. NMR спектри су снимани на Varian Gemini 200 MHz NMR спектрометру (^1H на 200 и ^{13}C на 50 MHz) на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу и на Bruker Ascend 400 MHz NMR спектрометру (^1H на 400 и ^{13}C на 101 MHz) на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду у одговарајућим деутерисаним растварачима и хемијска померања су изражена у ppm у односу на интерни стандард тетраметилсилан (TMS) као интерни стандард. За опис сигнала су коришћене следеће скраћенице: *s* (синглет), *d* (дублет), *t* (триплет), *q* (квартет), *m* (мултиплет) и *dd* (дублет дублета). Теоријске масе су потврђене на Shimadzu (Кјото, Јапан) LC-MS/MS систему који се састоји од две LC-40D $\times$ 3 пумпе, DGU-405 јединице за дегасирање, CTO-40S колонске пећи, SIL-40C $\times$ 3 аутосамплера и LCMS-8050cl масеног спектрометра са ESI интерфејсом у Институт за хигијену и технологију меса у Београду.

За синтезу и карактеризацију свих деривата тетрахидропиримидина као и за испитивање интеракција са макромолекулама коришћене су следеће хемикалије и реагенси аналитичке чистоће без додатног пречишћавања, осим ако није другачије наведено: тиоуреа, *N*-метилтиоуреа, метил ацетоацетат, етил 4-хлороацетоацетат, бензалдехид, 3-хлоробензалдехид, 4-хлоробензалдехид, 4-нитробензалдехид, 4-метоксибензалдехид, ванилин, 3,4-диметоксибензалдехид, 3,4,5-триметоксибензалдехид, терефталбензалдехид, 4-метилтиобензалдехид, етокси-2-хидроксибензалдехид, 4-хидрокси-5-метокси-изофталалдехид, 2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиол, триетиламин, полиетилен гликол 1000 (PEG 1000), анхидрид сирћетне киселине, пропаноил хлорид, циклопропилкарбоксил хлорид, бензоил хлорид, 4-метилбензоил хлорид, 4-метоксибензоил хлорид, *n*-бутил бромид, *n*-хексил бромид, *n*-хептил бромид, *n*-октил бромид, *n*-децил бромид, алил бромид, 2-метилалил хлорид, бензил хлорид, етидијум бромид, Hoechst 33342, натријумова со дезоксирибонуклеинске киселине говеђег тимуса (СТ ДНК), фосфатни пуфер (PBS, 10 mM, $C_{\text{NaCl}} = 137 \text{ mM}$, $C_{\text{KCl}} = 2,7 \text{ mM}$, pH = 7,4), говеђи серум албумин (BSA).

У реакцијама су коришћени следећи а) растварачи: THF, DCM, DMF, DMSO, 1,4-диоксан, метанол, етанол, ацетон, изопропанол, етил ацетат, глацијална сирћетна киселина, хлороформ, *n*-бутанол, DMSO-*d*₆, хлороформ-*d*, деутерисана вода и б) киселине и базе: хлороводонична киселина, азотна киселина, натријум-хидроксид, литијум-хидроксид, калијум-хидроксид, калијум-карбонат, литијум-карбонат, цезијум-карбонат.

Све горе наведене хемикалије, реагенси и растварачи, као и реагенси коришћени за биолошка испитивања набављени су од компанија: Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, MO, САД), Merck KGaA (Darmstadt, Немачка), Fisher Chemical, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, САД), Acros Organics, део Thermo Fisher Scientific Inc. (Geel, Белгија), ABCR GmbH (Karlsruhe, Немачка), као и од домаћих добављача Alfatrade Enterprise д.о.о. и Proanalitica д.о.о. (Београд, Србија).

3.2. Поступак за синтезу једињења серије А

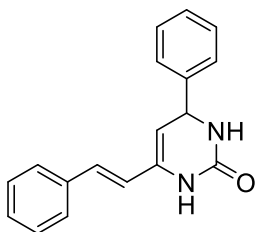
У балон са округлим дном запремине 25 mL додато је 5 mL 7,5% воденог раствора NaOH (2 екв., 10 mmol, 0,400 g у 5 mL) и температура је подешена на 70 °C. Затим је додато 5 mmol одговарајућег ароматичног алдехида и 5 mmol одговарајућег тетрахидропиримидина. Добијена реакциона суспензија је мешана 4 сата. Ток реакције је праћен помоћу TLC-а, при чему је као елуент коришћена смеша дихлорметана и метанола (v/v, 9:1). Током реакције је дошло до таложења производа, након чега је врела смеша процеђена под вакуумом. Преципитат је испиран 50% етанолом. Производи су били задовољавајуће чисте и није било потребно хроматографско пречишћавање. Исти поступак је примењен и за синтезу **A1-d₂**, с тим што је уместо NaOH/H₂O раствора коришћен NaOD/D₂O на температури од 70 °C током 12 сати.

3.3. Синтеза интермедијера ИНТ3 и ИНТ3-d

У балон су додати бензалдехид (1 mmol) и тетрахидропиримидин **ТХПМ1** (1 mmol) у 2 mL 7,5% NaOH/H₂O (за синтезу **ИНТ3**) или NaOD/D₂O (за синтезу **ИНТ3-d**) на 70 °C. Ради праћења процеса декарбоксилације, за обе реакције су сваких пола сата снимани ¹H NMR спектри. Реакционе смеше су охлађене, филтриране, а добијени талог је испран 50% етанолом и сушен у вакууму. Производи **ИНТ3** и **ИНТ3-d** су рекристалисани из смеше EtOAc/MeOH (3:1) ради постизања задовољавајуће чистоте.

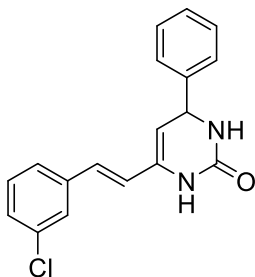
3.4. Спектроскопски подаци за једињења серије А

(E)-4-фенил-6-стирил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин (A1)

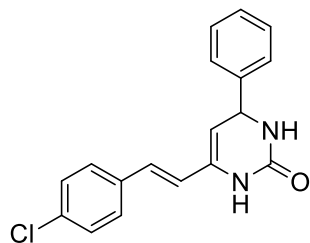


Светло жута прашкаста супстанца; принос: 84%; T.T. = 211 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 5,08–5,11 (*m*, 2H, H₄ + H₅), 6,62 (*d*, 1H, CH=CH–Ph, *J* = 16,6 Hz), 7,08 (*d*, 1H, CH=CH–Ph, *J* = 16,6 Hz), 7,24–7,45 (*m*, 11H, NH + CH_{Ar}), 8,44 (*s*, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 55,3, 104,2, 122,4, 126,3, 126,5, 127,3, 127,6, 127,8, 128,6, 128,8, 133,8, 136,6, 145,1, 153,3 ppm; ESI-MS (*m/z*) израчунато за C₁₈H₁₆N₂O: 276 [M]⁺; нађено: 277 [M + H]⁺.

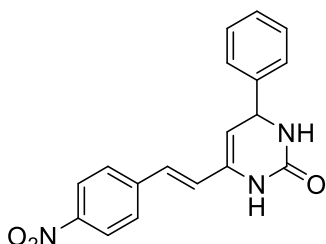
(E)-6-(3'-хлоростирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин (A2)



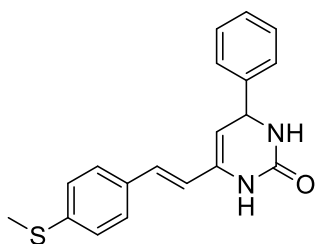
Жута прашкаста супстанца; принос: 81%; T.T. = 191 °C; ¹H NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆): δ_H 5,11 (*bs*, 2H, H₄ + H₅), 6,73 (*d*, 1H, CH=CH–Ph, *J* = 16,4 Hz), 7,06 (*d*, 1H, CH=CH–Ph, *J* = 16,4 Hz), 7,29–7,50 (*m*, 10H, NH + CH_{Ar}), 8,42 (*s*, 1H, NH) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, DMSO-*d*₆): δ_C 55,2, 105,1, 123,9, 125,2, 125,7, 126,0, 126,2, 127,3, 127,4, 128,6, 130,5, 133,5, 133,6, 138,9, 144,8, 153,1 ppm; ESI-MS (*m/z*) израчунато за C₁₈H₁₅ClN₂O: 310 [M]⁺; нађено: 333 [M + Na]⁺.

(E)-6-(4'-хлоростирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A3)

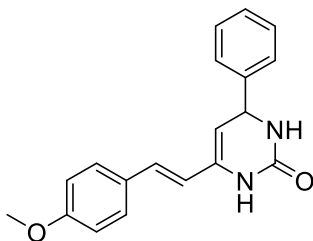
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 88%; Т.Т. = 204 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 5,10 (*bs*, 2H, H₄ + H₅), 6,67 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,6 Hz), 7,08 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,6 Hz), 7,23–7,48 (*m*, 10H, NH + CH_{Ar}), 8,48 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 55,3, 104,8, 123,2, 126,3, 127,3, 128,1, 128,6, 128,8, 132,2, 133,7, 135,6, 144,9, 153,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₁₈H₁₅ClN₂O: 310 [M]⁺; нађено: 333 [M + Na]⁺.

(E)-6-(4'-нитростирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A4)

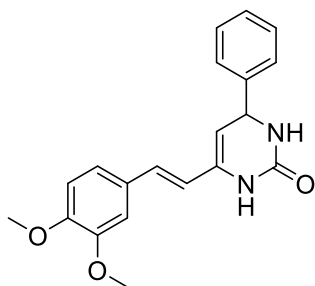
Жута прашкаста супстанца; принос: 73%; Т.Т. = 265 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 5,17 (*m*, 2H, H₄ + H₅), 6,87 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,6 Hz), 7,20 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,6 Hz), 7,25–7,37 (*m*, 7H, CH_{Ar}), 7,63 (*t*, 1H, CH_{Ar}, J = 7,8 Hz), 7,87 (*d*, 1H, CH_{Ar}, J = 7,8 Hz), 8,08 (*d*, 1H, CH_{Ar}, J = 7,4 Hz), 8,22 (*s*, 1H, NH), 8,48 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 55,3, 106,0, 120,6, 122,2, 125,4, 126,3, 127,4, 128,7, 130,4, 132,7, 133,5, 138,6, 144,8, 148,4, 153,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₁₈H₁₅N₃O₃: 321 [M]⁺; нађено: 322 [M + H]⁺.

(E)-6-(4'-метилтиостирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A5)

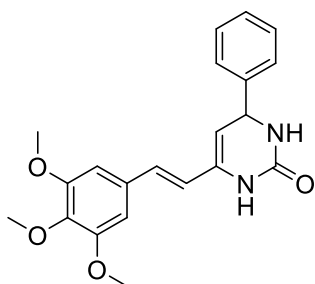
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 92%; Т.Т. = 202 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,46 (*t*, 3H, SCH₃), 5,05–5,10 (*m*, 2H, H₄ + H₅), 6,59 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,4 Hz), 7,5 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,4 Hz), 7,20–7,44 (*m*, 10H, NH + CH_{Ar}), 8,46 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,8, 55,3, 104,0, 121,6, 126,1, 126,3, 127,0, 127,3, 128,7, 133,3, 133,8, 137,9, 145,1, 153,4 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₁₉H₁₈N₂O₂: 322 [M]⁺; нађено: 345 [M + Na]⁺.

(E)-6-(4'-метоксистирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A6)

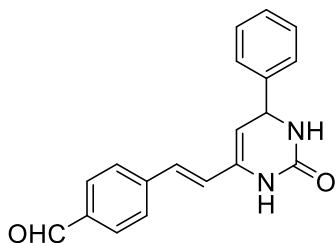
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 90%; Т.Т. = 198 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 3,75 (*s*, 3H, OCH₃), 5,01–5,09 (*m*, 2H, H₄ + H₅), 6,47 (*d*, 1H, CH=CH-Ph, J = 16,4 Hz), 6,89–7,41 (*m*, 11H, CH=CH-Ph + NH + CH_{Ar}), 8,42 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): 55,3, 103,0, 114,3, 120,1, 126,3, 127,3, 127,8, 128,6, 129,3, 133,9, 145,2, 153,4, 159,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₁₉H₁₈N₂O₂: 306 [M]⁺; нађено: 329 [M + Na]⁺.

(E)-6-(3',4'-диметоксистирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A7)

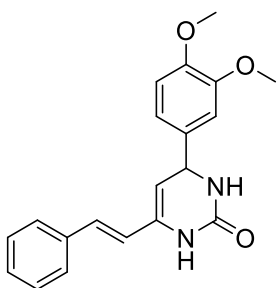
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 93%; Т.Т. = 232 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 3,73 (*m*, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 5,06 (*bs*, 2H, H₄ + H₅), 6,64 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,4$ Hz), 6,81–6,97 (*m*, 3H, CH_{Ar}), 7,10 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,4$ Hz), 7,21–7,47 (*m*, 6H, NH + CH_{Ar}), 8,45 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 54,9, 55,7, 55,8, 104,3, 110,5, 112,1, 118,3, 122,4, 126,4, 127,5, 128,8, 133,7, 136,7, 137,5, 148,2, 148,9, 153,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₂₀H₂₀N₂O₃: 336 [M]⁺; нађено: 359 [M + Na]⁺.

(E)-6-(3',4',5'-триметоксистирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A8)

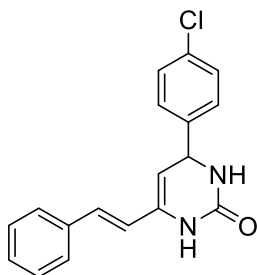
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 95%; Т.Т. = 245 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 3,65 (*s*, 3H, OCH₃), 3,78 (*s*, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 5,03–5,13 (*m*, 2H, H₄ + H₅), 6,61 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,6$ Hz), 6,74 (*s*, 2H, 2 $\times$ CH_{Ar}), 7,03 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,6$ Hz), 7,26–7,41 (*m*, 6H, CH_{Ar} + NH), 8,38 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 55,3, 56,0, 60,2, 103,9, 121,9, 126,2, 127,3, 127,8, 128,7, 132,4, 133,8, 145,1, 153,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₂₁H₂₂N₂O₄: 366 [M]⁺; нађено: 367 [M + H]⁺.

(E)-6-(4'-формилстирил)-4-фенил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A9)

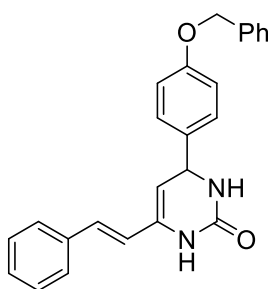
Жута прашкаста супстанца; принос: 79%; Т.Т. = 284 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 5,14 (*m*, 2H, H₄ + H₅), 6,70–7,93 (*m*, 12H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$ + NH + CH_{Ar}), 10,00 (*s*, 1H, CHO) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 55,1, 105,1, 123,9, 126,2, 127,0, 127,3, 128,6, 129,6, 132,1, 133,5, 136,6, 137,5, 144,8, 153,1, 193,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₁₉H₁₆N₂O₂: 304 [M]⁺; нађено: 305 [M + H]⁺.

(E)-4-(3',4'-диметоксифенил)-6-стирил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A10)

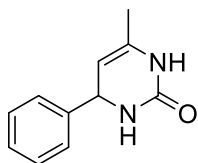
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 80%; Т.Т. = 246 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 3,73 (*m*, 6H, 2 $\times$ OCH₃), 5,06 (*br. s*, 2H, H₄ + H₅), 6,64 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,4$ Hz), 6,81–6,97 (*m*, 3H, CH_{Ar}), 7,06 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,4$ Hz), 7,14–7,47 (*m*, 6H, NH + CH_{Ar}), 8,45 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 54,9, 55,7, 55,8, 104,3, 110,5, 112,21, 118,3, 122,4, 126,4, 127,8, 128,8, 133,7, 136,7, 137,6, 148,2, 148,9, 153,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за C₂₀H₂₀N₂O₃: 336 [M]⁺; нађено: 359 [M + Na]⁺.

(E)-4-(4'-хлорофенил)-6-стирил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A11)

Бела прашкаста супстанца; принос: 81%; Т.Т. = 214 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 5,07–5,12 (*m*, 2H, $\text{H}_4 + \text{H}_5$), 6,63 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,6$ Hz), 7,12 (*d*, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph}$, $J = 16,6$ Hz), 7,24–7,47 (*m*, 10H, $\text{NH} + \text{CH}_{\text{Ar}}$), 8,58 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 54,6, 103,6, 122,3, 126,5, 127,9, 128,2, 128,6, 128,8, 131,9, 134,1, 136,6, 144,0, 153,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}$: 310 $[\text{M}]^+$; нађено: 333 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(E)-4-(4'-бензилоксифенил)-6-стирил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропириимидин (A12)

Светло жута прашкаста супстанца; принос: 76%; Т.Т. = 230 °C; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 4,95–5,21 (*m*, 4H, $\text{H}_4 + \text{H}_5 + \text{OCH}_2$), 6,93–7,45 (*m*, 16H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{Ph} + \text{NH} + \text{CH}_{\text{Ar}}$), 7,74 (*d*, 1H, $J = 3,6$ Hz, NH), 9,24 (*s*, 1H, NH) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 50,9, 69,4, 99,5, 114,8, 127,5, 127,7, 128,5, 137,2, 148,4, 152,3, 157,7, 165,9 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$: 382 $[\text{M}]^+$; нађено: 383 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6-метил-4-фенил-3,4-дихидропириимидин-2(1H)-он (ИНТЗ)

Бела прашкаста супстанца; принос: 56%; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,15 (*s*, 3H), 5,20 (*d*, $J = 4$ Hz, 1H), 7,53 (*d*, $J = 6$ Hz, 1H), 7,17–7,35 (*m*, 5H), 7,74 (1H), 9,40 (1H) ppm; ^{13}C (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 24,7, 52,8, 113,8, 126,4, 127,3, 128,4, 139,1, 144,4, 151,9 ppm.

3.5. Поступак за добијање 5-бромованилина (АЛД11)

У охлађени (0–5 °C) раствор ванилина (8,2 g, 0,05395 mol) у метанолу (50 mL) је укапаван бром (9,4 g, 0,1175 mol) током 30 минута. Смеша је затим мешана на собној температури 1,5 сат, након чега је у реакциону смешу укапавана ледена вода (30 mL). Добијени производ је филтриран, испран леденом водом и леденим 70% метанолом. Производ је осушен на вакууму при чему су добијени кристали бледо жуте боје као коначан производ.²⁵⁸ Принос 99% (10,2 g).

3.6. Поступак за добијање 5-јодованилина (АЛД12)

Ванилин (5 g) је растворен у 3,2% NaOH (50 mL) и загреван на 90°C да би се избегло таложење формиране соли натријум ванилата. У овако загрејан раствор је додат јод након чега је брзо дошло до таложења производа. Топао раствор је процеђен на вакууму, а добијени производ испран водом и 50% NaOH. Принос 70%.

3.7. Поступак за добијање 5-нитрованилина (АЛД13)

Ванилин (75 mmol) је растворен у дихлорометану (55 mL) на 5–10°C. Затим је у раствор укапавано 12 mL концентроване азотне киселине (брзина приближно 1,5

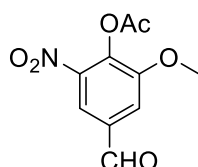
mL/мин). Током укапавања дошло је до таложења жутог производа, који је затим процеђен, испран дихлорометаном и водом и осушен на вакууму. Принос 63%.

3.8. Општа процедура за ациловање фенолне групе ванилина и њему сродних ароматичних алдехида

У реакциони суд са мешањем, охлађен на 0 °C (ледено купатило), додат је ванилин, 5-нитрованилин, 3-етокси-2-хидроксибензалдехид или 4-хидрокси-5-метокси-изофталалдехид (10 mmol) и триетиламин (18 mmol) у тетрахидрофурану (THF). Уз континуирано мешање се постепено укапава 18 mmol одговарајућег ацил хлорида (пропаноил хлорид, циклопропил карбоксил хлорид, бензоил хлорид, *пара*-метилбензоил хлорид, *пара*-метоксибензоил хлорид) или анхидрида сирћетне киселине, водећи рачуна да се температура одржава на 0 °C. Током додавања поменутог реагенса, долази до формирања белог талоба триетиламонијум-хлорида ($\text{Et}_3\text{N} \times \text{HCl}$). Након потпуног додавања, реакциона смеша се меша још 2 сата на собној температури. По завршетку реакције, THF се уклања упаравањем под вакуумом, а преостали сирови продукт се суспендује у врућој дестилованој води. Након кратког мешања, формирани талог се цеди, затим испира хладном водом и суши под вакуумом. У случају када се добије уљани производ, исти се екстрахује дихлорометаном ($3 \times 20 \text{ mL}$). Затим се органски слој суши изнад анхидрованог Na_2SO_4 , а растварач упарава под сниженим притиском. Добијени производ се на крају суши на ваздуху.

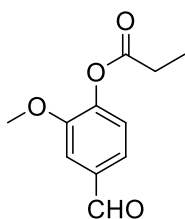
3.9. Спектроскопски подаци за естре ванилина и сродних ароматичних алдехида

4-Формил-2-метокси-6-нитрофенил ацетат (АЛД14)



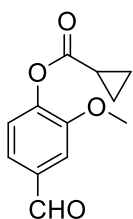
Светло жута прашкаста супстанца; принос: 34%; ^1H NMR (200 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 2,38 (s, 3H), 3,98 (s, 3H), 7,98 (d, $J = 1,7 \text{ Hz}$, 1H), 8,24 (d, $J = 1,7 \text{ Hz}$, 1H), 10,04 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{C} 20,2, 57,4, 116,5, 118,1, 134,2, 142,9, 153,2, 167,3, 190,7 ppm.

4-Формил-2-метоксифенил пропионат (АЛД15)

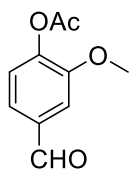


Жуто уље; принос: 95%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1,28 (t, 3H), 2,59–2,71 (q, 2H), 3,89 (s, 3H), 7,19–7,23 (m, 1H), 7,44–7,50 (m, 2H), 9,94 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 9,0, 27,3, 56,0, 76,4, 77,0, 77,6, 110,8, 123,3, 124,5, 135,0, 145,0, 151,9, 171,7, 190,9 ppm.

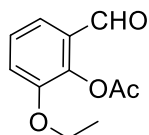
4-Формил-2-метоксифенил циклопропанкарбоксилат (АЛД16)



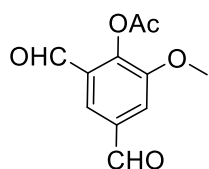
Жуто уље; принос: 80%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 1,28 (t, 3H), 2,59–2,71 (q, 2H), 3,89 (s, 3H), 7,19–7,23 (m, 1H), 7,44–7,50 (m, 2H), 9,94 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 9,0, 27,3, 56,0, 76,4, 77,0, 77,6, 110,8, 123,3, 124,5, 135,0, 145,0, 151,9, 171,7, 190,9 ppm.

4-Формил-2-метоксифенил ацетат (АЛД17)

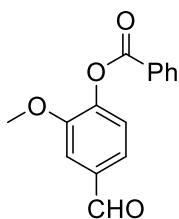
Бела прашкаста супстанца; принос: 83%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,35 (s, 3H), 3,91 (s, 3H), 7,20–7,27 (m, 1H), 7,46–7,50 (m, 2H), 9,95 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 20,6, 56,1, 110,9, 123,3, 124,6, 135,2, 151,9, 168,2, 190,8 ppm.

2-Етокси-6-формилфенил ацетат (АЛД18)

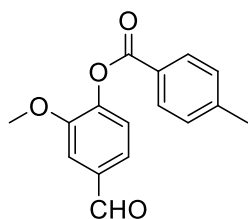
Жута кристална супстанца, принос: 77%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1,42 (t, $J = 7,0$ Hz, 3H), 2,40 (s, 3H), 4,09 (q, $J = 7,0$ Hz, 2H), 7,17–7,35 (m, 2H), 7,42–7,47 (m, 1H), 10,15 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 14,7, 20,4, 64,9, 118,9, 120,9, 126,6, 129,2, 141,9, 151,0, 168,5, 188,5 ppm.

2,4-Диформил-6-метоксифенил ацетат (АЛД19)

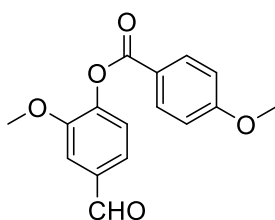
Жута прашкаста супстанца, принос: 71%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 2,44 (s, 3H), 3,96 (s, 3H), 7,72 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 7,97 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H), 10,20 (s, 1H), 10,01 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 20,4, 56,6, 114,6, 124,4, 129,5, 134,8, 146,5, 152,7, 167,8, 187,2, 190,0 ppm.

4-Формил-2-метоксифенил бензоат (АЛД20)

Жуто уље; принос: 88%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 3,89 (s, 3H), 7,47–7,66 (m, 5H), 8,14–8,24 (m, 3H), 9,94 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 56,1, 111,0, 123,5, 124,6, 128,4, 128,5, 128,8, 130,1, 130,3, 130,5, 133,6, 133,7, 134,4, 135,2, 145,2, 152,1, 164,0, 190,9 ppm.

4-Формил-2-метилфенил 4-метилбензоат (АЛД21)

Светло браон прашкаста супстанца; принос: 91%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,45 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 7,19–7,39 (m, 3H), 7,44–7,63 (m, 2H), 7,92–8,19 (m, 2H), 9,97 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 21,8, 56,1, 110,9, 123,5, 124,6, 129,1, 129,2, 129,5, 130,3, 130,5, 135,1, 144,6, 145,3, 152,1, 164,1, 190,9 ppm.

4-Формил-2-метилфенил 4-метоксибензоат (АЛД31)

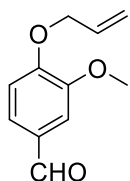
Браон прашкаста супстанца; принос: 77%. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 2,46 (s, 3H), 3,88 (s, 3H), 7,29–7,36 (m, 3H), 7,50–7,55 (m, 2H), 7,97–8,14 (m, 2H), 9,97 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 21,8, 56,1, 110,9, 123,5, 124,6, 126,0, 129,1, 129,3, 129,5, 130,1, 130,3, 130,5, 135,1, 144,6, 145,3, 145,4, 152,2, 164,1, 190,9 ppm.

3.10. Поступак за алкиловање ванилина

Смеша ванилина (20 mmol), одговарајућег алкил халогенида (*n*-бутил бромид, *n*-хексил бромид, *n*-хептил бромид, *n*-октил бромид, *n*-децил бромид, алил бромид, 2-метилаллил хлорид, бензил хлорид, 25 mmol), анхидрованог калијум-карбоната (40 mmol) и PEG 1000 (1 g) додата је у 10 mL DMF-а. Реакциона смеша је загревана у кућној микроталасној рерни на средњем новоу снаге (400–600 W) у циклусима од по 3 минута (три до пет пута). По завршетку реакције, у реакциони суд је додато 150 mL вруће дестиловане воде, након чега је смеша снажно мешана магнетном мешалицом 15 минута, све док се не појаве уљане капљице производа. Добијена емулзија је затим охлађена у замрзивачу 30 минута, након чега је очврсли производ филтриран и испран већом количином дестиловане воде. Уколико производ није очврснуо, реакциона смеша је екстрахована дихлорметаном (3 × 20 mL). Органски слој је сушен изнад анхидрованог Na₂SO₄, након чега је растварач упарен под сниженим притиском, а производ сушен на ваздуху. Жељени алдехиди су изоловани у високим приносима (68–96%).

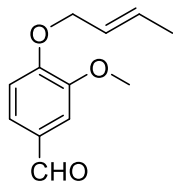
3.11. Спектроскопски подаци за *O*-алкил деривате ванилина

4-(Алилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД23)



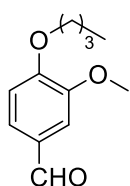
Светло браон уље; принос: 68%; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H 3,94 (*s*, 3H), 4,70–4,73 (*m*, 2H), 5,27–5,52 (*m*, 2H), 6,02–6,11 (*m*, 1H), 6,98 (*d*, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,38–7,52 (*m*, 2H), 9,85 (*s*, 1H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ_C 56,0, 69,7, 109,3, 111,9, 118,6, 126,3, 130,1, 132,1, 149,8, 153,4, 190,6 ppm.

(*E*)-4-(Бут-2-енилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД24)



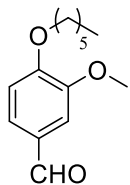
Браон уље; принос: 59%; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H 1,68 (*d*, 3H, *J* = 6,0 Hz, 3H), 3,71 (*s*, 3H), 4,47–4,72 (*m*, 2H), 5,65–5,79 (*m*, 2H), 6,99 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,34–7,53 (*m*, 2H), 9,89 (*s*, 1H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ_C 17,0, 56,8, 70,1, 111,7, 114,3, 125,7, 128,7, 128,8, 133,8, 150,1, 154,8, 190,7 ppm.

4-(Бутокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД25)

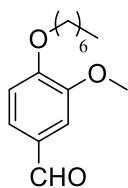


Светло браон прашкаста супстанца; принос: 69%; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H 0,98 (*t*, *J* = 8 Hz, 3H), 1,35–1,45 (*m*, 2H), 1,68–1,79 (*m*, 2H), 3,82 (*s*, 3H), 3,96–4,06 (*t*, *J* = 6,9 Hz, 2H), 6,97 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,05–7,44 (*m*, 2H), 9,88 (*s*, 1H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ_C 14,0, 19,9, 30,5, 56,8, 70,6, 112,2, 114,0, 125,7, 133,8, 150,0, 154,7, 190,7 ppm.

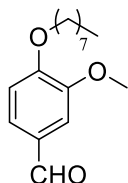
4-(Хексилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД26)



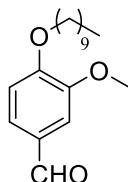
Светло браон прашкаста супстанца; принос: 75%; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ_H 0,91 (*t*, *J* = 8 Hz, 3H), 1,30–1,52 (*m*, 6H), 1,82–1,96 (*m*, 2H), 3,93 (*s*, 3H), 4,10 (*t*, *J* = 6,9 Hz, 2H), 6,97 (*d*, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,40–7,47 (*m*, 2H), 9,85 (*s*, 1H) ppm; ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ_C 14,0, 22,5, 25,6, 28,9, 31,5, 56,0, 69,2, 109,3, 111,4, 126,6, 129,8, 149,8, 154,1, 190,7 ppm.

4-(Хептилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД27)

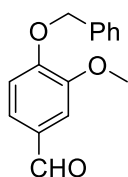
Светло браон прашкаста супстанца; принос: 92%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,89 (*t*, $J = 6,5$ Hz, 1H), 1,30–1,50 (*m*, 8H), 1,82–1,96 (*m*, 2H), 3,93 (*s*, 3H), 4,10 (*t*, $J = 6,9$ Hz, 2H), 6,97 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,40–7,47 (*m*, 2H), 9,85 (*s*, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 14,0, 22,6, 25,9, 28,9, 29,0, 31,7, 56,0, 69,2, 109,3, 111,3, 126,6, 129,8, 149,8, 190,7.

4-(Октилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД28)

Браон прашкаста супстанца; принос: 91%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,89 (*t*, $J = 6,5$ Hz, 1H), 1,28–1,51 (*m*, 10H), 1,82–1,96 (*m*, 2H), 3,93 (*s*, 3H), 4,10 (*t*, $J = 6,9$ Hz, 2H), 6,97 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,40–7,47 (*m*, 2H), 9,85 (*s*, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 14,1, 22,6, 25,9, 29,2, 29,3, 31,8, 56,0, 69,2, 109,3, 111,4, 126,6, 129,8, 149,8, 154,1, 190, 7 ppm;

4-(Децилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД29)

Светло браон прашкаста супстанца; принос: 96%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 0,89 (*t*, $J = 6,5$ Hz, 1H), 1,27–1,50 (*m*, 14H), 1,82–2,01 (*m*, 2H), 3,93 (*s*, 3H), 4,10 (*t*, $J = 6,9$ Hz, 2H), 6,97 (*d*, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,41–7,47 (*m*, 2H), 9,85 (*s*, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 14,1, 22,7, 25,8, 25,9, 28,9, 29,3, 29,4, 29,5, 31,9, 32,9, 56,0, 63,0, 69,2, 109,4, 111,4, 126,6, 129,8, 149,8, 154,2, 190,7.

4-(Бензилокси)-3-метоксибензалдехид (АЛД30)

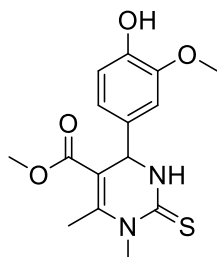
Браон прашкаста супстанца; принос: 83%; ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ_{H} 3,94 (*s*, 3H), 5,24 (*s*, 2H), 6,98 (*d*, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,35–7,43 (*m*, 7H), 9,83 (*s*, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ_{C} 56,0, 70,9, 112,4, 126,4, 127,1, 128,1, 128,6, 130,3, 136,0, 150,0, 153,5, 190,6 ppm.

3.12. Поступак за синтезу једињења серије Б

У балону запремине 25 mL растворено је 6 mmol *N*-метилтиоуреа и 2 mmol алдехида у смеши 1,4-диоксана и хлороформа (4/1, *v/v*) на собној температури. Након десет минута у реакциону смешу је додато 3 капи конц. HCl (36,5%). Додавање киселине је праћено променом боје у жуту. После два сата реакције у балон је додато 6 mmol метил ацетоацетата и 10 mol% 2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиола (ANP). Након 24 сата растварач је упарен, а сирова чврста супстанца је растворена у смеши етанола и воде (2:1, *v/v*). Производ је затим остављен у фрижидеру, где је након 24 сата дошло до формирања талог. Настали талог је филтриран, испран ацетоном и водом, а затим осушен на ваздуху. Добијени производи су рекристалисани из ацетона или из смеше етанола и воде (2/1, *v/v*) ради постизања високе чистоће.

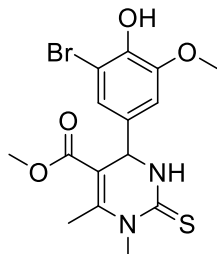
3.13. Спектроскопски подаци за једињења серије Б

Метил 4-(4'-хидрокси-3'-метоксифенил)-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б1)



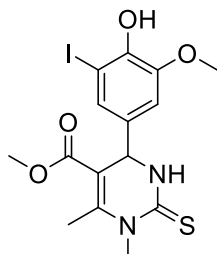
Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 25%; Т.Т. = 199 °C; IR (ATR) ν : 3326, 2942, 1630, 1510, 1352, 1080 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,51 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,62 (s, 3H), 3,71 (s, 3H), 5,10 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,52–6,57 (m, 1H), 6,68 (s, 1H), 6,72–6,76 (m, 1H), 9,01 (s, 1H), 9,77 (d, J = 4,6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 36,3, 51,7, 52,1, 55,7, 105,7, 110,6, 115,5, 118,3, 133,1, 146,3, 147,6, 147,8, 165,9, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 322 $[\text{M}]^+$; нађено: 323 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-(3'-бромо-4'-хидрокси-5'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиопиримидин-5-карбоксилат (Б2)



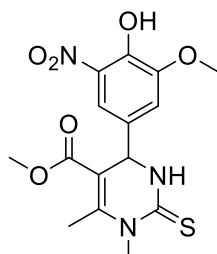
Бела прашкаста супстанца; принос: 63%; Т.Т. = 208°C; IR (ATR) ν : 3460, 3203, 1695, 1689, 1085 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,54 (s, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,78 (s, 3H), 5,12 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 6,77 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 9,83 (d, J = 4,6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 36,3, 51,6, 51,7, 56,2, 105,0, 109,2, 109,3, 121,5, 133,9, 143,4, 148,4, 148,5, 165,7, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{BrN}_2\text{O}_4\text{S}$: 401 $[\text{M}]^+$; нађено: 401 $[\text{M}]^+$ и 403 $[\text{M} + 2\text{H}]^+$.

