



Mgr Kamil Ostrowski

***Związki hybrydowe pochodnych kofeiny o potencjalnej
aktywności biologicznej***

***Hybrid compounds of caffeine derivatives with
potential biological activity***

Praca doktorska przedstawiona Recenzentom oraz Komisji Egzaminacyjnej Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu celem uzyskania stopnia doktora nauk
chemicznych



Poznań, 2026

Pracę doktorską wykonałem w Zakładzie Związków Bioaktywnych pod opieką promotorki prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz oraz promotorki pomocniczej dr Arlety Sierakowskiej

Składam szczególne podziękowania

Pani Prof. UAM dr hab. *Beacie Jasiewicz*

Za ogromną pomoc w przygotowaniu rozprawy jak i samą możliwość wykonania badań oraz za wszystkie lata współpracy

Pani dr *Arlecie Sierakowskiej*

Za współpracę przez ostatnie lata

Współpracownikom i współpracowniczkom, a w szczególności *Mildzie, Natalii* oraz *Grzegorzowi*

Za urozmaicanie uczelnianej codzienności i wspianą atmosferę w laboratorium

**Rodzicom – *Katarzynie i Cezariuszowi*,
bratu *Adamowi* oraz żonie *Julii***

Za wsparcie i wiarę podczas tej drogi

Spis treści

1. Wstęp i cel pracy	3
2. Część literaturowa.....	5
2.1 Związki hybrydowe.....	5
2.2 Związki bioaktywne	7
2.3 Kofeina i jej pochodne	8
2.3.1 Budowa i reaktywność kofeiny	8
2.3.2 Aktywność biologiczna kofeiny	12
2.4 Uracyl i jego pochodne.....	17
2.5 Polifenole	20
2.6 Związki azolowe	22
2.7 Chemia click, pierścień triazolowy	24
2.8 Stres oksydacyjny.....	27
2.9 Patogeny środowiskowe.....	29
3. Dyskusja wyników.....	33
3.1 Koniugaty kofeiny z pochodnymi uracylu i tiouracylu (I grupa pochodnych)	33
3.1.1 Synteza, analiza spektroskopowa	33
3.1.2 Ocena właściwości fizykochemicznych związków I grupy	36
3.1.3 Ocena aktywności biologicznej pochodnych I grupy	37
3.2 Koniugaty kofeiny z pochodnymi stilbenów (II grupa pochodnych).....	43
3.2.1 Synteza, analiza spektroskopowa	43
3.2.2 Ocena właściwości fizykochemicznych związków II grupy.....	45
3.2.3 Ocena aktywności biologicznej zsyntetyzowanych biokoniugatów	47
3.3 Koniugaty kofeiny z pochodnymi imidazoli i tioimidazoli (III grupa pochodnych)	51
3.3.1 Synteza, analiza spektroskopowa	51
3.3.2 Ocena właściwości fizykochemicznych pochodnych III grupy	53
3.3.3 Ocena aktywności biologicznej pochodnych III grupy	54
3.4 Koniugaty kofeiny z pochodnymi pirazoli (IV grupa pochodnych)	59
3.4.1 Synteza, analiza spektroskopowa	59
3.4.2 Struktura krystalograficzna pochodnych 37 i 41A	62
3.4.3 Ocena właściwości fizykochemicznych związków IV grupy	65
3.4.4 Ocena aktywności biologicznej pochodnych IV grupy.....	67
4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	74

4.1 Odczynniki	74
4.2 Metody	74
4.2.1 Procedury metodyki badania aktywności biologicznej otrzymanych związków	76
4.3 Synteza triazolowych pochodnych kofeiny z dołączonym ugrupowaniem uracylowym – Grupa I (związki 2–8)	82
4.4 Synteza i dane spektroskopowe pochodnych kofeiny z ugrupowaniem stilbenowym – Grupa II (związki 9–20)	97
4.5 Synteza i dane spektroskopowe biokonjugatów kofeiny i pochodnych pierścienia imidazolowego – Grupa III (związki 21–28)	120
4.6 Synteza i dane spektroskopowe pochodnych kofeiny z analogami pierścienia pirazolowego – Grupa IV (związki 29–45)	137
5. Podsumowanie pracy	170
6. Streszczenie pracy	173
6.1 Streszczenie w języku polskim	173
6.2 Streszczenie w języku angielskim	174
7. Literatura	175
8. Życiorys naukowy	191

1. Wstęp i cel pracy

Pomimo postępów w medycynie, opiece zdrowotnej i nauce wciąż mierzymy się z niewystarczającymi zabezpieczeniami przed zagrożeniami naturalnymi, takimi jak patogeny i nowotwory. Dodatkowo zmiany klimatyczne, urbanizacja planety i związane z tym czynniki zwiększają narażenie społeczeństwa na stres oksydacyjny spowodowany nierównowagą stężenia wolnych rodników i poziomu antyoksydantów. To osłabia odporność na patogeny, takie jak grzyby czy bakterie, a także zwiększa ryzyko występowania chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera, oraz chorób nowotworowych. W związku z tym konieczne staje się poszukiwanie nowych związków, które nie tylko skutecznie neutralizują nadmiar wolnych rodników, ale również wykazują wielokierunkową aktywność biologiczną.

W związku z tym, głównym celem badawczym mojej pracy była synteza nowych związków o wielokierunkowej aktywności biologicznej (m.in. antyoksydacyjnej, przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej i przeciwnowotworowej), które mogłyby pomóc w walce z patogenami, stresem oksydacyjnym oraz chorobami cywilizacyjnymi (takimi jak nowotwory czy choroby neurodegeneracyjne).

Najlepszą strategią syntezy nowych związków wydaje się łączenie znanych substancji aktywnych w struktury hybrydowe, aby dzięki efektowi synergii uzyskać związki wysoce skuteczne, a jednocześnie bezpieczne dla człowieka. Taka strategia może przyczynić się do opracowania nowoczesnych środków terapeutycznych o szerokim spektrum działania, ukierunkowanych na mechanizmy molekularne leżące u podstaw wielu chorób cywilizacyjnych.

W ramach pracy doktorskiej skupiłem się na syntezie związków hybrydowych łączących naturalny alkaloid kofeinę z pochodnymi uracylu, stilbenu oraz związkami azolowymi i tioazolowymi. Chemiczne modyfikacje, które przeprowadziłem, dotyczyły pozycji C-8 w cząsteczce kofeiny. Aby ułatwić analizę i interpretację wyników badań własnych, podzieliłem otrzymane pochodne na cztery grupy:

Grupa I – Koniugaty kofeiny z pochodnymi uracylu i tiouracylu (związki **2–8**),

Grupa II – Koniugaty kofeiny z pochodnymi stilbenu (związki **9–20**),

Grupa III – Koniugaty kofeiny z pochodnymi imidazolu i pirazolu (związki **21–28**),

Grupa IV – Koniugaty kofeiny z pochodnymi pirazoli (związki **29–45**).

Otrzymane związki zostały dokładnie scharakteryzowane spektroskopowo za pomocą spektroskopii protonowego i węglowego rezonansu magnetycznego (^1H NMR, ^{13}C NMR), spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) oraz spektrometrii mas (EI MS i ESI MS).

Dla większości z nich określono aktywność hemolityczną, antyoksydacyjną (we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu), przeciwgrzybiczą i przeciwbakteryjną w odniesieniu do kilku gatunków patogenów środowiskowych (we współpracy z Katedrą Gleboznawstwa i Mikrobiologii Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego). Dla pochodnych grup II i IV przeprowadzono badania cytotoksyczności wobec linii komórkowych U87 (komórki glejaka mózgu) oraz HT29 (komórki nowotworu jelita grubego), a także aktywności inhibicyjnej wobec enzymów: acetylocholinesterazy (AChE) oraz α -glikozydazy (we współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Van Yuzuncu Yil w Van, Turcja).

Analiza krystalograficzna dwóch otrzymanych przeze mnie pochodnych kofeiny została wykonana w Zakładzie Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

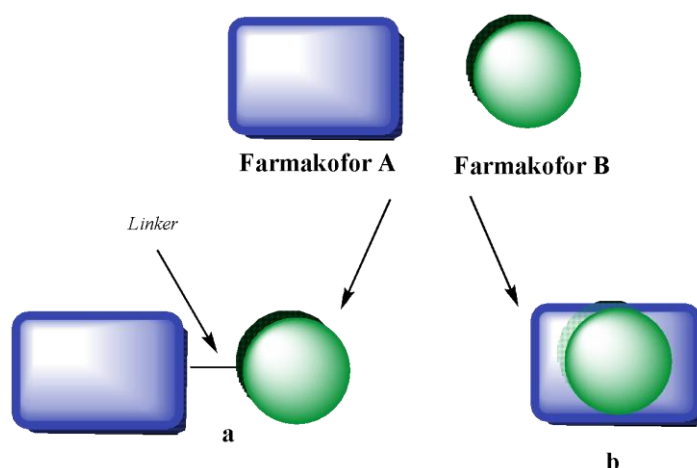
Dla wszystkich pochodnych określiłem parametry fizykochemiczne, takie jak masa cząsteczki, lipofilowość (logP), liczba donorów i akceptorów atomu wodoru (HBD i HBA) oraz powierzchnia polarna (PSA), pozwalające wstępnie oszacować biodostępność, toksyczność oraz podobieństwo nowych związków do obecnie stosowanych leków. Określiłem także wchłanianie związków przez układ pokarmowy (GI Abs), ich zdolność do przekraczania bariery krew–mózg (BBB Perm) oraz ich rozpuszczalność w wodzie.