Метил 4-(4'-хидрокси-3'-јодо-5'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиопиримидин-5-карбоксилат (Б3)

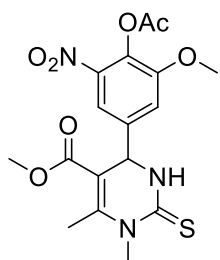


Бела прашкаста супстанца; принос: 73%; Т.Т. = 198°C; IR (ATR) ν : 3460, 3211, 1695, 1647, 1085 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,53 (s, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 5,10 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,76 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,02 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 9,60 (s, 1H), 9,82 (d, J = 4,6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 36,3, 56,1, 84,7, 105,1, 109,9, 127,3, 134,8, 145,9, 147,1, 148,3, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{IN}_2\text{O}_4\text{S}$: 448 $[\text{M}]^+$; нађено: 449 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

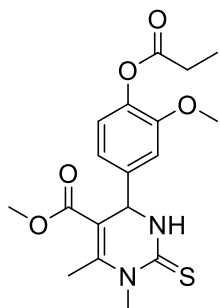
Метил 4-(4'-хидрокси-3'-нитро-5'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиопиримидин-5-карбоксилат (Б4)



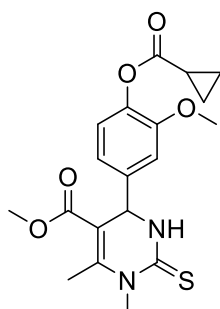
Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 77%; Т.Т. = 190°C; IR (ATR) ν : 3325, 1678, 1624, 1544, 1510, 1074 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,55 (s, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,85 (s, 3H), 5,19 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 7,09 (d, J = 2,0 Hz, 1H), 7,19 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,91 (d, J = 4,7 Hz, 1H), 10,52 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 36,4, 51,5, 51,8, 56,7, 104,5, 112,9, 114,1, 132,5, 136,9, 142,2, 148,9, 149,7, 165,6, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$: 367 $[\text{M}]^+$; нађено: 368 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-(4'-ацетокси-3'-нитро-5'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиопиримидин-5-карбоксилат (Б5)

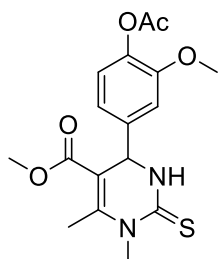
Жута прашкаста супстанца; принос: 46%; Т.Т. = 181 °C; IR (ATR) ν : 3178, 3024, 1772, 1708, 1537, 1346 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,32 (s, 3H), 2,57 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 5,30 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 7,33 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 10,01 (d, $J = 4,7$ Hz, 3H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 20,3, 36,5, 51,7, 51,9, 57,0, 103,9, 113,2, 115,5, 132,3, 141,3, 142,6, 149,5, 152,5, 165,5, 167,7 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$: 409 $[\text{M}]^+$; нађено: 410 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 1,2,3,4-тетрахидро-4-(3'-метокси-4'-пропаноилоксифенил)-1,6-диметил-2-тиоксопиримидин-5-карбоксилат (Б6)

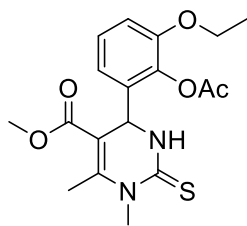
Бела прашкаста супстанца; принос: 28%; Т.Т. = 194 °C; IR (ATR) ν : 3213, 1755, 1712, 1647, 1413 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,11 (t, $J = 7,5$ Hz, 3H), 2,67–2,42 (m, 5H), 3,49 (s, 3H), 3,67 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 5,22 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,74 (dd, $J = 8,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 9,91 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 9,2, 16,5, 26,8, 36,4, 51,8, 52,0, 55,8, 105,2, 110,7, 117,7, 123,0, 138,9, 140,9, 148,4, 150,9, 165,8, 172,0, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 378 $[\text{M}]^+$; нађено: 379 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-(4'-(циклопропанкарбоксилокси)-3'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиоксопиримидин-5-карбоксилат (Б7)

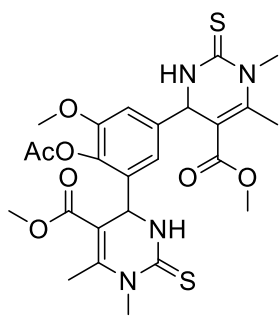
Бела прашкаста супстанца; принос: 75%; Т.Т. = 173 °C; IR (ATR) ν : 3196, 1735, 1708, 1651, 1537, 1138 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,92–1,09 (m, 3H), 1,81–1,94 (m, 1H), 9,90 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H), 2,53 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 5,21 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,73 (dd, $J = 8,2, 1,9$ Hz, 1H), 6,94 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 9,1, 12,5, 16,5, 36,3, 51,7, 52,0, 55,8, 105,2, 110,6, 117,7, 123,0, 138,7, 140,9, 148,4, 150,9, 165,7, 172,3, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 390 $[\text{M}]^+$; нађено: 391 $[\text{M} + \text{H}]^+$ и 413 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Метил 4-(4'-ацетокси-3'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиоксопиримидин-5-карбоксилат (Б8)

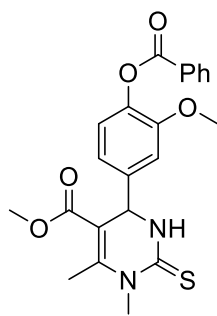
Бела прашкаста супстанца; принос: 66%; Т.Т. = 170 °C; IR (ATR) ν : 3188, 1761, 1707, 1616, 1074 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,24 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,66 (s, 3H), 3,74 (s, 3H), 5,22 (d, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,74 (dd, $J = 8,2, 2,0$ Hz, 1H), 6,95 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H), 7,04 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 9,91 (d, $J = 4,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 20,5, 36,4, 51,7, 52,0, 55,8, 105,1, 110,6, 117,7, 123,0, 138,8, 140,9, 148,4, 150,8, 165,7, 168,5, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 364 $[\text{M}]^+$; нађено: 365 $[\text{M} + \text{H}]^+$ и 387 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Метил 4-(2'-ацетокси-3'-етоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиоксопиримидин-5-карбоксилат (Б9)

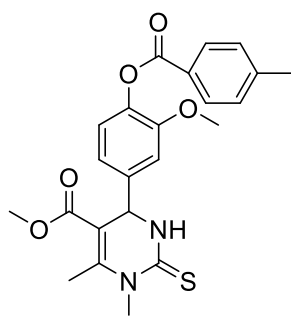
Бела прашкаста супстанца; принос: 79%; Т.Т. = 150°C; IR (ATR) ν : 3305, 3209, 1768, 1689, 1633 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,27 (*t*, J = 6,9 Hz, 3H), 2,29 (*s*, 3H), 2,51 (*s*, 3H), 3,50 (*s*, 3H), 3,56 (*s*, 3H), 4,00 (*q*, J = 6,9 Hz, 2H), 5,38 (*d*, J = 4,9 Hz, 1H), 6,74 (*dd*, J = 7,7, 1,5 Hz, 1H), 7,03 (*dd*, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 7,25–7,07 (*m*, 1H), 9,68 (*d*, J = 5,0 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,7, 16,4, 20,7, 36,4, 47,8, 51,6, 64,2, 104,5, 113,2, 118,7, 126,4, 134,4, 147,9, 150,3, 165,6, 168,0, 177,9 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 378 $[\text{M}]^+$; нађено: 379 $[\text{M} + \text{H}]^+$ и 401 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Диметил 4,4'-(4-ацетокси-5-метокси-1,3-фенилен)бис(1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б10)

Бела прашкаста супстанца; принос: 25%; Т.Т. = 220°C; IR (ATR) ν : 3254, 1760, 1684, 1624 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,29 (*s*, 3H), 2,51 (*m*, 6H), 3,46 (*s*, 3H), 3,49 (*s*, 3H), 3,67 (*s*, 3H), 3,72 (*s*, 3H), 5,18 (*d*, J = 4,6 Hz, 1H), 5,30 (*d*, J = 4,9 Hz, 1H), 6,46–6,49 (*m*, 1H), 6,91–6,97 (*m*, 1H), 9,69 (*d*, J = 5,0 Hz, 1H), 9,90 (*d*, J = 4,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,7, 20,7, 36,4, 47,6, 51,7, 51,8, 56,0, 104,7, 105,2, 110,1, 114,9, 134,3, 136,1, 140,3, 147,6, 148,3, 151,0, 165,5, 165,7, 168,0, 178,1, 178,4 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$: 562 $[\text{M}]^+$; нађено: 563 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

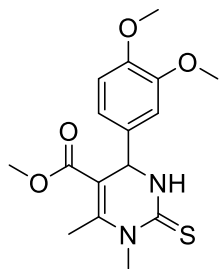
Метил 4-(4'-бензоилокси-3'-метоксифенил)-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиоксопиримидин-5-карбоксилат (Б11)

Бела прашкаста супстанца; принос: 74%; Т.Т. = 160°C; IR (ATR) ν : 3385, 1714, 1624, 1602 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,55 (*s*, 3H), 3,51 (*s*, 3H), 3,68 (*s*, 3H), 3,73 (*s*, 3H), 5,26 (*d*, J = 4,6 Hz, 1H), 6,80 (*dd*, J = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 7,01 (*d*, J = 1,8 Hz, 1H), 7,21 (*d*, J = 8,2 Hz, 1H), 7,60 (*t*, J = 7,5 Hz, 2H), 7,75 (*t*, J = 7,3 Hz, 1H), 8,07–8,11 (*m*, 2H), 9,93 (*d*, J = 4,7 Hz, 2H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 36,4, 51,7, 52,0, 55,9, 66,5, 105,1, 110,7, 117,8, 123,2, 128,6, 129,1, 129,8, 134,1, 138,8, 141,2, 148,5, 150,9, 164,0, 165,8, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 426 $[\text{M}]^+$; нађено: 427 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-[4'-(4''-метилбензоилокси)-3'-метоксифенил]-1,2,3,4-тетрахидро-1,6-диметил-2-тиоксопиримидин-5-карбоксилат (Б12)

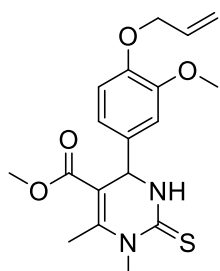
Бела прашкаста супстанца; принос: 34%; Т.Т. = 186°C; IR (ATR) ν : 3338, 1722, 1679, 1504 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,42 (*s*, 3H), 2,55 (*s*, 3H), 3,51 (*s*, 3H), 3,68 (*s*, 3H), 3,73 (*s*, 3H), 5,26 (*d*, J = 4,6 Hz, 1H), 6,80 (*dd*, J = 8,2, 1,9 Hz, 1H), 7,01 (*d*, J = 1,9 Hz, 1H), 7,19 (*d*, J = 8,1 Hz, 1H), 7,40 (*d*, J = 8,1 Hz, 2H), 7,99 (*d*, J = 8,2 Hz, 2H), 9,94 (*d*, J = 4,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 21,4, 36,4, 51,7, 52,0, 55,8, 105,2, 110,7, 117,8, 123,2, 125,9, 129,6, 129,9, 138,9, 141,1, 144,5, 148,4, 150,9, 164,0, 165,7, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 440 $[\text{M}]^+$; нађено: 441 $[\text{M} + \text{H}]^+$ и 463 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

Метил 4-(3',4'-диметоксифенил)-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б13)



Светло жута прашкаста супстанца; принос: 50%; Т.Т. = 157 °C; IR (ATR) ν : 3166, 2945, 1700, 1616, 1233, 1132 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,51 (s, 2H), 3,47 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,70 (s, 6H), 5,14 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,64–6,69 (m, 1H), 6,79–6,89 (m, 2H), 9,82 (d, J = 4,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,4, 36,7, 51,6, 51,6, 51,9, 55,6, 55,7, 105,5, 110,2, 112,0, 117,9, 134,5, 147,9, 148,4, 148,8, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунао за $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 336 $[\text{M}]^+$; нађено: 337 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

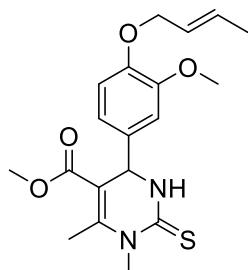
Метил 4-[4'-(алилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б14)



+ $\text{H}]^+$.

Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 94%; Т.Т. = 144 °C; IR (ATR) ν : 3348, 1710, 1648, 1504, 1079 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,51 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 4,50 (dt, J = 5,3, 1,5 Hz, 2H), 5,14 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 5,17–5,44 (m, 2H), 5,91–6,10 (m, 1H), 6,62–6,67 (m, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,82–6,91 (m, 1H), 9,82 (d, J = 4,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,4, 36,3, 51,6, 51,9, 55,6, 69,1, 105,4, 110,4, 113,6, 117,6, 117,8, 133,9, 134,8, 147,2, 148,0, 149,0, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунао за $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 362 $[\text{M}]^+$; нађено: 363 $[\text{M}$

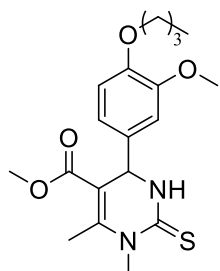
Метил (Е)-4-[4'-(бут-2''-енилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б15)



178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунао за $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 376 $[\text{M}]^+$; нађено: 377 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

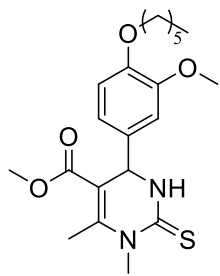
Жута прашкаста супстанца; принос: 31%; Т.Т. = 125 °C; IR (ATR) ν : 3203, 2961, 2944, 1705, 1629, 1512 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,68 (t, 3H), 2,53 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 4,42 (d, J = 5,7 Hz, 1H, *cis* изомер), 4,56 (d, J = 5,3 Hz, 1H, *trans* изомер), 5,15 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,55–5,96 (m, 2H), 6,63–6,68 (m, 2H), 6,81–6,93 (m, 1H), 9,84 (d, J = 4,6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 13,3, 16,4, 17,6, 36,3, 51,6, 51,9, 55,6, 64,1, 66,5, 68,8, 105,5, 110,3, 113,3, 117,8, 126,0, 126,6, 128,2, 129,7, 134,6, 147,4, 147,9, 149,0, 165,8,

Метил 4-[4'-(бутокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б16)

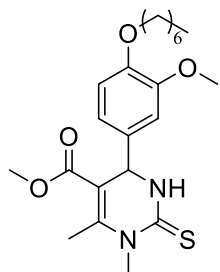


+ $\text{H}]^+$.

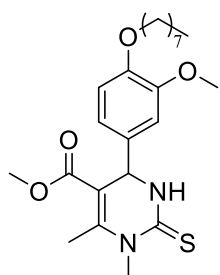
Жута прашкаста супстанца; принос: 29%; Т.Т. = 120 °C; IR (ATR) ν : 3183, 2947, 1706, 1629, 1510 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,91 (t, J = 7,3 Hz, 3H), 1,28–1,53 (m, 2H), 1,55–1,78 (m, 2H), 2,53 (s, 3H), 3,48 (s, 3H), 3,65 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 3,90 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 5,15 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,63–6,68 (m, 1H), 6,81–6,90 (m, 2H), 9,84 (d, J = 4,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 13,8, 16,4, 18,9, 31,0, 36,3, 51,6, 51,9, 55,6, 68,0, 105,5, 110,4, 113,0, 117,9, 134,4, 147,8, 148,0, 149,0, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунао за $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 378 $[\text{M}]^+$; нађено: 379 $[\text{M}$

Метил 4-[4'-(хексилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б17)

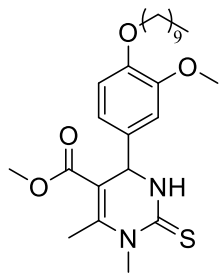
Жута прашкаста супстанца; принос: 46%; Т.Т. = 116 °C; IR (ATR) ν : 3184, 2945, 2853, 1697, 1509, 1246, 1081 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,84–0,90 (*m*, 3H), 1,24–1,42 (*m*, 6H), 1,61–1,71 (*m*, 2H), 2,45–2,61 (*m*, 3H, преклопљен са сигналом DMSO- d_6), 3,48 (*s*, 3H), 3,67 (*s*, 3H), 3,72 (*s*, 3H), 3,90 (*t*, $J = 6,5$ Hz, 2H), 5,15 (*d*, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,63–6,68 (*m*, 1H), 6,81–6,90 (*m*, 2H), 9,84 (*d*, $J = 4,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,0, 16,4, 22,2, 25,3, 25,6, 28,9, 31,1, 36,3, 51,6, 51,9, 55,6, 68,3, 105,5, 110,4, 113,1, 117,9, 134,5, 147,8, 147,9, 149,0, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 406 $[\text{M}]^+$; нађено: 407 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-[4'-(хептилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б18)

Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 48%; Т.Т. = 87 °C; IR (ATR) ν : 3180, 2924, 1697, 1623, 1509, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,86–0,90 (*m*, 3H), 1,25–1,36 (*m*, 8H), 1,61–1,71 (*m*, 2H), 2,52 (*s*, 3H), 3,48 (*s*, 3H), 3,64 (*s*, 3H), 3,72 (*s*, 3H), 3,89 (*t*, $J = 6,5$ Hz, 3H), 5,14 (*d*, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,62–6,67 (*m*, 1H), 6,80 (*s*, 1H), 6,81–6,89 (*m*, 1H), 9,82 (*d*, $J = 4,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,3, 16,5, 22,3, 25,7, 28,6, 29,0, 31,5, 36,3, 51,7, 52,0, 55,7, 68,4, 105,6, 110,5, 113,2, 118,0, 134,5, 147,9, 148,0, 149,0, 165,9, 178,2 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 420 $[\text{M}]^+$; нађено: 421 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

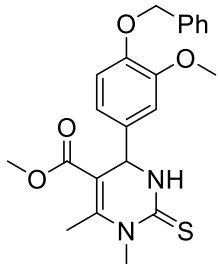
Метил 4-[4'-(октилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б19)

Наранџаста прашкаста супстанца; принос: 67%; Т.Т. = 119 °C; IR (ATR) ν : 3336, 3184, 2920, 2845, 1610, 1508, 1229, 1078 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,81–0,88 (*m*, 3H), 1,24–1,31 (*m*, 10H), 1,60–1,70 (*m*, 2H), 2,51 (*s*, 3H), 3,47 (*s*, 3H), 3,63 (*s*, 3H), 3,71 (*s*, 3H), 3,88 (*t*, $J = 6,5$ Hz, 2H), 5,13 (*d*, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,62–6,67 (*m*, 1H), 6,79–6,88 (*m*, 2H), 9,81 (*d*, $J = 4,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,0, 16,4, 22,2, 25,6, 28,7, 28,8, 28,9, 31,3, 36,2, 51,5, 51,9, 55,7, 68,4, 105,5, 110,5, 113,2, 117,9, 134,5, 147,8, 149,0, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 434 $[\text{M}]^+$; нађено: 435 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-[4'-(децилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б20)

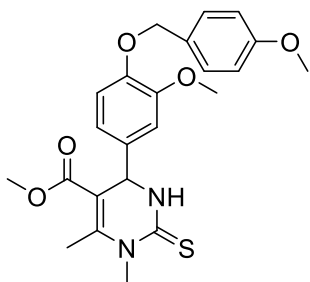
Светло наранџаста прашкаста супстанца; принос: 49%; Т.Т. = 90 °C; IR (ATR) ν : 3190, 2916, 2850, 1687, 1508, 1237, 1084 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,85 (*t*, 3H), 1,24–1,40 (*m*, 12H), 1,60–1,73 (*m*, 2H), 2,51 (*s*, 3H), 3,47 (*s*, 3H), 3,63 (*s*, 3H), 3,71 (*s*, 3H), 3,88 (*t*, $J = 6,4$ Hz, 2H), 5,14 (*d*, $J = 4,6$ Hz, 1H), 6,62–6,67 (*m*, 1H), 6,79–6,88 (*m*, 2H), 9,81 (*d*, $J = 4,7$ Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,0, 16,4, 22,2, 25,6, 28,8, 28,8, 28,9, 29,0, 29,1, 31,4, 36,2, 51,5, 51,9, 55,6, 68,4, 105,5, 113,2, 117,9, 134,5, 147,8, 149,0, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 462 $[\text{M}]^+$; нађено: 463 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-[4'-(бензилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б21)



Светло жута прашкаста супстанца; принос: 60%; Т.Т. = 130 °C; IR (ATR) ν : 3173, 2942, 1681, 1508, 1243, 1171, 1075 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,51 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,63 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 5,04 (s, 2H), 5,14 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,62–6,67 (m, 1H), 6,83 (s, 1H), 6,93–6,97 (m, 1H), 7,23–7,49 (m, 5H), 9,82 (d, J = 4,6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,4, 36,3, 51,6, 51,9, 55,7, 70,1, 105,5, 110,5, 113,7, 117,8, 127,7, 127,8, 128,4, 134,9, 137,2, 147,4, 148,0, 149,1, 165,8, 178,1 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: 412 $[\text{M}]^+$; нађено: 413 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Метил 4-{3'-метокси-4'-[(4''-метоксибензоил)окси]фенил}-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (Б22)



Жута прашкаста супстанца; принос: 34%; Т.Т. = 180 °C; IR (ATR) ν : 3152, 2939, 1730, 1604, 1247, 1162, 1067 cm^{-1} ; ^1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 2,55 (s, 3H), 3,51 (s, 3H), 3,68 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 5,25 (d, J = 4,6 Hz, 1H), 6,77–6,81 (m, 1H), 6,82 (s, 1H), 7,00–7,19 (m, 3H), 8,02–8,08 (m, 2H), 9,93 (d, J = 4,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (50 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 16,5, 36,3, 51,7, 52,0, 55,7, 55,8, 105,2, 110,7, 114,3, 117,8, 120,7, 123,2, 132,0, 138,9, 141,0, 148,4, 151,0, 163,7, 163,8, 165,7, 178,3 ppm; ESI-MS (m/z)

израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: 456 $[\text{M}]^+$; нађено: 457 $[\text{M} + \text{H}]^+$ и 479 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

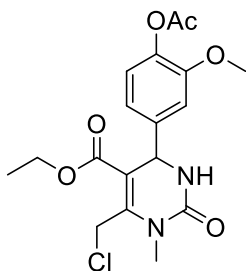
3.14. Поступак за синтезу једињења серије В

Метода 1: (*N*-метил)уреа (3 mmol), алдехид (2 mmol) и етил 4-хлорацетоацетат (2 mmol) су додати у лацијалну сирћетну киселину. Реакциона смеша је загревана на 60 °C током 48 сати. Након тога, растварач је упарен и у сирову смешу је додата смеша апсолутног етанола и H_2O (1:3). Овај раствор је остављен у фрижидеру током 48 сати. Формирани талог је процеђен и испран хладним 50% етанолом. Једињења **B1**, **B2** и **B4** су рекристалисана из ацетона, док је једињење **B3** рекристалисано из DCM.

Метода 2: Одговарајући алдехид (2 mmol), (*N*-метил)уреа (3 mmol) и етил 4-хлорацетоацетат (2 mmol) су помешани, а затим је додата каталитичка количина концентроване HCl. Након тога, смеша је загревана један сат, додато је 5 mL 96% EtOH и загревано под рефлуксом још два сата. Када је реакција завршена, реакциони суд је стављен у фрижидер на 12 сати. Производ је кристалисао и као такав је процеђен на вакууму и испран 70% етанолом. Где је било потребно, производ је рекристалисан из ацетона или DCM. Сва једињења су добијена у умереним приносима.

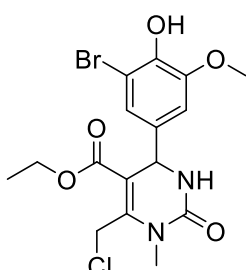
3.15. Спектроскопски подаци за једињења серије В

Етил 4-(4'-ацетокси-3'-метоксифенил)-6-(хлорометил)-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (В1)



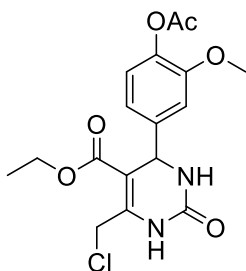
Жута прашкаста супстанца; принос: 55%; IR (ATR) ν : 3201, 3085, 2933, 1707, 1682 cm^{-1} ; T.T. = 137 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,15 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 2,23 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 3,72 (s, 3H), 4,11 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 5,09 (dd, J = 46,5, 11,9 Hz, 2H), 5,19 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 6,79 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 6,96 (s, 1H), 7,04 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 8,17 (d, J = 3,6 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 20,8, 29,4, 38,4, 52,4, 56,1, 60,9, 105,6, 111,0, 118,3, 123,4, 139,1, 142,3, 148,2, 151,2, 153,4, 164,9, 169,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 397 $[\text{M}]^+$; нађено: 397 $[\text{M}]^+$.

Етил 4-(3'-бромо-4'-хидрокси-5'-метоксифенил)-6-(хлорометил)-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (В2)



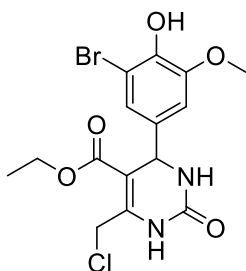
Светло наранџаста прашкаста супстанца; принос: 49%; IR (ATR) ν : 3330, 3230, 3106, 1707, 1689, 1652, 1464, 1221 cm^{-1} ; T.T. = 177 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,14 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 3,21 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 4,09 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 5,10 (d, J = 4,0 Hz, 3H), 6,79 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 6,88 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 8,10 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 9,52 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 29,3, 38,4, 52,0, 56,5, 60,8, 105,5, 109,6, 122,1, 135,3, 143,7, 148,1, 148,8, 153,3, 164,9 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BrClN}_2\text{O}_5$: 434 $[\text{M}]^+$; нађено: 435 $[\text{M}]^+$.

Етил 4-(4'-ацетокси-3'-метоксифенил)-6-(хлорометил)-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (В3)

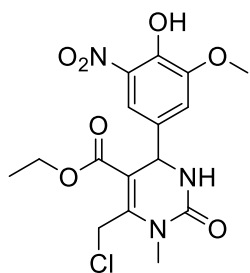


Бела прашкаста супстанца; принос: 50%; IR (ATR) ν : 3367, 3208, 3085, 2940, 1707, 1689, 1652, 1465, 1221 cm^{-1} ; T.T. = 168 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,13 (t, J = 7,1 Hz, 3H), 2,23 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 4,06 (q, J = 7,0 Hz, 2H), 4,69 (dd, J = 31,6, 10,6 Hz, 2H), 5,20 (d, J = 3,0 Hz, 1H), 6,74–6,88 (m, 1H), 6,94–7,12 (m, 2H), 7,87 (s, 1H), 9,52 (s, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 20,8, 54,0, 56,1, 60,5, 101,8, 111,3, 118,5, 123,4, 139,1, 143,2, 146,8, 151,1, 152,4, 164,6, 169,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClN}_2\text{O}_6$: 383 $[\text{M}]^+$; нађено: 383 $[\text{M}]^+$.

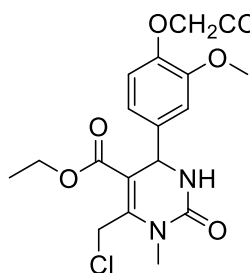
Етил 4-(3'-бромо-4'-хидрокси-5'-метоксифенил)-6-(хлорометил)-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (В4)



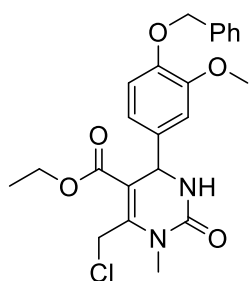
Жута прашкаста супстанца; принос: 74%; IR (ATR) ν : 3566, 3367, 3215, 3092, 2933, 1763, 1682, 1443, 1278 cm^{-1} ; T.T. = 133 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,12 (t, J = 7,1 Hz, 6H), 3,76 (s, 7H), 3,96–4,12 (m, 4H), 4,69 (s, 4H), 5,11 (d, J = 3,2 Hz, 2H), 6,86 (dd, J = 31,6, 1,6 Hz, 4H), 7,82 (s, 2H), 9,52 (s, 3H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 31,1, 53,6, 56,5, 60,4, 101,7, 109,5, 109,8, 122,2, 136,2, 143,6, 146,7, 148,8, 152,4, 164,6 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{BrClN}_2\text{O}_5$: 420 $[\text{M}]^+$; нађено: 420 $[\text{M}]^+$.

Етил 6-(хлорометил)-4-(4'-хидрокси-3'-метокси-5'-нитрофенил)-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B5)

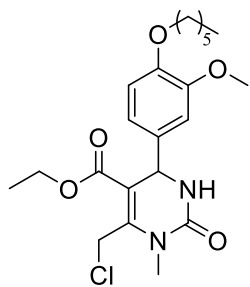
Жута прашкаста супстанца; принос: 67%; IR (ATR) ν : 3210, 3090, 2930, 1678, 1624, 1547, 1243, 1179 cm^{-1} ; T.T. = 194 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,14 (*t*, J = 7,1 Hz, 3H), 3,21 (*s*, 3H), 3,83 (*s*, 3H), 4,10 (*q*, J = 7,0 Hz, 2H), 4,96–5,22 (*m*, 3H), 7,11 (*d*, J = 1,6 Hz, 1H), 7,26 (*d*, J = 1,5 Hz, 1H), 8,19 (*d*, J = 3,8 Hz, 1H), 10,50 (*s*, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,3, 29,4, 38,3, 51,8, 56,9, 60,9, 104,9, 113,5, 114,4, 133,8, 137,2, 142,5, 148,7, 150,0, 153,2, 164,8 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_7$: 400 $[\text{M}]^+$; нађено: 400 $[\text{M}]^+$.

Етил 6-(хлорометил)-4-[4'-(2'-етокси-2'-оксоетокси)-3-метоксифенил]-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B6)

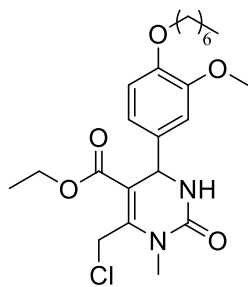
Светло беж прашкаста супстанца; принос: 41%; IR (ATR) ν : 3370, 2980, 1748, 1677, 1630, 1512, 1453, 1261, 1139 cm^{-1} ; T.T. = 115 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,17 (*dt*, J = 15,7, 7,1 Hz, 6H), 3,20 (*s*, 3H), 3,73 (*s*, 3H), 4,05–4,17 (*m*, 4H), 4,71 (*s*, 2H), 5,01–5,15 (*m*, 3H), 6,68 (*dd*, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 6,76–6,89 (*m*, 2H), 8,07 (*d*, J = 3,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 14,5, 29,3, 38,4, 52,2, 56,0, 60,8, 61,0, 65,7, 106,0, 111,0, 114,0, 118,2, 136,9, 147,0, 147,8, 149,2, 153,5, 166,0, 169,2 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_7$: 441 $[\text{M}]^+$; нађено: 441 $[\text{M}]^+$.

Етил 4-[4'-(бензилокси)-3'-метоксифенил]-6-(хлорометил)-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B7)

Светло жута прашкаста супстанца; принос: 52%; IR (ATR) ν : 3592, 3244, 3088, 2933, 1682, 1622, 1254, 1174 cm^{-1} ; T.T. = 156 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 1,14 (*t*, J = 7,1 Hz, 3H), 3,21 (*s*, 3H), 3,72 (*s*, 3H), 3,97–4,20 (*m*, 2H), 4,97–5,18 (*m*, 5H), 6,70 (*d*, J = 8,2 Hz, 1H), 6,85 (*d*, J = 1,1 Hz, 1H), 6,97 (*d*, J = 8,3 Hz, 1H), 7,29–7,42 (*m*, 5H), 8,08 (*d*, J = 3,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 29,3, 38,4, 52,3, 55,9, 60,8, 70,3, 106,1, 110,7, 113,9, 118,3, 128,2, 128,3, 128,9, 136,2, 137,5, 147,7, 149,4, 153,5, 165,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_5$: 445 $[\text{M}]^+$; нађено: 445 $[\text{M}]^+$.

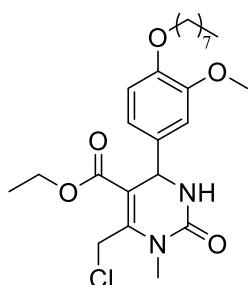
Етил 6-(хлорометил)-4-[4'-(хексилокси)-3-метоксифенил]-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B8)

Беж прашкаста супстанца; принос: 50%; IR (ATR) ν : 3367, 3201, 3085, 2926, 2356, 1668, 1678, 1514 cm^{-1} ; T.T. = 126 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ_{H} 0,86 (*t*, J = 6,8 Hz, 3H), 1,14 (*t*, J = 7,1 Hz, 3H), 1,43–1,21 (*m*, 6H), 1,77–1,56 (*m*, 2H), 3,21 (*s*, 3H), 3,70 (*s*, 3H), 3,89 (*t*, J = 6,5 Hz, 2H), 4,22–3,96 (*m*, 2H), 5,18–4,94 (*m*, 3H), 6,70 (*dd*, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 6,81 (*d*, J = 1,7 Hz, 1H), 6,88 (*d*, J = 8,3 Hz, 1H), 8,07 (*d*, J = 3,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6): δ_{C} 14,4, 14,4, 22,5, 25,6, 29,2, 29,3, 31,4, 38,4, 52,3, 55,9, 60,8, 68,6, 106,1, 110,7, 113,4, 118,4, 135,8, 147,7, 148,1, 149,3, 153,5, 165,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_5$: 439 $[\text{M}]^+$; нађено: 439 $[\text{M}]^+$.

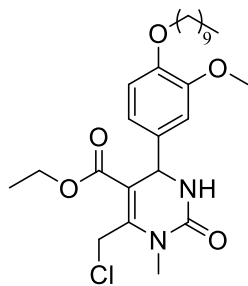
Етил 6-(хлорометил)-4-[4'-(хептилокси)-3'-метоксифенил]-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B9)

Жута прашкаста супстанца; Принос: 46%; IR (ATR) ν : 3208, 3100, 2923, 1822, 1708, 1678, 1513, 1238 cm^{-1} ; T.T. = 132 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 0,85 (*t*, J = 6,7 Hz, 3H), 1,15 (*t*, J = 7,1 Hz, 3H), 1,26–1,37(*m*, 8H), 1,63–1,70 (*m*, 2H), 3,20 (*s*, 3H), 3,70 (*s*, 3H), 3,89 (*t*, J = 6,5 Hz, 2H), 4,03–4,14 (*m*, 2H), 4,95–5,25 (*m*, 8H), 6,69–6,91 (*m*, 3H), 8,05 (*d*, J = 3,8 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{C} 14,4, 22,5, 25,9, 28,9, 29,2, 29,3, 31,7, 38,4, 52,3, 55,9, 60,8, 68,7, 106,2, 110,8, 113,5, 118,4, 135,8, 147,6, 148,2, 149,3, 153,5, 165,0 ppm; ESI-MS (m/z)

израчунато за $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{ClN}_2\text{O}_5$: 453 $[\text{M}]^+$; нађено: 453 $[\text{M}]^+$.

Етил 6-(хлорометил)-4-[3'-метокси-4'-(октилокси)фенил]-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B10)

Светло браон прашкаста супстанца; принос: 43%; IR (ATR) ν : 3200, 3085, 2925, 1763, 1682, 1510, 1172 cm^{-1} ; T.T. = 117 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 0,84 (*t*, J = 6,9 Hz, 3H), 1,15 (*t*, J = 7,1 Hz, 3H), 1,25–1,37 (*m*, 10H), 1,62–1,70 (*m*, 2H), 3,21 (*s*, 3H), 3,70 (*s*, 3H), 3,89 (*t*, J = 6,5 Hz, 2H), 4,05–4,12 (*m*, 2H), 5,04–5,12 (*m*, 3H), 6,69–6,91 (*m*, 3H), 8,05 (*d*, J = 3,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{C} 14,4, 22,5, 26,0, 29,1, 29,2, 29,3, 31,7, 38,4, 52,3, 55,9, 60,8, 68,7, 106,2, 110,8, 113,5, 118,4, 135,8, 147,6, 148,2, 149,3, 153,5, 165,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{ClN}_2\text{O}_5$: 467 $[\text{M}]^+$; нађено: 469 $[\text{M} + 2\text{H}]^+$.

Етил 6-(хлорометил)-4-[4'-(децилокси)-3'-метоксифенил]-1-метил-2-оксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат (B11)

Браон прашкаста супстанца; принос: 68%; IR (ATR) ν : 3208, 3092, 2924, 2854, 1709, 1682, 1512, 1250 cm^{-1} ; T.T. = 102 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{H} 0,84 (*t*, J = 6,5 Hz, 3H), 1,15 (*t*, J = 7,1 Hz, 3H), 1,24–1,37 (*m*, 14H), 1,65 (*dd*, J = 14,0, 6,6 Hz, 2H), 3,20 (*s*, 3H), 3,70 (*s*, 3H), 3,89 (*t*, J = 6,4 Hz, 2H), 4,09 (*dt*, J = 7,0, 5,1 Hz, 2H), 5,04–5,12 (*m*, 3H), 6,69–6,91 (*m*, 3H), 8,04 (*d*, J = 3,7 Hz, 1H) ppm; ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ_{C} 14,4, 22,5, 26,0, 29,1, 29,2, 29,3, 29,4, 31,7, 38,4, 52,3, 55,0, 60,8, 68,6, 106,1, 110,7, 113,5, 118,4, 135,8, 147,6, 148,2, 149,3, 153,5, 165,0 ppm; ESI-MS (m/z) израчунато за $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{ClN}_2\text{O}_5$: 495 $[\text{M}]^+$; нађено: 495 $[\text{M}]^+$.

3.16. Кристалографска анализа

За одређивање кристалних структура једињења **A1**, **A5**, **B11**, **B16** и **B4** коришћена је дифракција рендгенских зрака на монокристалу. Експериментални подаци су прикупљени на Gemini S дифрактометру помоћу CrysAlisPRO²⁵⁹ програмског пакета на собној температури. Коришћено зрачење је монохроматизовано. Структуре су решене директним методама (full-matrix методом најмањег квадрата на свим F2) коришћењем програмског пакета SHELX.²⁶⁰ Сви неводонични атоми су рафинисани анизотропно. Графички прикази структура су припремљени коришћењем програма MERCURY.²⁶¹ Остали програми који су коришћени за приказ и припрему добијених података су: WINGX,²⁶² PLATON,²⁶³ PARST,²⁶⁴ OLEX2.²³⁸

Табела 28. Основни кристалографски подаци.

Једињење	A1	A5	B11	B16	B4
Молекулска формула	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂ S	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ OS	C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₆ S	C ₁₉ H _{25.50} N ₂ O ₄ S	C ₁₅ H ₁₈ BrClN ₂ O ₆
M_r	354,46	322,41	470,53	377,97	437,67
Кристални систем	триклинични	триклинични	триклинични	триклинични	триклинични
Тип просторне групе	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$	$P\bar{1}$
a [Å]	6,0354(5)	5,9929(2)	8,7316(4)	11,4341(6)	9,8298(6)
b [Å]	11,7414(6)	10,0676(3)	10,4614(5)	13,8821(8)	10,5412(5)
c [Å]	14,2407(10)	14,2770(5)	13,5621(7)	13,9792(8)	10,6081(6)
α [°]	75,311(5)	96,061(3)	80,546(4)	74,365(5)	104,133(4)
β [°]	89,752(6)	95,541(3)	81,700(4)	82,173(5)	117,039(6)
γ [°]	79,510(5)	105,283(3)	74,121(4)	70,346(5)	117,039(6)
V [Å ³]	958,93(12)	819,31(5)	1168,90(10)	2009,8(2)	888,41(10)
Z	2	2	2	4	2
D_{calc} [Mg/m ³]	1,228	1,307	1,337	1,249	1,636
Врста зрачења	Mo $K\alpha$	Mo $K\alpha$	Cu $K\alpha$	Mo $K\alpha$	Mo $K\alpha$
μ [mm ⁻¹]	0,184	0,203	1,590	0,190	2,498
Димензије узорка [mm ³]	0,23 × 0,42 × 0,50	0,16 × 0,18 × 0,52	0,57 × 0,40 × 0,35	0,50 × 0,37 × 0,32	0,48 × 0,42 × 0,39
Прикупљање података					
θ вредности [°]	$\theta_{\text{max}} = 26,37,$ $\theta_{\text{min}} = 2,63$	$\theta_{\text{max}} = 26,37,$ $\theta_{\text{min}} = 2,72$	$\theta_{\text{max}} = 71,7,$ $\theta_{\text{min}} = 3,3$	$\theta_{\text{max}} = 29,4,$ $\theta_{\text{min}} = 2,1$	$\theta_{\text{max}} = 26,37$ $\theta_{\text{min}} = 2,13$
Опсег за h, k, l	$-7 \leq h \leq 7,$ $-14 \leq k \leq 14,$ $-17 \leq l \leq 17$	$-7 \leq h \leq 7,$ $-12 \leq k \leq 12,$ $-17 \leq l \leq 17$	$-10 \leq h \leq 10,$ $-12 \leq k \leq 12,$ $-15 \leq l \leq 16$	$-14 \leq h \leq 15,$ $-18 \leq k \leq 18,$ $-19 \leq l \leq 18$	$-12 \leq h \leq 12,$ $-13 \leq k \leq 13,$ $-13 \leq l \leq 13$
Измерене рефлексије	13147	17044	7855	18026	21807
Независне рефлексије	3919	3356	4451	9315	3637
R_{int}	0,0393	0,0259	0,0210	0,0260	0,0420
Параметри утацњавања					
Метода утацњавања	full-matrix метода најмањег квадрата на свим F2	full-matrix метода најмањег квадрата на свим F2	full-matrix метода најмањег квадрата на свим F2	full-matrix метода најмањег квадрата на свим F2	full-matrix метода најмањег квадрата на свим F2
S	1,061	1,026	1,041	1,024	1,093
$\Delta\rho_{\text{max}} / \text{e Å}^{-3}$	1,132	0,613	0,28	0,49	0,627
$\Delta\rho_{\text{min}} / \text{e Å}^{-3}$	-0,434	-0,391	-0,35	-0,29	-0,755

3.17. *In vitro* биолошка испитивања

3.17.1. Ћелијске културе

Ћелијске линије хуманог карцинома грлића материце (HeLa), аденокарцинома плућа (A549), карцинома дебелог црева (LS174), агресивни трипло негативан карцином дојке (MDA-MB-231), епителни аденокарцином дојке (MCF-7) и хронична мијелоидна леукемија (K562) као и нормалне хумане ћелије феталних фибробласта плућа (MRC-5), одржаване су и узгајане у одговарајућим подлогама за раст ћелија: RPMI-1640 медијум (Sigma) за HeLa, A549, LS174, K562 и MRC-5 ћелије, односно DMEM за MDA-MB-231 и MCF-7 ћелије. Све подлоге су биле са додатком 10% феталног говеђег серума, L-глутамина и раствора пеницилина и стрептомицина (Sigma). Све ћелијске линије су инкубиране на 37 °C у атмосфери са 5% CO₂.

3.17.2. Третман ћелијских линија

HeLa (2 000–3 000 ћелија по бунарићу), LS174 (7 000 ћелија по бунарићу), A549 (5 000 ћелија по бунарићу), MDA-MB-231 (5 000 ћелија по бунарићу), MCF-7 (7 000 ћелија по бунарићу) и MRC-5 (5 000 ћелија по бунарићу) ћелије су засејане у микротитрационе плоче са 96 бунарића равног дна један дан пре третмана. K562 ћелије, које расту у суспензији (5 000 ћелија по бунарићу), засејане су у исте плоче два сата пре додавања испитиваних једињења. Након 24 сата инкубације, адхерентне ћелије су третиране различитим концентрацијама испитиваних једињења и инкубиране 72 сата. Ћелије су третиране различитим концентрацијама једињења у опсегу од 6,25 до 100 µM или од 12,5 до 200 µM и инкубиране током 72 часа. Контролни узорци третирани су само комплетном хранљивом подлогом. Коначна концентрација DMSO није прелазила 2,5%, што је сматрано нетоксичним. Бунарићи који су садржали само подлогу и једињења, без ћелија, коришћени су као празни узорци. Све испитиване концентрације су рађене у три понављања.

3.17.3. Одређивање преживљавања ћелија

MTT тест се користи за испитивање цитотоксичног дејства одређених супстанци и пролиферације у *in vitro* условима. Митохондријална сукцинат дехидрогеназа метаболички активних ћелија редукује тетразолијумове соли [3-(4,5-диметилтиазол-2)-2,5-дифенилтетразолијум бромид, MTT] што доводи до формирања тамно љубичастих кристала формазана који се акумулирају у ћелијама. Количина произведеног формазана је пропорционална броју живих ћелија. У овом случају је коришћена Mosmann-ова²⁶⁵ метода са модификацијама Ohno-а и Abe-а.²⁶⁶ Након третмана ћелија током 72 сата, 20 mL MTT раствора (5 mg/mL физиолошког раствора пуферованог фосфатом) је додато у сваки бунарић и инкубирано наредна 4 сата на 37 °C у влажној атмосфери од 95% ваздуха/5% CO₂ (v/v). Вијабилне ћелије редукују MTT боју у нерастворан формазан који се затим екстрахује додавањем 100 µL 100 g/L натријум додецил сулфата. Интензитет апсорпције светлости је прочитан након 24 сата коришћењем читача плоча за ензимски имуносорбентни тест (ELISA) на 570 nm. Број живих ћелија био је пропорционалан интензитету апсорпције. Сви експерименти су урађени у три понављања. Цитотоксичне активности су представљене као IC₅₀ вредности.

3.17.4. Проточна цитометрија

У циљу бољег разумевања утицаја испитиваних једињења на пролиферацију, смрт ћелија и промене на молекулском нивоу, примењене су различите методе које омогућавају квантитативно и квалитативно праћење ћелијских одговора. Проточна цитометрија је коришћена као кључна техника за анализу различитих физиолошких и молекулских параметара ћелија, која омогућава прецизну и брзу процену променљивих као што су распоред ћелија у фазама ћелијског циклуса, активација каспаза, ниво интрацелуларних реактивних врста кисеоника (ROS), као и промене у експресији специфичних гена. Ова метода, заснована на мерењу расејања светлости и флуоресценције појединачних ћелија које пролазе кроз ласерски сноп, омогућава истовремену анализу великог броја параметара на нивоу појединачне ћелије.

3.17.4.1. Анализа ћелијског циклуса

HeLa и K562 ћелије су засејане у микротитрационе плоче са шест бунарића у хранљивом медијуму RPMI-1640. Након 24 сата инкубације, HeLa ћелије су третиране једињењима серије **A** у концентрацијама IC_{50} или $2 \times IC_{50}$, док су K562 ћелије третиране једињењима серије **B** у пет различитих концентрација (IC_{50} , $2 \times IC_{50}$, $3 \times IC_{50}$, $4 \times IC_{50}$ и $5 \times IC_{50}$) и једињењима **B** у концентрацијама IC_{50} или $2IC_{50}$. После третмана, ћелије су трипсинизоване, фиксиране у леденом 70% етанолу и чуване на $-20^{\circ}C$ најмање недељу дана. Након фиксације, ћелије су испране у PBS-у, а за уклањање РНК, ћелије су третиране са РНазом А ($100 \mu g/mL$) на температури од $37^{\circ}C$ током 30 минута. Затим је додат пропидијум јодид (PI; $40 \mu g/mL$) и ћелије су инкубиране током 30 минута. Дистрибуција ћелијског циклуса и садржај ДНК одређени су на проточном цитометру BD FACSCalibur™. Анализа је извршена на минимум 10 000 ћелија по узорку уз помоћ софтвера BD CellQuestPro™. Проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса (subG1, G1, S и G2/M) је анализиран у три независна експеримента.

3.17.4.2. Одређивање циљних каспаза

Ћелије K562 (250 000 ћелија по бунарићу) су засејане у микротитрационим плочама са шест бунарића у комплетној RPMI-1640 подлози за раст ћелија. Узорци ћелија су били инкубирани са специфичним, неповратним пептидним инхибиторима каспазе (примењеним у концентрацији од $40 \mu M$) у трајању од 2 сата пре додавања тестираних једињења. Коришћени су следећи инхибитори каспаза: Z-DEVD-FMK као инхибитор каспазе-3, Z-IETD-FMK као инхибитор каспазе-8 и Z-LEHD-FMK као инхибитор каспазе-9, у складу са претходно описаном методом.²⁶⁷ За свако тестирано једињење, један узорак ћелија није био претходно третиран инхибиторима каспаза, већ му је било додато само тестирано једињење. Сва једињења су коришћена при $2 \times IC_{50}$ концентрацији. Након 24 часа инкубације, ћелије су сакупљене и обрађене у складу са протоколом за анализу ћелијског циклуса методом проточне цитометрије и одређен је проценат ћелија у subG1 фази ћелијског циклуса.

3.17.4.3. Одређивање интрацелуларног нивоа ROS

K562 ћелије (250 000 ћелија по бунарићу) су засејане у микротитрационим плочама са шест бунарића у комплетној RPMI-1640 подлози за раст ћелија. Два сата касније, ћелије су третиране IC_{50} концентрацијама једињења **B18**, **B19** и **B20**. Контролним ћелијама је додата само комплетна подлога за раст. Након 24 сата инкубације, K562 ћелије су сакупљене, испране PBS-ом и инкубиране у PBS раствору који садржи $30 \mu M$ ћелијски пропустљив 2',7'-дихлородихидрофлуоресцеин диацетат, у трајању од 45 минута на $37^{\circ}C$.

°C, у складу са претходно описаним протоколом.²⁶⁸ Након инкубације, ћелије су поново испране PBS-ом и анализирани применом проточне цитометрије. Интензитет зелене флуоресценције, коју емитије формирани дихлорофлуоресцеин у контролним и третираним K562 ћелијама, детектован је у FL1 каналу. Изведена су два независна експеримента.

3.17.5. Анализа експресије гена

Ћелије K562 су засејане у стерилне флашкове за одржавање ћелијских култура запремине 25 cm² (2 × 10⁶ ћелија по фласку) и третиране су IC₅₀ концентрацијама једињења **B18**, **B19** и **B20**. Контролне ћелије су одржаване само у комплетном медијуму за раст ћелија. Након икубације од 24 сата, K562 ћелије су сакупљене, испране PBS-ом и чуване на –80 °C. Укупна РНК је изолована из K562 ћелија коришћењем TRI Reagent™ раствора (Ambion), у складу са упутством произвођача. Концентрација и квалитет изолованог РНК за сваки узорак су одређени спектрофотометријски (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific). За обрнуту транскрипцију 1 µg укупног РНК у једноланчану комплементарну ДНК коришћен је High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Ниво експресије одабраних гена је праћен методом квантитативног PCR-а у реалном времену (енг. *Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR) на апарату LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Немачка) TaqMan® техником. За анализу експресије су коришћени комерцијални тестови: Hs01548727_m1 за *MMP2*, Hs00957562_m1 за *MMP9* и Hs00900055_m1 за *VEGFA*. Као ендогена контрола је коришћен *GAPDH* ген (Hs02758991_g1), а добијени резултати су квантификовани применом компаративне ddCt методе и анализирани помоћу LightCycler® 480 софтвера.

3.17.6. Одређивање односа ћелија које су у апоптози и некрози методом FITC Annexin V/пропидијум јодид бојења

K562 ћелије (250 000 по бунарићу) су засејане у микротитрационе плоче са шест бунарића, а након 2 сата третиране су са 2×IC₅₀ концентрацијама једињења **B1** и **B2** и инкубиране 24 сата. Након инкубације, ћелије су сакупљене, опране фосфатним пуфером (PBS), и додати су им реагенси за бојење: анексин (FITC Annexin V) и пропидијум јодид (PI), а затим су инкубиране 15 минута на собној температури у тами. Анализа је извршена на проточном цитометру BD FACSCalibur™ уз коришћење софтвера BD CellQuest Pro™. За контролне и третиране узорке ћелија одређени су проценти: живих (Annexin V[–]/PI[–]), рано апоптотских (Annexin V⁺/PI[–]), касно апоптотских/секундарно некротичних (Annexin V⁺/PI⁺) и мртвих (Annexin V[–]/PI⁺) ћелија. Изведена су три независна експеримента.

3.17.7. Одређивање антимикуробне активности

За испитивање антимикуробне активности одабраних једињења коришћено је 10 стандардних ATCC култура (*American Type Culture Collection*) од тога пет сојева бактерија: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Klebsiella oxytoca* (ATCC 8724), *Proteus mirabilis* (ATCC 29906) и *Escherichia coli* (ATCC 25922), и пет врста гљива: *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533), *Mucor mucedo* (ATCC 20094), *Penicillium italicum* (ATCC 10454), *Aspergillus flavus* (ATCC 9170) и *Aspergillus niger* (ATCC 16888).

Бактеријски сојеви су изоловани из култура узгајаних преко ноћи на Mueller-Hinton агар подлози, а суспензије су припремљене у стерилној дестилованој води. Стандардизација суспензија извршена је помоћу 0,5 Mc Farland стандарда, што одговара

приближно концентрацији од 10^8 CFU/mL (енг. *Colony Forming Unit*, CFU). Суспензије спора гљива припремљене су од култура старих 3 до 7 дана, узгајаних на кромпир-декстрозним агар подлогама. Споре су испране стерилном дестилованом водом и замућеност суспензије је одређена спектрофотометријски на 530 nm, у складу са препорукама NCCLS (1998), при чему је добијена концентрација од приближно 10^6 CFU/mL.

Минимална инхибиторна концентрација (енг. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) испитиваних једињења одређена је применом микродилуционе методе у стерилним микротитрационим плочама са 96 бунарића. MIC представља најнижу концентрацију супстанце која спречава видљиви раст микроорганизама. За бактерије, процена раста је извршена употребом ресазурина као индикатора метаболичке активности ћелија (ензимска редукција ресазурина до резоруфина). Насупрот томе, код гљива је процена инхибиторног ефекта вршена визуелним читавањем, без додатка индикатора.

Почетни раствори испитиваних једињења припремљени су растварањем у 5% DMSO. Након тога су извршене серије дуплих разблаживања у опсегу концентрација од 13 до 0,015 mg/mL, у стерилним микротитрационим плочама које су садржале Mueller-Hinton подлогу за бактерије и *Sabouraud* декстрозну подлогу за гљивице. У бунариће су додаване одговарајуће разређене суспензије микроорганизама. За бактерије је додаван и раствор ресазурина, док је код гљива његова примена изостављена.

Инкубација је трајала 24 часа на 37 °C за бактерије и 72 часа на 28 °C за гљиве. MIC вредност је одређена као најнижа концентрација једињења која спречава промену боје ресазурина из плаве у розе (за бактерије), односно као најнижа концентрација која онемогућава видљив раст (за гљиве). Као позитивне контроле коришћени су стрептомицин за бактерије и флуконазол за гљиве, док је у контролној серији испитан могући утицај 5% DMSO на раст микроорганизама (тзв. негативна контрола).

3.17.8. Испитивање инхибиције α -глюкозидазе

Могући инхибиторни ефекат испитиваних једињења на α -глюкозидазу испитиван је према модификованом поступку који су описали McCue и сарадници²⁶⁹ а који је раније детаљније представљен у литератури.²⁷⁰ Раствор α -глюкозидазе из *Saccharomyces cerevisiae* припремљен је у концентрацији од 400 mU/mL у 0,1 М фосфатном пуферу (pH = 6,8). Смеше раствора једињења у пуферу и раствора ензима инкубиране су у микротитрационим плочама са равним дном, на температури од 37 °C у трајању од 15 минута. Ензимска реакција је започета додавањем супстрата, раствора *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозида (PNP-G) концентрациј од 1,5 mg/mL у пуферу. Апсорбанца реакционе смеше је прво измерена на 405 nm (A_1), затим је инкубација настављена на 37 °C још 15 минута, након чега је измерена друга вредност апсорбанце (A_2) на истој таласној дужини. Као позитивна контрола коришћена је акарбоза.

Проценат инхибиције активности α -глюкозидазе израчунат је према једначини:

$$I (\%) = 100 \times (A_2S - A_1S) / (A_2B - A_1B) \quad (4)$$

где A_1B и A_2B представљају апсорбанце узорка без једињења (фосфатни пуфер, DMSO, раствор ензима и раствор PNP-G), а A_1S и A_2S апсорбанце узорка са испитиваним једињењем. Сви експерименти су извођени у дубликатима. Концентрација једињења која је инхибирала 50% ензимске активности α -глюкозидазе означена је као IC₅₀.

3.18. Интеракције са макромолекулама

3.18.1. Флуоресцентна мерења

Механизам везивања једињења **A10**, **A11** и **B18** за ДНК је испитан применом флуоресцентне спектроскопије на Shimadzu RF-6000 PC спектрофлуориометру (Кјото, Јапан), уз коришћење одговарајућих маркера: етидијум бромида (ЕБ) као интеркалирајућег агенса и Hoechst 33342 (НОЕ) као маркера за мали жлеб. Концентрација матичног ДНК раствора је одређена на UV-Vis спектрофотометру (Perkin-Elmer Lambda 35) мерењем апсорбација на 260 и 280 nm. Однос A_{260}/A_{280} од приближно 1,8–1,9 имплицира да је ДНК ослобођена протеина,²⁷¹ а концентрација ДНК по нуклеотиду је одређена коришћењем моларног коефицијента апсорпције од $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 260 nm. За мерења у присуству ЕБ емисиони спектри су снимани након екситације на 550 nm у опсегу 550–700 nm, док су у присуству НОЕ снимани након екситације на 346 nm у опсегу 400–600 nm. Раствори ДНК (2,52 mM) и маркера (ЕБ и НОЕ, 0,1 mM) су припремљени у 10 mM фосфатном пуферу (pH = 7,4), док су раствори једињења концентрације 0,1 mM припремани у DMSO-у. Интеракције једињења **A10** и **A11** испитиване су припремом серије раствора са константном концентрацијом ДНК (100 μM) и растућим концентрацијама једињења (50–300 μM) након инкубације од 24 сата. Код једињења **B18**, раствор ДНК фиксне концентрације (40 μM), је титрован растућим концентрацијама једињења **B18** (4–100 μM) и емисиони спектри су снимани на сваких 5 минута.

За испитивање интеркација са говеђим серум албумином, раствор BSA је такође припремљен у 10 mM PBS пуферу (pH = 7,4). Флуоресцентни емисиони спектри су снимани у опсегу од 300 до 500 nm са екситацијом на 280 nm. Концентрација BSA била је 200 μM , а концентрације једињења **A10** и **A11** су вариране од 20 до 160 μM .

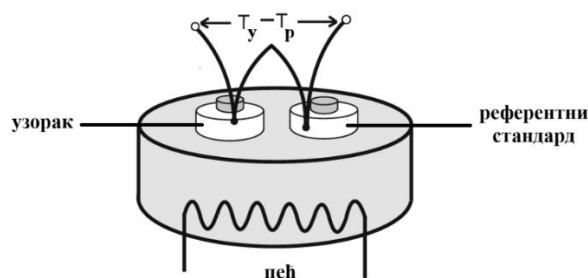
3.18.2. Мерење вискозности

Испитивање вискозности ДНК у присуству једињења **B18** је урађено на вискозиметру са котрљајућом куглицом Lovis 2000 M/ME (Anton Paar GmbH, Аустрија). Узорци су припремљени у фосфатном пуферу (10 mM, pH = 7,4) тако да је концентрација ДНК у свим узорцима била константна (20 μM), док је концентрација једињења **B18** варијала у распону од 2 до 20 μM , чиме су добијени моларни односи од 0 до 1. Вискозност ДНК раствора без једињења **B18** је измерена као η_0 , а вискозност сваког узорка са једињењем **B18** је мерена појединачно као η , при температури од 25 °C. Добијени резултати су представљени као зависност кубног корена релативне вискозности, $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, од моларног односа $[\text{B18}]/[\text{ДНК}]$.

3.18.3. Мерења диференцијалном скенирајућом калориметријом (DSC)

Диференцијална скенирајућа калориметрија је термоаналитичка техника која прати разлику унете енергије (топлоте) супстанце и референтног узорка, током исте контролисане температурне промене. Енталпија узорка се мења када он пролази кроз фазни прелаз и та промена се детектује као ендотермна (апсорпција топлоте) или екзотермна (ослобађање топлоте) промена протока топлоте у односу на базну линију. Ова техника се користи и у испитивању нуклеинских киселина, модификованих нуклеинских

киселина и код испитивања интеракција нуклеинских киселина и лиганата, самостално или као допуна другим физичко-хемијским методама.^{272,273}



Слика 87. Шематски приказ DSC ћелије.

Помоћу DSC технике испитана је термичка денатурација **B18**/ДНК система на Nano DSC инструменту (TA, Waters LLC, Њу Касл, САД). Да би се избегло формирање мехурића при загревању, узорци су пре мерења дегазирани. Раствори су припремљени у фосфатном пуферу ($I = 0,01$ M; NaCl; pH = 7,40) уз максимално присуство до 8% DMSO, при различитим C_D/C_R моларним односима (0, 0,1, 0,3, 0,6 и 1) где је C_D концентрација једињења **B18**, а C_R концентрација ДНК. Мерења су вршена у температурном опсегу од 20 до 95 °C при брзини загревања од 1 °C мин⁻¹ и притиску од 3 atm.

3.19. Припрема једињења за 3D-QSAR студију

За 3D-QSAR моделирање одабран је скуп различитих деривата тетрахидропиримидина (**A1–24**) за која је испитана антипролиферативна активност (Табела 29). Антипролиферативна активност једињења је изражена као IC₅₀ вредност на HeLa ћелијама. Негативни логаритам IC₅₀ вредности је даље коришћен као зависна варијабла у 3D-QSAR моделу, а GRIND дескриптори за једињења су израчунати у Pentacle 1.07 софтверу као независне варијабле. Једињења су припремљена коришћењем програма Marvin Sketch 6.1.0 (Chem Axon 2013), где су све доминантне микроврсте дефинисане на физиолошком pH = 7,4. У следећем кораку, структуре доминантних микроврста су оптимизоване помоћу Gaussian 09 софтвера²⁷⁴ из програмског пакета ChemBio3D Ultra 13.0²⁷⁵ коришћењем Hartree-Fock/3-21 G методе.²⁷⁶

Табела 29. Експерименталне и предвиђене IC₅₀ вредности једињења из датасета.

Једињење	Експериментална pIC ₅₀	Предвиђена pIC ₅₀	Ресидуали
Тренинг сет			
A1	4,833	4,760	0,073
A2	4,286	4,351	–0,065
A5	4,847	4,814	0,033
A10	4,985	4,982	0,003
A11	4,820	4,825	–0,005
A12	4,749	4,741	0,008
A13	4,374	4,382	–0,018
A14	3,832	3,867	–0,035
A15	5,025	5,051	–0,026

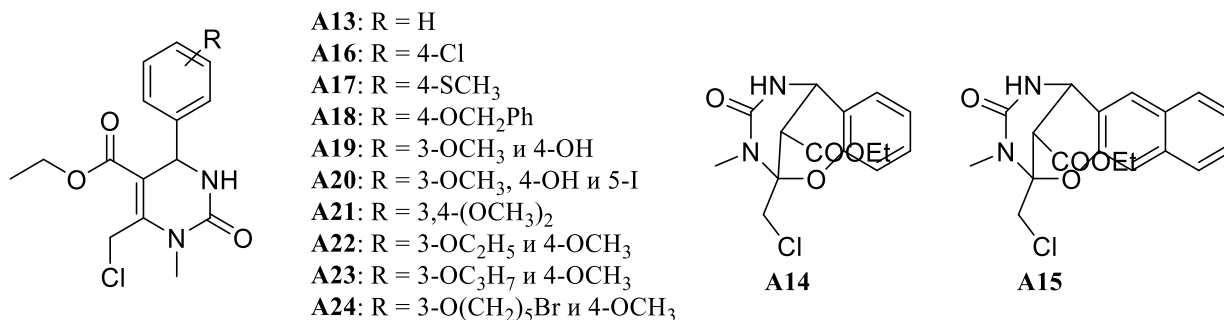
A16	5,117	5,111	0,006
A19	5,018	5,031	-0,013
A20	4,957	4,918	0,039
A21	4,780	4,807	-0,027
A23	5,062	5,050	0,039
A24	5,220	5,198	0,022
Тест сет			
A3	4,792	4,876	-0,084
A6	4,751	4,619	0,132
A8	4,782	4,843	-0,061
A17	4,973	4,883	0,090
A18	5,090	5,062	0,028
A22	5,018	5,009	0,009

3.19.1. Креирање 3D-QSAR модела

3D-QSAR модел је креиран коришћењем Pentacle 1.07 софтвера.²⁷⁷ Pentacle софтвер врши израчунавање тродимензионалних молекулских дескриптора независних од поравнања (GRIND).²⁷⁸ Главни циљ развоја 3D-QSAR модела у овом случају је дефинисање кључних структурних елемената једињења која имају најважнији утицај на анти-HeLa активност. Концепт који израчунава GRIND варијабле коришћењем хемијских проби које ступају у интеракцију са једињењима познат је као методологија поља молекулских интеракција (MIF). Постоје четири различите хемијске пробе које се користе за симулирање интеракције мете са испитиваним једињењима: *DRY пробе* (симулира хидрофобне интеракције), *NI пробе* (симулира амидни азот, представља групе које су доноси водоничне везе), *O пробе* (симулира карбонилни кисеоник и представља групе које су акцептори водоничне везе) и *TIP пробе* (симулира стерне интеракције и облик једињења). Резолуција GRIND методе је подешена на 0,5 Å. Након израчунавања MIF варијабли за цео скуп података, издвојени су најважније области где се остварују интеракције применом алгоритма ALMOND на основу удаљености између нодова и њиховог интензитета.²⁷⁹ GRIND дескриптори су израчунати применом CLACC (енг. *Consistently Large Auto and Cross Correlation*) алгоритма²⁸⁰ са опсегом равнања од 0,8 Å. GRIND варијабле су коришћене као независне варијабле, а pIC₅₀ као зависне варијабле применом регресије парцијалних најмањих квадрата (PLS) која је изведена у оквиру Pentacle софтвера. Најважније GRIND варијабле за PLS регресију одабране су коришћењем фракционог факторског дизајна (FFD).²³³

3.19.2. Избор једињења за тренинг и тест сет

Поред једињења A1–12 која су синтетисана у оквиру ове докторске дисертације, коришћена су и претходно синтетисана једињења A13–24 у оквиру исте истраживачке групе (Слика 88) за која је испитана антитуморска активност.²³² Једињења су подељена на тренинг сет (N = 15): A1, A2, A5, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16, A19, A20, A21, A23, A24 и тест сет (N = 6): A3, A6, A8, A17, A18, A22 узимајући у обзир да је цео опсег pIC₅₀ равномерно распоређен у оба скупа података (Табела 29).



Слика 88. Структуре једињења A13–24 из датасета.

3.19.3. Интерна и екстерна валидација модела

Параметри који су коришћени за интерну валидацију 3D-QSAR модела су: R² (коэффициент детерминације), PRESS (предвиђена резидуална сума квадрата), Q² (валидациони регресиони фактор) и RMSEE (средња квадратна грешка процене).

Коефицијент детерминације R² се израчунава применом једначине (5) где се Y односи на експериментално добијене pIC₅₀ вредности, $\bar{Y}$ на средњу вредност Y, а $\hat{Y}$ на предвиђене (моделом израчунате) вредности. Валидациони регресиони фактор Q² се рачуна применом једначине (7) унакрсном валидацијом по принципу *leave-one-out* (LOO) методе тако што се свако једињење уклони једном из тренинг сета, а затим се формира нови модел са преосталим једињењима. Нови модел се користи за предвиђање вредности за изостављено једињење.²⁸¹ Затим се за свако једињење из тренинг сета, након што је једном изостављено, рачуна предвиђена резидуална сума квадрата PRESS. На основу PRESS параметра су дефинисани регресиони фактор Q² и средња квадратна грешка RMSEE. Коришћене су следеће једначине:

$$R^2 = \frac{\sum(\hat{Y}_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2}{\sum(Y_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2} \quad (5)$$

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n e_i^2 \quad (6)$$

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum(Y_{\text{training}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2} \quad (7)$$

$$\text{RMSEE} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}} \quad (8)$$

Код доброг 3D-QSAR модела вредност Q² параметра треба да буде већа од 0,5.^{281,282} Такође, процена поузданости 3D-QSAR модела заснива се и на екстерној валидацији тест сета једињења. Параметри који се користе за екстерну валидацију су: R²_{pred}, RMSEP (средња квадратна грешка предвиђања) и r²_m метрички параметри.²⁸³ Поуздани 3D-QSAR модел има вредности r²_m и r²_m које су блиске или више од 0,5.²³⁴ Разлика између њих (Δr_m^2) треба да буде нижа од 0,2, док вредност R²_{pred} треба да буде већа од 0,5.²³⁴ Ови параметри су израчунати помоћу следећих једначина:

$$R_{\text{pred}}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{\text{test}} - \bar{Y}_{\text{test}})^2}{\sum(Y_{\text{test}} - \bar{Y}_{\text{training}})^2} \quad (9)$$

$$\text{RMSEP} = \sqrt{\frac{\text{PRESS}}{n}} \quad (10)$$

$$r_m^2 = r^2 \left(1 - \sqrt{r^2 - r_0^2} \right) \quad (11)$$

$$r_m^{\bar{2}} = r^2 \left(1 - \sqrt{r^2 - r_0^{\bar{2}}} \right) \quad (12)$$

3.20. Молекулски докинг

За испитивање способности везивања одабраних једињења за ДНК, BSA и изабране ензиме (CAT, GP4 и SOD) примењене су рачунарске методе молекулског докинга. Употребом софтверског пакета Schrodinger 2015–02 су испитани афинитети везивања једињења **A10** и **A11** за ДНК и BSA. Кристалне структуре ДНК и BSA преузете су из Protein Data Bank (PDB) базе података. Одговарајући PDB кодови су били 1BNA за ДНК додекамер и 3V03 за BSA. Структуре рецептора су обрађене и оптимизоване пре испитивања интеракција помоћу програмског додатка Protein Preparation Wizard.²⁸⁴ Интегритет структура је верификован и правилно подешен коришћењем програма *Prime* који је додао недостајуће резидуе. Молекули воде су уклоњени из ДНК и BSA фрагмената, након чега су додати атоми водоника и подешен је редослед веза. Протоновање и таутомерна стања су оптимизовани тако да одговарају pH вредности од 7, а узорковање водоничне везе је спроведено коришћењем PROPKA²⁸⁵ на pH = 7. Након тога, геометрија рецептора је оптимизована коришћењем OPLS-2005 поља силе ограничене минимизације поља силе са конвергенцијом тешких атома до RMSD од 0,3 Å. Лиганди су оптимизовани коришћењем поља силе OPLS-2005,²⁸⁶ као и мреже рецептора за сваку мету. Докинг је урађен употребом функције *Glide*.²⁸⁷ Додате су структуре лиганада и након тога су сви положаји оптимизовани. За даљу анализу одабране су структуре са најнижом енергијом везивања. Добијени резултати су анализирани на основу „score“ функција који комбинује енергије везивања, допринос водоничних веза и van der Waals-ове електростатичке интеракције.

Код испитивања везивања једињења **B18** за ДНК, његова молекулска структура је најпре нацртана у ChemDraw-у, док су енергије минимизоване семи-емпиријским PM3 (параметаризовани модел ревизија 3) и Hartree-Fock/3-21 G методама у Gaussian-у из програмског пакета Chem3D Ultra.^{233,279–281,288} Кристалне структуре ДНК додекамера (PDB код 1BNA) и BSA (PDB код 3V03) су преузете из *Protein Data Bank* базе података и даље су модификоване коришћењем *UCSF Chimera* софтвера. Енергије преузетих структура су минимизоване на основу критеријума најстрмијег смањења (енг. *steepest descent steps*) са величином корака од 0,02 Å и ажурирањем градијента након 10 итерација. Анализа молекулске везе је извршена коришћењем софтвера AutoDock 4.2.6.²²⁵ За прорачуне молекулског докинга примењен је Lamarck-ов генетски алгоритам (енг. *Lamarckian genetic algorithm*, LGA). За анализу је одабрана конформација са најнижом слободном енергијом везивања, док су везани комплекси визуелизовани и илустровани коришћењем програма *Biovia Discovery Studio*.²⁸⁹

Геометрија молекула **B18** за испитивање везивања за ензиме је оптимизована у програму MORAC2016 коришћењем PM6 методе.²⁹⁰ Структуре испитиваних ензима су преузете из RCSB Protein Data Bank базе података²⁹¹ и припремљене коришћењем AutoDockTools алата,²⁹² уклањањем кокристализованих супстрата и воде, израчунавањем Gasteiger-ових наелектрисања и одређивањем типова атома. Молекулски докинг је

изведен у програму Auto-Dock4 (AD4) применом Lamarck-овог хибридног генетског алгоритма методом локалног претраживања (GA-LS). Сваки експеримент се састојао од 10 GA-LS циклуса, са $2,5 \times 10^7$ процена енергије по циклусу. За испитивање интеракција са каталазом је као мета коришћена кристална структура хуманих еритроцита CAT (PDB:1dgb)²⁹³ док је околина аминокиселинских остатака Ala117, Ala123, Val126, Arg127 и Ser254 одабрана као место за везивање.²⁹⁴ Код испитивања инхибиције хидропероксид-глутатион пероксидазе је коришћена кристална структура мутиране хумане фосфолипидне GP (PDB: 2obi), а као место везивања је одабран²⁹⁵ каталитички центар који се састоји од аминокиселинских остатака Cys46, Gln81 и Trp136. Кристална структура хумане SOD (PDB: 4mcm)²⁹⁶ је коришћена као мета везивања док је околина аминокиселинских остатака Val7, Lys9, Asn53 и Val148 одабрана као место везивања.²⁹⁷

3.21. Фармакокинетичка испитивања

3.21.1. Хроматографија

Једињења **B1**, **B13–22** су изабрана за испитивање ретенције у условима реверзно-фазне танкослојне хроматографије (RP-TLC). Раствори аналитичких узорака за хроматографску анализу припремљени су у концентрацији 1 mg/mL. Аликвоти од 1 μ L сваког раствора аналитичког узорка нанети су на RP-TLC плоче (силика гел F 254s, 20 $\times$ 20 cm, Merck Darmstadt). Хроматограми су развијани коришћењем система растварача MeOH/H₂O и MeCN/H₂O са $\Phi(\text{MeCN/MeOH}) = 0,5\text{--}0,7$ v/v. Све хроматографске анализе спроведене су у складу са раније објављеном процедуром.²⁴⁰ Нису уочене значајне статистичке разлике у ретенционом фактору (R_f). Ретенционе константе (R_M) израчунате су из једначине:

$$R_M = \log(1/R_f - 1) \quad (13)$$

R_f представља ретенциони фактор, а R_M вредности линеарно зависе од логаритма концентрације органског модификатора у мобилној фази према Soczewiński:²⁹⁸

$$R_M = R_M^0 + b \log C \quad (14)$$

R_M^0 представља вредност одсечка, b нагиб праве, а C је концентрација органског растварача (50–70%) у мобилној фази.

Табела 30. Експериментално добијени ретенциони параметри.

	R_M^0 (MeOH)	b (MeOH)	R_M^0 (MeCN)	b (MeCN)
B1	3,62	–1,635	3,58	–1,606
B13	3,26	–1,431	2,88	–1,21
B14	2,08	–0,7627	1,68	–0,567
B15	2,18	–0,82	1,99	–0,7419
B16	3,51	–1,567	3,43	–0,1525
B17	4,77	–2,253	4,44	–2,071
B18	5,28	–2,52	4,94	–2,347
B19	4,19	–1,933	3,85	–1,747

Б20	5,75	-2,786	5,45	-2,621
Б21	6,34	-3,108	6,46	-2,621
Б22	2,71	-1,125	2,63	-1

3.21.2. Израчунавање молекулских дескриптора

Молекулски дескриптори су израчунати на основу 2D и 3D молекулских структура једињења оптимизованих методом механичког поља силе. Укупно је израчунато 18 дескриптора који су представљени у **Табели 31** и **Табели 32**. За израчунавање су коришћени следећи софтвери: Molinspiration,²⁹⁹ SwissADME,³⁰⁰ MarvinSketch 21.1 и pkCSM.³⁰¹

Софтвер Molinspiration коришћен је за израчунавање $\text{milog}P$ вредности, молекулске масе (M_w) и молекулске запремине (V) примењујући методе засноване на подешавању доприноса појединачних група. Софтвер SwissADME омогућава процену $\log P$ вредности применом следећих метода: $\text{ilog}P$ (модел заснован на физичким принципима који користи слободне енергије солватације у n -октанолу и води, израчунате применом GB/SA модела), $\text{Mlog}P$ (тополошки модел заснован на линеарној корелацији са 13 молекулских дескриптора), $\text{Xlog}P3$ (атомистички модел који користи корективне факторе и базу података засновану на познатим информацијама), $\text{Wlog}P$ (атомистички модел који примењује фрагментални приступ), SILICOS-IT (хибридни модел који комбинује доприносе појединачних група и тополошке дескрипторе). На крају, Consensus $\text{Log}P_{\text{o/w}}$ вредност представља аритметичку средину вредности добијених свих пет метода.

Табела 31. Израчунати физичко-хемијски дескриптори помоћу различитих софтвера.

	M _w	PSA	V	HLB	POL	ASA	ASA+	ASA-	ASAH	ASAP	VdW	REF
Б1	322,39	71,03	281,71	12,5	33,7	650,48	472,18	178,3	566,12	84,36	566,6	106,37
Б13	336,41	60,04	299,24	12,54	35,61	562,56	428,89	133,66	471,85	90,71	474,36	92,5
Б14	362,45	60,04	327,21	11,53	39,04	565,3	447,22	118,07	481,57	83,73	505,56	101,66
Б15	376,48	60,04	343,45	11,04	40,08	632,53	465,73	166,8	548,15	84,38	537,72	107,34
Б16	378,49	60,04	349,64	11,02	41,12	650,48	472,18	178,3	566,12	84,36	566,6	106,37
Б17	406,55	60,04	383,25	10,09	44,8	663,07	519,67	143,4	585,36	77,71	627,98	115,57
Б18	420,57	60,04	400,05	9,65	46,65	757,95	585,5	172,45	673,27	84,68	658,65	120,18
Б19	434,6	60,04	416,85	9,22	48,49	732,68	571,67	161,01	654,96	77,72	689,51	124,78
Б20	462,66	60,04	450,45	8,38	52,17	851,72	659,66	192,06	767,06	84,66	752,43	133,98
Б21	412,51	60,04	370,89	9,74	45,19	661,87	483,08	178,8	573,94	87,94	580,55	117,11
Б22	456,52	86,34	398,61	11,8	47,46	717,67	510,67	207	563,58	154,09	624,76	124,3

M_w – молекулска маса, PSA – поларна површина молекула, V – молекулска запремина, HLB – хидрофилно-липофилни баланс, POL – поларизабилност, ASA – укупна површина која је доступна за растварач (израчуната коришћењем радијуса растварача: 1,4 Å за молекул воде), ASAplus – површина свих атома са позитивним парцијалним наелектрисањем (изричито већим од 0) која је доступна растварачу, ASAmminus – површина свих атома са негативним парцијалним наелектрисањем (изричито мањим од 0) која је доступна растварачу, ASAH – површина свих хидрофобних атома ($|q_i| < 0,125$) доступна растварачу, ASAP – површина свих поларних ($|q_i| > 0,125$) атома доступна растварачу, vdWSA – van der Waals-ова површина, REF – рефрактивност.

MarvinSketch је примењен за израчунавање $\log D$ при pH 7,4 и осталих изабраних физичко-хемијских дескриптора (HLB, POL, ASA, ASApplus, ASAMinus, ASAH, ASAP, VdW, REF), док је за израчунавање различитих фармакокинетичких параметара коришћен софтвер pkCSM.³⁰²

Табела 32. Вредности фармакокинетичких дескриптора предвиђене применом софтвера pkCSM.

	Caco2	HIA%	SP(log)	VDss (l/kg)	FU	LogBB
Б1	1,236	92,937	-3,058	-0,151	0	-0,088
Б13	1	93	-3,682	-0,086	0,161	-0,043
Б14	0,089	92,189	-3,898	-0,159	0,359	0,758
Б15	1,275	95,049	-3,885	-0,261	0,294	-0,161
Б16	1,223	92,808	-3,614	-0,044	0,156	-0,07
Б17	1,213	91,379	-3,395	0,062	0,066	-0,108
Б18	1,208	91,022	-3,269	0,114	0,025	-0,134
Б19	1,204	95,424	-2,778	-0,457	0,006	-0,667
Б20	1,204	90,672	-3,143	0,16	0	-0,175
Б21	1,195	89,985	-2,927	0,228	-0,258	-2,622
Б22	1,228	93,659	-3,695	-0,114	0,213	-0,025

Caco2 – интестинална пропустљивост ћелија аденокарцинома колона, HIA – предикција апсорпције у цревима, SPlog – пропустљивост молекула кроз кожу, VDss – волумен дистрибуције у стању равнотеже, FU – фракција невезаних једињења, logBB – логаритам подеоног коефицијента крвно-мождане баријере.