2. Część literaturowa

2.1 Związki hybrydowe

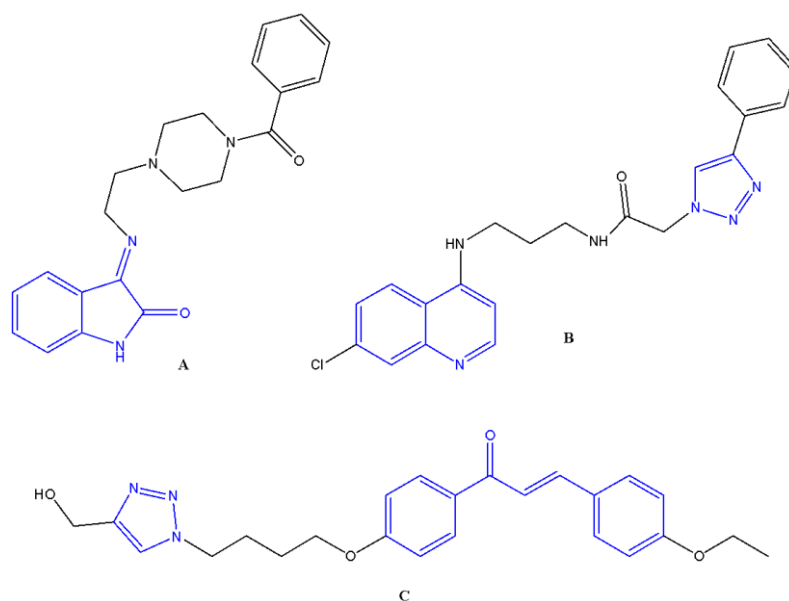
Związki hybrydowe to związki powstałe w wyniku połączenia dwóch lub więcej substancji o aktywności biologicznej. Jeśli przynajmniej jeden z fragmentów takiej cząsteczki ma pochodzenie naturalne, mówimy o biokoniugetach. Synteza związków hybrydowych stanowi innowacyjną strategię w chemii medycznej i projektowaniu leków. Połączenie aktywności biologicznej różnych rodzajów związków w ramach jednej cząsteczki pozwala uzyskać nowe substancje o zwiększonej aktywności biologicznej, selektywności lub korzystniejszych właściwościach farmakokinetycznych [1]. Ponadto hybrydy mogą oddziaływać na jeden lub wiele biologicznych celów (enzymów, receptorów, białek strukturalnych), co wpisuje się w koncepcję tzw. wielocelowego projektowania leków (*multi-target drug design*).

Wyróżnia się kilka głównych strategii syntezy związków hybrydowych. Jedną z nich jest bezpośrednie połączenie dwóch farmakoforów (fragmentów wykazujących aktywność biologiczną) mostkiem chemicznym lub grupą łączącą, tzw. *linkerem*, zachowując ich oryginalne właściwości. Inne podejście obejmuje integrację obu fragmentów w jeden nowy szkielet cząsteczki, tworząc tzw. *fused hybrids* [2]. Niezależnie od przyjętej strategii kluczowym celem jest poprawa efektywności terapeutycznej przy jednoczesnym zmniejszeniu skutków ubocznych związków wyjściowych. W ostatnich latach związki hybrydowe cieszą się rosnącym zainteresowaniem w świecie nauki, szczególnie w kontekście badań nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi, przeciwbakteryjnymi czy neuroprotektoryjnymi. Synteza związków hybrydowych może prowadzić do przezwyciężenia lekooporności, zwiększenia biodostępności oraz obniżenia toksyczności w porównaniu z prekursorami wobec zdrowych komórek, co czyni tę strategię bardzo przydatną w nowoczesnym projektowaniu leków. Na poniższym schemacie (Schemat 1) przedstawiłem strategię tworzenia związków hybrydowych.



Schemat 1. Synteza związków hybrydowych a) przez linker b) tworzenie fused hybrids

Znanych jest wiele związków hybrydowych. Przykładem są hybrydy izatyny, triazyny lub aniliny z innymi biologicznie aktywnymi związkami (Rys. 1), które wykazują działanie przeciwneurodegeneracyjne (poprzez jednoczesną inhibicję enzymów acetylcholinesterazy i butyrylocholinesterazy), a także antyoksydacyjne i przeciwzapalne, co umożliwia wykorzystanie tych związków w walce z chorobą Alzheimera (AD) czy Parkinsona (PD) [3]. Hybrydy chalkonu i triazolu wykazują obiecującą aktywność przeciwdrobnoustrojową i cytotoksyczną, szczególnie wobec komórek raka jelita grubego i płuc [4], natomiast hybrydy triazolu i chinoliny są wykorzystywane w walce z malarią. Te ostatnie działają jako potencjalne inhibitory hem-polimerazy; wykazują także aktywność wobec różnych szczepów *Plasmodium falciparum*, w tym tych opornych na leki [5]. Ciekawym przykładem są również sulfonowe hybrydy chalkonu, które wykazują działanie antyoksydacyjne oraz działają przeciwotyłociowo poprzez hamowanie aktywności enzymów trawiennych [6]. Z kolei związki zawierające w swojej strukturze pirol i tetrazol wykazują działanie przeciwgrzybicze wobec czterech gatunków grzybów, a w badaniach na szczurach wykazują działanie rozluźniające naczynia krwionośne [7]. Powyższe przykłady pokazują, że projektowanie związków hybrydowych umożliwia tworzenie układów wielofunkcyjnych, które dzięki synergistycznemu oddziaływaniu farmakoforów mogą przewyższać skutecznością związki wyjściowe.



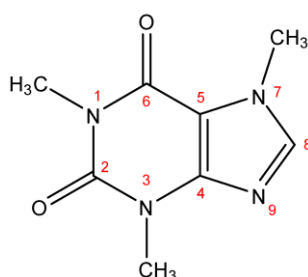
Rys.1. Wzory strukturalne związków hybrydowych izatyny (A), chinoliny (B) i chalkonu (C)

2.2 Związki bioaktywne

W obliczu rosnącej liczby zagrożeń związanych zarówno z chorobami zakaźnymi, jak i cywilizacyjnymi, nauka intensyfikuje poszukiwania nowych, skutecznych cząsteczek o wysokiej aktywności biologicznej. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się produkty naturalne, znane człowiekowi od wieków i szeroko wykorzystywane w tradycyjnej medycynie, które często wykazują wielokierunkowe działanie biologiczne. Związki pochodzenia naturalnego, dzięki swojej biodostępności i niskiej toksyczności, stanowią doskonały materiał wyjściowy do dalszych modyfikacji chemicznych. W procesie projektowania leków okazuje się, że niewielkie modyfikacje strukturalne znanych związków – takie jak podstawienie określonych grup funkcyjnych, wprowadzenie heteroatomów czy sprzężenie z innym farmakoforem – mogą znacznie zwiększyć ich aktywność biologiczną. Co więcej, łączenie dwóch lub więcej bioaktywnych fragmentów w strukturę hybrydową umożliwia wykorzystanie efektu synergistycznego, który często przekłada się na większą skuteczność otrzymanego produktu przy niższych dawkach terapeutycznych oraz mniejszej liczbie działań niepożądanych. Tego typu podejście, przy relatywnie niskim koszcie syntezy i szerokiej dostępności substratów, wpisuje się w aktualne potrzeby farmakologii i biotechnologii. W konsekwencji, synteza z wykorzystaniem związków chemicznych pochodzenia naturalnego oraz ich modyfikacja pozostają jednymi z kluczowych kierunków poszukiwań nowych leków w dobie globalnych wyzwań medycznych.

2.3 Kofeina i jej pochodne

Jednym z naturalnych związków bioaktywnych jest przedstawiciel alkaloidów purynowych – kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna) (Rys. 2), występująca między innymi w ziarnach kawy (*Coffea arabica*), liściach herbaty (*Camellia sinensis*) czy owocach guarany (*Paullinia cupana*) (Rys. 3). Zawartość kofeiny w suchej masie różni się w zależności od gatunku roślin lub sposobu obróbki (np. palenia ziaren kawy) [8]. Kofeina, ze względu na swoje pobudzające działanie, była stosowana już w starożytności. To związek znany na całym świecie i spożywany codziennie przez miliony ludzi. Po raz pierwszy został wyizolowany z ziaren kawy w 1819 roku przez Friedricha Ferdynanda Rungego [9].