3.22. *In vivo* билошка испитивања

3.22.1. Акутна орална токсичност

Испитивање токсичног дејства једињења **Б18** обављено је у Центру изврности за истраживање редокс равнотеже код кардиоваскуларних и метаболичких поремећаја Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Здравих мужјаца пацова ($n = 6$, три по групи, телесне масе 180–200 g) добијени су са Војномедицинске академије, Београд, Србија. Током трајања експеримента лабораторијске животиње су држане на температури 22 ± 2 °C, са дванаесточасовним светлосним циклусом, храњене су готовом храном за лабораторијске пацове (20% протеинске хране за пацове; Ветеринарски институт Суботица, Србија) и имале су на располагању храну и воду *ad libitum*. Акутна орална токсичност је процењена према претходно успостављеном протоколу по OECD методологији (*Acute toxic class method* – OECD бр. 423).³⁰³ Протокол студије је спроведен у складу са прописима Етичке комисије Факултета за добробит лабораторијских животиња и принципима Добре лабораторијске праксе и протоколима Европске уније (86/609/ЕЕС).

Животиње су насумично подељене у две групе: група I тј. контролна група која је примила једну дозу 1% DMSO-а и група II која је примала 50 mg/kg једињења **Б18** раствореног у 1 % DMSO *per os*. Животиње нису храњене 3 сата пре и након третмана. Након тога, животиње су чуване у појединачним кавезима и пажљиво праћене због појаве симптома тровања. Током четрнаестодневног протокола једном дневно су праћени следећи параметри: промене понашања и сви знаци тровања попут промена на кожи и крзну, мокрење (боја), конзистенција фекалија, очи, саливација. Такође, свакодневно су

мерени унос хране и воде, као и телесна маса животиња. Након завршетка периода праћења, пацови су жртвовани и измерена је маса органа (јетра, бубрези, желудац и срце).³⁰⁴ Релативна маса органа израчуната је на следећи начин:

$$(\text{апсолутна маса органа} \times 100\%) / \text{телесна маса пацова на дан жртвовања} \quad (15)$$

3.22.2. Експерименталне животиње и дизајн експеримената за испитивање (анти)генотоксичности, биохемијских и оксидативних параметара

Мужјаци албино пацова из Wistar соја масе 220 ± 20 g су набављени из животињске фарме Војномедицинске академије и аклиматизовани су три дана пре експеримента. Животиње су чуване у дванаесточасовном светлосном циклусу, са доступном храном и водом *ad libitum*. Све експерименте на животињама одобрила је Етичка комисија Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу бр.1-01/2022, која поступа у складу са Законом о добробити животиња („Службени гласник РС“, бр. 41/09), у складу са смерницама за смештај, негу и етичку употребу лабораторијских животиња, као и у складу са протоколима Европске уније (86/609/ЕЕЦ).

Четрдесет мужјака албино пацова било је подједнако подељено у осам група од по пет животиња у свакој. Примењен је интраперитонеални начин апликације и то на следећи начин: првој групи, која представља негативну контролну групу, интраперитонеално је убризгано 1 mL/kg т.м. комерцијалног маслиновог уља (Monini Olio Extra Vergine di Oliva), друга група је служила као позитивна контролна група, којој је убризгана једна доза CCl_4 (1 mL/kg телесне тежине, смеша 1:1 у маслиновом уљу).³⁰⁵ Животиње треће, четврте и пете групе примале су појединачну дозу испитиваног једињења од 5, 10 и 20 mg/kg т.м. Животиње шесте, седме и осме групе су истовремено добијале одговарајућу дозу једињења **B18** (5, 10, односно 20 mg/kg т.м.) и једну дозу CCl_4 . Након 24 сати све животиње су анестезиране диетил етром након чега су жртвоване, затим су прикупљени узорци крви и јетре да би се проценила генотоксичност и антигенотоксичност испитиваног једињења **B18**, биохемијски параметри серума и нивои маркера оксидативног стреса у хомогенатима ткива јетре.

3.22.3. Одређивање степена оштећења ДНК применом Комет-теста

Након поступка припреме узорак ткива јетре, процењена су оштећења ДНК у узорцима методом Singh-а и сарадника.³⁰⁶ Након електрофорезе и бојења плочица етидијум бромидом, ћелије се сликају и анализирају применом флуоресцентног микроскопа Nikon (Ti-Eclipse). За сваки узорак врше се 3 мерења по 100 ћелија. Комете се визуелно анализирају и класификују у категорије по степену оштећења у пет класа од 0 до 4, при чему је класа 0 – неоштећена ДНК; класе 1, 2 и 3 – мање, средње и дуге ДНК миграције и класа 4 – максимално оштећење ДНК.³⁰⁷ Укупан скор и проценат редукције (%R) израчунати су према формулама из радова Manoharan-а и Banerjee-а³⁰⁸ и Waters-а и сарадника.³⁰⁹

3.22.4. Одређивање биохемијских маркера у серуму

Како би се добили узорци серума за анализу, најпре су прикупљени узорци крви сваке животиње и остављени 15 минута на собној температури како би дошло до згушавања, а затим су центрифугирани на 3000 rpm на 4 °C. Серум је сакупљен у стерилне Епендорф епрувете и чуван у замрзивачу до даљих анализа. Биохемијски

параметри функције јетре и то ензимска активност аланин трансаминазе (ALT), аспартат трансаминазе (AST), и гама-глутамил трансферазе (γ -GT) и количина укупних протеина (TP) одређени су коришћењем комерцијално доступних дијагностичких сетова (Proanalytica) према протоколима произвођача. Све методе су засноване на спектрофотометријским мерењима која су праћена на Halo DB-20S UV-Vis двозрачним спектрофотометру (Dynamica GmbH, Швајцарска).

3.22.5. Одређивање маркера оксидативног стреса у хомогенатима ткива јетре

Хомогенати ткива јетре (10%) су припремљени коришћењем физиолошког раствора фосфатног пуфера (50 mM PBS, pH 7,4). Ткиво јетре је хомогенизовано у авану са тучком уз додавање PBS раствора. Након тога, смеша је центрифугирана у стерилним стакленим епруветама на 10000 rpm током 10 минута на 4 °C. Супернатанти су сакупљени и држани на леду. Ниво оксидативног стреса у јетри тестираних животиња је процењен коришћењем неколико параметара. Концентрација редукованог глутатиона (GSH) одређена је спектрофотометријском методом по Ellman-у.³¹⁰ Концентрација редукованог глутатиона је изражена као mg GSH по граму протеина у хомогенату јетре. Концентрација тиобарбитурна киселина реагујућих супстанци (TBARS) се одређује у еквивалентима малондиалдехида (MDA) који настаје након липидне пероксидације. Садржај MDA је одређен спектрофотометријски на апсорпционом максимуму комплекса малондиалдехида и осталих TBARS са тиобарбитурном киселином на 535 nm.³¹¹ Резултати су изражени као pmol MDA по mg протеина у хомогенату. Активности кључних ензима укључених у ендегену антиоксидативну одбрану организма, каталазе (CAT) и супероксид дисмутазе (SOD), такође су одређиване спектрофотометријским методама.^{248,249} Активност оба ензима приказана је у јединицама U по mg протеина у хомогенату. Садржај укупних протеина у хомогенатима ткива јетре одређен је Lowry-евом методом³¹² са BSA као стандардом.

3.22.6. Статистичка анализа

Резултати су изражени као средње вредности $\pm$ С.Д. и анализирани коришћењем IBM SPSS version 20 статистичког софтверског пакета за оперативни систем Windows. Студија акутне оралне токсичности проверена је помоћу Kolmogorov–Smirnov и Shapiro–Wilk тестова. Независни Студентов *t*-тест (параметарски) и Mann–Whitney *U* тест (непараметарски) коришћени су за процену разлике у процењеним варијаблама између група. *P*-вредност $<0,05$ сматрана је статистички значајном. Хомогеност варијансе и дистрибуција података за генотоксичне и антигенотоксичне активности одређене су Levene и Kolmogorov–Smirnov тестом, респективно. *Post hoc* поређење између контролне и третиране групе извршено је T3 Dunnett тестом или Bonferroni тестом када варијанса није била хомогена. Статистичка процена података извршена је једносмерном анализом варијансе (ANOVA). Сматра се да су резултати статистички значајни при $p < 0,05$. Нивои биохемијских параметара и маркера оксидативног стреса су сматрани статистички значајним у три нивоа $p < 0,05$, $p < 0,01$ и $p < 0,001$ коришћењем Fisher LSD и Tukey тестова.

4. Закључак

На основу приказаних резултата у поглављу *Резултати и дискусија* могу се извести следећи закључци:

- Дериватизацијом на С6 атому у тетрахидропиримидинима, који су добијени помоћу Biginelli-јеве реакције, синтетисана је серија **A** коју чине 12 нових једињења.
- Реакција добијања једињења серије **A** је извођена у *on water* условима и представља једну од првих тако објављених синтеза за добијање ових деривата тетрахидропиримидина. Праћењем механизма реакције је установљено да су управо протони из воде заслужни за добијање производа и да се реакција дешава на додирној површини воде и органског слоја.
- Помоћу Biginelli-јеве реакције синтетисана су 32 једињења из серија **B** и **V**.
- Сва једињења су окарактерисана користећи различите спектроскопске методе (^1H и ^{13}C NMR, IR, ESI-MS), док су поједина једињења (**A1**, **A5**, **B11**, **B16** и **B4**) окарактерисана рендгено-структурном анализом.
- За сва једињења је испитана цитотоксичност у *in vitro* условима МТТ тестом (серија **A** на HeLa, A549 и LS174, док су једињења серија **B** и **V** тестирана на HeLa, K562 и MDA-MB-231) и вредности су изражене као IC_{50} .
- На основу IC_{50} вредности се може рећи да сва једињења имају умерену до добру цитотоксичну активност, при чему се издвајају једињења серије **B** која имају *O*-алкил ванилински фрагмент као и једињења из серије **V**.
- K562 ћелијска линија је била најосетљивија на дејство свих испитиваних деривата.
- На основу формираног 3D-QSAR модела закључено је да присуство пиримидинског прстена највише утиче на антипролиферативну активност, али и присуство хидрофобне фенил групе у положају С4. У будућим истраживањима требало би покушати са увођењем водоник-акцепторских група као супституената на фенилном прстену што би потенцијално побољшало активност.
- Једињење **B18** је показало изузетан потенцијал са IC_{50} вредностима од $12,76 \pm 1,93$ и $9,20 \pm 0,14$ μM на K562 и MDA-MB-231 ћелијским линијама, због чега је подробније испитан његов механизам дејства као и понашање у *in vivo* условима.
- Деловање једињења **B18** доводи до дозно-зависног пораста удела ћелија у subG1 фази што је знак да ово једињење изазива апоптозу и на тај начин испољава своје цитотоксично дејство. Апоптоза се дешава делимично преко активације ефекторске каспазе-3 и иницијаторске каспазе-8.
- Такође, деловањем једињења **B18** долази до умереног пораста интрацелуларног нивоа ROS што указује на повезаност настанка оксидативног стреса и цитотоксичног дејства.
- Албино пацови из соја Wistar су праћени током 14 дана током којих су конзумирали једињење **B18**. У периоду праћења, код животиња нису примећени знаци тровања ни друге промене у понашању, као ни промене на крзну и слузокожи.
- Након Комет теста је утврђено да концентрација од 5 mg/kg т.м. једињења **B18** има протективни ефекат, док на основу одређиваних биохемијских параметара из серума нема оштећења која су изазвана деловањем једињења, а концентрација **B18** од 10 mg/kg т.м. сузбија штетне ефекте оксидативног стреса изазваног дејством угљен-тетрахлорида.
- РСА анализа фармакокинетичких дескриптора, липофилности и хроматографског понашања једињења серије **B** је показала да на липофилност као веома важан параметар у дизајну фармаколошких агенаса, највише утиче молекулска маса, запремина и поларизабилност испитиваних молекула.

- Добијене вредности за Hansch-ове константе су потврдиле да једињење **B18** као најактивније из серије, има најбољи однос липофилности и хидрофилности.
- Испитивање начина везивања једињења **B18** за ДНК помоћу флуоресцентне титрације уз Ноеcht као маркер су показала да се поменуто једињење везује за мали жлеб ДНК хеликса, а мерење вискозности и DSC мерења искључују интеркалацију као могући начин везивања.
- Молекулски докинг је потврдио стабилне интеракције једињења **B18** у малом жлебу што додатно подржава екпериментално добијене резултате.
- Од једињења серије **B**, издвајају се једињења **B1** и **B2** која имају IC₅₀ вредности од $1,76 \pm 0,09$ и $1,66 \pm 0,05$ μM на K562 ћелијској линији са индексом селективности приближно SI ≈ 3 .

Остварени резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације указују да тетрахидропиримидини представљају перспективну класу једињења са потенцијалном применом пре свега у лечењу малигнух обољења, нарочито имајући у виду једноставну синтезу и повољан токсиколошки профил. Након опсежних *in vitro* и *in vivo* тестова, једињење **B18** {Метил 4-[4'-(хептилокси)-3'-метоксифенил]-1,6-диметил-2-тиоксо-1,2,3,4-тетрахидропиримидин-5-карбоксилат} се издваја као кандидат за даља преклиничка испитивања, а развијени 3D-QSAR модел може послужити као основа за рационални дизајн нових деривата, који ће имати још повољнији токсиколошки профил.

5. Литература

1. Nammalwar, B.; Bunce, R. A. Recent Advances in Pyrimidine-Based Drugs. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 104.
2. Wang, S.; Wang, S.; Yuan, X.-H.; Wang, S.-Q.; Zhao, W.; Chen, X.-B.; Yu, B. FDA-Approved Pyrimidine-Fused Bicyclic Heterocycles for Cancer Therapy: Synthesis and Clinical Application. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *214*, 113218.
3. Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274.
4. Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* **1999**, *286*, 971–974.
5. Biginelli, P. Derivati Aldeiduredici degli Eteri Acetil- e Dossal-Acetico. *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, *23*, 360–413.
6. Tron, G. C.; Minassi, A.; Appendino, G. Pietro Biginelli: The Man Behind the Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 5541–5550.
7. Folkers, K.; Johnson, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXVI. The Mechanism of Formation of Tetrahydropyrimidines by the Biginelli Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3784–3791.
8. Fissekis, J. D.; Sweet, F. On the Synthesis of 3,4-Dihydro-2(1H)-Pyrimidinones and the Mechanism of the Biginelli Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *38*, 804.
9. Kappe, C. O. A Reexamination of the Mechanism of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. Support for an N-Acyliminium Ion Intermediate. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7201–7204.
10. Folkers, K.; Johnson, T. B. Researches on Pyrimidines. CXXXIII. Some Reactions and Derivatives of 2-Keto-4-Phenyl-5-Carboethoxy-6-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 2886–2893.
11. Kappe, C. O.; Roschger, P. Synthesis and Reactions of “Biginelli-Compounds”. Part I. *J. Heterocycl. Chem.* **1989**, *26*, 55–64.
12. Koyano, K.; McArthur, C. R. Formation and Reactions of (1-Chloroalkyl)Carbamoyl Chlorides. Synthesis of 1,2,4-Triazolidine-5-Ones. *Can. J. Chem.* **1973**, *51*, 333–337.
13. De Souza, R. O.; da Penha, E. T.; Milagre, H. M.; Garden, S. J.; Esteves, P. M.; Eberlin, M. N.; Antunes, O. A. The Three-Component Biginelli Reaction: A Combined Experimental and Theoretical Mechanistic Investigation. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9799–9804.
14. Ramos, L. M.; Ponce de Leon y Tobio, A. Y.; dos Santos, M. R.; de Oliveira, H. C.; Gomes, A. F.; Gozzo, F. C.; de Oliveira, A. L.; Neto, B. A. Mechanistic Studies on Lewis Acid Catalyzed Biginelli Reactions in Ionic Liquids: Evidence for the Reactive Intermediates and the Role of the Reagents. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10184–10193.
15. Puripat, M.; Ramozzi, R.; Hatanaka, M.; Parasuk, W.; Parasuk, V.; Morokuma, K. The Biginelli Reaction Is a Urea-Catalyzed Organocatalytic Multicomponent Reaction. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6959–6967.
16. Shutalev, A. D.; Kishko, E. A.; Sivova, N. V.; Kuznetsov, A. Y. A New Convenient Synthesis of 5-Acyl-1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine-2-Thiones/Ones. *Molecules* **1998**, *3*, 100–106.
17. Dondoni, A.; Massi, A. Parallel Synthesis of Dihydropyrimidinones Using Yb(III)-Resin and Polymer-Supported Scavengers under Solvent-Free Conditions. A Green Chemistry Approach to the Biginelli Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6225–6228.
18. Zhang, X.; Li, Y.; Liu, C.; Wang, J. An Efficient Synthesis of 4-Substituted Pyrazolyl-3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-(Thio)ones Catalyzed by Mg(ClO₄)₂ under Ultrasound Irradiation. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2006**, *253*, 207–211.

19. Ahn, B. J.; Gang, M. S.; Chae, K.; Oh, Y.; Shin, J.; Chang, W. A Microwave-Assisted Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-Ones Catalyzed by FeCl₃-Supported Nanopore Silica under Solvent-Free Conditions. *J. Ind. Eng. Chem.* **2008**, *14*, 401–405.
20. Devthade, V.; Kamble, G.; Ghugal, S. G.; Chikhalia, K. H.; Umare, S. S. Visible Light-Driven Biginelli Reaction over Mesoporous g-C₃N₄ Lewis-Base Catalyst. *ChemistrySelect* **2018**, *3*, 4009–4014.
21. Gulati, S.; Singh, R.; Prakash, R.; Sangwan, S. One-Pot Three-Component Synthesis of Substituted Dihydropyrimidinones Using Fruit Juices as Biocatalyst and Their Biological Studies. *PLoS One* **2020**, *15*, e0235747.
22. Ismaili, L.; Nadaradjane, A.; Nicod, L.; Guyon, C.; Xicluna, A.; Robert, J. F.; Refouvelet, B. Synthesis and Antioxidant Activity Evaluation of New Hexahydropyrimido[5,4-c]quinoline-2,5-Diones and 2-Thioxohexahydropyrimido[5,4-c]quinoline-5-Ones Obtained by Biginelli Reaction in Two Steps. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1270–1275.
23. Jiang, C.; You, Q. D. An Efficient and Solvent-Free One-Pot Synthesis of Dihydropyrimidinones under Microwave Irradiation. *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 647–650.
24. Tayebbe, R.; Ghadamgahi, M. Solvent-Free One-Pot Multi-Component Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones Catalyzed by Mesoporous NH₄H₂PO₄/MCM-41 as an Environmentally Friendly, Cheap, and Effective Catalyst. *Arab. J. Chem.* **2017**, *10*, S757–S764.
25. Kargar, M.; Hekmatshoar, R.; Mostashari, A.; Hashemi, Z. Efficient and Green Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones/Thiones Using Imidazol-1-yl-Acetic Acid as a Novel, Reusable and Water-Soluble Organocatalyst. *Catal. Commun.* **2011**, *15*, 123–126.
26. Gore, S.; Baskaran, S.; Koenig, B. Efficient Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-Ones in Low Melting Tartaric Acid-Urea Mixtures. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1009–1013.
27. Kumar, K. A.; Kasthuraiah, M.; Reddy, C. S.; Reddy, C. D. Mn(OAc)₃·2H₂O-Mediated Three-Component, One-Pot, Condensation Reaction: An Efficient Synthesis of 4-Aryl-Substituted 3,4-Dihydropyrimidin-2-Ones. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7873–7876.
28. Paraskar, A. S.; Dewkar, G. K.; Sudalai, A. Cu(OTf)₂: A Reusable Catalyst for High-Yield Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3305–3308.
29. Gohain, M.; Prajapati, D.; Sandhu, J. S. A Novel Cu-Catalysed Three-Component One-Pot Synthesis of Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones Using Microwaves under Solvent-Free Conditions. *Synlett* **2004**, *2004*, 235–238.
30. Su, W.; Li, J.; Zheng, Z.; Shen, Y. One-Pot Synthesis of Dihydropyrimidinones Catalyzed by Strontium(II) Triflate under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6037–6040.
31. Sabitha, G.; Reddy, G. S. K. K.; Reddy, K. B.; Yadav, J. S. Vanadium(III) Chloride Catalyzed Biginelli Condensation: Solution Phase Library Generation of Dihydropyrimidin-(2H)-Ones. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6497–6499.
32. Ahmed, N.; van Lier, J. E. TaBr₅-Catalyzed Biginelli Reaction: One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-Ones/Thiones under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5407–5409.
33. Adib, M.; Ghanbary, K.; Mostofi, M.; Ganjali, M. R. Efficient Ce(NO₃)₃·6H₂O-Catalyzed Solvent-Free Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones. *Molecules* **2006**, *11*, 63–68.
34. Angeles-Beltrán, D.; Lomas-Romero, L.; Lara-Corona, V.H.; González-Zamora, E.; Negrón-Silva, G. Sulfated Zirconia-Catalyzed Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones (DHPMs) Under Solventless Conditions: Competitive Multicomponent Biginelli vs. Hantzsch Reactions. *Molecules* **2006**, *11*, 731–738.
35. Karade, H. N.; Sathe, M.; Kaushik, M. P. Synthesis of 4-Aryl Substituted 3,4-Dihydropyrimidinones Using Silica-Chloride Under Solvent-Free Conditions. *Molecules* **2007**, *12*, 1341–1351.

36. Liu, C. J.; Wang, J. De. Ultrasound-Assisted Synthesis of Novel 4-(2-Phenyl-1,2,3-Triazol-4-yl)-3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-(Thio)ones Catalyzed by $\text{Sm}(\text{ClO}_4)_3$. *Molecules* **2010**, *15*, 2087–2095.
37. Nandurkar, N. S.; Bhanushali, M. J.; Bhor, M. D.; Bhanage, B. M. $\text{Y}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: A Novel and Reusable Catalyst for One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones under Solvent-Free Conditions. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2007**, *271*, 14–17.
38. Zych, A. J.; Wang, H. J.; Sakwa, S. A. Synthesis and Suzuki–Miyaura Reactions of 5-Halo-3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5103–5105.
39. Karade, H. N.; Acharya, J.; Kaushik, M. P. An Efficient and Rapid Dehydrogenation of 4-Aryl-3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones (DHPMs) Using CAN/HCl . *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 5541–5543.
40. Starcevich, J. T.; Laughlin, T. J.; Mohan, R. S. Iron(III) Tosylate Catalyzed Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones/Thiones via the Biginelli Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 983–985.
41. Niknam, K.; Zolfigol, M. A.; Hossieninejad, Z.; Daneshvar, N. Efficient Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-one Using Metal Hydrogen Sulfates $\text{M}(\text{HSO}_4)_n$ as Catalyst Under Solvent-Free Conditions. *Chin. J. Catal.* **2007**, *28*, 591–595.
42. Safaei Ghomi, J.; Teymuri, R.; Ziarati, A. A Green Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidine-2(1H)-one/Thione Derivatives Using Nanosilica-Supported Tin(II) Chloride as a Heterogeneous Nanocatalyst. *Monatsh. Chem.* **2013**, *144*, 1865–1870.
43. Kathing, C.; Rani, J. W. S.; Nongthombam Singh, G.; Tumtin, S.; Nongrum, R.; Nongkhlaw, R. One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones Catalysed by Cupric Acetate Under Solvent-Free Conditions. *J. Chin. Chem. Soc.* **2014**, *61*, 1254–1258.
44. Karimi, H. Copper Zirconium Phosphate as an Efficient Catalyst for Multi-Component Reactions in Solvent-Free Conditions. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A: Sci.* **2018**, *42*, 219–235.
45. Popovics-Tóth, N.; Tajti, Á.; Hümpfner, E.; Bálint, E. Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-one-Phosphonates by the Microwave-Assisted Biginelli Reaction. *Catalysts* **2021**, *11*, 1865–1870.
46. Medyouni, R.; Elgabsi, W.; Naouali, O.; Romerosa, A.; Al-Ayed, A. S.; Baklouti, L.; Hamdi, N. One-Pot Three-Component Biginelli-Type Reaction to Synthesize 3,4-Dihydropyrimidine-2(1H)-ones Catalyzed by Co Phthalocyanines. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2016**, *167*, 165–174.
47. Gein, V. L.; Zamaraeva, T. M.; Dmitriev, M. V. Sodium Hydrogen Sulfate as a Catalyst for the Synthesis of N,4-Diaryl-6-Methyl-1-Methyl(Phenyl)-2-Thioxo-1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine-5-Carboxamides via the Biginelli Reaction. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2018**, *54*, 177–182.
48. Moosavifar, M. An Appropriate One-Pot Synthesis of Dihydropyrimidinones Catalyzed by Heteropoly Acid Supported on Zeolite. *C. R. Chim.* **2012**, *15*, 444–447.
49. Shahid, A.; Ahmed, N.S.; Saleh, T.S.; Al-Thabaiti, S.A.; Basahel, S.N.; Schwieger, W.; Mokhtar, M. Solvent-Free Biginelli Reactions Catalyzed by Hierarchical Zeolite Utilizing a Ball Mill Technique. *Catalysts* **2017**, *7*, 84.
50. Bentahar, S.; Ait Taleb, M.; Sabour, A.; Dbik, A.; El Khomri, M.; El Messaoudi, N.; Lacherai, A.; Mamouni, R. Potassium Fluoride-Modified Clay as a Reusable Heterogeneous Catalyst for One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Russ. J. Org. Chem.* **2019**, *55*, 1423–1431.
51. Torres-Méndez, C. E.; López-Mayorga, B. Copper Supported on Acid-Activated Vermiculite as an Efficient and Recyclable Catalyst for the Biginelli Reaction. *Clay Miner.* **2020**, *55*, 271–280.

52. Bosica, G.; Cachia, F.; De Nittis, R.; Mariotti, N. Efficient One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones via a Three-Component Biginelli Reaction. *Molecules* **2021**, *26*, 3753.
53. Diarjani, E.S.; Rajabi, F.; Yahyazadeh, A.; Puente-Santiago, A.R.; Luque, R. Copper Tridentate Schiff Base Complex Supported on SBA-15 as Efficient Nanocatalyst. *Materials* **2018**, *11*, 2458.
54. Akbarzadeh, P.; Koukabi, N. Immobilized Polythiophene on Magnetic Carbon Nanotube as Catalyst for the Synthesis of Dihydropyrimidinone Derivatives. *Res. Chem. Intermed.* **2020**, *46*, 4955–4969.
55. Farooq, S.; Alharthi, F. A.; Alsalmeh, A.; Hussain, A.; Dar, B. A.; Hamid, A.; Koul, S. One-Pot Green Synthesis Using Montmorillonite-KSF and Evaluation of Cytotoxic Activity. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 42221–42234.
56. Freitas, E. F.; Souza, R. Y.; Passos, S. T. A.; Dias, J. A.; Dias, S. C. L.; Neto, B. A. D. Tuning the Biginelli Reaction Mechanism by the Ionic Liquid Effect. *RSC Adv.* **2019**, *9*, 27125–27135.
57. Zhang, Y.; Wang, B.; Zhang, X.; Huang, J.; Liu, C. Synthesis Catalyzed by a Brønsted Acidic Ionic Liquid Under Solvent-Free Conditions. *Molecules* **2015**, *20*, 3811–3820.
58. Liu, Z.; Ma, R.; Cao, D.; Liu, C. Efficient Synthesis Catalyzed by Benzotriazolium-Based Ionic Liquids. *Molecules* **2016**, *21*, 462.
59. Mohammadi, B.; Behbahani, F. K. Recent Developments in the Synthesis and Applications of DHPMs. *Mol. Divers.* **2018**, *22*, 405–446.
60. Nagarajaiah, H.; Mukhopadhyay, A.; Moorthy, J. N. Biginelli Reaction: An Overview. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 5135–5149.
61. Shumaila, A. M. A.; Al-Thulaia, A. A. N. Greener Catalysis for Biginelli Analogs. *Synth. Commun.* **2019**, *49*, 1613–1632.
62. Heravi, M. M.; Moradi, R.; Mohammadkhani, L.; Moradi, B. Current Progress in Asymmetric Biginelli Reaction. *Mol. Divers.* **2018**, *22*, 751–767.
63. Heravi, M. M.; Asadi, S.; Lashkariani, B. M. Progress in Asymmetric Biginelli Reaction. *Mol. Divers.* **2013**, *17*, 389–407.
64. Guo, Y.; Gao, Z.; Wang, K.; Li, J.; Bi, X.; Guo, L.; Liu, H.; Shi, E.; Xiao, J. Chiral Spirocyclic Phosphoric Acid-Catalyzed Synthesis. *Asian J. Org. Chem.* **2020**, *9*, 626–630.
65. Anastas, P.; Warner, J. *Green Chemistry: Theory and Practice*; Oxford University Press: New York, 1998.
66. Dalko, P. I.; Moisan, L. In the Golden Age of Organocatalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138–5175.
67. Oliveira, V. G.; Cardoso, M. F. D. C.; Forezi, L. S. M. Organocatalysis Overview. *Catalysts* **2018**, *8*, 605.
68. Xiang, S.-H.; Tan, B. Advances in Asymmetric Organocatalysis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3786.
69. MacMillan, D. W. C. The Advent and Development of Organocatalysis. *Nature* **2008**, *455*, 304–308.
70. Suresh; Saini, A.; Kumar, D.; Sandhu, J. S. Multicomponent Eco-Friendly Synthesis Using Lactic Acid. *Green Chem. Lett. Rev.* **2009**, *2*, 29–33.
71. de Vasconcelos, A.; Oliveira, P. S.; Ritter, M.; Freitag, R. A.; Romano, R. L.; Quina, F. H.; Pizzuti, L.; Pereira, C. M. P.; Stefanello, F. M.; Barschak, A. G. Antioxidant Capacity and Environmentally Friendly Synthesis of Dihydropyrimidin-(2H)-ones Promoted by Naturally Occurring Organic Acids. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2012**, *160*, 155–161.
72. Quadri, S. A. I.; Das, T. C.; Malik, M. S.; Seddigi, Z. S.; Farooqui, M. Itaconic Acid as an Environmentally Benign Catalyst in Efficient and Scalable Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Chem. Select* **2016**, *1*, 4602–4606.

73. Karimi-Jaberi, Z.; Moaddeli, M. S. Synthesis Using Trichloroacetic Acid. *ISRN Org. Chem.* **2012**, 1–4.
74. Borik, R. M. A. Comparison of Microwave and Ultrasound Methods. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **2013**, 7, 543–547.
75. Chen, X. H.; Xu, X. Y.; Liu, H.; Cun, L. F.; Gong, L. Z. Highly Enantioselective Organocatalytic Biginelli Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14802–14803.
76. Ishihara, K. Organoboronic Acids as Brønsted–Lewis Acid Catalysts. In *Boronic Acids*; Wiley, 2005; pp 377–409.
77. Debache, A.; Boumoud, B.; Amimour, M.; Belfaitah, A.; Rhouati, S.; Carboni, B. Phenylboronic Acid as a Mild and Efficient Catalyst for Biginelli Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 5697–5699.
78. Tajbakhsh, M.; Ranjbar, Y.; Masuodi, A.; Khaksar, S. A Simple and Environmentally Benign Protocol for Biginelli Reactions Catalyzed by Silica-Bonded S-Sulfonic Acid. *Chinese J. Catal.* **2012**, 33, 1542–1545.
79. Nandi, G. C.; Samai, S.; Singh, M. S. Biginelli and Hantzsch-Type Reactions Leading to Highly Functionalized Dihydropyrimidinone, Thiocoumarin, and Pyridopyrimidinone Frameworks via Ring Annulation with β -Oxodithioesters. *J. Org. Chem.* **2010**, 75, 7785–7795.
80. Narahari, S. R.; Reguri, B. R.; Gudaparthi, O.; Mukkanti, K. Synthesis of Dihydropyrimidinones via Biginelli Multi-Component Reaction. *Tetrahedron Lett.* **2012**, 53, 1543–1545.
81. Côté, A. P.; Benin, A. I.; Ockwig, N. W.; O’Keeffe, M.; Matzger, A. J.; Yaghi, O. M. Porous, Crystalline, Covalent Organic Frameworks. *Science* **2005**, 310 (5751), 1166–1170.
82. Diercks, C. S.; Yaghi, O. M. The Atom, the Molecule, and the Covalent Organic Framework. *Science* **2017**, 355 (6328), eaal1585.
83. Yao, B. J.; Wu, W. X.; Ding, L. G.; Dong, Y. Bin. Sulfonic Acid and Ionic Liquid Functionalized Covalent Organic Framework for Efficient Catalysis of the Biginelli Reaction. *J. Org. Chem.* **2021**, 86, 3024–3032.
84. Pandey, J.; Anand, N.; Tripathi, R. P. L-Proline Catalyzed Multicomponent Reaction of 3,4-Dihydro-(2H)-pyran, Urea/Thiourea, and Aldehydes: Diastereoselective Synthesis of Hexahydropyrano Pyrimidinones (Thiones). *Tetrahedron* **2009**, 65, 9350–9356.
85. Ghorbani-Choghamarani, A.; Zamani, P. Three-Component Reactions: An Efficient and Green Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-Ones and Thiones Using Silica Gel-Supported L-Pyrrolidine-2-Carboxylic Acid-4-Hydrogen Sulfate. *Chin. Chem. Lett.* **2013**, 24, 804–808.
86. Sohn, J. H.; Choi, H. M.; Lee, S.; Joung, S.; Lee, H. Y. Probing the Mode of Asymmetric Induction of Biginelli Reaction Using Proline Ester Salts. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3858–3862.
87. Sih, C. J.; Chen, C. Microbial Asymmetric Catalysis—Enantioselective Reduction of Ketones [New Synthetic Methods (45)]. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1984**, 23, 570–578.
88. Rama Rao, K.; Sampath Kumar, H. Baker’s Yeast Catalyzed Oxidative Coupling of Thiols to Disulfides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1991**, 1, 507–508.
89. Ohta, H.; Kobayashi, N.; Ozaki, K. Asymmetric Reduction of Nitro Olefins by Fermenting Baker’s Yeast. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1802–1804.
90. Utaka, M.; Konishi, S.; Takeda, A. Asymmetric Reduction of Z-3-Chloro-3-Alken-2-ones with Fermenting Baker’s Yeast. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 4737–4740.
91. Fuganti, C. Baker’s Yeast Mediated Synthesis of Natural Products. *Pure Appl. Chem.* **1990**, 62, 1449–1452.

92. Fuganti, C.; Grasselli, P.; Servi, S.; Spreafico, F.; Zirotti, C.; Casati, P. On the Steric Course of Baker's Yeast Reduction of α -Hydroxy Ketones. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 4087–4089.
93. Kumar, A.; Maurya, R. A. An Efficient Baker's Yeast Catalyzed Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-Ones. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4569–4571.
94. Borse, B. N.; Borude, V. S.; Shukla, S. R. Synthesis of Novel Dihydropyrimidin-2(1H)-ones Derivatives Using Lipase and Their Antimicrobial Activity. *Curr. Chem. Lett.* **2012**, *1*, 59–68.
95. Patil, S.; Jadhav, S. D.; Deshmukh, M. B. Natural Acid Catalyzed Multi-Component Reactions as a Green Approach. *Arch. Appl. Sci. Res.* **2011**, *3*, 203–208.
96. Patil, S.; Jadhav, S. D.; Mane, S. Y. Pineapple Juice as a Natural Catalyst: An Excellent Catalyst for Biginelli Reaction. *Int. J. Org. Chem.* **2011**, *1*, 125–131.
97. Mohammadian, N.; Akhlaghinia, B. *Punica granatum* Peel: An Organocatalyst for Green and Rapid Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones/Thiones under Solvent-Free Condition. *Res. Chem. Intermed.* **2017**, *43*, 3325–3347.
98. Anchan, H. N.; Naik, C. P.; Bhat, N. S.; Kumari, M.; Dutta, S. Efficient Synthesis of Novel Biginelli and Hantzsch Products Sourced from Biorenewable Furfurals Using Gluconic Acid Aqueous Solution as the Green Organocatalyst. *ACS Omega* **2023**, *8*, 34077–34083.
99. Chidambaram, S.; Mostafa, A. A.; Al-Askar, A. A.; Sayed, S. R. M.; Radhakrishnan, S.; Akbar, I. Green Catalyst Cu(II)-Enzyme-Mediated Eco-Friendly Synthesis of 2-Pyrimidinamines as Potential Larvicides Against *Culex quinquefasciatus* Mosquito and Toxicity Investigation Against Non-Target Aquatic Species. *Bioorg. Chem.* **2021**, *109*, 104697.
100. Lal, J.; Gupta, S. K.; Agarwal, D. D. Chitosan: An Efficient Biodegradable and Recyclable Green Catalyst for One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidinones of Curcumin in Aqueous Media. *Catal. Commun.* **2012**, *27*, 38–43.
101. Earle, M. J.; Seddon, K. R. Ionic Liquids. Green Solvents for the Future. *Chem. Eng. News* **2000**, *72*, 1391–1398.
102. Fang, D.; Zhang, D. Z.; Liu, Z. L. One-Pot Three-Component Biginelli-Type Reaction Catalyzed by Ionic Liquids in Aqueous Media. *Monatsh. Chem.* **2010**, *141*, 419–423.
103. Sheldon, R. Catalytic Reactions in Ionic Liquids. *Chem. Commun.* **2001**, *1*, 2399–2407.
104. Gui, J.; Liu, D.; Wang, C.; Lu, F.; Lian, J.; Jiang, H.; Sun, Z. One-Pot Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones Catalyzed by Acidic Ionic Liquids under Solvent-Free Conditions. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 3436–3443.
105. Garima; Srivastava, V. P.; Yadav, L. D. S. Biginelli Reaction Starting Directly from Alcohols. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6436–6438.
106. Yadav, L. D. S.; Rai, A.; Rai, V. K.; Awasthi, C. Chiral Ionic Liquid-Catalyzed Biginelli Reaction: Stereoselective Synthesis of Polyfunctionalized Perhydropyrimidines. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1420–1429.
107. Jadhav, C. K.; Nipate, A. S.; Chate, A. V.; Songire, V. D.; Patil, A. P.; Gill, C. H. Efficient Rapid Access to Biginelli for the Multicomponent Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydropyrimidines in Room-Temperature Diisopropyl Ethyl Ammonium Acetate. *ACS Omega* **2019**, *4*, 22313–22324.
108. Deepa, M. J. A.; Singh, S. Enantioselective Biginelli Reaction Catalyzed by (L)-Prolinamide Containing Imidazolium Ionic Liquid. *ChemistrySelect* **2022**, *7*, e202103918.
109. Santos, M. C.; Uemi, M.; Gonçalves, N. S.; Bizeto, M. A.; Camilo, F. F. Niobium Chloride in 1-n-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride Ionic Liquid as a Catalyst for Biginelli Reaction. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1220*, 128653.