Rys.2. Wzór strukturalny cząsteczki kofeiny

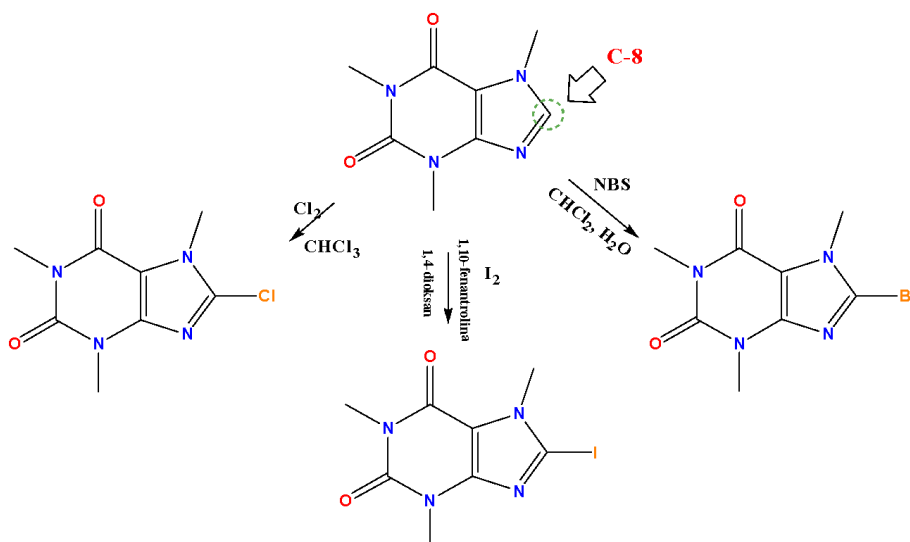


Rys.3. Rośliny zawierające kofeinę, kolejno – ziarna kawy, liście herbaty i owoce guarany

Źródła obrazów: <https://www.bonappetit.com/drinks/non-alcoholic/article/storing-coffee> <https://newenglishtea.com/en-cu/blogs/top-tips/loose-leaf-tea-love> <https://urushop.co.uk/guarana-the-eye-of-the-rainforest/>

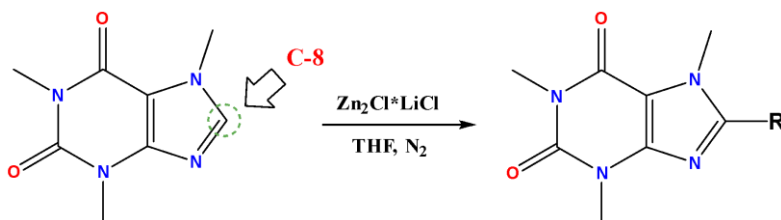
2.3.1 Budowa i reaktywność kofeiny

Na szkielet kofeiny składają się skondensowane pierścienie pirymidyny i imidazolu. Obecność grup metylowych w pozycjach *N*-1, *N*-3 i *N*-7 skutkuje dezaktywacją atomów azotu w cząsteczce. Najczęstszym miejscem modyfikacji cząsteczki kofeiny jest atom węgla C-8. Kofeina w tej pozycji ulega między innymi halogenowaniu rodnikowemu w reakcjach z chlorem, bromem czy jodem (Rys. 4) [10–14].



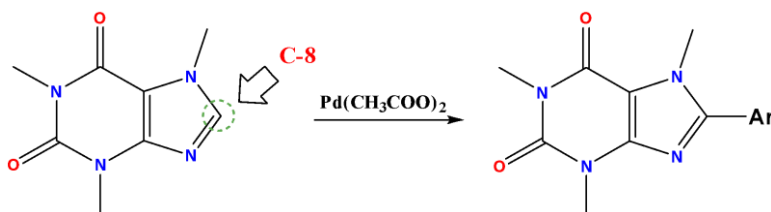
Rys.4. Schemat halogenowania cząsteczki kofeiny

Kofeina, w obecności soli lub kompleksów metali przejściowych, takich jak miedź czy cynk, działających jako katalizatory, reaguje z halogenkami alkilowymi, tworząc pochodne podstawione w pozycji C-8 (Rys. 5) [15–16].



Rys.5. Schemat alkirowania cząsteczki kofeiny

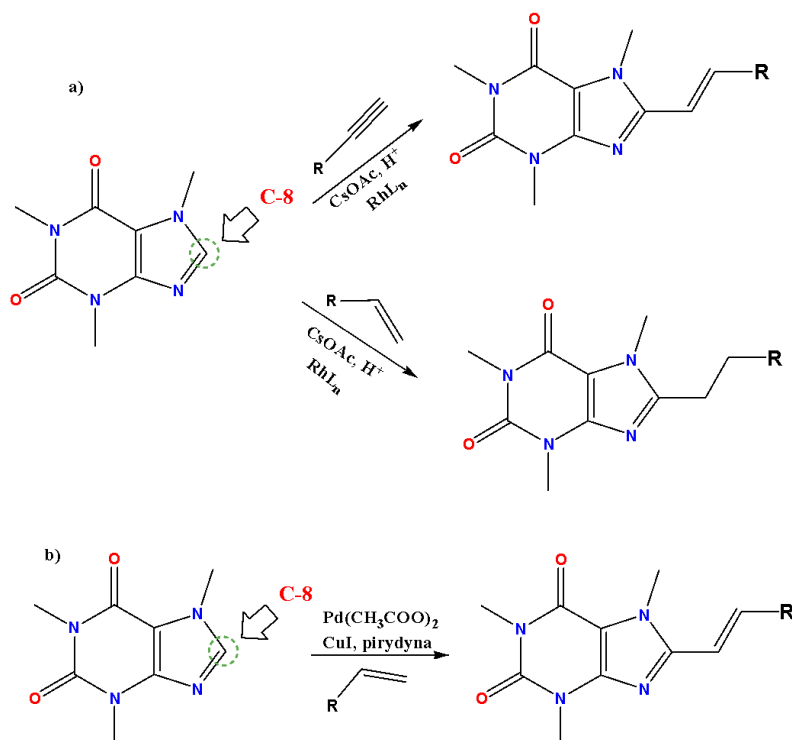
Natomiast w obecności soli takich jak $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CuI chętnie reaguje ze związkami aromatycznymi (Rys. 6) [17–22].



Rys.6. Reakcja arylowania cząsteczki kofeiny

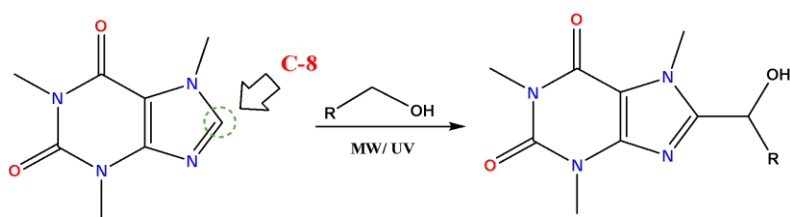
Pozycja C-8 jest także preferowana w reakcjach kofeiny ze związkami zawierającymi wiązania wielokrotne. W kwaśnym środowisku, w obecności kompleksów rutenu, następuje redukcja

wiązań wielokrotnych (Rys. 7a), natomiast w zasadowym środowisku, z użyciem jonów palladu i miedzi jako katalizatorów, zachodzi reakcja sprzęgania Hecka (Rys. 7b) [23–25].



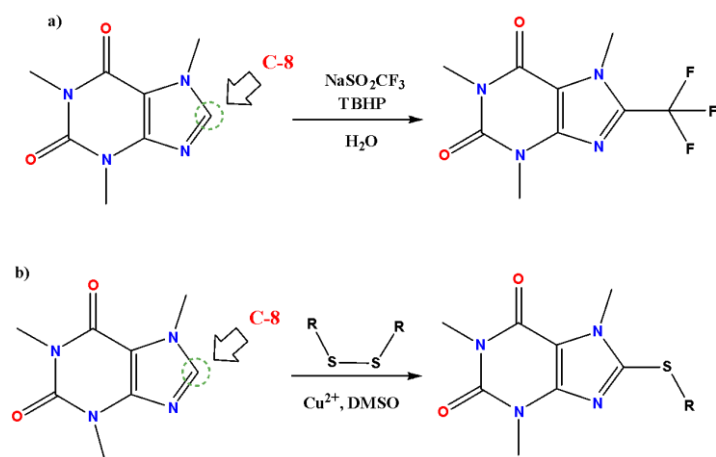
Rys.7. Reakcje kofeiny ze związkami zawierającymi wiązania wielokrotne

Cząsteczka kofeiny poddana działaniu promieniowania mikrofalowego lub UV reaguje z pierwszo- i drugorzędowymi alkoholami, tworząc odpowiednie alkohole o wyższej rzędowości (Rys. 8) [26-27], natomiast w obecności nadtlenku tert-butyłu w środowisku wodnym ulega reakcji trifluorometylacji w pozycji C-8 (Rys. 9a) [28-29].



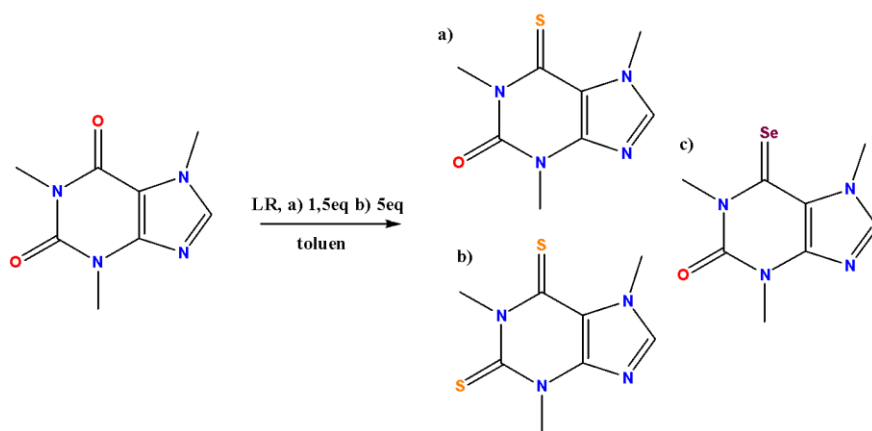
Rys.8. Reakcja kofeiny z alkoholami w obecności promieniowania

Kofeina jest także podatna na atak nukleofilowy związków disulfidowych w obecności jonów miedzi, w efekcie czego dochodzi do zerwania mostka disiarczkowego substratu i utworzenia tiopochodnej (Rys. 9b) [30].



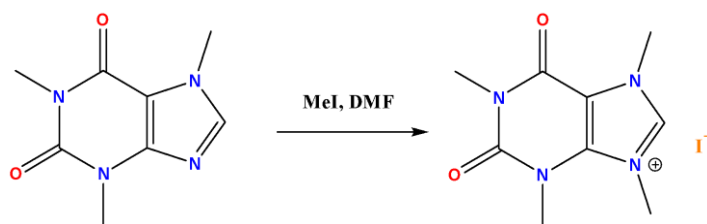
Rys.9. Synteza pochodnych kofeiny a) trifluorometylowej b) sulfonowej

Kolejnym, mniej preferowanym miejscem modyfikacji cząsteczki kofeiny są grupy karbonylowe. Ze względu na ich umiejscowienie w pierścieniu nie podlegają one standardowym reakcjom podstawiania węgla karbonylowego, ale mogą zostać zamienione na atomy siarki (reakcja z odczynnikami Lawessona) albo na atomy selenu w przypadku użycia odczynnika Woolinsa (Rys. 10) [31–33].



Rys.10. Synteza pochodnych siarkowych (a, b) oraz pochodnej selenowej (c) kofeiny

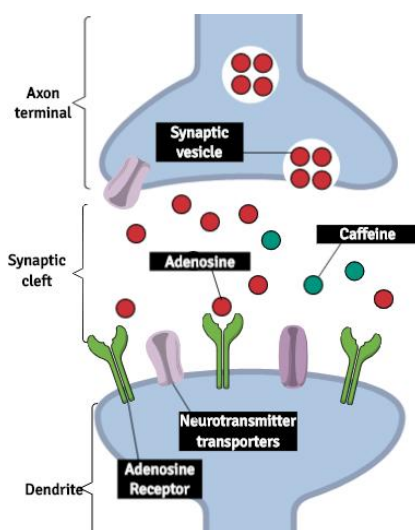
Możliwa jest również reakcja metylowania atomu azotu N-9 cząsteczki kofeiny (Rys. 11). Powstały produkt reakcji ma ładunek dodatni, co w efekcie pozwala na utworzenie kompleksów metali z cząsteczką kofeiny [34-36].



Rys.11. Reakcja metylowania pozycji N-9 kofeiny

2.3.2 Aktywność biologiczna kofeiny

Kofeina w roślinach pełni funkcję ochronną; jest naturalnym pestycydem, który odstrasza owady. Natomiast ludzie wykorzystują kofeinę głównie ze względu na jej pobudzający wpływ na organizm. Podobieństwo chemiczne cząsteczki kofeiny do jednego z neuroprzekaźników – adenozyiny – sprawia, że może ona wiązać się z receptorami adenozynowymi w organizmie (Rys. 12), co czyni ją inhibitorem adenozyiny o działaniu kompetencyjnym [37]. Dzięki temu do mózgu nie docierają informacje o zmęczeniu organizmu, co skutkuje poprawą koncentracji.



Rys.12. Mechanizm działania pobudzającego kofeiny

Źródło obrazu: <https://mindthegraph.com/blog/caffeine/>

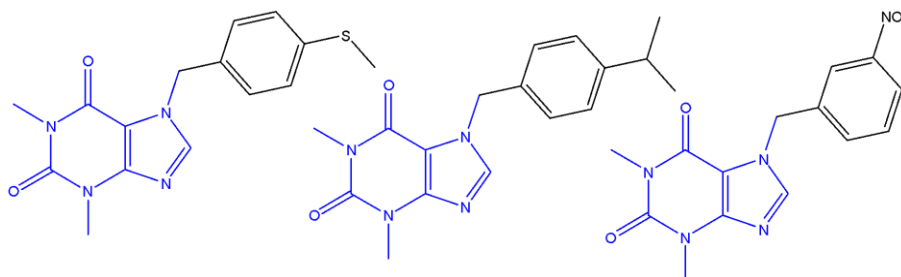
Kofeina jako związek bioaktywny działa wielokierunkowo, wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą [38], przeciwbakteryjną [39], antynowotworową [40], a także działa neuroprotekcynie jako małowcząsteczkowy antyoksydant [41]. Na przestrzeni lat otrzymano wiele związków hybrydowych i pochodnych kofeiny, które wykazują aktywności wymienione powyżej.

Aktywność przeciwgrzybicza

Badania nad aktywnością przeciwgrzybiczą kofeiny wskazują, że związek ten może znaleźć zastosowanie w ochronie drzew przed grzybami pleśniowymi (*Coniophora puteana*, *Poria placenta*, *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor*) [38]. Szczególnie obiecujące są wyniki dotyczące mieszaniny kofeiny z chitozanem, która skutecznie inhibuje rozrost *C. puteana*, co sugeruje synergiczne działanie tych substancji [42]. Kofeina wykazuje również zdolność do hamowania wzrostu *Colletotrichum fructicola*, patogenu odpowiedzialnego za antraknozę liści, poważną chorobę wpływającą na uprawy owoców i warzyw [43]. Co więcej, fungistyczne właściwości kofeiny potwierdzono w odniesieniu do gatunków *Fusarium sp.*, *C. gloeosporioides* oraz *F. verticillioides*, które są odpowiedzialne za istotne straty w rolnictwie [44]. Kofeina charakteryzuje się niską toksycznością dla organizmów wyższych oraz łatwością biodegradacji, co czyni ją atrakcyjną alternatywą dla syntetycznych fungicydów.

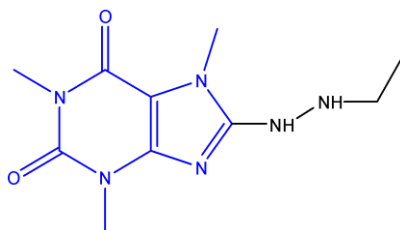
Aktywność przeciwnowotworowa

Badania nad aktywnością biologiczną kofeiny podkreślają jej potencjał w zastosowaniach onkologicznych. Jej działanie przeciwnowotworowe wiąże się głównie z hamowaniem kinaz ATM i ATR – kluczowych regulatorów odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA – co zwiększa wrażliwość komórek nowotworowych na stres genotoksyczny [45]. Chociaż kofeina sama wykazuje stosunkowo słabą zdolność do inhibicji tych enzymów, modyfikacje strukturalne tego związku prowadzą do powstania nowych pochodnych o silniejszych właściwościach antyproliferacyjnych (Rys. 13) [45,46]. Niektóre z nich, szczególnie te zawierające hydrofobowe podstawniki przy atomie azotu N-7 pierścienia ksantynowego, wykazują działanie cytotoksyczne wobec linii komórek nowotworowych takich jak A2780 (rak jajnika), MOLT-4 (białaczka) i HeLa (rak szyjki macicy), dorównując lub przewyższając aktywność znanych inhibitorów ATR, takich jak VE-821 [45].



Rys.13. Pochodne kofeiny o właściwościach antyproliferacyjnych

Na szczególną uwagę zasługują także di- i poliaminowe pochodne kofeiny (Rys. 14), które wykazały selektywną cytotoksyczność wobec komórek raka piersi (MCF-7), a jednocześnie chroniły erytrocyty przed stresem oksydacyjnym, co sugeruje synergizm mechanizmów antyoksydacyjnych i przeciwnowotworowych [46].