110. Madivalappa Davanagere, P.; Maiti, B. 1,3-Bis(carboxymethyl)imidazolium Chloride as a Sustainable, Recyclable, and Metal-Free Ionic Catalyst for the Biginelli Multicomponent Reaction in Neat Condition. *ACS Omega* **2021**, *6*, 26035–26047.
111. Sharma, M.; Verma, K.; Kaushik, A.; Singh, J.; Singh, A.; Badru, R. DBU-MIm Coupled Ionic Liquids as Reusable Catalysts for the Biginelli Reaction. *Mol. Catal.* **2023**, *536*, 112906.
112. Patil, S. R.; Choudhary, A. S.; Patil, V. S.; Sekar, N. Synthesis, Optical Properties, Dyeing Study of Dihydropyrimidones (DHPMs) Skeleton: Green and Regioselectivity of Novel Biginelli Scaffold from Lawsone. *Fibers Polym.* **2015**, *16*, 2349–2358.
113. Peng, J.; Deng, Y. Ionic Liquids Catalyzed Biginelli Reaction under Solvent-Free Conditions. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5917–5919.
114. Martins, M. A. R.; Pinho, S. P.; Coutinho, J. A. P. Insights into the Nature of Eutectic and Deep Eutectic Mixtures. *J. Solution Chem.* **2019**, *48*, 962–982.
115. Azizi, N.; Dezfali, S.; Hahsemi, M. M. Eutectic Salt Catalyzed Environmentally Benign and Highly Efficient Biginelli Reaction. *Sci. World J.* **2012**, 908702.
116. Khan, M. S.; Nawaz, M. A.; Jalil, S.; Rashid, F.; Hameed, A.; Asari, A.; Mohamad, H.; Rehman, A. U.; Iftikhar, M.; Iqbal, J.; al-Rashida, M. Deep Eutectic Solvent Mediated Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones and Evaluation of Biological Activities Targeting Neurodegenerative Disorders. *Bioorg. Chem.* **2022**, *118*, 105457.
117. Momeni, A. R.; Samimi, A.; Vaezzadeh, H. Chemical Methodologies Eutectic Mixture Choline Chloride–Chloroacetic Acid: A New and Efficient Catalyst for Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2-ones. *Chem. Methodol.* **2018**, *4*, 253–261.
118. Cui, Y.; Li, C.; Bao, M. Deep Eutectic Solvents (DESs) as Powerful and Recyclable Catalysts and Solvents for the Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones. *Green Process. Synth.* **2019**, *8*, 568–576.
119. Shaibuna, M.; Kuniyil, M. J. K.; Sreekumar, K. Deep Eutectic Solvent Assisted Synthesis of Dihydropyrimidinones/thiones via Biginelli Reaction: Theoretical Investigations on Their Electronic and Global Reactivity Descriptors. *New J. Chem.* **2021**, *45*, 20765–20775.
120. Nguyen, T.-D. T.; Truong, A. V.; Tran, H. P. Metal- and Solvent-Free Preparation of Benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine Derivatives Catalysed by Deep Eutectic Solvents. *Vietnam J. Sci. Technol. Eng.* **2021**, *63*, 15–17.
121. Monem, A.; Habibi, D.; Goudarzi, H. An Acid-Based DES as a Novel Catalyst for the Synthesis of Pyranopyrimidines. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 18009.
122. Pawar, N.S.; Patil, P.N.; Pachpande, R.N. An Efficient Synthesis and Antibacterial Activity of Some Novel 3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-Ones. *Chem. Proc.* **2022**, *8*, 37.
123. Xu, Z.; Jiang, Y.; Zou, S.; Liu, Y. Bio-Based Solvent Mediated Synthesis of Dihydropyrimidinethiones via Biginelli Reaction. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **2014**, *189*, 791–795.
124. Clark, J. H.; Macquarrie, D. J.; Sherwood, J. The Combined Role of Catalysis and Solvent Effects on the Biginelli Reaction: Improving Efficiency and Sustainability. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 5174–5182.
125. Noppawan, P.; Sangon, S.; Supanchaiyamat, N.; Hunt, A. J. Vegetable Oil as a Highly Effective 100% Bio-Based Alternative Solvent for the One-Pot Multicomponent Biginelli Reaction. *Green Chem.* **2021**, *23*, 5766–5774.
126. Jagatap, S. A.; Patil, V. S.; Sadawarte, G. P.; Rajput, J. D. Bio-Waste Curd Water as a Greener Protocol for the Synthesis of Biginelli Products at Ambient Temperature. *J. Chem. Educ. Res. Pract.* **2021**, *5*, 89–94.
127. Gawande, M. B.; Bonifácio, V. D. B.; Luque, R.; Branco, P. S.; Varma, R. S. Benign by Design: Catalyst-Free In-Water, On-Water Green Chemical Methodologies in Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5522–5551.

128. Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K. What Is a Green Solvent? A Comprehensive Framework for the Environmental Assessment of Solvents. *Green Chem.* **2007**, *9*, 927–934.
129. Tamaddon, F.; Razmi, Z.; Jafari, A. A. Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones and 1,4-Dihydropyridines Using Ammonium Carbonate in Water. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1187–1189.
130. Tu, S.; Li, C.; Shi, F.; Zhou, D.; Shao, Q.; Cao, L.; Jiang, B. An Efficient Chemoselective Synthesis of Pyrido[2,3-d]pyrimidine Derivatives under Microwave Irradiation. *Synthesis* **2008**, *3*, 369–376.
131. Polshettiwar, V.; Varma, R. S. Biginelli Reaction in Aqueous Medium: A Greener and Sustainable Approach to Substituted 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7343–7346.
132. Lin, H.-X.; Xie, X.-Z.; Wang, X.-H.; He, B. A Practical Approach Towards Synthesis of Octahydroquinazolinone Derivatives in Water. *Lett. Org. Chem.* **2009**, *6*, 254–258.
133. Hassani, Z.; Islami, M. R.; Kalantari, M. An Efficient One-Pot Synthesis of Octahydroquinazolinone Derivatives Using Catalytic Amount of H₂SO₄ in Water. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4479–4482.
134. Mandhane, P. G.; Joshi, R. S.; Nagargoje, D. R.; Gill, C. H. An Efficient Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones Catalyzed by Thiamine Hydrochloride in Water under Ultrasound Irradiation. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3138–3140.
135. Mukhopadhyay, C.; Datta, A. The Development of an Ecofriendly Procedure for Alkaline Metal (II) Sulfate Promoted Synthesis of N,N'-Dimethyl Substituted (Unsubstituted)-4-Aryl-3,4-Dihydropyrimidones (Thiones) and Corresponding Bis-Analogues in Aqueous Medium: Evaluation by Green Chemistry Metrics. *J. Heterocycl. Chem.* **2010**, *47*, 136–146.
136. Takale, S.; Parab, S.; Phatangare, K.; Pisal, R.; Chaskar, A. IBX in Aqueous Medium: A Green Protocol for the Biginelli Reaction. *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1128–1132.
137. Bose, A. K.; Manhas, M. S.; Pednekar, S.; Ganguly, S. N.; Dang, H.; He, W.; Mandadi, A. Large Scale Biginelli Reaction via Water-Based Biphasic Media: A Green Chemistry Strategy. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1901–1903.
138. Sarvaiya, B. H.; Vaja, P. I.; Paghdar, N. A.; Ghelani, S. M. Medicinal Perspective of a Promising Scaffold – Dihydropyrimidinones: A Review. *J. Heterocycl. Chem.* **2024**, *61*, 1325–1348.
139. Kamat, V.; Reddy, D. S.; Kumar, A. Catalytic Role in Biginelli Reaction: Synthesis and Biological Property Studies of 2-Oxo/Thioxo-1,2,3,4-Tetrahydropyrimidines. *Arch. Pharm.* **2023**, *356*, e2300008.
140. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray, F. Cancer Statistics for the Year 2020: An Overview. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 778–789.
141. Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. *Science* **1999**, *286* (5441), 971–974.
142. Russowsky, D.; Canto, R. F.; Sanches, S. A.; D'Oca, M. G.; de Fátima, A.; Pilli, R. A.; Kohn, L. K.; Antônio, M. A.; de Carvalho, J. E. Synthesis and Differential Antiproliferative Activity of Biginelli Compounds against Cancer Cell Lines: Monastrol, Oxo-Monastrol and Oxygenated Analogues. *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 173–182.
143. da Silva, D. L.; Reis, F. S.; Muniz, D. R.; Ruiz, A. L.; de Carvalho, J. E.; Sabino, A. A.; Modolo, L. V.; de Fátima, A. Free Radical Scavenging and Antiproliferative Properties of Biginelli Adducts. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2645–2650.
144. Kamal, A.; Shaheer Malik, M.; Bajee, S.; Azeeza, S.; Faazil, S.; Ramakrishna, S.; Naidu, V. G.; Vishnuwardhan, M. V. Synthesis and Biological Evaluation of Conformationally

- Flexible as Well as Restricted Dimers of Monastrol and Related Dihydropyrimidones. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 3274–3281.
145. Salgueiro, W. G.; Xavier, M. C.; Duarte, L. F.; Câmara, D. F.; Fagundez, D. A.; Soares, A. T.; Perin, G.; Alves, D.; Avila, D. S. Direct Synthesis of 4-Organysulfenyl-7-Chloro Quinolines and Their Toxicological and Pharmacological Activities in *Caenorhabditis elegans*. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *75*, 448–459.
 146. Gonçalves, I. L.; Rockenbach, L.; Göethel, G.; Säuer, E.; Kagami, L. P.; das Neves, G. M.; Munhoz, T.; Figueiró, F.; Garcia, S. C.; Oliveira Battastini, A. M.; Eifler-Lima, V. L. New Pharmacological Findings Linked to Biphenyl DHPMs, Kinesin Eg5 Ligands: Anticancer and Antioxidant Effects. *Future Med. Chem.* **2020**, *12*, 1137–1154.
 147. Vala, R. M.; Sharma, M. G.; Patel, D. M.; Puerta, A.; Padrón, J. M.; Ramkumar, V.; Gardas, R. L.; Patel, H. M. Synthesis and *In Vitro* Study of Antiproliferative Benzyloxy Dihydropyrimidinones. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **2021**, *354*, e2000466.
 148. Prashantha Kumar, B. R.; Sankar, G.; Nasir Baig, R. B.; Chandrashekar, S. Novel Biginelli Dihydropyrimidines with Potential Anticancer Activity: A Parallel Synthesis and CoMSIA Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4192–4198.
 149. Holla, B. S.; Rao, B. S.; Sarojini, B. K.; Akberali, P. M. One Pot Synthesis of Thiazolodihydropyrimidinones and Evaluation of Their Anticancer Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 777–783.
 150. Soumyanarayanan, U.; Bhat, V. G.; Kar, S. S.; Mathew, J. A. Monastrol Mimic Biginelli Dihydropyrimidinone Derivatives: Synthesis, Cytotoxicity Screening against HepG2 and HeLa Cell Lines and Molecular Modeling Study. *Org. Med. Chem. Lett.* **2012**, *2*, 23.
 151. Vendrusculo, V.; de Souza, V. P.; Fontoura, L. A. M.; D'Oca, M. G.; Banzato, T. P.; Monteiro, P. A.; Pilli, R. A.; de Carvalho, J. E.; Russowsky, D. Synthesis of Novel Perillyl-Dihydropyrimidinone Hybrids Designed for Antiproliferative Activity. *MedChemComm* **2018**, *9*, 1553–1564.
 152. Awadallah, F. M.; Piazza, G. A.; Gary, B. D.; Keeton, A. B.; Canzoneri, J. C. Synthesis of Some Dihydropyrimidine-Based Compounds Bearing Pyrazoline Moiety and Evaluation of Their Antiproliferative Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *70*, 273–279.
 153. Carreiro, E. P.; Sena, A. M.; Puerta, A.; Padrón, J. M.; Burke, A. J. Synthesis of Novel 1,2,3-Triazole-Dihydropyrimidinone Hybrids Using Multicomponent 1,3-Dipolar Cycloaddition (Click)–Biginelli Reactions: Anticancer Activity. *Synlett* **2020**, *31*, 615–621.
 154. Sashidhara, K. V.; Singh, L. R.; Shameem, M.; Shakya, S.; Kumar, A.; Laxman, T. S.; Krishna, S.; Siddiqi, M. I.; Bhatta, R. S.; Banerjee, D. Design, Synthesis and Anticancer Activity of Dihydropyrimidinone–Semicarbazone Hybrids as Potential Human DNA Ligase 1 Inhibitors. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7*, 2349–2363.
 155. Stefani, H. A.; Oliveira, C. B.; Almeida, R. B.; Pereira, C. M.; Braga, R. C.; Cella, R.; Borges, V. C.; Savegnago, L.; Nogueira, C. W. Dihydropyrimidin-(2H)-ones Obtained by Ultrasound Irradiation: A New Class of Potential Antioxidant Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 513–518.
 156. de Vasconcelos, A.; Oliveira, P. S.; Ritter, M.; Freitag, R. A.; Romano, R. L.; Quina, F. H.; Pizzuti, L.; Pereira, C. M.; Stefanello, F. M.; Barschak, A. G. Antioxidant Capacity and Environmentally Friendly Synthesis of Dihydropyrimidin-(2H)-ones Promoted by Naturally Occurring Organic Acids. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2012**, *26*, 155–161.
 157. Jayanthi, M.; Venkatesh, P.; Thirunavukkarasu, S. V. A Novel and Efficient Synthesis of 1,2,3,4-Tetrahydropyrimidine Carboxamide Derivatives by Biginelli Reaction and Their *In Vitro* Antibacterial Activity. *Biomedicine (Taipei)* **2022**, *42*, 280–285.

158. Gangwar, N.; Kasana, V. K. 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-one Derivatives: Organocatalysed Microwave Assisted Synthesis and Evaluation of Their Antioxidant Activity. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 4506–4511.
159. Mansouri, M.; Movahedian, A.; Rostami, M.; Fassihi, A. Synthesis and Antioxidant Evaluation of 4-(Furan-2-yl)-6-methyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate Esters. *Res. Pharm. Sci.* **2012**, *7*, 257–264.
160. Murray, C. J. L.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655.
161. Oren, I.; Paul, M. Up to Date Epidemiology, Diagnosis and Management of Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 1–4.
162. Wani, M. Y.; Ahmad, A.; Kumar, S.; Sobral, A. J. F. N. Flucytosine Analogues Obtained through Biginelli Reaction as Efficient Combinative Antifungal Agents. *Microb. Pathog.* **2017**, *105*, 57–62.
163. Akbas, E.; Berber, I.; Akyazi, I.; Anil, B.; Yildiz, E. Microwave-Assisted Synthesis of Tetrahydropyrimidines via Multicomponent Reactions and Evaluation of Biological Activities. *Lett. Org. Chem.* **2011**, *8*, 663–667.
164. Rajanarendar, E.; Reddy, M. N.; Murthy, K. R.; Reddy, K. G.; Raju, S.; Srinivas, M.; Praveen, B.; Rao, M. S. Synthesis, Antimicrobial, and Mosquito Larvicidal Activity of 1-Aryl-4-methyl-3,6-bis-(5-methylisoxazol-3-yl)-2-thioxo-2,3,6,10b-tetrahydro-1H-pyrimido[5,4-c]quinolin-5-ones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6052–6055.
165. Chitra, S.; Devanathan, D.; Pandiarajan, K. Synthesis and in Vitro Microbiological Evaluation of Novel 4-Aryl-5-isopropoxycarbonyl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidinones. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 367–371.
166. Makwana, A. H.; Malani, A. H. Synthesis, Characterization and in Vitro Antimicrobial Activity of Newly Synthesized 4-(2'-Cyanobiphenyl-2-yl)-3,4-dihydropyrimidines. *J. Applicable Chem.* **2019**, *8*, 1146–1154.
167. Ashok, M.; Holla, B. S.; Kumari, N. S. Convenient One Pot Synthesis of Some Novel Derivatives of Thiazolo[2,3-b]dihydropyrimidinone Possessing 4-Methylthiophenyl Moiety and Evaluation of Their Antibacterial and Antifungal Activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 380–385.
168. Alam, M. M.; Akhter, M.; Husain, A.; Marella, A.; Tanwar, O. P.; Ali, R.; Hasan, S. M.; Kumar, H.; Haider, R.; Shaquiquzzaman, M. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activity of 4,5-Dihydropyrimidine-5-carbonitrile Derivatives: Their Synthesis and Spectral Elucidation. *Acta Pol. Pharm.* **2012**, *69*, 1077–1085.
169. Zamponi, G. W.; Striessnig, J.; Koschak, A.; Dolphin, A. C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol. Rev.* **2015**, *67*, 821–870.
170. Grover, G. J.; Dzwonczyk, S.; McMullen, D. M.; Normandin, D. E.; Parham, C. S.; Sleph, P. G.; Moreland, S. Pharmacologic Profile of the Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers SQ 32,547 and SQ 32,926 [Correction of SQ 32,946]. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1995**, *26*, 289–294.
171. Atwal, K. S.; Swanson, B. N.; Unger, S. E.; Floyd, D. M.; Moreland, S.; Hedberg, A.; O'Reilly, B. C. Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic Acid Esters as Orally Effective Antihypertensive Agents. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 806–811.
172. Chioua, M.; Buzzi, E.; Moraleda, I.; Iriepa, I.; Maj, M.; Wnorowski, A.; Giovannini, C.; Tamarin, A.; Portali, F.; Ismaili, L.; López-Alvarado, P.; Bolognesi, M. L.; Jóźwiak, K.; Menéndez, J. C.; Marco-Contelles, J.; Bartolini, M. Tacripyrimidines, the First Tacrine-Dihydropyrimidine Hybrids, as Multi-Target-Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 839–846.

173. Mahgoub, S.; Kotb El-Sayed, M. I.; El-Shehry, M. F.; Mohamed Awad, S.; Mansour, Y. E.; Fatahala, S. S. Synthesis of Novel Calcium Channel Blockers with ACE2 Inhibition and Dual Antihypertensive/Anti-Inflammatory Effects: A Possible Therapeutic Tool for COVID-19. *Bioorg. Chem.* **2021**, *116*, 105272.
174. Teleb, M.; Rizk, O. H.; Zhang, F. X.; Fronczek, F. R.; Zamponi, G. W.; Fahmy, H. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Some Substituted Dihydropyrimidines with L-/T-Type Calcium Channel Blocking Activities. *Bioorg. Chem.* **2019**, *83*, 354–366.
175. Zamponi, G. W. Targeting Voltage-Gated Calcium Channels in Neurological and Psychiatric Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 19–34.
176. Hansen, P. B. L. Functional Importance of T-Type Voltage-Gated Calcium Channels in the Cardiovascular and Renal System: News from the World of Knockout Mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2015**, *308*, R227–R237.
177. Perez-Reyes, E.; Van Deusen, A. L.; Vitko, I. Molecular Pharmacology of Human Ca v 3.2 T-Type Ca 2+ Channels: Block by Antihypertensives, Antiarrhythmics, and Their Analogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *328*, 621–627.
178. Kanukula, R.; Dhurjati, R.; Vidyasagar, K.; Rehana, N.; Talari, A.; Salam, A.; Rodgers, A.; Page, M. J.; ESC Scientific Document Group. 2018 ESC/ESH Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 3021–3104.
179. Sedova, V. F.; Voevoda, T. V.; Tolstikova, T. G.; Shkurko, O. P. Synthesis and Antiarrhythmic Effect of 4-Aryl-5-nitro-6-phenyl-3,4-dihydro-(1H)-pyrimidin-2-ones. *Pharm. Chem. J.* **2002**, *36*, 284–287.
180. Bryzgalov, A. O.; Dolgikh, M. P.; Sorokina, I. V.; Tolstikova, T. G.; Sedova, V. F.; Shkurko, O. P. Antiarrhythmic Activity of 4,6-Di(het)aryl-5-nitro-3,4-dihydropyrimidin-(1H)-2-ones and Its Effects on Arterial Pressure in Rats. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1418–1420.
181. Zorkun, I. S.; Saraç, S.; Çelebi, S.; Erol, K. Synthesis of 4-Aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione Derivatives as Potential Calcium Channel Blockers. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8582–8589.
182. Sujatha, K.; Shanmugam, P.; Perumal, P. T.; Muralidharan, D.; Rajendran, M. Synthesis and Cardiac Effects of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-one-5 Carboxylates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4893–4897.
183. Singh, K.; Arora, D.; Falkowski, D.; Liu, Q.; Moreland, R. S. An Efficacious Protocol for 4-Substituted 3,4-Dihydropyrimidinones: Synthesis and Calcium Channel Binding Studies. *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 3258–3264.
184. De Clercq, E. Emerging Anti-HIV Drugs. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2005**, *10*, 241–274.
185. Naidu, B. N.; Sorenson, M. E.; Patel, M.; Ueda, Y.; Banville, J.; Beaulieu, F.; Bollini, S.; Dicker, I. B.; Higley, H.; Lin, Z.; Pajor, L.; Parker, D. D.; Terry, B. J.; Zheng, M.; Martel, A.; Meanwell, N. A.; Krystal, M.; Walker, M. A. Synthesis and Evaluation of C2-Carbon-Linked Heterocyclic-5-Hydroxy-6-oxo-Dihydropyrimidine-4-Carboxamides as HIV-1 Integrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 717–720.
186. Kim, Y.; Sohn, J. H.; Park, Y.; Ju, M. K.; Kim, J.; Han, S. J.; Kim, T. H.; Cechetto, J.; Nam, J.; Sommer, P.; No, Z. Discovery of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones with Inhibitory Activity against HIV-1 Replication. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2119–2124.
187. Kumarasamy, D.; Roy, B. G.; Rocha-Pereira, J.; Neyts, J.; Nanjappan, S.; Maity, S.; Mookerjee, M.; Naesens, L. Synthesis and *In Vitro* Antiviral Evaluation of 4-Substituted 3,4-Dihydropyrimidinones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 139–142.
188. Kaoukabi, H.; Kabri, Y.; Curti, C.; Taourirte, M.; Rodriguez-Ubis, J. C.; Snoeck, R.; Andrei, G.; Vanelle, P.; Lazrek, H. B. Dihydropyrimidinone/1,2,3-Triazole Hybrid

- Molecules: Synthesis and Anti-Varicella-Zoster Virus (VZV) Evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 772–781.
189. Zabihollahi, R.; Fassihi, A.; Aghasadeghi, M. R.; Memarian, H. R.; Soleimani, M.; Majidzadeh-A, K. Inhibitory Effect and Structure–Activity Relationship of Some Biginelli-Type Pyrimidines against HSV-1. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 1270–1276.
 190. Priya, N.; Singh, P.; Bhatia, S.; Medhi, B.; Prasad, A. K.; Parmar, V. S.; Raj, H. G. Characterization of a Unique Dihydropyrimidinone, Ethyl 4-(4'-Heptanoyloxyphenyl)-6-Methyl-3,4-Dihydropyrimidin-2-one-5-carboxylate, as an Effective Antithrombotic Agent in a Rat Experimental Model. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *63*, 1175–1185.
 191. Bairagi, K. M.; Younis, N. S.; Emeka, P. M.; Venugopala, K. N.; Alwassil, O. I.; Khalil, H. E.; Sangtani, E.; Gonnade, R. G.; Mohanlall, V.; Nayak, S. K. Chemistry, Anti-Diabetic Activity and Structural Analysis of Substituted Dihydropyrimidine Analogues. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1227*, 129412.
 192. Mourad, A. A. E.; Khodir, A. E.; Saber, S.; Mourad, M. A. E. Novel Potent and Selective DPP-4 Inhibitors: Design, Synthesis and Molecular Docking Study of Dihydropyrimidine Phthalimide Hybrids. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 1–24.
 193. Shaikh, A.; Meshram, J. S. Design, Synthesis and Pharmacological Assay of Novel Azo Derivatives of Dihydropyrimidinones. *Cogent Chem.* **2015**, *1*, 1019809.
 194. Viveka, S.; Dinesha; Nagaraja, G. K.; Shama, P.; Basavarajaswamy, G.; Rao, K. P.; Sreenivasa, M. Y. One Pot Synthesis of Thiazolo[2,3-b]dihydropyrimidinone Possessing Pyrazole Moiety and Evaluation of Their Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities. *Med. Chem. Res.* **2018**, *27*, 171–185.
 195. Wu, G.-M.; Sun, W.-L.; Shen, Z.-Q. Synthesis and Properties of Two Poly(Phenyl Methacrylate)s Functionalized with Pedent Dihydropyrimido(Thi)one Groups. *Chin. J. Polym. Sci.* **2009**, *27*, 293–296.
 196. Zhu, C.; Yang, B.; Zhao, Y.; Fu, C.; Tao, L.; Wei, Y. A New Insight into the Biginelli Reaction: The Dawn of Multicomponent Click Chemistry? *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 5395–5400.
 197. Zhao, Y.; Wu, H.; Zhang, Y.; Wang, X.; Yang, B.; Zhang, Q.; Ren, X.; Fu, C.; Wei, Y.; Wang, Z.; Wang, Y.; Tao, L. Postpolymerization Modification of Poly(dihydropyrimidin-2(1H)-thione)s via the Thiourea-Haloalkane Reaction to Prepare Functional Polymers. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 843–847.
 198. Zhao, Y.; Yu, Y.; Zhang, Y.; Wang, X.; Yang, B.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Fu, C.; Wei, Y.; Tao, L. From Drug to Adhesive: A New Application of Poly(dihydropyrimidin-2(1H)-one)s via the Biginelli Polycondensation. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 4940–4945.
 199. Xue, H.; Zhao, Y.; Wu, H.; Wang, Z.; Yang, B.; Wei, Y.; Wang, Z.; Tao, L. Multicomponent Combinatorial Polymerization via the Biginelli Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 8690–8693.
 200. Wu, H.; Fu, C.; Zhao, Y.; Yang, B.; Wei, Y.; Wang, Z.; Tao, L. Multicomponent Copolycondensates via the Simultaneous Hantzsch and Biginelli Reactions. *ACS Macro Lett.* **2015**, *4*, 1189–1193.
 201. Ren, B.; Yang, B.; Zhao, Y.; Zhang, X.; Wang, X.; Wei, Y.; Tao, L. One-Pot Polymer Conjugation on Carbon Nanotubes through Simultaneous π - π Stacking and the Biginelli Reaction. *Polymer* **2015**, *64*, 210–215.
 202. Slatore, C. G.; Littman, A. J.; Au, D. H.; Satia, J. A.; White, E. Long-Term Use of Supplemental Multivitamins, Vitamin C, Vitamin E, and Folate Does Not Reduce the Risk of Lung Cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *177*, 524–530.
 203. Maraveas, C.; Bayer, I. S.; Bartzanas, T. Recent Advances in Antioxidant Polymers: From Sustainable and Natural Monomers to Synthesis and Applications. *Polymers* **2021**, *13*, 2465.

204. Mao, T.; Yang, L.; Liu, G.; Wei, Y.; Gou, Y.; Wang, J.; Tao, L. Ferrocene-Containing Polymer via the Biginelli Reaction for In Vivo Treatment of Oxidative Stress Damage. *ACS Macro Lett.* **2019**, *8*, 639–645.
205. Wu, H.; Yang, L.; Tao, L. Polymer Synthesis by Mimicking Nature's Strategy: The Combination of Ultra-Fast RAFT and the Biginelli Reaction. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 5679–5687.
206. Mao, T.; Liu, G.; Wu, H.; Wei, Y.; Gou, Y.; Wang, J.; Tao, L. High Throughput Preparation of UV-Protective Polymers from Essential Oil Extracts via the Biginelli Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 6865–6872.
207. Liu, Z. Q. Enhancing Antioxidant Effect against Peroxyl Radical-Induced Oxidation of DNA: Linking with Ferrocene Moiety! *Chem. Rec.* **2019**, *19*, 2385–2397.
208. Wang, Z.; Yu, Y.; Li, Y.; Yang, L.; Zhao, Y.; Liu, G.; Wei, Y.; Wang, X.; Tao, L. Post-Polymerization Modification via the Biginelli Reaction to Prepare Water-Soluble Polymer Adhesives. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 5490–5495.
209. Yang, L.; Zeng, Y.; Wu, H.; Zhou, C.; Tao, L. An Antioxidant Self-Healing Hydrogel for 3D Cell Cultures. *J. Mater. Chem. B*, **2020**, *8*, 1383–1388.
210. Li, Y.; Tan, T.; Zhao, Y.; Wei, Y.; Wang, D.; Chen, R.; Tao, L. Anticancer Polymers via the Biginelli Reaction. *ACS Macro Lett.* **2020**, *9*, 1249–1254.
211. Ringsdorf, H. Structure and Properties of Pharmacologically Active Polymers. *J. Polymer* **1975**, 135–153.
212. Dong, J.; Liu, M.; Jiang, R.; Huang, H.; Wan, Q.; Wen, Y.; Tian, J.; Dai, Y.; Zhang, X.; Wei, Y. Synthesis and Biological Imaging of Cross-Linked Fluorescent Polymeric Nanoparticles with Aggregation-Induced Emission Characteristics Based on the Combination of RAFT Polymerization and the Biginelli Reaction. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *528*, 192–199.
213. Quan, Z.-J.; Wei, Q.-B.; Ma, D.-D.; Da, Y.-X.; Wang, X.-C.; Shen, M.-S. General and Green Synthesis of C-6 Sulfonylmethyl 4-Aryl-3,4-dihydropyrimidinones in Water. *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 3816–3826.
214. Shehab, W. S.; Assy, M. G.; Moustafa, H. Y.; Abdellatif, M. H.; Rahman, H. M. A. Pyrimidines as Block Units in Heterocycles: Novel Synthesis of Pyrimidines and Condensed Pyrimidine Derivatives. *J. Iran. Chem. Soc.* **2019**, *16*, 2451–2461.
215. Dhankar, R.; Rahatgaonkar, A. M.; Shukla, R.; Chorghade, M.; Tiwari, A. Computer Simulation of the In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Activities of Dihydropyrimidines Acid Derivatives through the Inhibition of Cyclooxygenase-2. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 2493–2504.
216. Steele, T. G.; Coburn, C. A.; Patane, M. A.; Bock, M. G. Expedient Synthesis of 5-Unsubstituted 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 9315–9318.
217. Shutalev, A. D.; Aksionov, A. N. Simple Synthesis of 4-Aryl-6-styryl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2-ones by the Alkaline Hydrolysis of Biginelli Compounds. *Mendeleev Commun.* **2005**, *15*, 73–75.
218. Zigeuner, G.; Knopp, C.; Blaschke, H. Über Tetrahydro-6-methyl- bzw. 6-phenyl-2-oxopyrimidin-5-carbonsäuren und ihre Derivate. *Monatsh. Chem.* **1976**, *107*, 587–603.
219. Zigeuner, G.; Fuchs, E.; Galatik, W. Über Heterocyclen, 9. Mitt.: 2-Oxo-tetrahydropyrimidine, 1. Mitt. *Monatsh. Chem.* **1966**, *97*, 43–51.
220. Kappe, C. O. 100 Years of the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6937–6963.
221. Butler, R. N.; Coyne, A. G. Organic Synthesis Reactions On-Water at the Organic–Liquid Water Interface. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9945–9960.
222. Hurley, L. H. DNA and Its Associated Processes as Targets for Cancer Therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, *2*, 188–200.

223. Strekowski, L.; Wilson, B. Noncovalent Interactions with DNA: An Overview. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 623, 3–13.
224. Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug–DNA Interactions and Their Study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltammetry. *J. Photochem. Photobiol. B.* **2013**, 124, 1–19.
225. Ramana, M. M.; Betkar, R.; Nimkar, A.; Ranade, P.; Mundhe, B.; Pardeshi, S. Synthesis of a Novel 4H-Pyran Analog as Minor Groove Binder to DNA Using Ethidium Bromide as Fluorescence Probe. *Spectrochim. Acta, Part A.* **2016**, 152, 165–171.
226. Carter, D. C.; Chang, B.; Ho, J. X.; Keeling, K.; Krishnasami, Z. Preliminary Crystallographic Studies of Four Crystal Forms of Serum Albumin. *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 1049–1052.
227. Perry, J. L.; Il'ichev, Y. V.; Kempf, V. R.; McClendon, J.; Park, G.; Manderville, R. A.; Rüker, F.; Dockal, M.; Simon, J. D. Binding of Ochratoxin A Derivatives to Human Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 6644–6652.
228. Lakowicz, J. R.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Dattelbaum, J. D. Anisotropy-Based Sensing with Reference Fluorophores. *Anal. Biochem.* **1999**, 267, 397–405.
229. Ghisaidoobe, A.; Chung, S. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 22518–22538.
230. Rosenoer, V. M.; Oratz, M.; Rothschild, M., Eds. *Albumin: Structure, Function and Uses*, 1st ed.; Pergamon: Oxford, 2014.
231. Nantasenamat, C.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Prachayasittikul, V. Advances in Computational Methods to Predict the Biological Activity of Compounds. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, 5, 633–654.
232. Janković, N.; Trifunović Ristovski, J.; Vraneš, M.; Tot, A.; Petronijević, J.; Joksimović, N.; Stanojković, T.; Đorđić Crnogorac, M.; Petrović, N.; Boljević, I.; Matić, I. Z.; Bogdanović, G. A.; Mikov, M.; Bugarčić, Z. Discovery of the Biginelli Hybrids as Novel Caspase-9 Activators in Apoptotic Machines: Lipophilicity, Molecular Docking Study, Influence on Angiogenesis Gene and miR-21 Expression Levels. *Bioorg. Chem.* **2019**, 86, 569–582.
233. Baroni, M.; Costantino, G.; Cruciani, G.; Riganelli, D.; Valigi, R.; Clementi, S. Generating Optimal Linear PLS Estimations (GOLPE): An Advanced Chemometric Tool for Handling 3D-QSAR Problems. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1993**, 12, 9–20.
234. Ruzic, D.; Petkovic, M.; Agbaba, D.; Ganesan, A.; Nikolic, K. Combined Ligand and Fragment-Based Drug Design of Selective Histone Deacetylase – 6 Inhibitors. *Mol. Inform.* **2019**, 38, e1800156.
235. www.swisstargetprediction.ch.
236. Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissTargetPrediction: Updated Data and New Features for Efficient Prediction of Protein Targets of Small Molecules. *Nucleic Acids Res.* **2019**, 47, W357–W364.
237. Janković, N.; Milović, E.; Jovanović, J. Đ.; Marković, Z.; Vraneš, M.; Stanojković, T.; Matić, I.; Crnogorac, M. Đ.; Klisurić, O.; Cvetinov, M.; Abbas Bukhari, S. N. A New Class of Half-Sandwich Ruthenium Complexes Containing Biginelli Hybrids: Anticancer and Anti-SARS-CoV-2 Activities. *Chem. Biol. Interact.* **2022**, 363, 110025.
238. Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Edgington, P. R.; Kessler, M.; Macrae, C. F.; McCabe, P.; Pearson, J.; Taylor, R. New Software for Searching the Cambridge Structural Database and Visualizing Crystal Structures. *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.* **2002**, 58 (Pt 3 Pt 1), 389–397.
239. Cremer, D.; Pople, J. A. A General Definition of Ring Puckering Coordinates. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1354–1358.

240. Ristovski Trifunović, J.; Minorics, R.; Bartha, S.; Janković, N.; Zupkó, I. The Evaluation of the Anticancer Activity of the Biginelli Hybrids and Pharmacokinetic Profiling Based on Their Retention Parameters. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1254*, 132715.
241. Wu, Y.; Yang, G. Interaction between Garcigenin and DNA by Spectrophotometry and Fluorescence Spectroscopy. *Spectrosc. Lett.* **2010**, *43*, 28–35.
242. Banerjee, S.; Mondal, S.; Chakraborty, W.; Sen, S.; Gachhui, R.; Butcher, R. J.; Slawin, A. M. Z.; Mandal, C.; Mitra, S. Syntheses, X-ray Crystal Structures, DNA Binding, Oxidative Cleavage Activities and Antimicrobial Studies of Two Cu(II) Hydrazone Complexes. *Polyhedron* **2009**, *28*, 2785–2793.
243. Ramakrishnan, S.; Palaniandavar, M. Interaction of $\text{rac-[Cu(diimine)}_3\text{]}^{2+}$ and $\text{rac-[Zn(diimine)}_3\text{]}^{2+}$ Complexes with CT DNA: Effect of Fluxional Cu(II) Geometry on DNA Binding, Ligand-Promoted Exciton Coupling and Prominent DNA Cleavage. *Dalton Trans.* **2008**, 3866–3878.
244. Kapicak, L.; Gabbay, E. J. Effect of Aromatic Cations on the Tertiary Structure of Deoxyribonucleic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 403–408.
245. Shahabadi, N.; Nemati, L. DNA Interaction Studies of a Platinum(II) Complex Containing 1-Histidine and 1,10-Phenanthroline Ligands. *DNA Cell Biol.* **2012**, *31*, 883–890.
246. Phadte, A. A.; Banerjee, S.; Mate, N. A.; Banerjee, A. Spectroscopic and Viscometric Determination of DNA-Binding Modes of Some Bioactive Dibenzodioxins and Phenazines. *Biochem. Biophys. Rep.* **2019**, *18*, 100627.
247. Pérez-Arnaiz, C.; Busto, N.; Leal, J. M.; García, B. New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 1288–1295.
248. Misra, H. P.; Fridovich, I. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170–3175.
249. Goth, L. A Simple Method for Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. *Clin. Chim. Acta* **1991**, *196*, 143–152.
250. Mihailović, V.; Katanić, J.; Mišić, D.; Stanković, V.; Mihailović, M.; Uskoković, A.; Arambašić, J.; Solujić, S.; Mladenović, M.; Stanković, N. Hepatoprotective Effects of Secoiridoid-Rich Extracts from *Gentiana cruciata* L. against Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage in Rats. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1795–1803.
251. Mihailović, V.; Mihailović, M.; Uskoković, A.; Arambašić, J.; Mišić, D.; Stanković, V.; Katanić, J.; Mladenović, M.; Solujić, S.; Matić, S. Hepatoprotective Effects of *Gentiana asclepiadea* L. Extracts against Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *52*, 83–90.
252. Boll, M.; Weber, L. W. D.; Becker, E.; Stampfl, A. Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2001**, *56c*, 6–15.
253. Wang, J.; Yu, X.; Jia, R.; Liu, R.; Zong, W. An *In Vitro* and *In Silico* Study to Explore the Response of Catalase to 4-Chlorophenol and Their Interacting Mechanisms. *J. Mol. Liq.* **2021**, *337*, 116444.
254. Alameen, A. A.; Abdalla, M.; Alshibl, H. M.; AlOthman, M. R.; Alkhulaifi, M. M.; Mirgany, T. O.; Elsayim, R. In-Silico Studies of Glutathione Peroxidase4 Activators as Candidate for Multiple Sclerosis Management. *J. Saudi Chem. Soc.* **2022**, *26*, 101554.
255. Gür, F.; Gür, B.; Erkeyman, B.; Halıcı, Z.; Karakoç, A. Investigation of Serum and Brain Superoxide Dismutase Levels Depending on Atomoxetine Used in ADHD Treatment: A Combination of *In Vivo* and Molecular Docking Studies. *Bioorg. Chem.* **2020**, *105*, 104435.
256. Ni, W.-J.; Leng, X.-M. Dynamic miRNA–mRNA Paradigms: New Faces of miRNAs. *Biochem. Biophys. Rep.* **2015**, *4*, 337–341.