Rys.14. Pochodna poliaminowa kofeiny

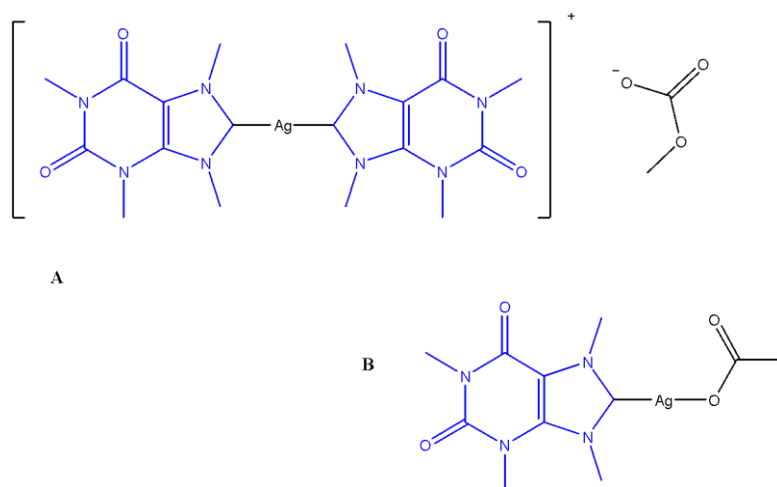
Analiza właściwości antynowotworowych kofeiny wskazuje na jej działanie na różnych etapach rozwoju nowotworu, takich jak proces kancerogenezy, indukcja apoptozy oraz hamowanie angiogenezy. Dodatkowo kofeina przyjmowana podczas chemioterapii wzmacnia jej działanie [47]. Badania przesiewowe *in silico* pozwoliły zidentyfikować szereg pochodnych kofeiny jako obiecujące inhibitory wzrostu komórek nabłonkowych nowotworów, co dodatkowo potwierdza znaczenie tej grupy związków w projektowaniu leków celowanych [48].

Aktywność przeciwbakteryjna

Kofeina nie wykazuje szerokiej aktywności przeciwbakteryjnej [49]; działa hamująco na rozwój biofilmu *Pseudomonas aeruginosa* [50] poprzez zaburzenie *quorum sensing** bakterii, co w efekcie hamuje ruchliwość rojową tego gatunku [51]. Hamuje również rozwój enterobakterii z gatunków *Serratia marcescens* i *Enterobacter cloacae* [52], które mogą powodować stany zapalne m.in. stawów, wsierdza czy spojówek [53]. Dzięki modyfikacjom cząsteczki kofeiny otrzymano pochodne o zdecydowanie wyższej aktywności przeciwbakteryjnej.

*Quorum sensing** – zjawisko komunikacji bakterii pozwalające organizmom określić gęstość populacji i dostosować ją poprzez regulację genów. Jest to sposób przystosowania się do niekorzystnych warunków środowiska. Zjawisko to nie ma jeszcze polskiej nazwy.

Przykładem mogą być nietoksyczne kompleksy kofeiny z dodatkową grupą metylową w pozycji *N*-9 oraz octanem srebra, wykazujące skuteczność przeciwko *Burkholderia cepacia*, bakteriom powodującym ciężkie schorzenia dróg oddechowych (Rys. 15) [54].



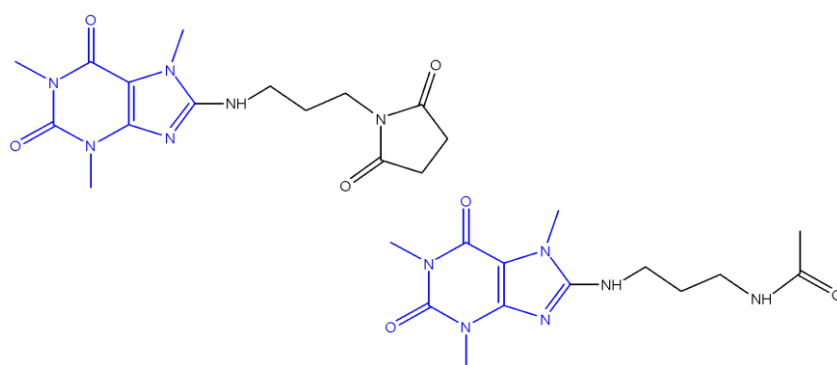
Rys.15. Wzory strukturalne kompleksu kofeinowo-octanowego (A) oraz hybrydy octanu i kofeiny (B)

Co więcej, kofeina często wzmacnia efekty i aktywność związków w mieszaninie. Przebadane ekstrakty z ziaren guarany i kawy wykazują działanie przeciwbakteryjne wobec szczepów bakterii takich jak *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus* [49], *Escherichia coli* czy *Bacillus cereus* [55]. Aktywność ta jest wyższa niż aktywność pojedynczych związków (polifenoli, katechin) [55]. Mimo działania na niewielką grupę gatunków, kofeina może stanowić cenny składnik w terapiach przeciwbakteryjnych – jej synergistyczne działanie z innymi związkami przeciwbakteryjnymi, dzięki wielotorowemu mechanizmowi, może znaleźć zastosowanie w walce z antybiotykoopornością bakterii, na co wskazują powyższe wyniki dotyczące zaburzania biofilmu bakterii.

Aktywność antyoksydacyjna

Kofeina zaliczana jest do egzogennych antyoksydantów małocząsteczkowych – związków o małej masie cząsteczkowej dostarczanych do organizmu. Jej głównymi mechanizmami działania przeciwutleniającego są mechanizmy SET (single electron transfer) oraz RAF (radical adduct formation) [56], które zostaną omówione w dalszej części pracy. Wykazuje ona skuteczne działanie antyoksydacyjne wobec rodnika hydroksylowego $\cdot\text{OH}$ [56], umiarkowanie neutralizuje rodnik metoksyłowy $\cdot\text{OCH}_3$ oraz słabo neutralizuje rodnik hydroperoksyłowy $\text{HOO}\cdot$. Nie wykazuje żadnego działania względem rodników $\text{O}_2^{\cdot-}$ oraz $\cdot\text{OOCH}_3$ [56]. Badania wskazują, że kofeina słabo neutralizuje alkilowe rodniki peroksyłowe [57]. W kontekście stresu oksydacyjnego może odgrywać rolę cząsteczki ochronnej,

szczególnie w komórkach narażonych na wysokie stężenie reaktywnych form tlenu, takich jak neurony, komórki nerek czy hepatocyty. Kofeina wykazuje synergistyczne działanie z innymi biologicznie aktywnymi związkami znajdującymi się w ekstraktach z ziaren kawy lub liści zielonej herbaty. Wraz z katechinami działa hamująco na proces peroksydacji lipidów oraz zwiększa aktywność enzymów neutralizujących reaktywne formy tlenu w nerkach, dzięki czemu może zapobiegać chorobom nerek [58,59]. Na rysunku (Rys. 16) przedstawiono przykładowe pochodne kofeiny wykazujące aktywność cytoprotekcyjną, które są również dobrymi chelatorami jonów żelaza(II) [60].



Rys.16. Pochodne kofeiny o aktywności antyoksydacyjnej

Ze względu na jej częste spożycie w diecie i dobrze znaną toksyczność, kofeina jest ważnym związkiem wyjściowym w syntezie nowych bioaktywnych związków o właściwościach antyoksydacyjnych.

Kofeina jako inhibitor enzymów

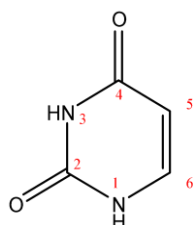
Kofeina i jej pochodne wykazują potencjał jako inhibitory enzymu monoaminooksydazy (MAO) [61], co może opóźniać postęp chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera (AD) i choroba Parkinsona (PD) [62]. Działając na ośrodkowy układ nerwowy, mogą także wspierać leczenie zaburzeń psychicznych, takich jak depresja, zespół stresu pourazowego (PTSD) czy zaburzenia obsesyjno-kompulsyjne (OCD).

Kofeina ma również zdolność do hamowania enzymów trawiennych w organizmie – α -glukozydazy i α -amylazy, odgrywających ważną rolę w rozkładzie węglowodanów na prostsze związki [63,64]. Zaproponowane mechanizmy działania wskazują na reaktywację przez kofeinę szlaku sygnalizacyjnego insuliny oraz szlaku metabolizmu pirogronianu i biosyntezy katecholoamin [63]. Aktywność kofeiny względem katabolicznych enzymów

cukrów może przyczyniać się do wykorzystywania tego związku w terapii cukrzycy i chorób wątroby [65]. Ponadto cząsteczka kofeiny wykazuje powinowactwo do acetylocholinoesterazy, enzymu neurotransmisyjnego katalizującego reakcję rozpadu acetylocholiny na cholinę i kwas octowy. Kofeina pełni funkcję selektywnego inhibitora niekompetycyjnego dla tego enzymu. Mimo 1000-krotnie słabszego wiązania z enzymem niż standardowa takryna, kofeina jest zdecydowanie mniej toksyczna [66]. Istotą badań nad skutecznymi inhibitorami enzymów neurotransmisyjnych jest terapia chorób neurodegeneracyjnych. Odkrycie związków o wysokim potencjale terapeutycznym w tym zakresie może prowadzić do znacznego zahamowania rozwoju AD czy PD, a w dłuższej perspektywie możliwe jest całkowite wyeliminowanie tych schorzeń.

2.4 Uracyl i jego pochodne

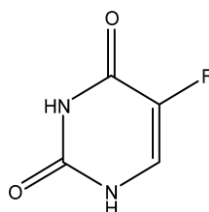
Jednym ze związków pochodzenia naturalnego jest uracyl (Rys. 17). Jest on jedną z czterech zasad azotowych występujących w kwasie rybonukleinowym (RNA), komplementarną do adeniny.



Rys.17. Wzór uracylu

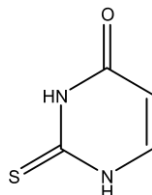
Główną funkcją uracylu w organizmach żywych jest udział w procesie kodowania i translacji genów, czyli produkcji białek. Szkieletem uracylu jest pierścień pirymidynowy. Biosynteza uracylu przebiega poprzez deaminację cytozyny, a jego naturalna obecność ogranicza się niemal wyłącznie do RNA; w DNA jest niepożądany, ponieważ może być efektem spontanicznej deaminacji cytozyny, co może prowadzić do mutacji. Mimo to, ugrupowanie uracylu nie występuje wyłącznie w kwasach nukleinowych. W przyrodzie jest również identyfikowany jako metabolit w organizmach roślinnych i zwierzęcych. Jest składnikiem wielu szlaków metabolicznych. W mikroorganizmach i roślinach uracyl oraz jego pochodne biorą udział w regulacji wzrostu i syntezie białek. Co istotne, niektóre pochodne uracylu wykazują aktywność biologiczną, np. przeciwnowotworową, przeciwwirusową,

przeciwbakteryjną, przeciwpasożytniczą [67] i znajdują zastosowanie jako substancje czynne leków, jak choćby 5-fluorouracyl (Rys. 18), stosowany w chemioterapii nowotworów [68].



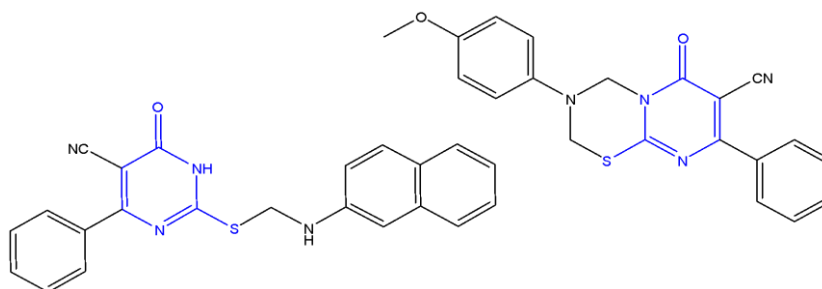
Rys.18. Wzór 5-fluorouracylu

5-Fluorouracyl wykazuje działanie cytotoksyczne wobec nowotworów piersi, przewodu pokarmowego, jajników czy skóry [67], a dzięki swojej strukturze metabolizowany jest jak naturalnie występujący w organizmie uracyl [69]. Już w 1987 roku Erik De Clercq i jego współpracownicy badali aktywność antywirusową związków pirymidynowych i purynowych, wykazując, że analogi pirymidyn skutecznie zwalczają cytomegalowirusy, natomiast w zwalczaniu wirusów układu autoimmunologicznego skuteczniejsze działanie wykazują związki purynowe [70]. Inną wartą uwagi pochodną uracylu jest 2-tiouracyl (Rys. 19), wykazujący powinowactwo do ludzkiej albuminy [71].



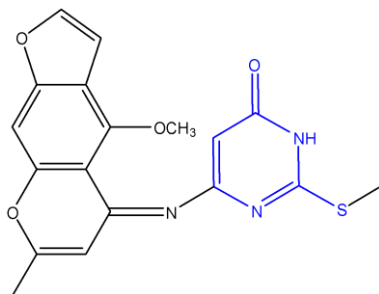
Rys.19. Struktura 2-tiouracylu

Związki zawierające w swojej strukturze ugrupowanie tiouracylowe (Rys. 20) wykazują ponadto działanie antyproliferacyjne wobec linii komórek raka piersi, jelita grubego, prostaty oraz wątroby. Pochodne te działają jako inhibitory syntazy tymidylanowej (TS) – enzymu stanowiącego jedno z głównych miejsc docelowych działania związków cytotoksycznych [72].



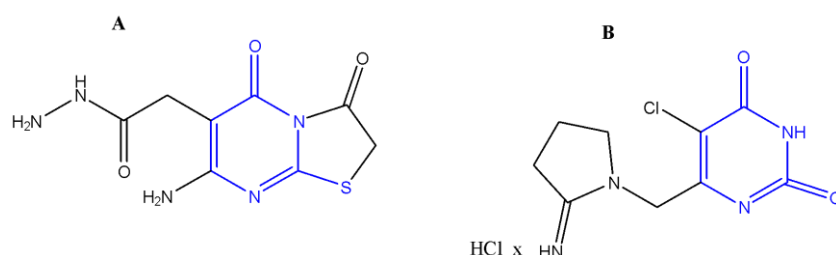
Rys.20. Pochodne 6-arylo-5-cyjano-2-tiouracylu

Związki syntetyzowane z 6-amino-2-tiouracylu oraz dostępnych na rynku preparatów Khelinu i Visangenu (Rys. 21), zawierające ugrupowanie pirymidynowe, wykazały działanie przeciwzapalne i analgetyczne [73].



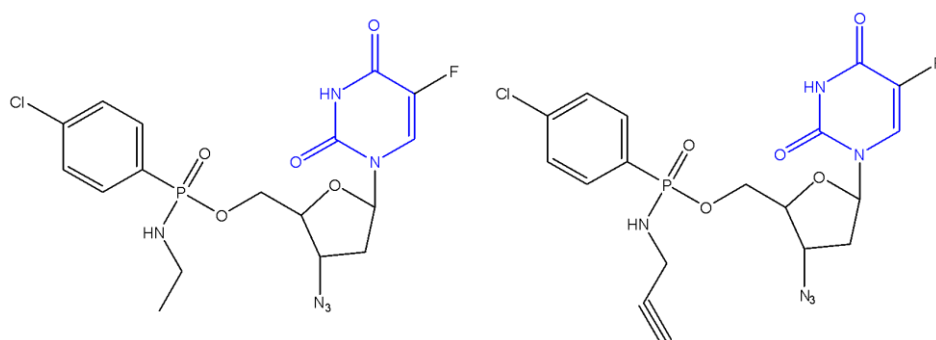
Rys.21. Hybryda Visangenu i pochodnej uracylowej

Pochodne pirymidynowe powstałe w reakcji zamykania pierścienia z 6-amino-2-tiouracylu i bromooctanu metylu (Rys. 22A) wykazują działanie antyoksydacyjne przy jednoczesnej protekcji DNA, a także są zdolne do skutecznego uśmiercania linii komórek Ehrlicha [74]. Na przestrzeni lat naukowcy zsyntetyzowali wiele tego typu pochodnych o zróżnicowanym działaniu. W 2000 roku Fukushima wraz z zespołem otrzymał chlorowoderek 5-chloro-6-[1-(2-iminopirolidynylo)metylo]uracylu (TPI) – skuteczny inhibitor fosforylasy tymidynowej (Rys. 22B) [75], enzymu odpowiedzialnego za fosforylację nukleotydów pirymidynowych, a także promującego angiogenezę komórek rakowych [68].



Rys.22. Pochodne uracylu – bromooctanowa (A) oraz chlorowodorkowa (B)

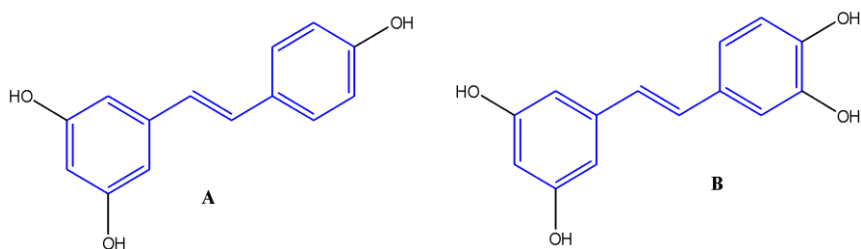
W 2013 roku opublikowano syntezę pochodnych nukleozydów uracylowych o aktywności antynowotworowej [76]. Związki te (Rys. 23) wykazują również działanie antywirusowe wobec wirusów HSV-1 i VZV [77]. Natomiast związki hybrydowe izatyny i uracylu połączone pierścieniem triazolowym wykazują aktywność przeciwnowotworową [78].