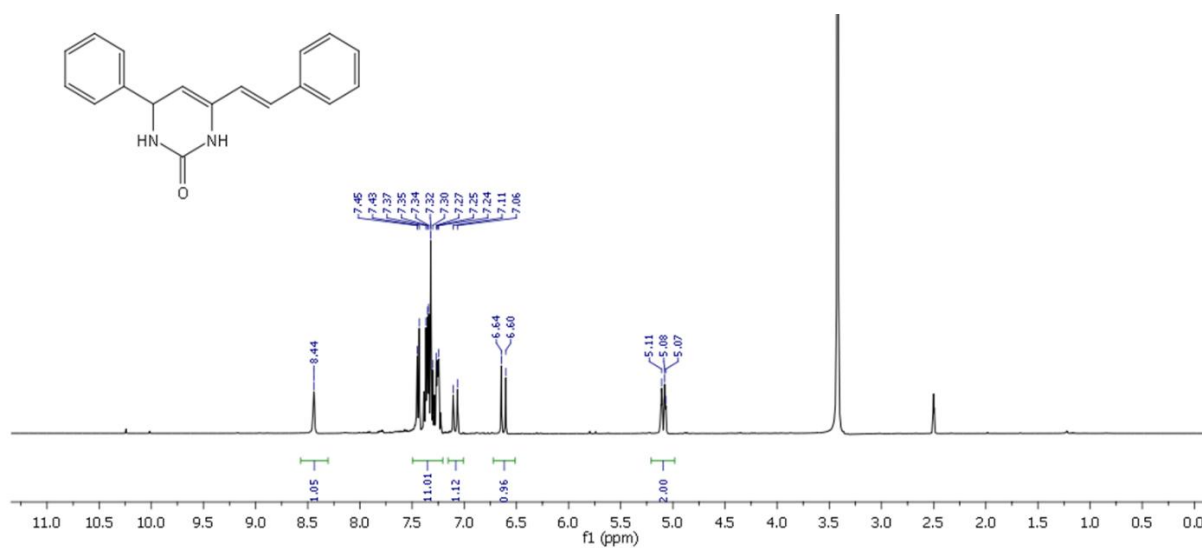
257. Hatzl, S.; Perfler, B.; Wurm, S.; Uhl, B.; Quehenberger, F.; Ebner, S.; Troppmair, J.; Reinisch, A.; Wölfler, A.; Sill, H.; Zebisch, A. Increased Expression of Micro-RNA-23a Mediates Chemoresistance to Cytarabine in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 496.
258. Stefański, T.; Mikstacka, R.; Kurczab, R.; Dutkiewicz, Z.; Kucińska, M.; Murias, M.; Zielińska-Przyjemska, M.; Cichocki, M.; Teubert, A.; Kaczmarek, M.; Hogendorf, A.; Sobiak, S. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Combretastatin A-4 Thio Derivatives as Microtubule Targeting Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 797–816.
259. *CrysAlisPro*, Version 2021; Rigaku Oxford Diffraction.
260. Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr., Sect. C: Struct. Chem.* **2015**, *71*, 3–8.
261. Macrae, C. F.; Sovago, I.; Cottrell, S. J.; Galek, P. T. A.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Platings, M.; Shields, G. P.; Stevens, J. S.; Towler, M.; Wood, P. A. Mercury 4.0: From Visualization to Analysis, Design and Prediction. *J. Appl. Crystallogr.* **2020**, *53* (Pt 1), 226–235.
262. Farrugia, L. J. WinGX Suite for Small-Molecule Single-Crystal Crystallography. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.
263. Spek, A. L. Single-Crystal Structure Validation with the Program PLATON. *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 7–13.
264. Nardelli, M. PARST 95 – An Update to PARST: A System of Fortran Routines for Calculating Molecular Structure Parameters from the Results of Crystal Structure Analyses. *J. Appl. Crystallogr.* **1995**, *28*, 659–659.
265. Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
266. Ohno, M.; Abe, T. Rapid Colorimetric Assay for the Quantification of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and Interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods* **1991**, *145*, 199–203.
267. Matić, I. Z.; Aljančić, I.; Žižak, Ž.; Vajs, V.; Jadranin, M.; Milosavljević, S.; Juranić, Z. D. In Vitro Antitumor Actions of Extracts from Endemic Plant *Helichrysum zivojinii*. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, *13*, 36.
268. Mihailović, N.; Marković, V.; Matić, I. Z.; Stanisavljević, N. S.; Jovanović, Ž. S.; Trifunović, S.; Joksović, Lj. Synthesis and Antioxidant Activity of 1,3,4-Oxadiazoles and Their Diacylhydrazine Precursors Derived from Phenolic Acids. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 8550–8560.
269. McCue, P.; Kwon, Y.-I.; Shetty, K. Anti-Amylase, Anti-Glucosidase and Anti-Angiotensin I-Converting Enzyme Potential of Selected Foods. *J. Food Biochem.* **2005**, *29*, 278–294.
270. Grozdanić, N.; Zdunić, G.; Šavikin, K.; Đuričić, I.; Kosanić, M.; Mačić, V.; Matić, I. Z.; Stanojković, T. P. Seasonal Variation in Biopharmaceutical Activity and Fatty Acid Content of Endemic *Fucus virsoides* Algae from Adriatic Sea. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* **2019**, *76*, 833–844.
271. Barton, J. K.; Danishefsky, A. T.; Goldberg, J. M. Tris(phenanthroline)ruthenium(II): Stereoselectivity in Binding to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2172–2176.
272. Chiu, M.; Prenner, E. Differential Scanning Calorimetry: An Invaluable Tool for a Detailed Thermodynamic Characterization of Macromolecules and Their Interactions. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2011**, *3*, 39–59.
273. Bruylants, G.; Wouters, J.; Michaux, C. Differential Scanning Calorimetry in Life Science: Thermodynamics, Stability, Molecular Recognition and Application in Drug Design. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2011–2020.
274. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; et al. *Gaussian 09*, Revision D.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2016.
275. ChemBio3D Ultra; PerkinElmer Informatics: 2013.

276. Hehre, W. J.; Radom, L.; von R. Schleyer, P.; Pople, J. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*; Wiley: New York, 1986.
277. Moldiscovery. Pentacle Software. <http://www.moldiscovery.com/software/pentacle> (accessed 2025-07-01).
278. Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3233–3243.
279. Cruciani, G. *Molecular Interaction Fields: Applications in Drug Discovery and ADME Prediction*; Wiley: Chichester, 2005; Vol. 27.
280. Duran, A.; Pastor, M. An Advanced Tool for Computing and Handling Grid-Independent Descriptors. User Manual Version 1.06. 2011.
281. Ojha, P. K.; Roy, K. Comparative QSARs for Antimalarial Endochins: Importance of Descriptor-Thinning and Noise Reduction Prior to Feature Selection. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.* **2011**, *109*, 146–161.
282. Tropsha, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Mol. Inform.* **2010**, *29*, 476–488.
283. Roy, K.; Chakraborty, P.; Mitra, I.; Ojha, P. K.; Kar, S.; Das, R. N. Some Case Studies on Application of “ r_m^2 ” Metrics for Judging Quality of Quantitative Structure–Activity Relationship Predictions: Emphasis on Scaling of Response Data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34*, 1071–1082.
284. Protein Preparation Wizard; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2015.
285. Rostkowski, M.; Olsson, M. H.; Søndergaard, C. R.; Jensen, J. H. Graphical Analysis of pH-Dependent Properties of Proteins Predicted Using PROPKA. *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 6.
286. Jorgensen, W. L.; Tirado-Rives, J. Potential Energy Functions for Atomic-Level Simulations of Water and Organic and Biomolecular Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 6665–6670.
287. Glide; Schrödinger, LLC: New York, NY, 2015.
288. Artese, A.; Cross, S.; Costa, G.; Distinto, S.; Parrotta, L.; Alcaro, S.; Ortuso, F.; Cruciani, G. Molecular Interaction Fields in Drug Discovery: Recent Advances and Future Perspectives. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2013**, *3*, 594–613.
289. Kragh-Hansen, U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacol. Rev.* **1981**, *33*, 17–53.
290. Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173–1213.
291. Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235–242.
292. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. Software News and Updates: AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2785–2791.
293. Putnam, C. D.; Arvai, A. S.; Bourne, Y.; Tainer, J. A. Active and Inhibited Human Catalase Structures: Ligand and NADPH Binding and Catalytic Mechanism. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 295–309.
294. Grodner, B.; Napiórkowska, M.; Pisklak, D.M. Catalase Inhibition by Aminoalkanol Derivatives with Potential Anti-Cancer Activity—In Vitro and In Silico Studies Using Capillary Electrophoresis Method. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 7123.

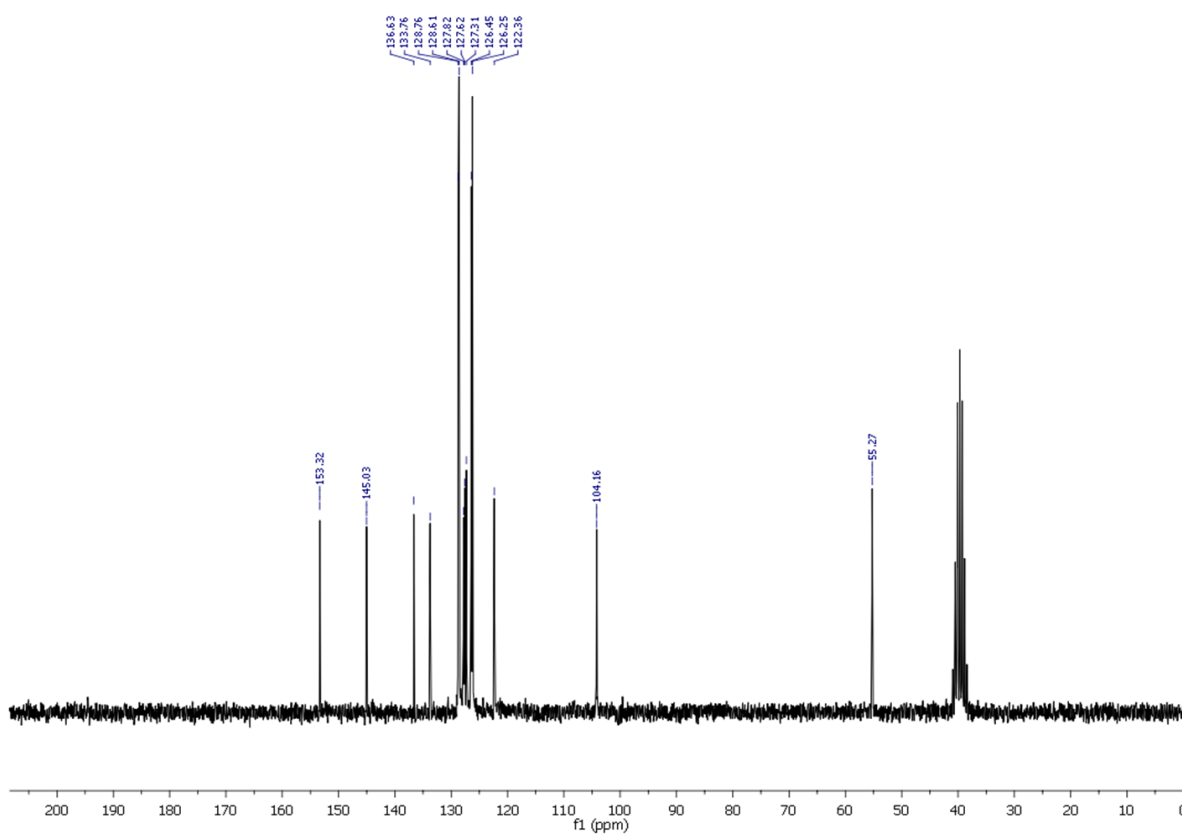
295. Scheerer, P.; Angermüller, S.; Herold, S.; Winklhofer, K. F.; Schmid, R. D.; Hofrichter, M. Structural Basis for Catalytic Activity and Enzyme Polymerization of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase-4 (GPx4). *Biochemistry* **2007**, *46*, 9041–9049.
296. Sea, K.; Xie, Y.; Wang, W.; Xu, Y.; Wang, X.; Deng, W.; Wang, X. Insights into the Role of the Unusual Disulfide Bond in Copper-Zinc Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 2405–2418.
297. Bastin, A.; Abadie, E.; Durieu, E.; Pardon, P.; Piffaut, C.; Galinier, A. In Vitro and Molecular Docking Analysis of Quercetin as an Anti-Inflammatory and Antioxidant. *Curr. Pharm. Des.* **2023**, *29*, 883–891.
298. Soczewiński, E.; Wachtmeister, C. A. The Relation between the Composition of Certain Ternary Two-Phase Solvent Systems and RM Values. *J. Chromatogr. A* **1962**, *7*, 311–320.
299. Molinspiration Cheminformatics. <https://www.molinspiration.com/> (accessed 2025-07-01).
300. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. <http://www.swissadme.ch/> (accessed 2025-07-01).
301. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. <http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsmprediction> (accessed 2025-07-01).
302. Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4066–4072.
303. Nedeljković, N.; Dobričić, V.; Bošković, J.; Vesović, M.; Bradić, J.; Anđić, M.; Kočović, A.; Jeremić, N.; Novaković, J.; Jakovljević, V.; et al. Synthesis and Investigation of Anti-Inflammatory Activity of New Thiourea Derivatives of Naproxen. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 666.
304. Salga, M. S.; Ali, H. M.; Abdulla, M. A.; Abdelwahab, S. I. Acute Oral Toxicity Evaluations of Some Zinc(II) Complexes Derived from 1-(2-Salicylaldiminoethyl)Piperazine Schiff Bases in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 1393–1404.
305. Szende, B.; Timár, F.; Hargitai, B. Olive Oil Decreases Liver Damage in Rats Caused by Carbon Tetrachloride (CCl₄). *Exp. Toxicol. Pathol.* **1994**, *46*, 355–359.
306. Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191.
307. Collins, A. R. Comet Assay for DNA Damage and Repair, Principles, Applications, and Limitations. *Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 249–261.
308. Manoharan, K. A.; Banerjee, M. R. β -Carotene Reduces Sister Chromatid Exchanges Induced by Chemical Carcinogens in Mouse Mammary Cells in Organ Culture. *Cell Biol. Int. Rep.* **1985**, *9*, 783–789.
309. Waters, M. D.; Brady, A. L.; Stack, H. F.; Brockman, H. E. Antimutagenicity Profiles for Some Model Compounds. *Mutat. Res.* **1990**, *238*, 57–85.
310. Ellman, G. L. Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.
311. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* **1979**, *95*, 351–358.
312. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265–275.
313. Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.

6. Прилог

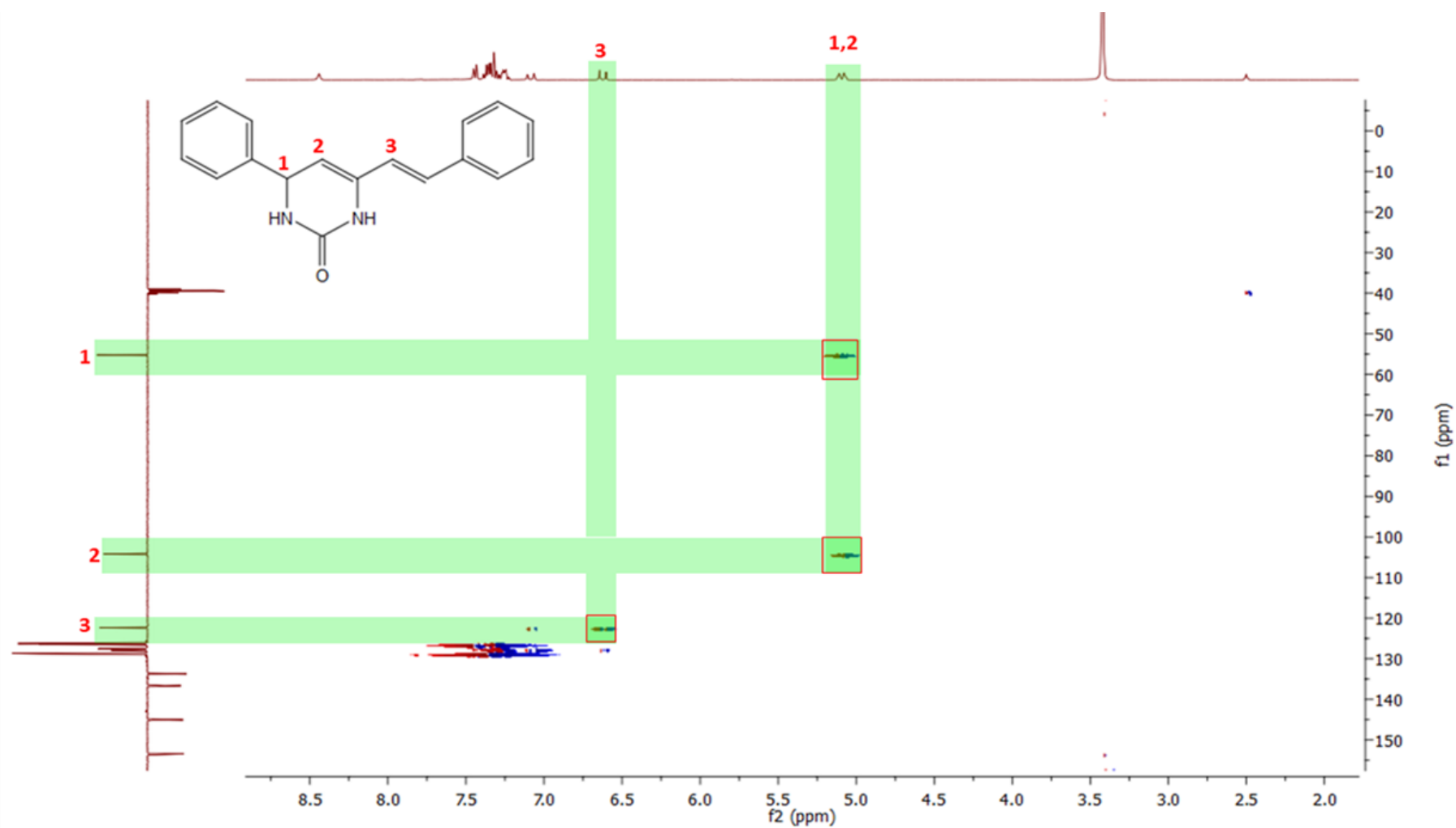
6.1. ^1H и ^{13}C NMR спектри за релевантна једињења



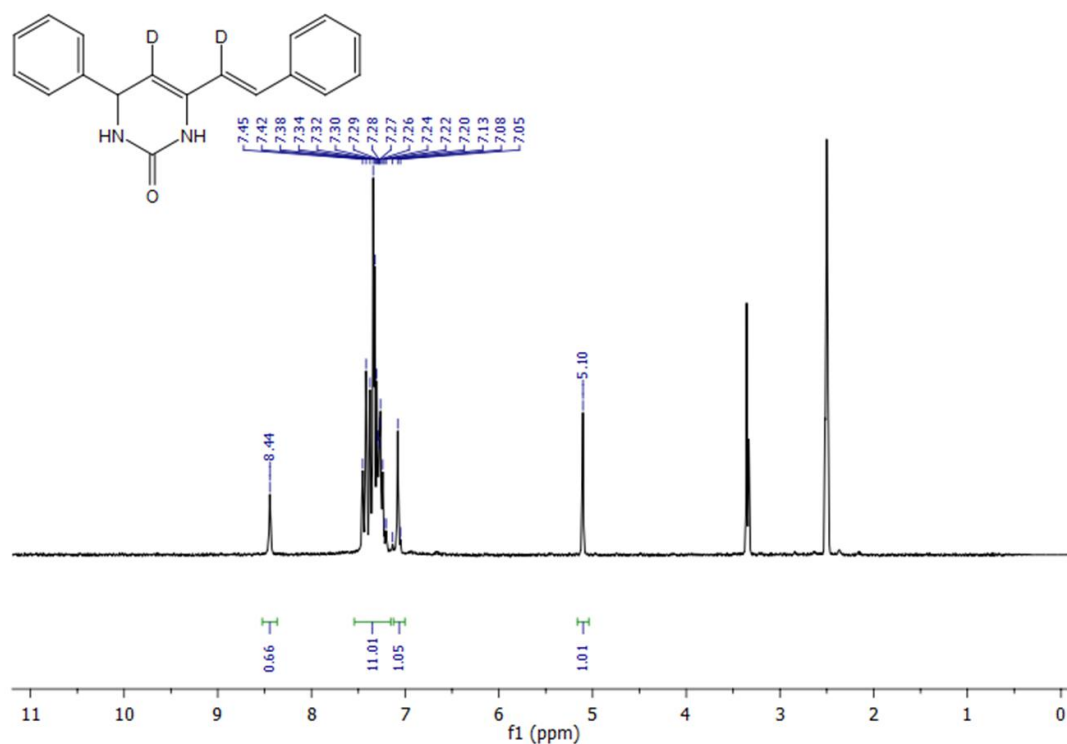
Слика П1. ^1H NMR спектар једињења A1 у DMSO- d_6 .



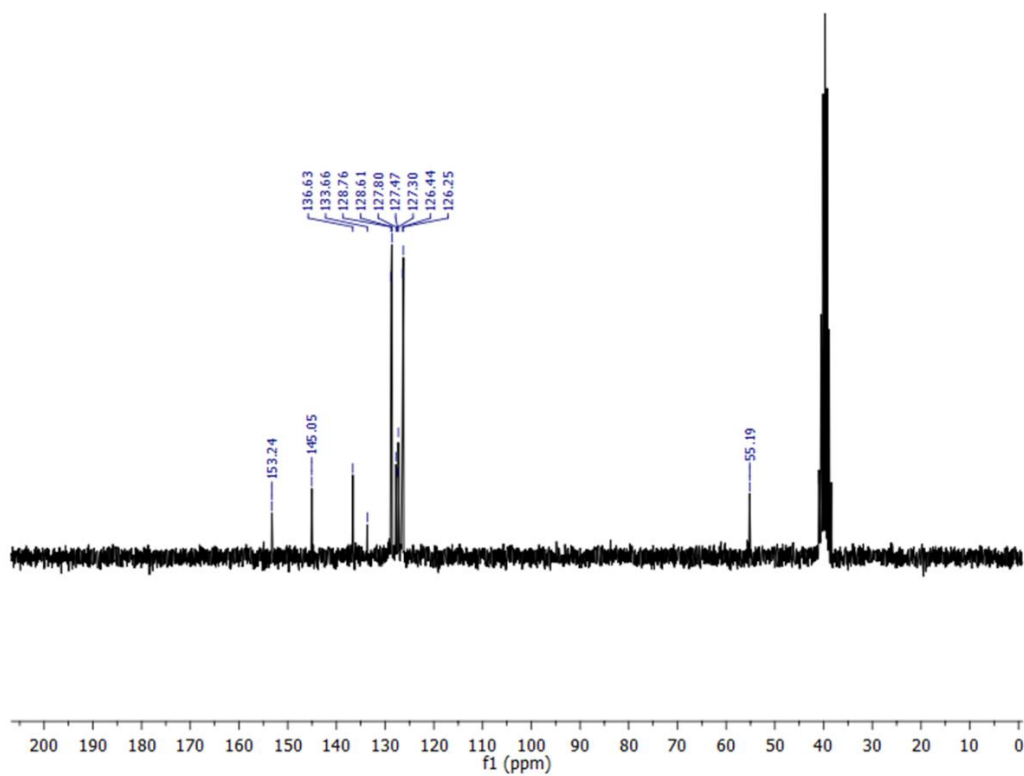
Слика П2. ^{13}C NMR спектар једињења A1 у DMSO- d_6 .



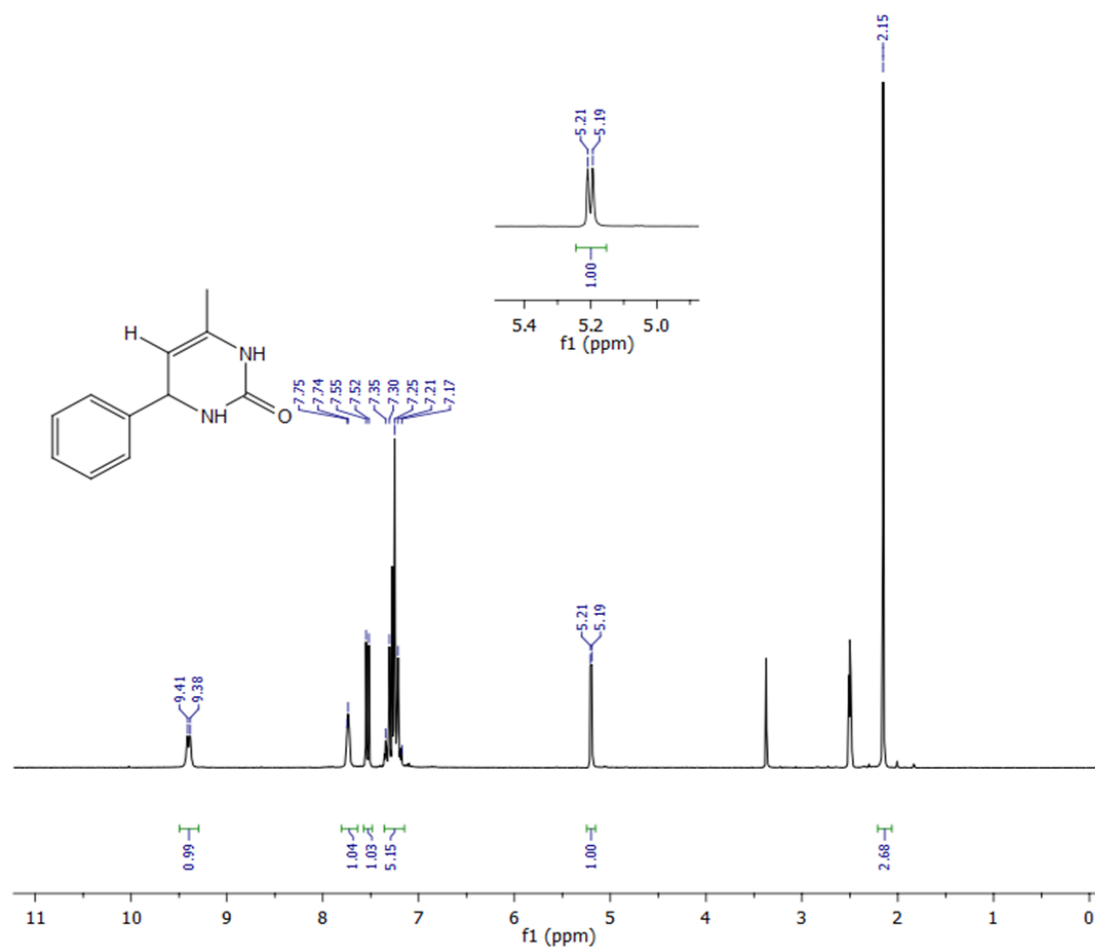
Слика ПЗ. HSQC спектар једињења A1.



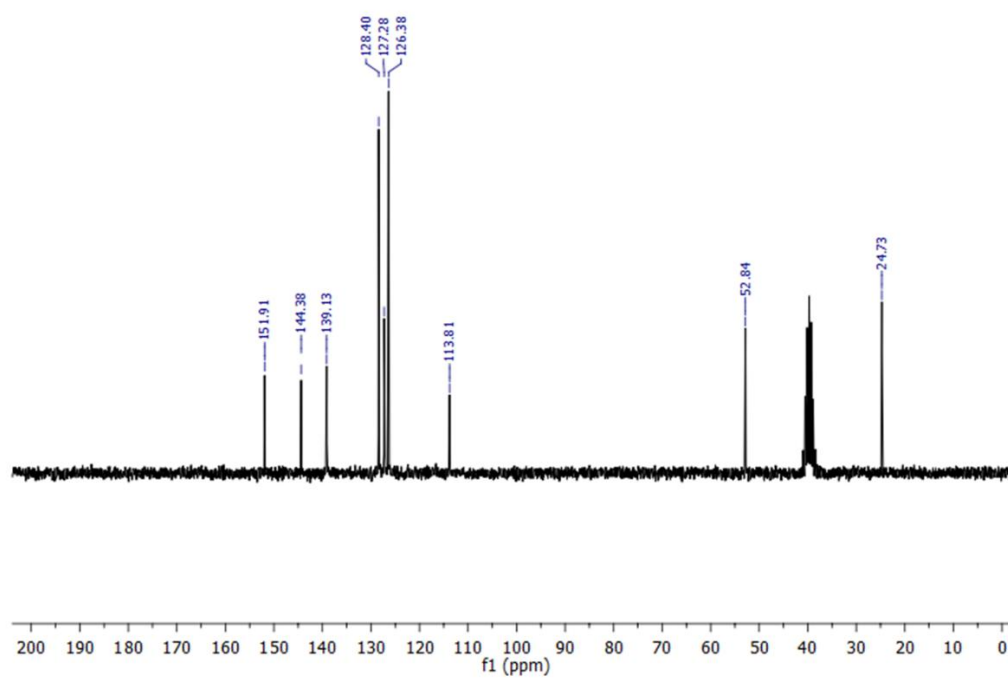
Слика П4. ¹H NMR спектар једињења A1-d₂ у DMSO-d₆.



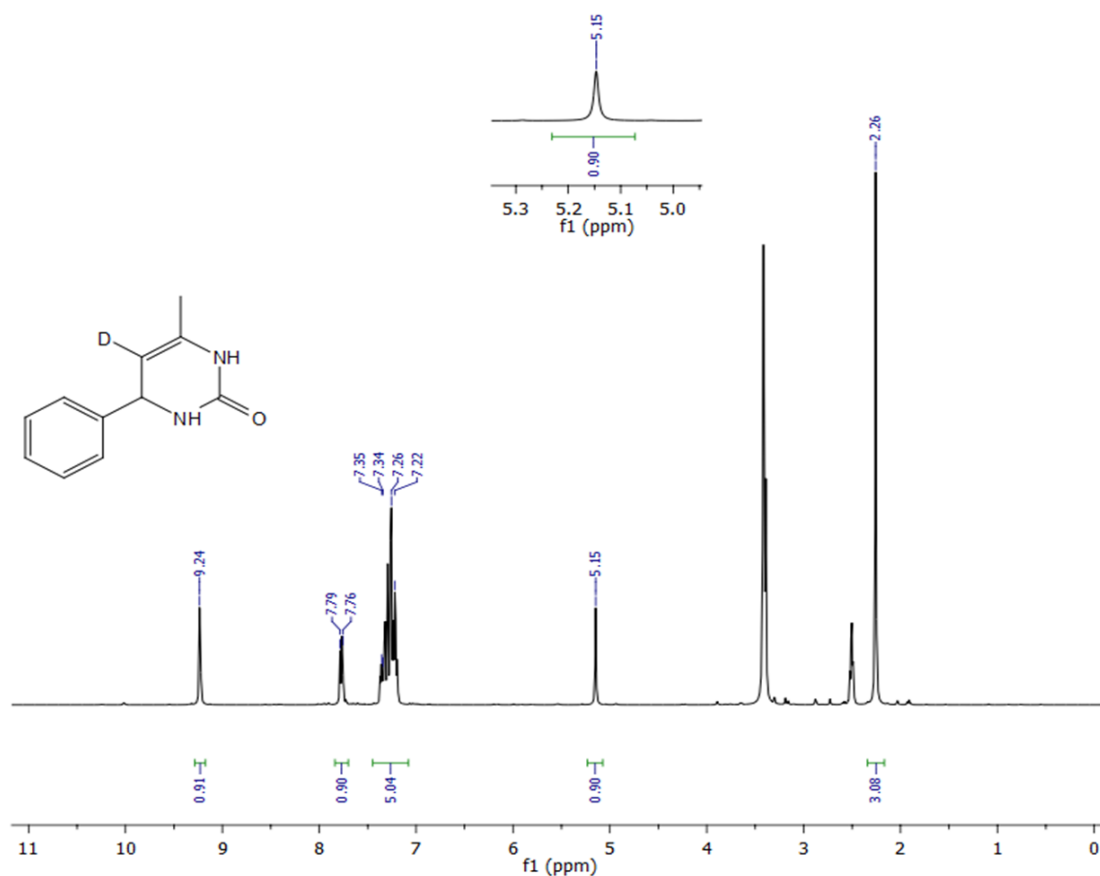
Слика П5. ¹³C NMR спектар једињења A1-d₂ у DMSO-d₆.



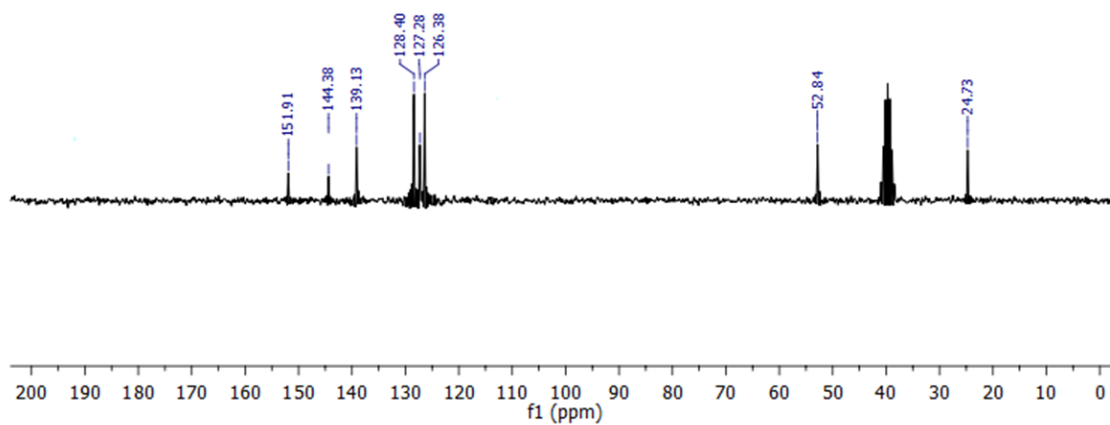
Слика П6. ¹H NMR спектар једињења **ИНТ3** у DMSO-*d*₆.



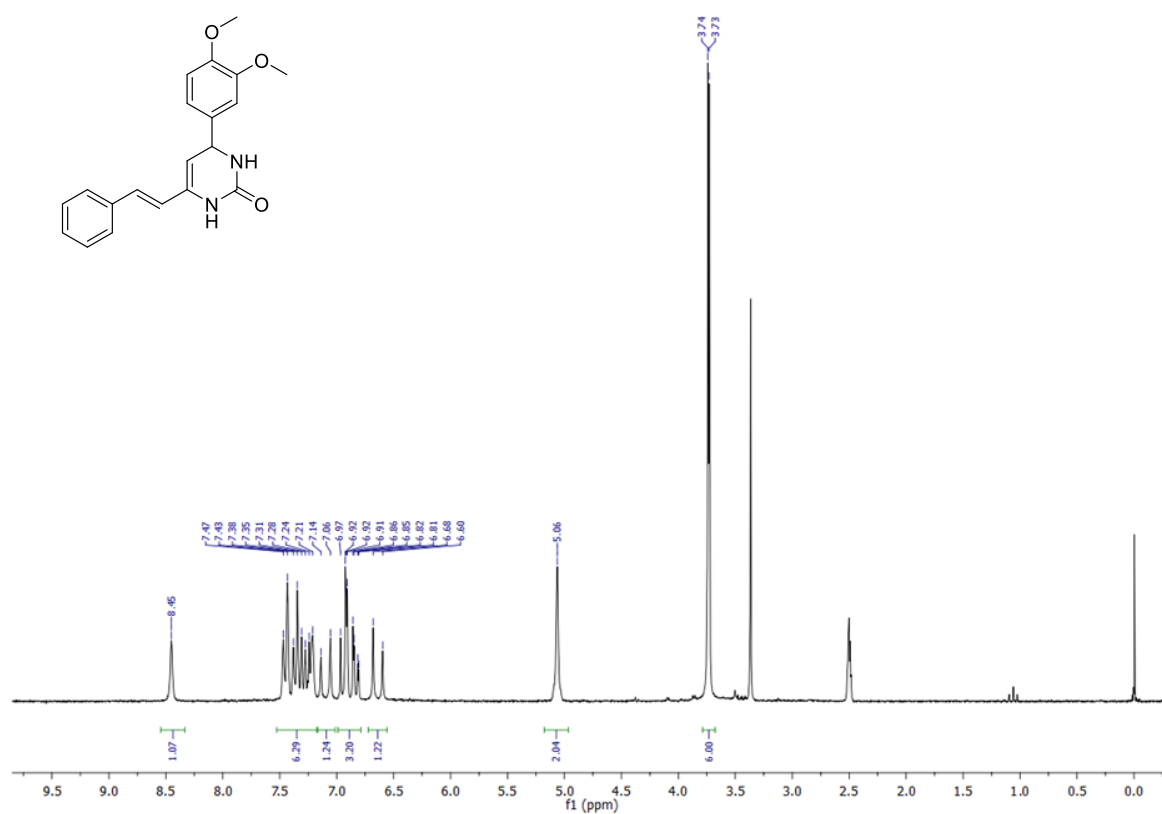
Слика П7. ¹³C NMR спектар једињења **ИНТ3** у DMSO-*d*₆.