Rys.23. Pochodne nukleozydowe uracylu o aktywności przeciw wirusom HSV-1 i VZV

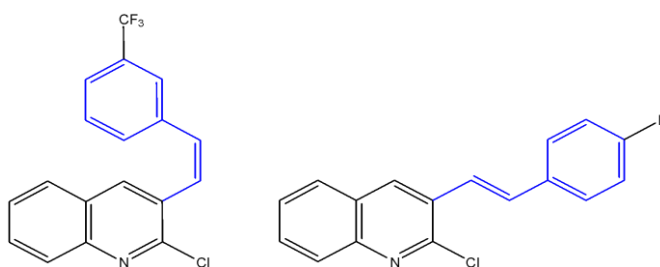
2.5 Polifenole

Kolejną interesującą grupą związków o wysokim potencjale biologicznym są polifenole. Stanowią one jedną z najliczniejszych grup metabolitów występujących w roślinach. Struktura polifenoli jest definiowana obecnością co najmniej dwóch grup fenylowych w cząsteczce. W organizmach roślinnych polifenole pełnią głównie funkcje ochronne przed czynnikami środowiskowymi, zarówno biotycznymi (ochrona przed patogenami – grzybami, bakteriami czy wirusami), jak i abiotycznymi (promieniowanie UV, uszkodzenia mechaniczne czy stres oksydacyjny). Dodatkowo polifenole biorą udział w procesach fizjologicznych roślin, takich jak regulacja wzrostu oraz barwienie tkanek. Znaczenie biologiczne polifenoli nie ogranicza się jednak wyłącznie do roślin. W organizmach wyższych, w tym ludzi, związki te wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej. Uważa się, że ich regularne spożywanie wraz z dietą roślinną przyczynia się do zmniejszenia ryzyka rozwoju wielu chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów, chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy typu II oraz schorzeń neurodegeneracyjnych [59,79]. Polifenole występują powszechnie w roślinach wyższych. Szczególnie bogate w polifenole są owoce jagodowe (np. borówki, porzeczki, winogrona), herbata, kakao, oliwki, zboża pełnoziarniste, przyprawy oraz warzywa. W roślinach związki te gromadzą się głównie w skórkach, łupinach oraz warstwach zewnętrznych owoców, liści i nasion. Polifenole dzielą się na kilka grup chemicznych, takich jak flawonoidy, taniny, kwasy fenolowe oraz stilbeny. Stilben (1,2-difenyloetylen) w naturze występuje głównie w postaci resweratrolu (3,5,4'-trihydroksystilben) (Rys. 24A), pterostilbenu, piceatannolu (Rys. 24B) oraz ϵ -winiferyny.



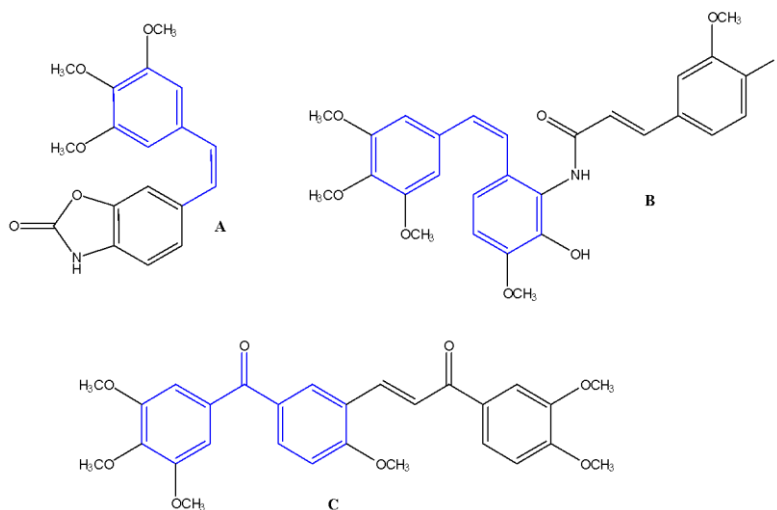
Rys. 24. Naturalne pochodne stilbenu – resweratrol (A), piceatannol (B)

W przyrodzie związki stilbenowe są wtórnymi metabolitami roślinnymi, które przede wszystkim pełnią funkcje ochronne. Najczęściej spotykane są w takich rodzinach roślin jak *Vitaceae* (winoroślowate), *Fabaceae* (bobowate) czy *Pinaceae* (sosnowate). Największe ilości resweratrolu znajdują się w skórkach winogron, owocach morwy, orzeszkach ziemnych oraz w czerwonym winie. W organizmach roślinnych związki stilbenowe działają przeciwdrobnoustrojowo i są syntetyzowane przez rośliny w miejscu występowania infekcji [80]. Stilbeny mają wysoką zdolność do neutralizowania wolnych rodników, co czyni je skutecznymi antyoksydantami. Wcześniej wspomniany resweratrol wykazuje zdolność zmiatania wolnych rodników porównywalną do standardowych wzorców (Troloxu, α -tokoferolu) oraz zapobiega peroksydacji lipidów [81]. Ponadto resweratrol ma zdolność hamowania cyklu komórkowego wielu linii komórkowych nowotworów ludzkich; jest inhibitorem kinazy tyrozynowej (co prowadzi do blokady transkrypcji w komórkach nowotworowych) [82], a dodatkowo przyczynia się do spowolnienia agregacji płytek krwi, wspierając ochronę organizmu przed miażdżycą [83]. Pomimo dobrych właściwości terapeutycznych resweratrol ma niską biodostępność i jest bardzo szybko metabolizowany oraz wydalany z organizmu. W związku z tym na znaczeniu zyskuje synteza pochodnych stilbenu o zwiększonej biodostępności dla organizmu. W 2015 roku Vandana Srivastava i Hoyun Lee opublikowali syntezę chinolinowo-stilbenowych hybryd (Rys. 25) o wysokiej aktywności antyproliferacyjnej, przy jednocześnie wyższej selektywności wobec komórek rakowych niż wobec komórek gospodarza [84].



Rys. 25. Hybrydy chinolinowo-stilbenowe

Ponadto pochodne stilbenu połączone z benzoksazonem, kwasem cynamonowym czy chalkonem (Rys. 26) okazały się skutecznymi inhibitorami polimeryzacji tubuliny [85].

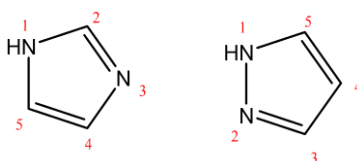


Rys.26. Pochodne benzoksazonu (A), kwasu cynamonowego (B) i chalkonu (C) zawierające ugrupowanie stilbenowe

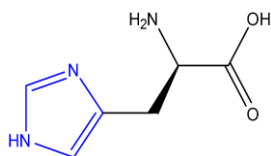
Podsumowując, pochodne stilbenu, dzięki szerokiemu spektrum działania, stanowią grupę związków o potencjale terapeutycznym, szczególnie w leczeniu nowotworów. Jako silne antyoksydanty mogą też przyczyniać się do zapobiegania chorobom neurodegeneracyjnym.

2.6 Związki azolowe

Związki azolowe, a w szczególności imidazole i pirazole (Rys. 27), należą do jednych z najważniejszych związków heterocyklicznych zawierających atomy azotu. Struktury azolowe powszechnie występują zarówno w naturze, jak i w licznych biologicznie aktywnych związkach syntetycznych. Imidazol to kluczowy składnik histydyny (Rys. 28), aminokwasu niezbędnego do prawidłowego funkcjonowania organizmu, oraz jej pochodnej, histaminy, biorącej udział w reakcjach zapalnych i alergicznych, a także w regulacji wydzielania soku żołądkowego.

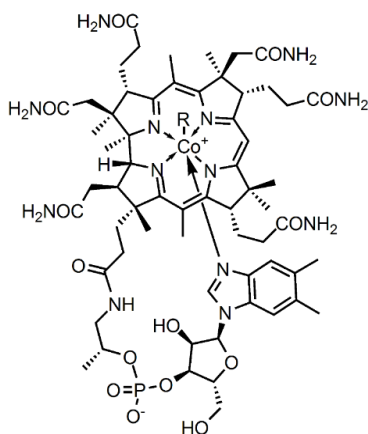


Rys.27. Imidazol i pirazol



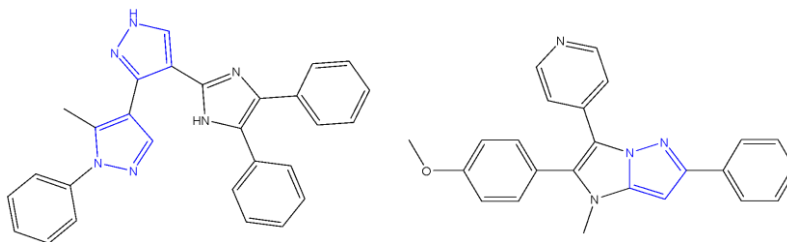
Rys.28. Struktura histydyny

Struktura imidazolu jest również obecna w wielu koenzymach, takich jak cytochrom P450 czy witamina B12 (Rys. 29), w których uczestniczy w procesach enzymatycznych i transportowych.



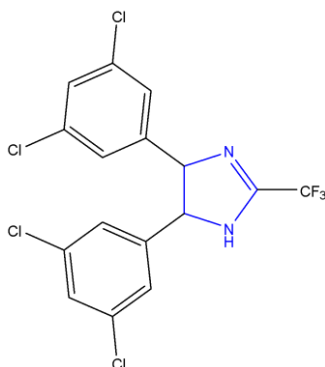
Rys.29. Związki naturalne zawierające pierścień imidazolowy – witamina B12

Pirazole to związki zdecydowanie rzadziej występujące w środowisku naturalnym, jednak zarówno imidazole, jak i pirazole cechują się wysoką reaktywnością chemiczną oraz zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych i koordynacyjnych, co sprawia, że są wykorzystywane w syntezie związków o znaczeniu farmakologicznym, w tym o działaniu przeciwzapalnym, oraz jako inhibitory 5-lipogenazy, a także jako agoniści i antagoniści receptorów histaminowych [86]. Pochodne zawierające w swojej strukturze pierścień pirazolowy wykazują aktywność przeciwnowotworową wobec różnych linii komórkowych [87,88], w tym nowotworów płuc (A549) [89]. Przykłady takich pochodnych przedstawiono poniżej (Rys. 30).