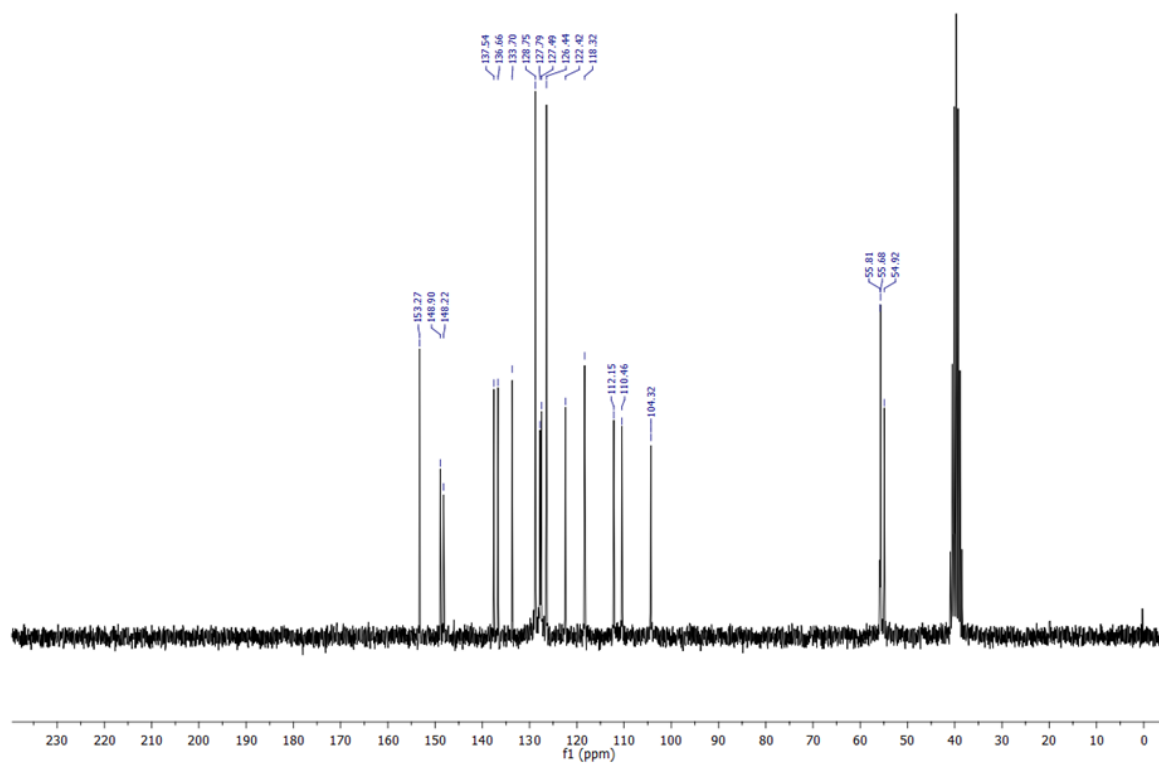
Слика П8. ^1H NMR спектар једињења **ИНТ3-d** у DMSO- d_6 .



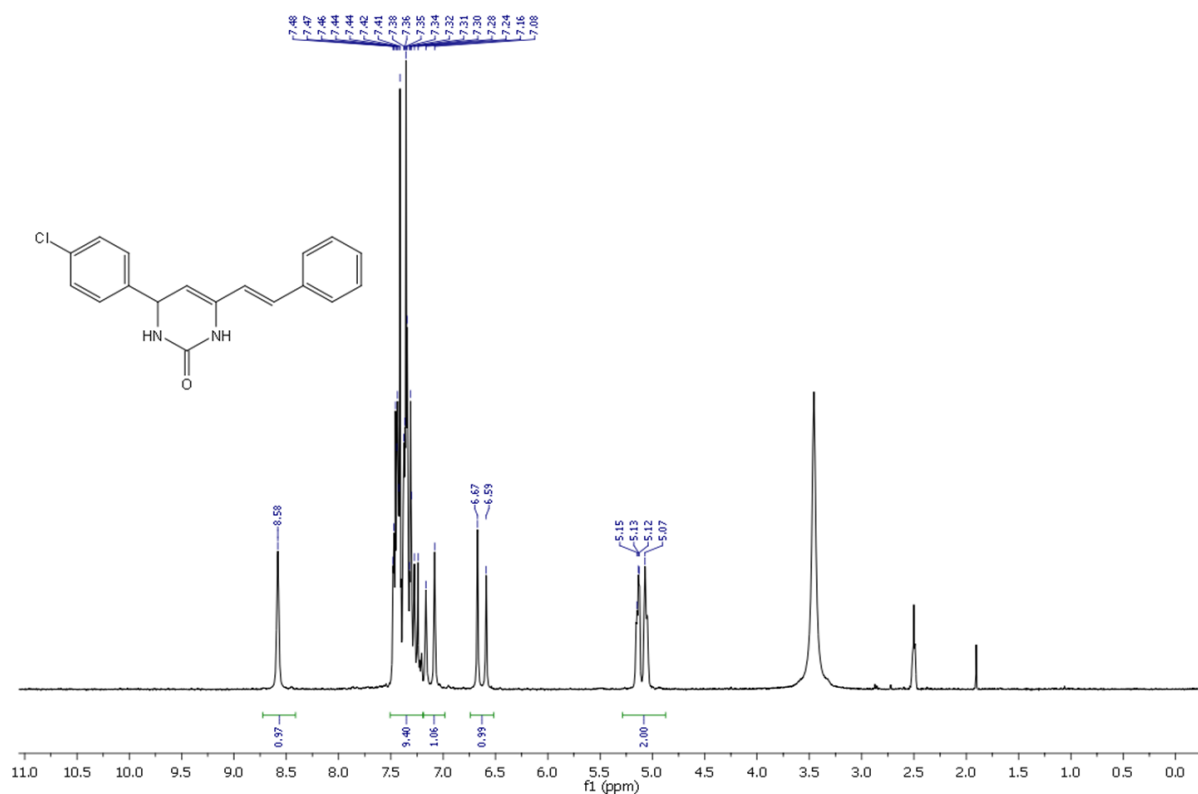
Слика П9. ^{13}C NMR спектар једињења **ИНТ3-d** у DMSO- d_6 .



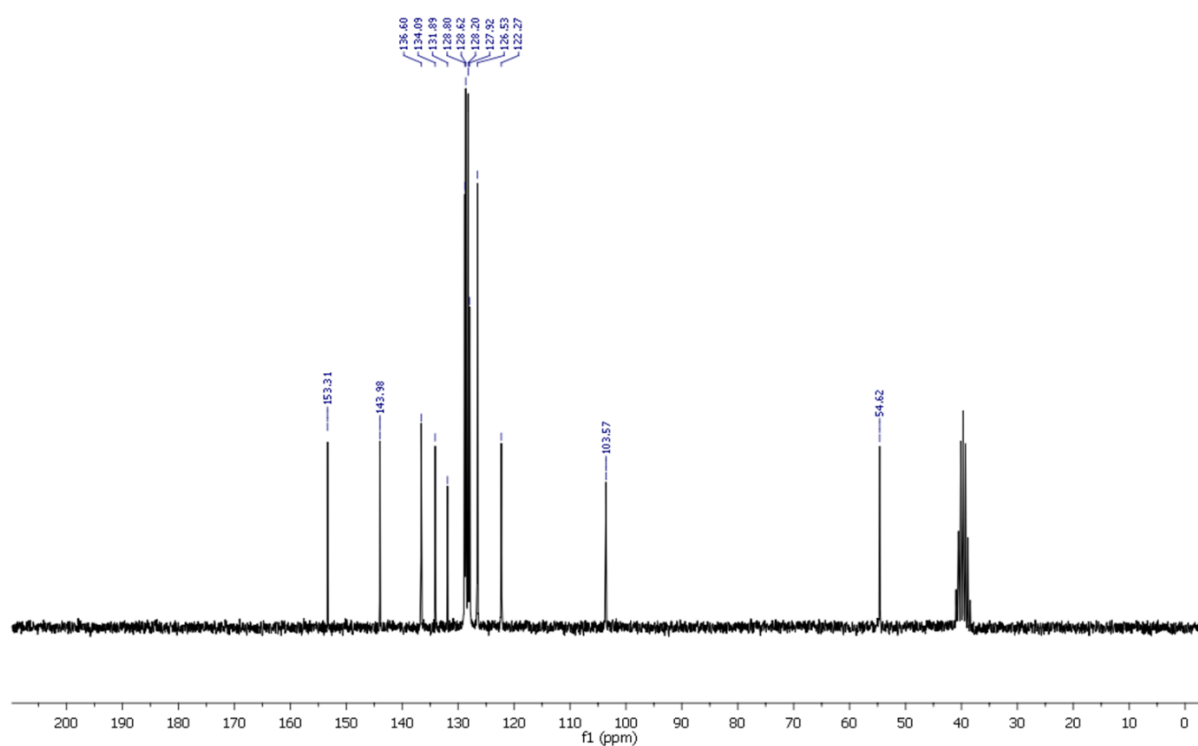
Слика П10. ^1H NMR спектар једињења A10 у $\text{DMSO-}d_6$.



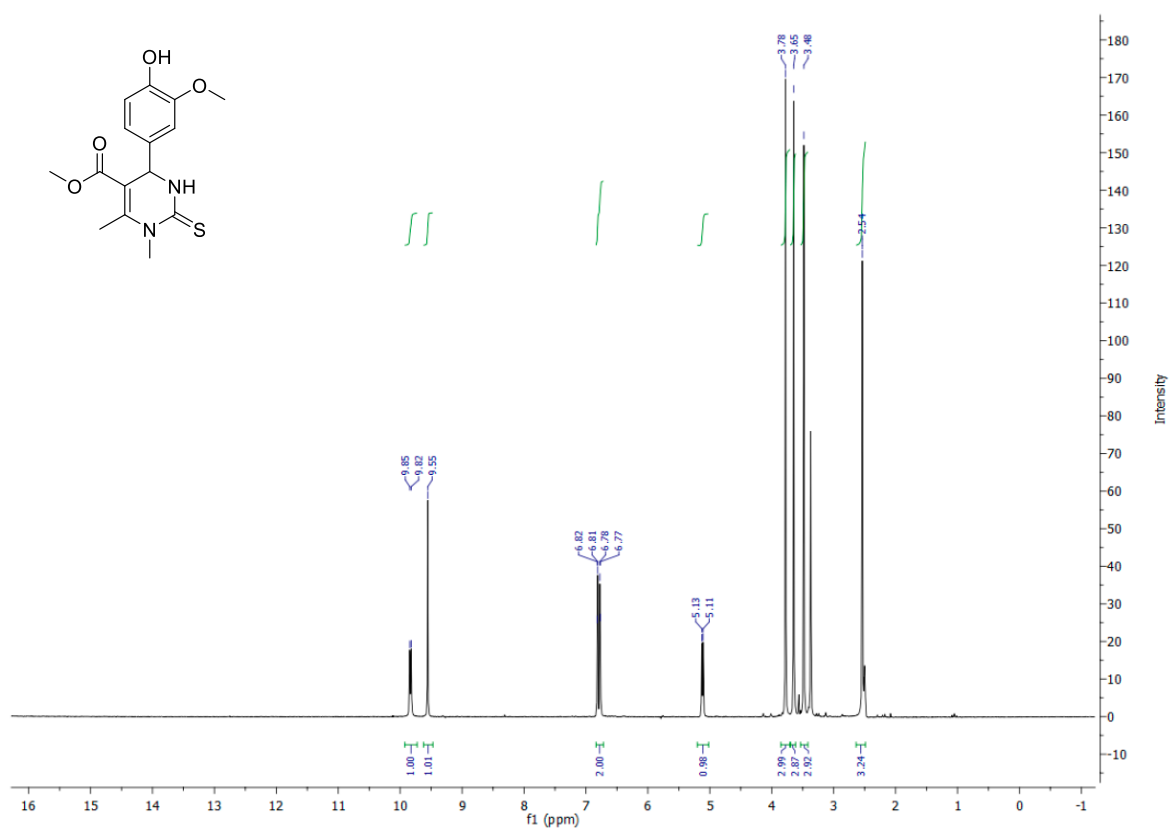
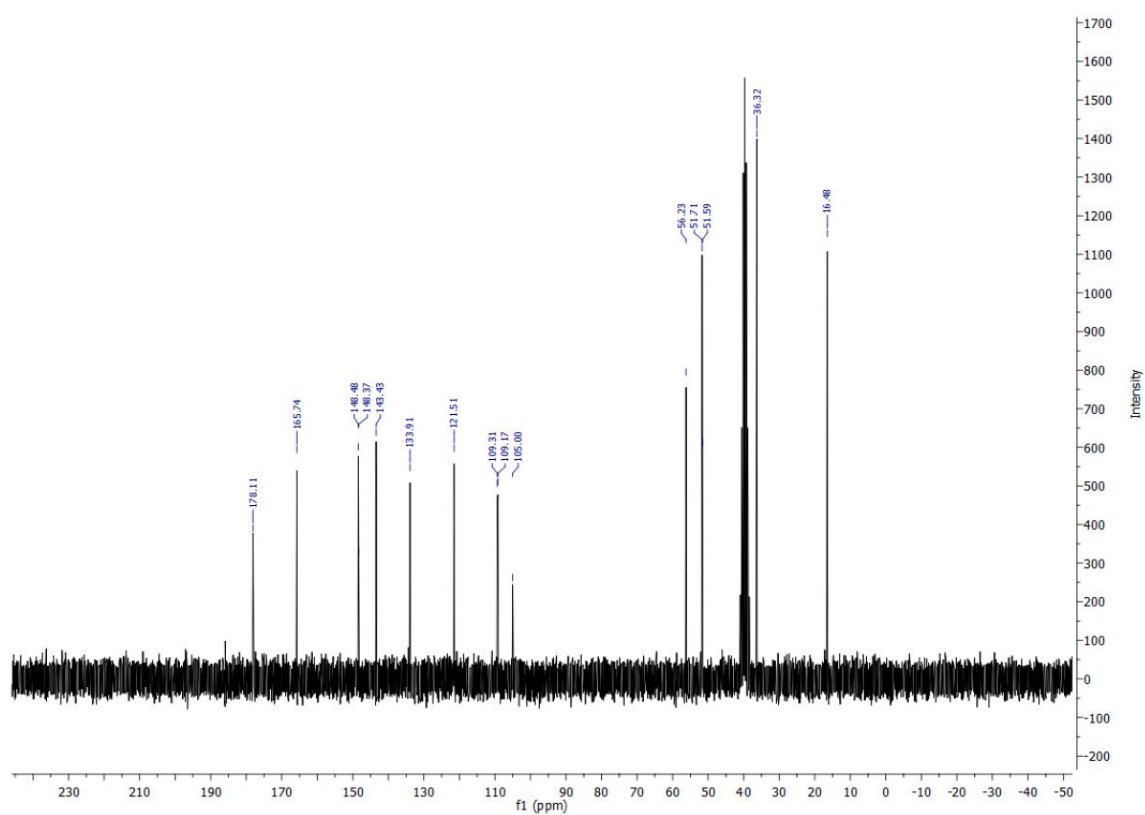
Слика П11. ^{13}C NMR спектар једињења A10 у $\text{DMSO-}d_6$.

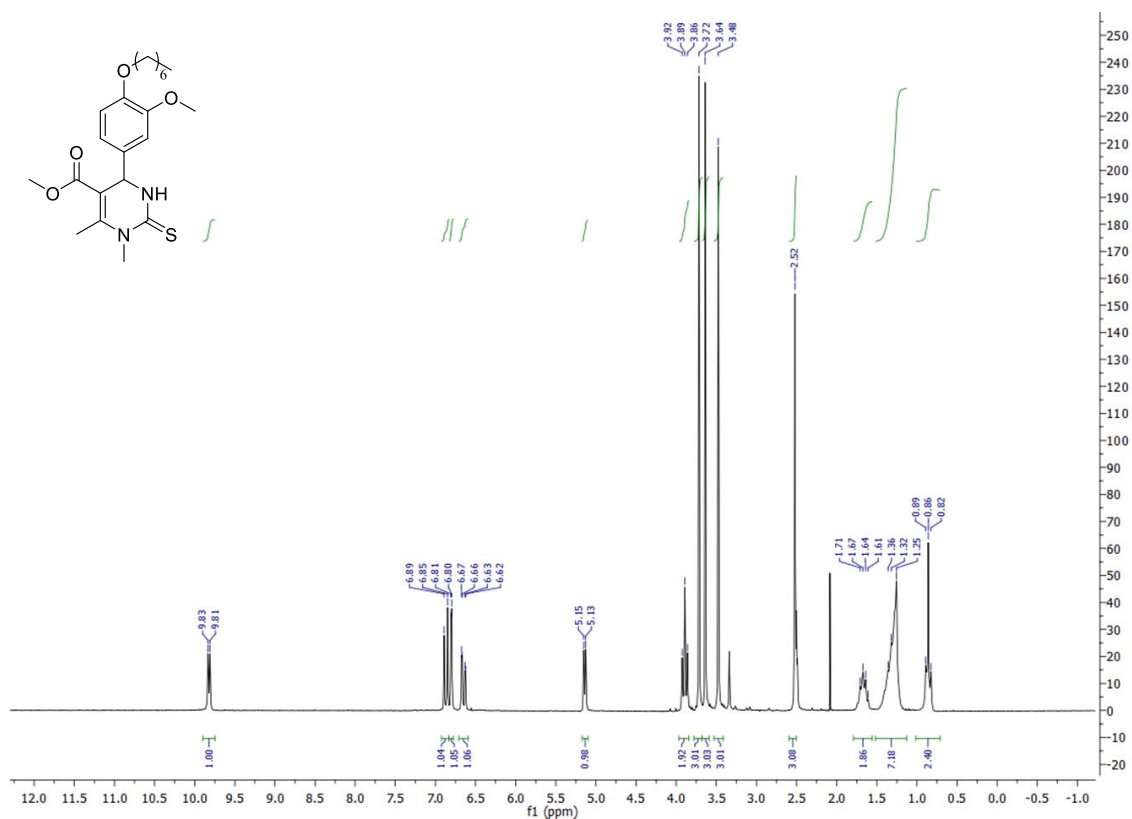


Слика П12. ¹H NMR спектар једињења A11 у DMSO-*d*₆.

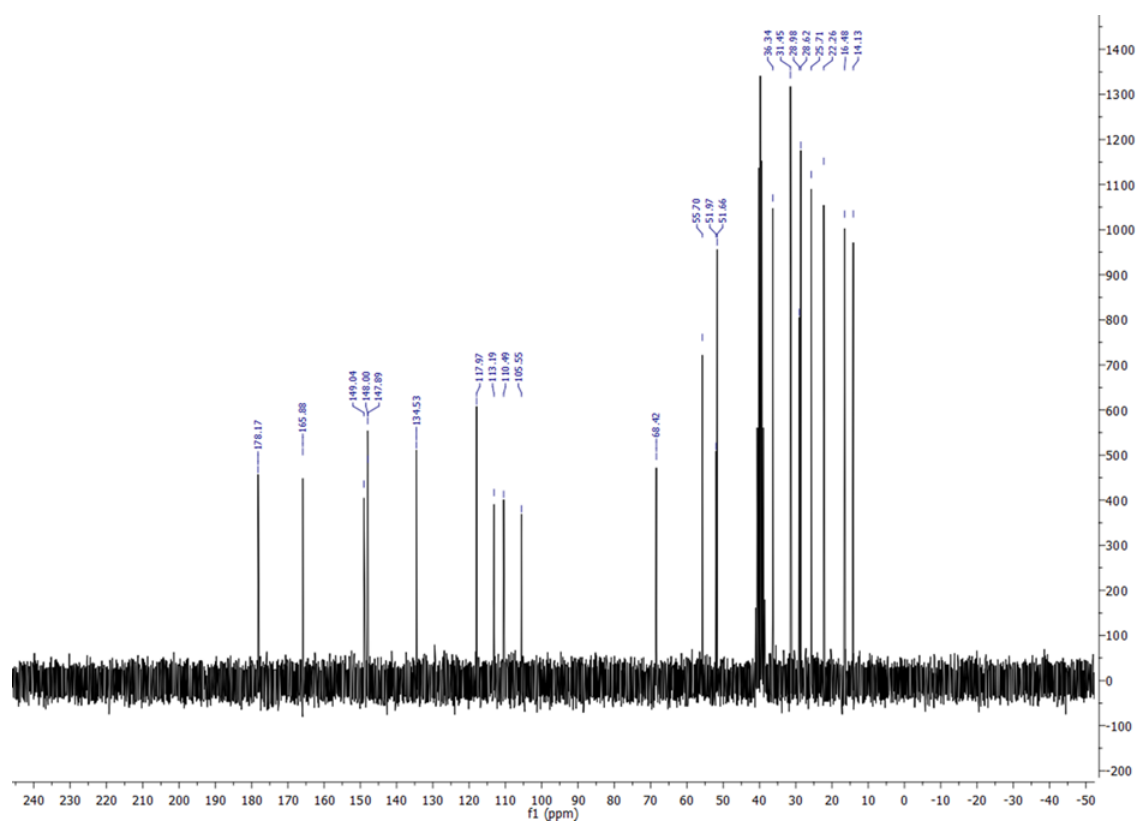


Слика П13. ¹³C NMR спектар једињења A11 у DMSO-*d*₆.

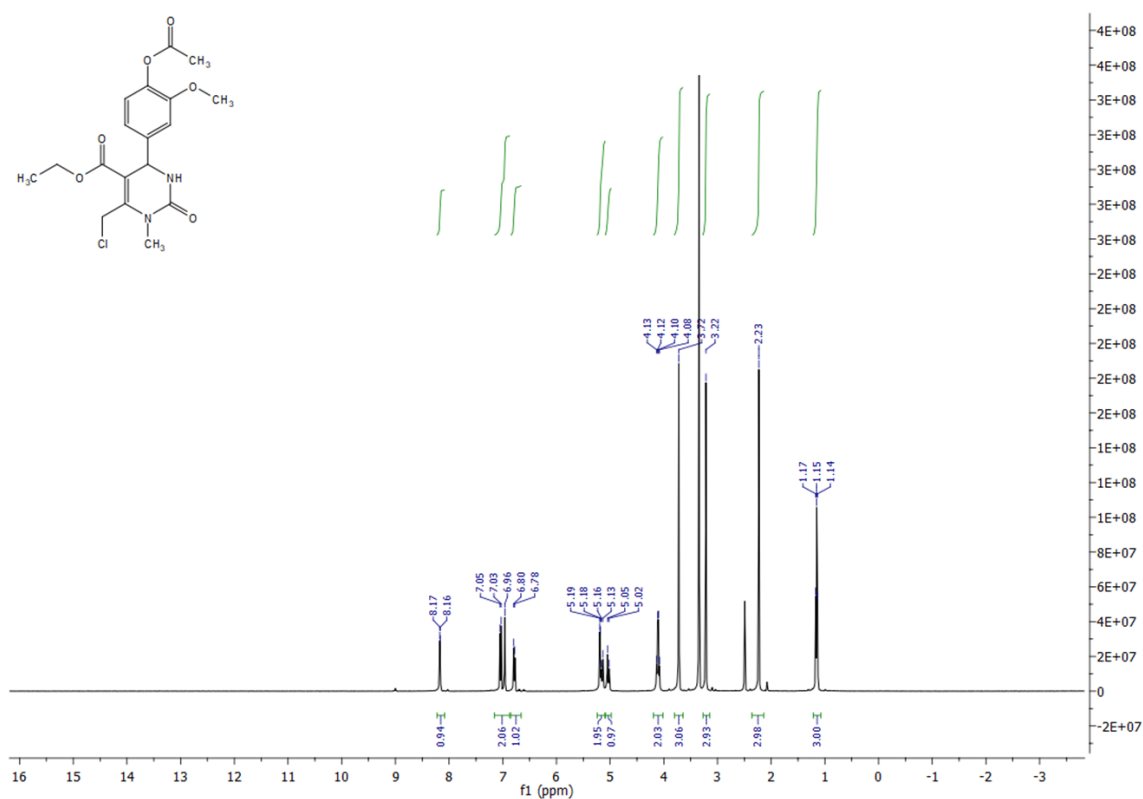
Слика П14. ¹H NMR спектар једињења Б1 у DMSO-*d*₆.Слика П15. ¹³C NMR спектар једињења Б1 у DMSO-*d*₆.



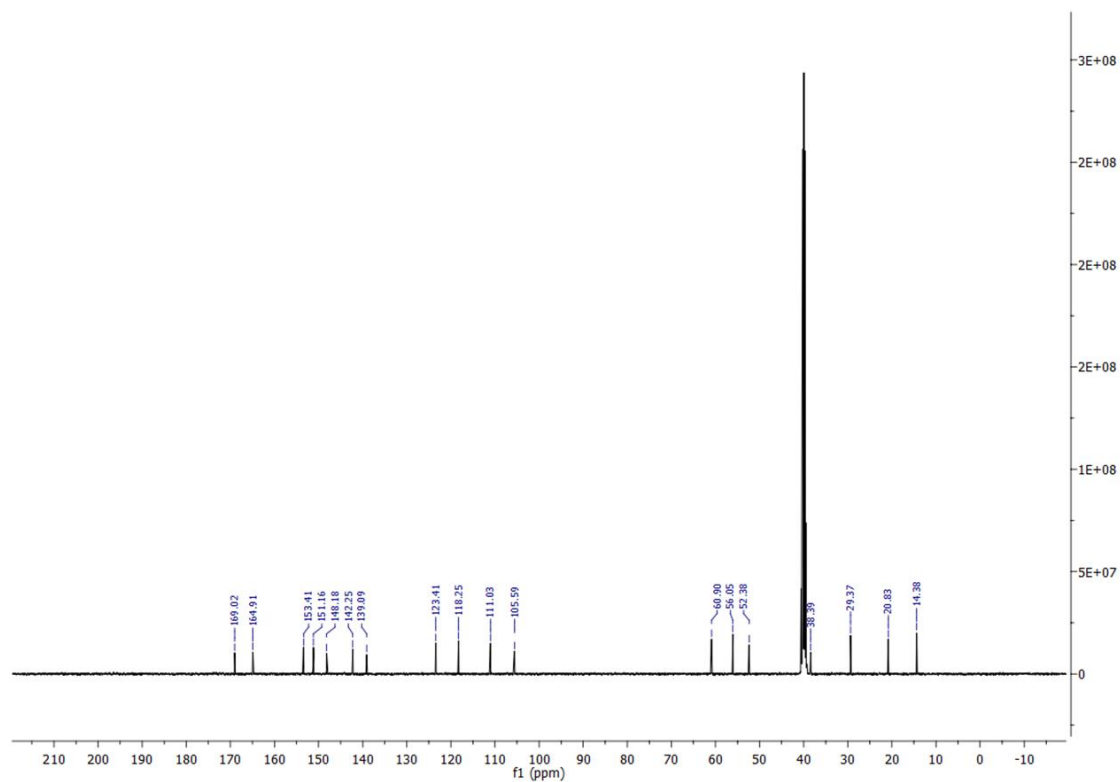
Слика П16. ¹H NMR спектар једињења **B18** у DMSO-*d*₆ (сигнал на 2,09 ppm потиче од ацетона).³¹³



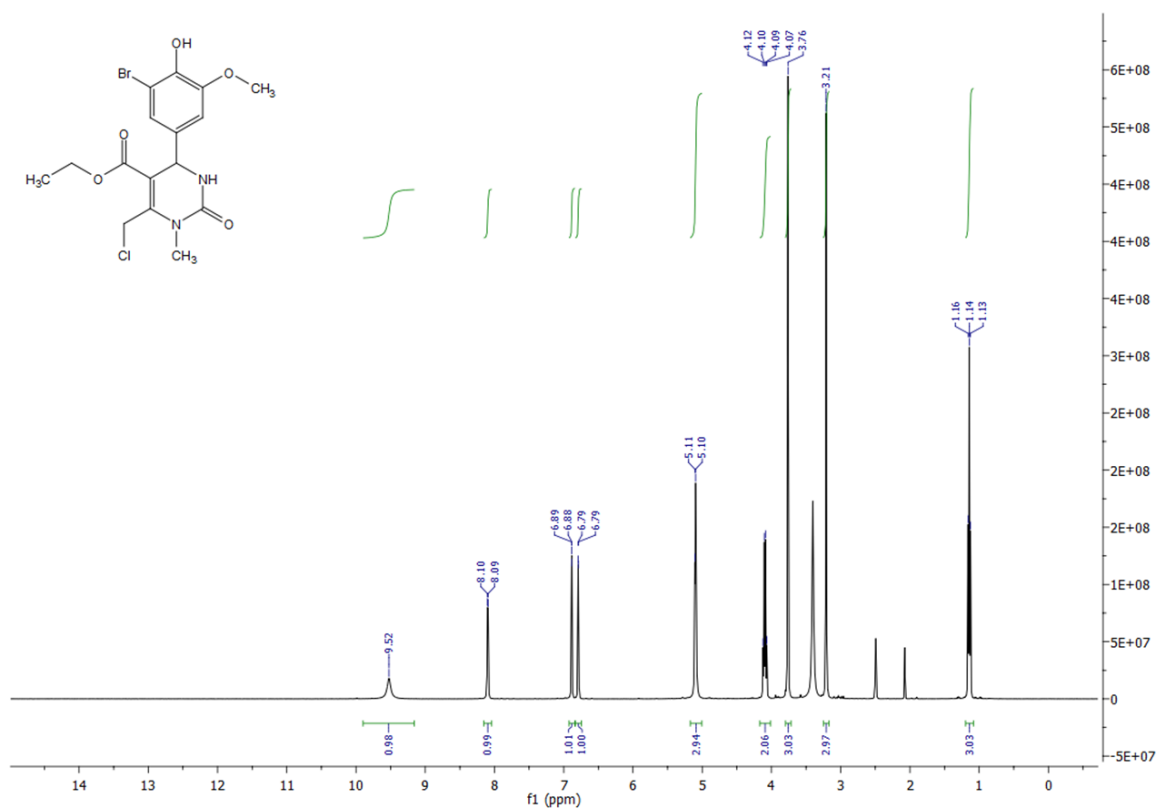
Слика П17. ¹³C NMR спектар једињења **B18** у DMSO-*d*₆.



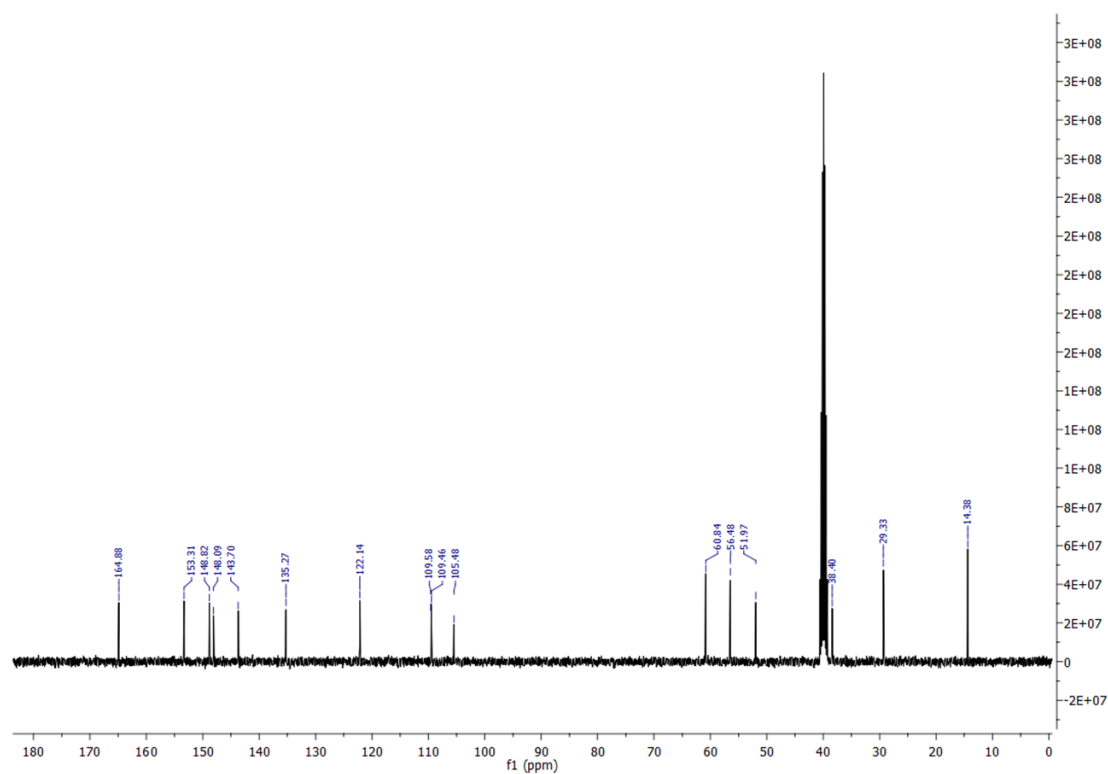
Слика П18. ¹H NMR спектар једињења **B1** у DMSO-*d*₆ (синглети на 2,09 и 3,33 ppm потичу од ацетона и воде).³¹³



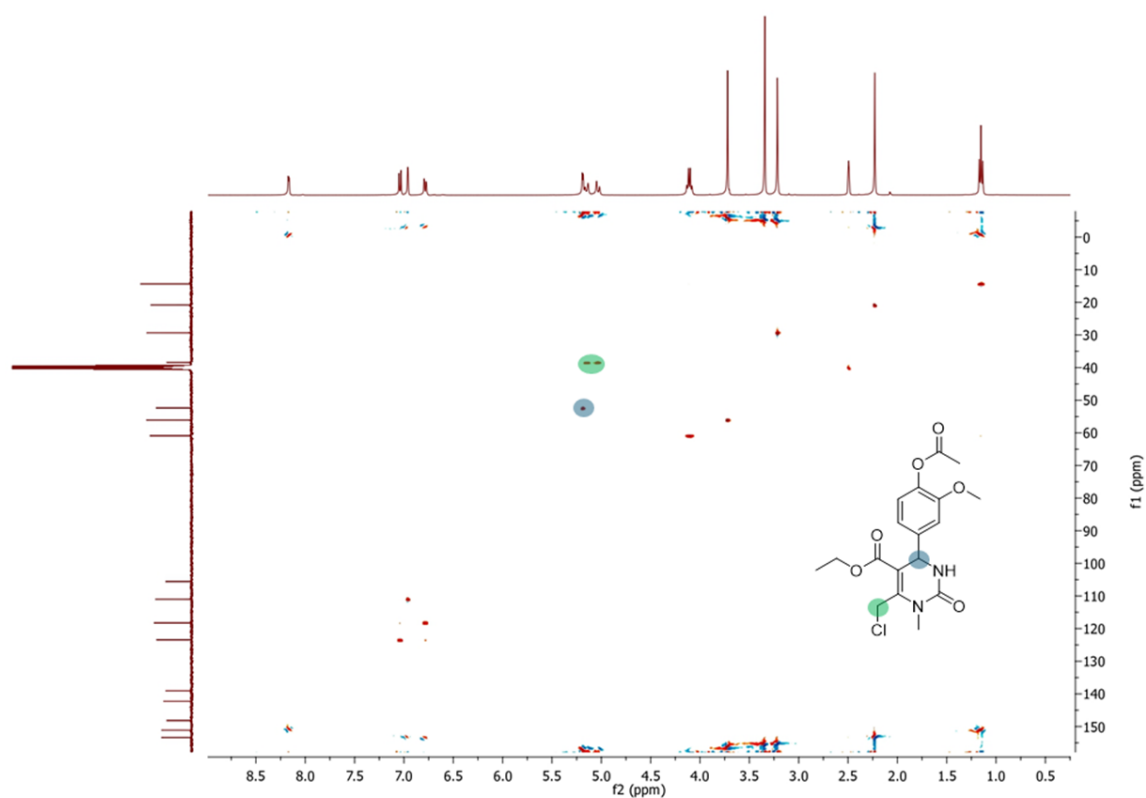
Слика П19. ¹³C NMR спектар једињења **B1** у DMSO-*d*₆.



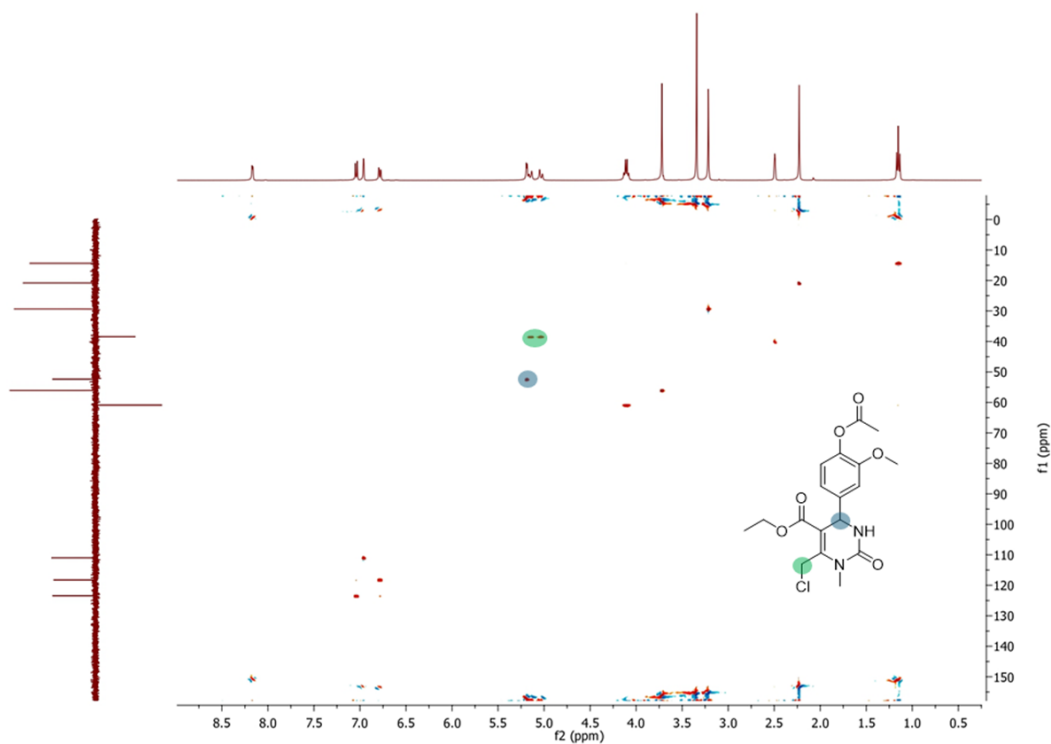
Слика П20. ¹H NMR спектар једињења **B2** у DMSO-*d*₆.



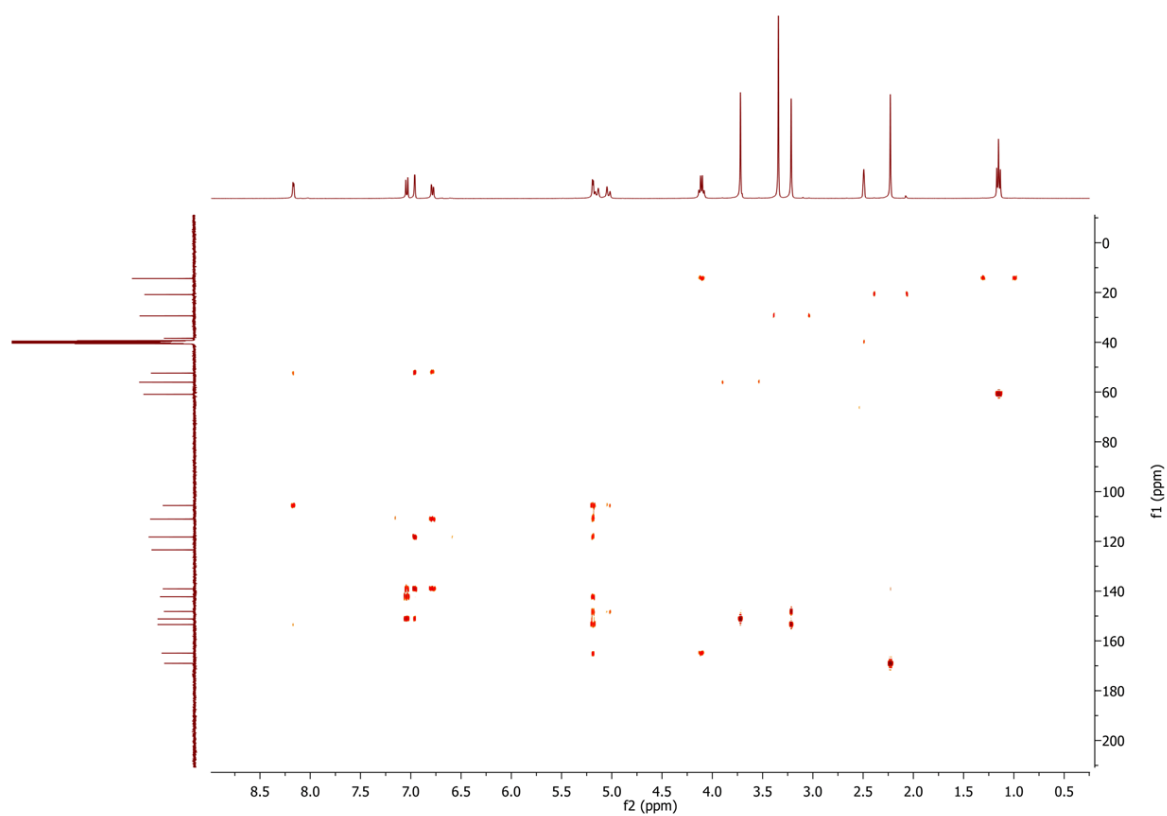
Слика П21. ¹³C NMR спектар једињења **B2** у DMSO-*d*₆.



Слика П22. 2D ^1H – ^{13}C HSQC спектар једињења **V1**. Плавом бојом је означен бензилни протон, док су зеленом бојом означени алилни протони $-\text{CH}_2\text{Cl}$ групе.



Слика П23. 2D ^1H – ^{13}C APT–HSQC једињења **V1**. Плавом бојом је означен бензилни протон, а зеленом бојом су означени алилни протони.



Слика П24. НМВС спектар једињења **V1**.

6.2. Публиковани научni radovi u kojima su predstavljени rezultati doktorske disertacije



On water synthesis of the novel 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines

Emilija Milović^a, Nenad Janković^{b,*}, Goran A. Bogdanović^c, Jelena Petronijević^a, Nenad Joksimović^a

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

^b University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijica bb, Kragujevac, 34000, Serbia

^c "VINCA" Institute of Nuclear Sciences - National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, P.O. Box 522, 11001, Belgrade, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 September 2020
Received in revised form
12 November 2020
Accepted 19 November 2020
Available online xxx

Keywords:
On water
Pyrimidines
Biginelli reaction
Isotopic labeling

ABSTRACT

A simple *on water* approach for the synthesis of novel tetrahydropyrimidine (THPM) derivatives has been developed under a green and sustainable fashion. For the first time, a deuterated Biginelli's hybrid was synthesized. Novel THPMs are suitable for further derivatization and could be an excellent toolkit for lead-oriented synthesis and/or cross-coupling reactions.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Biginelli reaction is well-known multicomponent reaction through which is possible to access 2-oxo- and 2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines-THPMs [former name 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-ones(thiones)]. This reaction was found by Pietro Biginelli in 1893 [1]. Since then, the synthetic potential of the mentioned reaction has been ignored, and this discovery has been put undercover by the scientific community. In the second half of the 20th century (1980s) a significant exploration of Biginelli chemistry started after decades of silence and disregarding that discovery. The principal reason for this action was the discovery in the terms of great and broad biological potential that Biginelli's products possess. From the 1980s until now, over 70 000 Biginelli-like compounds have been synthesized (source SciFinder). A significant number of THPM derivatives have been found to be potent calcium-channel blockers, antihypertensive agents, adrenergic antagonists, mPGES-1 inhibitors, antimicrobials, anticancer, and antiviral agents [2–4]. They were also used as a tool for combinatorial [5] as well as material science [6–8]. From a structural point of view, the Biginelli reaction is attractive because substituents attached at THPM core can be readily transformed into

different functional groups required for some further synthetic manipulation. Considering, many different methods and catalysts have been applied for accessing THPMs [9]. Almost all the THPM derivatives were synthesized directly *via* one-pot fashion [10,11]. Although there were six diversity points at the THPM core (N1, C2, N3, C4, C5, and C6) that could be furthermore functionalized, the most interesting seemed to be the derivatization of the substituent at the C6 position (Fig. 1, methyl group). Functionalization (bromination) of the methyl group from THPM was easily reached by substitution reaction, giving the 6-bromomethyl and 6-dibromomethyl THPM derivatives as products [12,13]. Another way implies catalytic olefination of a methyl group at the C6 using benzaldehyde under high temperature, hazardous solvents, and catalysts consumption [13–15].

Therefore, the behavior of THPM core under hydrolytic conditions was very interesting (Fig. 1) [16–20]. Pietro Biginelli noted that the presence of KOH (in water under reflux) initiated deep decomposition of the THPM core into benzaldehyde, ammonia, and potassium carbonate [1]. Lately, Zigeuner showed that the N₁-unsubstituted THPMs were inactive under the hydrolytic conditions (5% KOH, reflux) [19,20]. Also, some data showed that the THPM can react with excess benzaldehyde and KOH in boiled 70% EtOH, while the appropriate product was isolated in moderate yield (<50%). It was also published that the N₁-unsubstituted THPMs can easily undergo to hydrolysis/decarboxylation process giving a

* Corresponding author.
E-mail address: nenad.jankovic@kg.ac.rs (N. Janković).

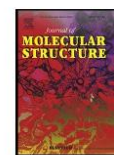
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131790>
0040-4020/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: E. Milović, N. Janković, G.A. Bogdanović *et al.*, On water synthesis of the novel 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidines, *Tetrahedron*, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131790>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

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

Anticancer evaluation of the selected tetrahydropyrimidines: 3D-QSAR, cytotoxic activities, mechanism of action, DNA, and BSA interactions



Emilija Milović^a, Jelena Petronijević^b, Nenad Joksimović^b, Milan Beljkaš^c, Dušan Ružić^c, Katarina Nikolić^c, Milan Vraneš^d, Aleksandar Tot^d, Marija Đorđić Crnogorac^e, Tatjana Stanojković^e, Nenad Janković^{a,*}

^a Department of Sciences, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, Kragujevac 34000, Serbia

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia

^c Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, Belgrade 11000, Serbia

^d Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3, Novi Sad 21000, Serbia

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2022

Revised 8 February 2022

Accepted 10 February 2022

Available online 11 February 2022

ABSTRACT

Selected tetrahydropyrimidines (THPMs) were investigated by means of cytotoxic activities on selected cancer (HeLa, A549, and LS174) and non-cancerous cell lines (MRC-5). Among evaluated compounds, two of them (**B7** and **B8**) showed good cytotoxic activity on the tested cell lines and were selected for further evaluation that included mechanism of action, DNA and BSA interactions and molecular docking study. Calculated parameters from fluorescence quenching studies indicated that **B7** and **B8** bind on minor groove of DNA and have great ability to bind on carrier protein. Three-dimensional quantitative structure-anti-HeLa activity study was performed with data set of THPMs. Molecular Interaction Fields were used to derive Grid independent descriptors (GRIND), as independent variables in Pentacle software. The quality and predictive capacity of the model was proved by internal statistical parameters: $R^2 = 0.992$, $Q^2 = 0.51$, as well as external parameters such as $R^2_{pred} = 0.804$ and r_m^2 , r^2_m and $r^2_{m^2}$, that were higher than 0.5. The structural determinants significant for anti-HeLa activity of compounds were identified by using developed 3D-QSAR model. Interpretation of the most impactful GRIND variables on the anti-HeLa activity generated several hypotheses for design of novel and more potent anti-HeLa tetrahydropyrimidines. Additional molecular targets for the most active synthesized derivatives (**B7** and **B8**) are predicted by use of online web-based tool-SwissTargetPrediction.

© 2022 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Numerous heterocyclic compounds occur in the nature as basic structural motifs of carbohydrates, amino acids, and nucleic acids. Therefore, heterocycles have special place in medicinal chemistry as important molecules with significant biological activity [1]. Analysis of the U.S. FDA (Food and Drug Administration) database shows that 59% of approved drugs contain a nitrogen heterocycle, while pyrimidine is in the top five most common six-membered heterocycles [1]. Although 1,2,3,4-tetrahydropyrimidines – THPMs (former name 3,4-dihydropyrimidines – DHPMs) were introduced for the first time in the literature over 100 years ago, interest in THPMs was increased in the early 1980s initially due to structural similarity of THPMs to the familiar dihydropyridine calcium chan-

nel modulators of the Hantzsch type [2]. Leading synthetic path for THPMs production is the Biginelli reaction, a simple one-pot reaction of an aromatic aldehyde, (thio)urea, and a 1,3-dicarbonyl compound [3]. Therefore, THPMs are often called Biginelli adducts. During the last decade, THPMs attracted attention as a very important class of azaheterocycles with broad pharmacological activities. In many studies have been proven that THPMs have anticancer, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, antifungal, anti-HIV or anti-SARS activity [4–6]. THPMs have great potential to be calcium channel [7,8], urease [9], and acetylcholinesterase inhibitors [10]. Moreover, they displayed prospective efficiency in therapy of Alzheimer's disease and other dementias [11] and diabetes mellitus [12]. The most reasonable explanation for their biological activity could be the presence of a pyrimidine base in the structure of DNA and RNA (thymine, cytosine, and uracil) [13].

Cancer causes high mortality rate and the discovery of anticancer agents with better selectivity and with less side effects is in

* Corresponding author.

E-mail address: nenad.jankovic@kg.ac.rs (N. Janković).

Article

Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Tetrahydropyrimidines: Dual-Activity and Mechanism of Action

Emilija Milović¹, Nenad Janković^{1,*}, Jelena Petronijević², Nenad Joksimović², Marijana Kosanić³, Tatjana Stanojković⁴, Ivana Matić⁴, Nađa Grozdanić⁴, Olivera Klisurić⁵ and Srđan Stefanović⁶

¹ University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

² University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

³ University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

⁴ Institute of Oncology and Radiology of Serbia, Pasterova 14, 11000 Belgrade, Serbia

⁵ University of Novi Sad, Faculty of Science, Department of Physics, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Serbia

⁶ Institute of Meat Hygiene and Technology, Kačanskog 13, 11000 Belgrade, Serbia

* Correspondence: nenad.jankovic@kg.ac.rs



Citation: Milović, E.; Janković, N.; Petronijević, J.; Joksimović, N.; Kosanić, M.; Stanojković, T.; Matić, I.; Grozdanić, N.; Klisurić, O.; Stefanović, S. Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Tetrahydropyrimidines: Dual-Activity and Mechanism of Action. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 2254. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102254>

Academic Editor: Haibing Zhou

Received: 26 September 2022

Accepted: 19 October 2022

Published: 21 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In this paper, the synthesis, characterization, and biological evaluation of the novel tetrahydropyrimidines—THPMs are described. THPMs are well-known for wide pharmacological activities such as antimicrobial, anticancer, antiviral, etc. This research includes obtained results of in vitro antimicrobial, anticancer, and α -glucosidase inhibitory activities of the eleven novel THPMs. An antibiotic assessment was done against five bacteria (two Gram-positive and three Gram-negative) and five fungi by determining the minimal inhibitory concentration (MIC), using the broth tube dilution method. The most active antibacterial compounds were **4a**, **4b**, and **4d**, while the best antifungal activity was shown by **4e**, **4f**, and **4k**. The lowest MIC value (0.20 mg/mL) was measured for **4e**, **4f**, and **4k** against the *Trichophyton mentagrophytes*. Moreover, examining the α -glucosidase inhibitory activity revealed the compound **4g** as the one with the best activity. The cytotoxic activity was performed on the tumor cell lines (HeLa, K562, and MDA-MB-231) and normal cells (MRC-5). The best antitumor activity was shown by compounds **4b** and **4k** against HeLa cell lines. The influence on cell cycle and mechanism of action of the most active compounds were examined too. Compound **4b** had good antibacterial and anticancer activities, while **4k** showed promising antifungal and anticancer activities.

Keywords: Biginelli reaction; tetrahydropyrimidine; antimicrobial; anticancer; apoptosis

1. Introduction

Pietro Giacomo Biginelli (1860–1937) was an Italian chemist who discovered a one-pot multicomponent reaction. He invented the procedure that would subsequently be named Biginelli synthesis in his honor [1,2]. Despite being the first multicomponent reaction, the scientific community dismisses the Biginelli reaction as outmoded. Nevertheless, since the finding of monastrol as a kinesin-5 inhibitor [3], as well as its anticancer activity, Biginelli chemistry has expanded [4–6]. Huge numbers of tetrahydropyrimidines—THPMs (former name 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-(thi)ones-DHPMs) have been synthesized using the Biginelli reaction to date. THPMs derivatives have a wide range of biological effects, including anti-inflammatory, antiviral, anticancer, calcium channel inhibition, antibacterial, antifungal, and antioxidant [7,8]. Significant anti-inflammatory activity of the Biginelli thioxo-hybrids was denoted towards various inflammatory diseases [9–11]. Although

Received: 23 May 2024 | Revised: 8 July 2024 | Accepted: 11 July 2024

DOI: 10.1002/ardp.202400403

FULL PAPER

ARCH PHARM DPhG
Archiv der Pharmazie

Synthesis, in vitro anticancer activity, and pharmacokinetic profiling of the new tetrahydropyrimidines: Part I

Emilija Milović¹ | Jovana Trifunović Ristovski² | Srđan Stefanović³ |
Jelena Petronijević⁴ | Nenad Joksimović⁴ | Ivana Z. Matić⁵ | Ana Đurić⁵ |
Bojana Ilić⁶ | Olivera Klisurić⁷ | Milica Radan^{8,9} | Katarina Nikolić⁸ |
Nenad Janković¹¹Department of Sciences, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia²Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia³Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade, Serbia⁴Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia⁵Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade, Serbia⁶Department for Neuroendocrine Tumors and Hereditary Cancer Syndromes, Diabetes and Metabolic Diseases, Medical School, Clinic for Endocrinology, University of Belgrade, Belgrade, Serbia⁷Department of Physics, Faculty of Science, University of Novi Sad, Novi Sad, Serbia⁸Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia⁹Institute for Medicinal Plants Research "Dr. Josif Pancic", Belgrade, Serbia

Correspondence

Nenad Janković, Department of Sciences,
Institute for Information Technologies
Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana
Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia.
Email: nenad.jankovic@uni.kg.ac.rs

Funding information

Ministry of Science, Technological
Development, and Innovation of the Republic
of Serbia, Grant/Award Numbers: 451-03-66/
2024-03/200378, 451-03-66/2024-03/
200122, 451-03-65/2024-03/200161,
451-03-66/2024-03/200043; APV Provincial
Secretariat for Higher Education and Scientific
Research, Grant/Award Number: 142-451-
3154/2022-01/2

Abstract

Different vanillin-based aldehydes were used to synthesize novel tetrahydropyrimidines (THPMs) via conventional Biginelli reaction. The THPMs were tested against human normal cells (MRC-5) and cancer cell lines (HeLa, K562, and MDA-MB-231). With IC₅₀ values of 10.65, 10.70, and 12.76 μM, compounds **4g**, **4h**, and **4i** exerted the strongest cytotoxic effects against K562 cells. The best activity was achieved for **4g** on MDA-MB-231 cells (IC₅₀ = 9.20 ± 0.14 μM). The effects of compounds **4g**, **4h**, and **4i** on the cell-cycle phase distribution of K562 cells were analyzed. Principal component analysis was carried out for the chemometrics analysis to comprehend the relationship between the anticancer activity of the THPMs, pharmacokinetic properties, and partition coefficients, as well as the relationship between the chromatographic behavior and retention parameters. The highest retention rates are found for molecules **4g**, **4h**, and **4i**, which have the longest carbon chains, indicating that the length of the alkyl chain positively affects the molecule's anticancer activity but only if the number of carbon atoms is not higher than seven. Additionally, molecular docking analysis was performed to determine the preferred binding modes of the investigated ligands (**4g**, **4h**, and **4i**) with a DNA dodecamer and bovine serum albumin.

© 2024 Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft.

Arch. Pharm. 2024;e2400403.
<https://doi.org/10.1002/ardp.202400403>wileyonlinelibrary.com/journal/ardp | 1 of 15

Received: 23 May 2024 | Revised: 5 August 2024 | Accepted: 7 August 2024

DOI: 10.1002/ardp.202400409

FULL PAPER

ARCH PHARM DPhG
Archiv der PharmazieDNA interaction of selected tetrahydropyrimidine and its effects against CCl₄-induced hepatotoxicity in vivo: Part IIEmilija Milović¹ | Sanja Lj. Matić¹ | Jelena S. Katanić Stanković¹ | Nikola Srećković² | Ignjat Filipović² | Jovana Bradić^{3,4} | Anica Petrović^{3,4} | Vladimir Jakovljević^{4,5,6} | Natalia Busto Vazquez⁷ | Nenad Janković¹¹Department of Sciences, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia²Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia³Department of Pharmacy, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia⁴Center of Excellence for Redox Balance Research in Cardiovascular and Metabolic Disorders, Kragujevac, Serbia⁵Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia⁶Department of Human Pathology, University IM Sechenov, First Moscow State Medical University, Moscow, Russia⁷Department of Health Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Burgos, Burgos, Spain

Correspondence

Nenad Janković, Department of Sciences, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia.
Email: nenad.jankovic@uni.kg.ac.rs

Funding information

The Ministry of Science, Technological Development, and Innovation of the Republic of Serbia; COST (European Cooperation in Science and Technology)

Abstract

Tetrahydropyrimidine (compound **A** = methyl 4-[4'-(heptyloxy)-3'-methoxyphenyl]-1,6-dimethyl-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate) was chosen for in vivo studies after exhibiting noteworthy in vitro activity against the K562 and MDA-MB-231 cell lines, with IC₅₀ values of 9.20 ± 0.14 μM and 12.76 ± 1.93 μM, respectively. According to experimental (fluorescence titration, viscosity, and differential scanning calorimetry) results, **A** interacts with DNA *via* the minor groove. In vivo, acute oral toxicity studies in Wistar albino rats proved no noticeable symptoms of either toxicity or death during the follow-up period. Genotoxic and antigenotoxic studies at three different concentrations of **A** (5, 10, and 20 mg/kg of body weight) in Wistar albino rats showed that the dose of 5 mg/kg body weight did not cause DNA damage and had a remarkable DNA protective activity against CCl₄-induced DNA damage, with a percentage reduction of 78.7%. It is also important to note that, under the investigated concentrations of **A**, liver damage is not observed. Considering all experimental outcomes realized under various in vivo investigations (acute oral toxicity, genotoxicity, antigenotoxicity, and biochemical tests), compound **A** could be a promising candidate for further clinical testing.

KEYWORDS

DNA comet assay, in vivo, oral toxicity, oxidative stress, tetrahydropyrimidines

© 2024 Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft.

Arch. Pharm. 2024;e2400409.
<https://doi.org/10.1002/ardp.202400409>wileyonlinelibrary.com/journal/ardp | 1 of 14



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic Chemistry

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

Chlorine containing tetrahydropyrimidines: Synthesis, characterization, anticancer activity and mechanism of action

Emilija Milović^a, Ivana Z. Matić^b, Nina Petrović^{b,c}, Ivana Pašić^b, Tatjana Stanojković^b, Miloš R. Petrović^d, Goran A. Bogdanović^e, Ferda Ari^e, Nenad Janković^{a,*}

^a Department of Science, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Kragujevac 34000, Serbia

^b Institute for Oncology and Radiology of Serbia, Belgrade 11 000, Serbia

^c "VINCA" Institute of Nuclear Sciences-National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade 11000, Serbia

^d Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade 11 000, Serbia

^e Department of Biology, Faculty of Science and Art, Bursa Uludağ University, Bursa 16059, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:

Tetrahydropyrimidines
Vanillin
K562
Cytotoxicity
OncomiRNA
Tumour suppressor

ABSTRACT

The aim of the presented research was to explore anticancer potential of eleven newly synthesized tetrahydropyrimidine derivatives. The compounds were synthesized via Biginelli multicomponent *one-pot* reaction using different derivatives of vanillin, ethyl 4-chloroacetate and (N-methyl)urea. The cytotoxic effects of the compounds were examined on three human malignant cell lines (HeLa, K562, and MCF7), and normal lung fibroblasts MRC-5. The mechanisms of anticancer activity were examined for two compounds 4a and 4b which showed the strongest and selective cytotoxicity against chronic myelogenous leukaemia K562 cells ($IC_{50} = 1.76 \pm 0.09$, and 1.66 ± 0.05 , respectively). The changes of matrix metalloproteinase 2 (MMP2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9), and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) were investigated in the K562 cell line, as well as oncomiRNA miR-10b, miR-23a described to have both features, depending on a specific type of malignancy, and miR-34a with mostly described as a tumour suppressor.

1. Introduction

Multicomponent reactions (MCRs) have been very popular in organic chemistry for decades. MCRs include three or more starting components reacting to generate a product usually via cascade process. Those types of reactions have many advantages over classical synthetic approach such as shorter reaction times, no need for isolation of products after every step in synthetic path, high efficiency, atom economy, reduced waste generation, etc. [1]. The Biginelli reaction is one of the first applied and widely used MCR for obtaining biological active compounds [2]. It is a simple condensation of aldehyde, active methylene compound and derivatives of urea. Obtained tetrahydropyrimidines – THPMs (dihydropyrimidines – DHPMs) are a class of aza-heterocyclic that have shown diverse biological activities like anti-HIV, anticancer, calcium channel modulation, and many others [3–8]. Using different reagents in the reaction gives opportunities for diverse products with potential usage in pharmacology or other fields of interest. Monastrol and its analogues, with a THPMs core in their structure are proven Eg5

inhibition and promising anticancer agents (Fig. 1) [9,10]. After systematic *in vitro* anticancer investigation against more than 60 malignant cell lines, few compounds possessed remarkable results where compounds I and II (Fig. 1) obtained great percentage growth inhibition (GI %) at 10 μ M concentration against K562 cell line [11]. Compound III (Fig. 1) from recently study, has showed significant anticancer potential [12]. FDA-approved drugs used in anticancer treatments that possess pyrimidine fragments in the structural core are well-known 5-fluorouracil, capecitabine, and gemcitabine (Fig. 1). 5-Fluorouracil has been used since the 1960s [13], while capecitabine [14] and gemcitabine [15] have been used since the 1990s. All mentioned drugs are on the WHO Model List of Essential Medicines and have been successfully applied in the treatments of various cancer types, such as early-stage colon cancer, rectal cancer, metastatic breast cancer, colorectal cancer, etc. [16]. Up to now, newly approved tyrosine kinase inhibitors such as imatinib, nilotinib, and dasatinib are used in the treatment of chronic myeloid leukaemia (CML) (Fig. 1) [17–19]. However, imatinib failed in the treatment of patients in chronic phase and more in advanced phases

* Corresponding author at: Department of Sciences, Institute for Information Technologies Kragujevac, University of Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia.

E-mail address: nenad.jankovic@uni.kg.ac.rs (N. Janković).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107907>

Received 8 July 2024; Received in revised form 9 October 2024; Accepted 20 October 2024

Available online 23 October 2024

0045-2068/© 2024 Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

Листа скраћеница

A–Ш

АЛД	алдехид
АМ	активнометиленско једињење
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
ЕБ	етидијум бромид
екв.	еквивалент
ИНТ	интермедијер
КАТ	катализатор
конц.	концентрирана
мин.	минут
н.д.	није детектовано
н.о.	није одређивано
РНК	рибонуклеинска киселина
С.Д.	стандардна девијација
с.т.	собна температура
СЗО	Светска здравствена организација
т.м.	телесна маса
Т.Т.	тачка топљења
ТУ	тиоуреа
ТХПМ	тетрахидропиримидин
У	уреа
цисплатина	<i>cis</i> -диаминдихлоридоплатина(II)

A–Z

3D-QSAR	квантитативни однос структуре и активности (енг. <i>Quantitative Structure Activity Relationships</i>)
q _i	апсолутна вредност парцијалног наелектрисања атома
AAEMA	(2-ацетоацетокси)етил метакрилат
ACE2	ангиотензин-конвертујући ензим 2
<i>ad libitum</i>	(на латинском: „по жељи“ или „неограничено“) – термин који се користи да означи да су животиње имале слободан, неограничен приступ храни и/или води.
AD-169	лабораторијски сој хуманог цитомегаловируса
ADAM17	дисинтегрин-металопротеиназа 17 (енг. <i>A Disintegrin and Metalloproteinase 17</i>)
ADME	апсорпција, дистрибуција, метаболизам и екскреција (енг. <i>Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion</i>)
ADP	аденозин дифосфат
AEMA	2-аминоетилметакрилат
AFIR	вештачком силом индукована реакција (енг. <i>Artificial Force Induced Reaction</i>)
AIBN	азобисизобутиронитрил
AIDS	синдром стечене имунодефицијенције (енг. <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)

AIE	емисија изазвана агрегацијом (енг. <i>Aggregation-Induced Emission</i>)
Ala	аланин
ALT	аланин трансаминаза
ANOVA	анализа варијансе
ANP	2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиол
Arg	аргинин
ASA	укупна површина која је доступна растварачу (енг. <i>Accessible Surface Area</i>)
ASAH	површина свих хидрофобних атома доступна растварачу
ASAmminus	површина свих атома са негативним парцијалним наелектрисањем доступна растварачу
ASAP	површина свих поларних атома доступна растварачу
ASApplus	површина свих атома са позитивним парцијалним наелектрисањем доступна растварачу
Asn	аспарагин
Asp	аспарагинска киселина
AST	аспартат трансаминаза
ATCC	Америчка непрофитна организација за сакупљање и складиштење референтних микроорганизама и ћелијских линија (енг. <i>American Type Culture Collection</i>)
ATR	атенуирано тотално рефлектовање; техника инфрацрвене спектроскопије која омогућава снимање спектра површине узорака без сложене припреме (енг. <i>Attenuated Total Reflectance</i>)
[BCMIm]Cl	бис(карбоксиметил)имидазолијум хлорид
BINOL	(<i>R</i>)-1,1'-би-2-нафтол
[BMIm]Cl	<i>n</i> -бутил-3-метилимидазолијум хлорид
BSA	Говеђи серум албумин (енг. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
Caco-2	интестинална пропустљивост ћелија аденокарцинома колона према испитиваним једињењима
CAT	каталаза
CFU	мерна јединица која се користи за процену броја живих ћелија које су способне да формирају колоније (енг. <i>Colony Forming Unit</i>)
cGMP	циклични гуанозин монофосфат
CLACC	Алгоритам за израчунавање ауто и крос корелација са великим вредностима, коришћен у анализи структура (енг. <i>Consistently Large Auto and Cross Correlation</i>)
COFs	Ковалентни органски оквири (енг. <i>Covalent Organic Frameworks</i>)
CRP	C-реактивни протеин
CTA	агенс за пренос ланаца током полимеризације (енг. <i>Chain Transfer Agent</i>)
Cys	цистеин
DA	дезоксиаденозин
DAPI	4',6-Диамидино-2-фенилиндол
DBU	1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундек-7-ен
DC	дезоксцитидин
DCM	дихлорметан
DEPT	Једнодимензионална NMR техника којом се добијају подспектри DEPT-45, DEPT-90 и DEPT-135 помоћу којих се тачније може одредити мултиплицитет појединих атома угљеника (енг. <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)

DES	дубоко еутектичке смеше (енг. <i>Deep Eutectic Solvent</i>)
DFT	теорија функционала густине (енг. <i>Density Functional Theory</i>)
DG	дезоксигуанозин
DIPEAc	Диизопропил етил амонијум ацетат
DMEM	медијум у коме се гаје ћелије (енг. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMF	<i>N,N</i> -диметилформамид
DMSO	диметил сулфоксид
DPP-4	дипептидилна пептидаза 4 (енг. <i>Dipeptidyl peptidase 4</i>)
DPPH	2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DSC	Диференцијална скенирајућа калориметрија (енг. <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DT	дезокситимидин
DTNB	5,5'-дитиобис(2-нитробензоева киселина)
EDTA	етилендиаминтетрасирћетна киселина
EMS	етил метансулфонат
ESI-MS	електроспреј јонска масена спектрометрија (енг. <i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>)
FDA	Управа за храну и лекове (енг. <i>Food and Drug Administration</i>)
FFD	метода фракционисаног факторског дизајна (енг. <i>Fractional Factorial Design</i>)
FITC	флуоресцин изотиоцијанат (енг. <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
FT-IR	инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом
FT-NMR	нуклеарна магнетна резонанца са Фуријеовом трансформацијом (енг. <i>Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance</i>)
FU	фракција невезаних једињења
GAPDH	глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа (енг. <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>)
GI ₅₀	концентрација при којој је раст ћелија инхибиран за 50% (енг. <i>Growth Inhibition</i>)
Gln	глутамин
Glu	глутаминска киселина
GPx4	глутатион пероксидаза
GRIND	дескриптори независни од GRID координатног система (енг. <i>GRid-INdependent Descriptors</i>)
GSH	глутатион
HB	водонична веза
HBL-100	ћелијска линија аденокарцинома дебелог црева
HCMV	цитомегаловирус
hChEs	хумана холинестераза (енг. <i>human cholinesterase</i>)
HEL	ћелијама хуманих ембрионских плућа
HeLa	ћелијска линија хуманог карцинома грлића материце
HepG2	ћелијска линија хепатома
HIA	предикција апсорпције у цревима (енг. <i>Human Intestinal Absorption</i>)
His	хистидин
HIV	вирус хумане имунодефицијенције (енг. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLB	хидрофилно-липофилни баланс (енг. <i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>)
hLig1	хумана лигаза 1 (енг. <i>human ligase 1</i>)

HMBC	дводимензионална NMR техника која открива корелације између протона и угљеника преко две или више веза (енг. <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HNMP	N-метил-2-пиролидонијум
HOE	флуоресцентна боја <i>Hoechst</i>
HRMS	Масена спектроскопија високе резолуције (енг. <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>)
HSA	Хумани серум албумин (енг. <i>human serum albumin</i>)
HSQC	¹ H- ¹³ C хетеронуклеарна корелациона спектроскопија (енг. <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>)
HSV	херпес симплекс вирус
HT-29	ћелијска линија колоректалног аденокарцинома
HTS	методологије високопропусног скрининга (енг. <i>High-Throughput Screening</i>)
IC ₅₀	концентрација једињења неопходна за 50 % инхибиције неког биолошког процеса
IL	Јонска течност (енг. <i>Ionic Liquid</i>)
Ile	изолеуцин
<i>in silico</i>	„на силицијуму“, компјутерски софтвери
<i>in situ</i>	„на лицу места“, онде где се појава догађа
<i>in vitro</i>	„у стаклу“, ван нормалног биолошког окружења
<i>in vivo</i>	„у живом“, унутар живог организма
K562	ћелијска линија хроничне мијелоидне левкемије
LD ₅₀	летална доза (енг. <i>Lethal Dose, 50%</i>)
LGA	Ламарков генетски алгоритам
logBB	логаритам проласка лека кроз крвно-мождану баријеру (енг. <i>brain/blood partition coefficient</i>)
logP	логаритам партиционог коефицијанте расподеле молекула између органске и водене фазе
LS174	ћелијска линија колоректалног аденокарцинома
LSD	Тест најмање значајне разлике (енг. <i>Least Significant Difference test</i>)
LV	латентне варијабле
Lys	лизин
MCF-7	ћелијска линија карцинома дојке
MCR	мултикомпонентна реакција (енг. <i>multicomponent reactions</i>)
MDA	малондиалдехид
MDA-MB-231	ћелијска линија агресивног трипло негативног рака дојке
Met	метионин
MIC	минимална инхибиторна концентрација (енг. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
MIF	методологија поља молекулских интеракција
Mim	метилимидазол
MMP	матрична металопроотеаза
MRC-5	ћелијска линија нормалних фибробласта плућа ембриона
MTCC	Колекција типских микробиолошких култура; званични извор стандардизованих сојева микроорганизама (енг. <i>Microbial Type Culture Collection</i>)
MTPPBr	метилтрифенил-фосфонијум бромид
MTT	тетразолијум тест у микрокултури (енг. <i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)

MW	микроталасно зрачење (енг. <i>Microwave radiation</i>)
Mw	молекулска маса (енг. <i>Molecular weight</i>)
NaDES	природни DES (енг. <i>natural DES</i>)
NCCLS	Национални комитет за клиничке лабораторијске стандарде (енг. <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>)
NCI-ADR/RES	мулти-лек-резистентни карцином јајника
NCI-H460	неситноћелијски карцином плућа
NCIM	Народна колекција индустријских микроорганизама (енг. <i>National Collection of Industrial Microorganisms</i>)
NMR	нуклеарна магнетна резонанца (енг. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	Спектроскопија нуклеарног Overhauser-овог ефекта; дводимензионална NMR техника за утврђивање просторне блискости протона у молекулу (енг. <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
NOS	синтаза азот-оксида
OECD	Организација за економску сарадњу и развој; организација задужена за издавање званичних протокола (енг. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>)
OVCAR-3	ћелијска линија аденокарцинома јајника
PBA	фенилборонска киселина
PBS	физиолошки раствор фосфатног пуфера (енг. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PC-3	ћелијска линија аденокарцинома простате
PCA	анализа главних компоненти (енг. <i>Principal Component Analysis</i>)
PCAT	протокатехуинска киселина
PCR	Реакција ланчаног умножавања (енг. <i>Polymerase Chain Reaction</i>) ланчана реакција полимеразе
PDB	база података <i>Protein Data Bank</i>
PEG	полиетилен гликол
PEGMA	полиетилен гликол метакрилат
<i>per os</i>	на латинском: на уста; примена лека или супстанце оралним путем
Phe	фенилаланин
PI	пропидијум јодид
PLS	метода парцијалних најмањих квадрата (енг. <i>Partial Least Square</i>)
PNP-G	<i>p</i> -нитрофенил- α -D-глукопиранозид
POL	диполарност/поларизабилност
<i>Post hoc</i>	на латинском: после тога
PRESS	предвиђена резидуална сума квадрата
Pro	пролин
PRRP	пролактин-ослобађајући хормонски рецептор
PTSA	<i>пара</i> -толуенсулфонска киселина
PVA	поливинил алкохол
RAFT	реверзибилно адиционо-фрагментациони трансфер (енг. <i>Reversible Addition–Fragmentation Chain-Transfer</i>)
REF	моларна рефракција
RMSD	средње коренско одступање положаја атома (енг. <i>Root Mean Square Deviation</i>)
RNS	реактивне азотове врсте (енг. <i>Reactive Nitrogen Species</i>)

RNU6B	мала нуклеарна РНК која се користи као ендогена контрола у анализама експресије microRNA
ROR γ	нуклеарни рецептор и транскрипциони фактор укључен у регулацију имунолошког одговора (енг. <i>retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma</i>)
ROS	Реактивне кисеоничне врсте (енг. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPMI-1640	медијум који се користи за раст и одржавање ћелија
RP-TLC	реверзно-фазна танкослојна хроматографије (енг. <i>Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography</i>)
RQ	релативни ниво експресија
SAR	однос структуре и активности (енг. <i>Structure–Activity Relationship</i>)
Ser	серин
SOD	супероксид дисмутаза
SPINOL	(<i>S</i>)-1,1'-спиро-би-индан-7,7'-диол
SPlog	пропустљивост кроз кожу (енг. <i>Skin permeability</i>)
SPR	сепиаптерин редуктаза
SV1573	ћелијска линија аденокарцинома плућа
T24	ћелијска линија карцинома мокраћне бешике
T-47D	ћелијска линија рака дојке (позитивна на естрогене и прогестерон рецепторе)
TBARS	реактивне врсте тиобарбитурне киселине
TBARS	тиобарбитурна киселина реагујуће супстанце
TFA	трифлуоросирћетна киселина
TGI	потпуно инхибирање раста ћелија (енг. <i>Total Growth Inhibition</i>)
THF	тетрахидрофуран
TK ⁻	тимидин-киназа-дефицијентни сој
TP	количина укупних протеина (енг. <i>Total Proteins</i>)
Trp	триптофан
Tyr	тирозин
U138	ћелијска линија глиобластома
U251	ћелијска линија глиобластома
UACC-62	ћелијска линија меланома
US	ултразвук (енг. <i>ultrasound</i>)
UV	ултраљубичасто зрачење (енг. <i>ultraviolet radiation</i>)
Val	валин
VD _{ss}	волумен дистрибуције у стању равнотеже
vdWSA/vdW	van der Waals-ова површина (енг. <i>Van der Waals Surface Area</i>)
VEGF-A	васкуларни ендотелијали фактор раста А (енг. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
WiDr	ћелијска линија аденокарцинома дебелог црева
WLOGP	дескриптор липофилности
XLOGP	дескриптор липофилности
γ -GT	гама-глутамил трансфераза

Биографија



Емилија Миловић рођена је 4. новембра 1995. године у Крагујевцу, где је завршила основну школу и Прву крагујевачку гимназију. Дипломирала је 2018. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, на студијском програму Хемија са просечном оценом 9,67. Мастер рад из области органске хемије успешно је одбранила у септембру 2019. године на истом факултету са просечном оценом 10. Докторске академске студије, модул Органска хемија, уписала је школске 2019/20. године. Током свог академског образовања била је добитница стипендије Фонда за младе таленте Републике Србије за 800 најбољих студената завршних година основних академских студија у школској 2017/18. години и за 400 најбољих студената мастер академских студија у школској 2018/19. години. Добитница је специјалног признања Српског хемијског друштва за изузетан успех током студирања.

Током докторских студија је два месеца била на стручној пракси у оквиру ERASMUS+ програма на Природно-математичком факултету Универзитета у Порту, Португал у истраживачкој групи професорке Пауле Гомеш. У оквиру COST Action CA18202 NECTAR пројекта, боравила је на Универзитету у Бургосу, Шпанија током једномесечног истраживачког усавршавања.

Емилија Миловић је запослена на Институту за информационе технологије Крагујевац као истраживач-сарадник. Бави се научно-истраживачким радом у области органске, медицинске и зелене хемије. Њена истраживања усмерена су на синтезу хетероцикличних молекула, спектроскопску карактеризацију и испитивање њиховог биолошког потенцијала. Досадашњи резултати њеног рада су објављени у 22 научне публикације у реномираним међународним часописима и 23 саопштења на међународним и националним научним конференцијама. Активно је укључена у реализацију билатералног пројекта између Републике Србије и Турске.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности одабраних деривата тетрахидропириимидина” представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 16.10.2025. године,

Емилија Мишковић
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**„Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности одабраних
деривата тетрахидропиримидина”** истоветне.

У Крагујевцу, 16.10.2025. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Емилија Миловић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

„Синтеза, карактеризација и испитивање биолошке активности одабраних деривата тетрахидропиримидина”

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

Овом Изјавом такође

☒ дозвољавам

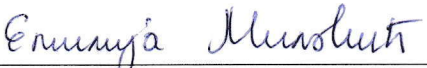
☐ не дозвољавам¹

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

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

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

У Крагујевцу, 16.10.2025. године,


потпис аутора

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