Rys.30. Pochodne pirazolu o działaniu przeciwnowotworowym

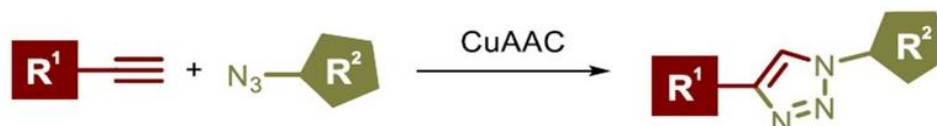
Na uwagę zasługują także ich właściwości antybakteryjne. Przykładem może być 4,5-bis(3,5-dichlorofenylo)-2-(trifluorometylo)-1H-imidazol (Rys. 31), który skutecznie hamuje rozwój *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* [90].



Rys.31. Pochodne z pierścieniem imidazolowym o właściwościach antybakteryjnych

2.7 Chemia click, pierścień triazolowy

Skutecznym narzędziem do otrzymywania związków hybrydowych, cząsteczek aktywnych biologicznie, jest reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji, zwana reakcją „chemii click”. Poniżej przedstawiłem schemat reakcji chemii click (Schemat 2).

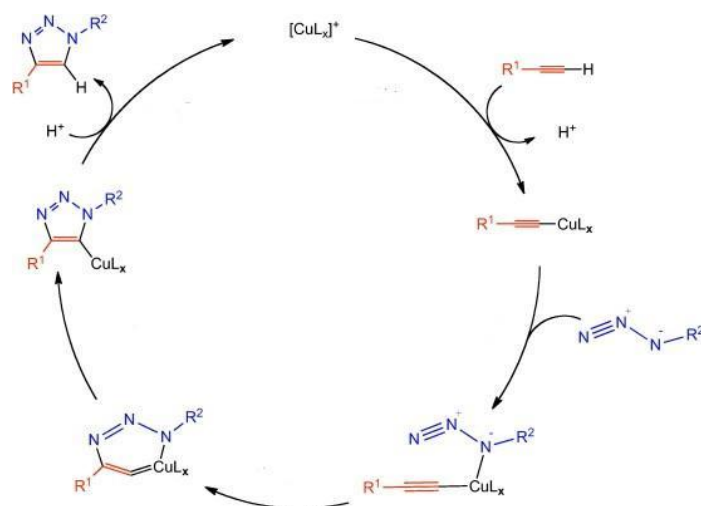


Schemat 2. Schemat reakcji click

Źródło obrazu: https://www.researchgate.net/publication/370421790_Advances_in_the_construction_of_diverse_SuFEx_linkers

Opracowanie tej metody przez Sharplessa na początku XXI wieku stanowi jeden z kroków milowych w chemii organicznej, a jej autorzy w 2022 roku otrzymali za nią Nagrodę Nobla. Główne założenia tej metody to prowadzenie reakcji w sposób szybki i wydajny, przy minimalnej ilości produktów ubocznych oraz łatwa izolacja produktu końcowego. Chemia click została zaprojektowana jako uniwersalne narzędzie do syntezy związków chemicznych w warunkach przyjaznych środowisku, często w obecności wody jako rozpuszczalnika i przy niskich temperaturach [91]. Reakcje „click” cechują się wysoką regioselektywnością, zachodząc niemal wyłącznie z utworzeniem produktu 1,4-dipodstawionego triazolu, co czyni je niezwykle przydatnymi w projektowaniu i syntezie związków hybrydowych, leków,

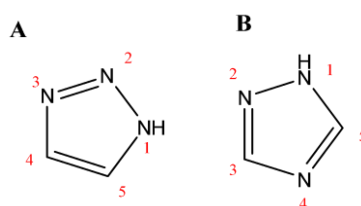
materiałów polimerowych oraz sond biologicznych. Szczególną popularność zyskała reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydkiem a alkinem, katalizowana przez kationy miedzi (Cu(I)) – tzw. reakcja CuAAC (Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition). Końcowym produktem reakcji jest pięcioczłonowy pierścień 1,2,3-triazolowy, który charakteryzuje się wysoką stabilnością chemiczną i termiczną. Schemat reakcji przedstawiono poniżej (Schemat 3).



Schemat 3. Mechanizm CuAAC

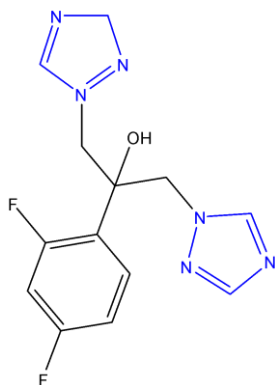
Źródło obrazu: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010854511001809>

Od czasu opracowania metody chemia click znalazła szerokie zastosowanie. Przykładowo, pozwala na łatwe znakowanie DNA, białek, peptydów i wirusów bez konieczności stosowania grup ochronnych. Jej niezaprzeczalnym atutem jest również możliwość funkcjonalizacji powierzchni stałych (np. mikromacierzy) oraz tworzenia nanostruktur i polimerów sieciowych [92]. Powstający w reakcji pierścień 1,2,3-triazolowy (Rys. 32A), podobnie jak pierścień 1,2,4-triazolowy (Rys. 32B), jest stabilny, odporny na hydrolizę i utlenianie, a przy tym wykazuje powinowactwo do białek [93]. Pierścień triazolowy nie tylko pełni funkcję skutecznego łącznika pomiędzy różnorodnymi fragmentami bioaktywnymi, lecz także sam wykazuje istotne właściwości farmakologiczne.



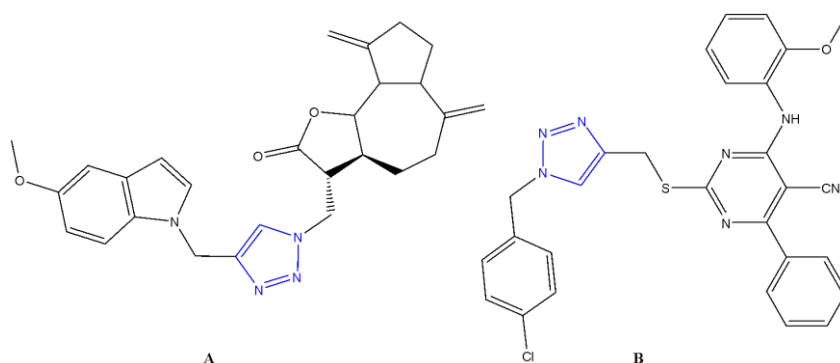
Rys.32. Struktura pierścienia 1,2,3-triazolowego (A) oraz 1,2,4-triazolowego (B)

Na szczególną uwagę zasługują właściwości antyproliferacyjne i przeciwgrzybicze pierścienia triazolowego. Przykładami mogą być pochodne triazolowe: ketokonazol, vorikonazol i flukonazol [94]. Ten ostatni jest najpowszechniej stosowanym lekiem zawierającym ugrupowanie triazolowe (Rys. 33), stosowanym klinicznie od lat 90., który zapoczątkował rozwój licznych pochodnych o zbliżonym lub poszerzonym spektrum działania [95,96].



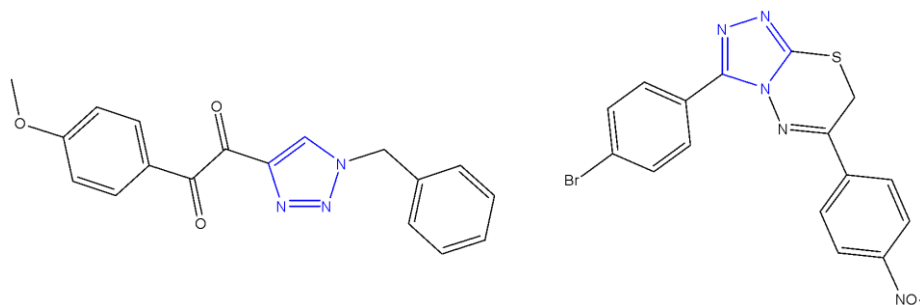
Rys.33. Struktura flukonazolu – najpopularniejszego triazolowego środka grzybobójczego

Wykazano, że połączenie pochodnych triazolowych z naturalnymi lub półsyntetycznymi fragmentami, takimi jak indol [97] (Rys. 34A), chalkon [98], pierścień pirymidynowy [99] (Rys. 34B), a nawet szkielet steroidowy [100], prowadzi do powstania hybryd o silnym działaniu przeciwnowotworowym. Związki te skutecznie oddziałują (prawdopodobnie poprzez inhibicję polimeryzacji tubuliny lub indukcję apoptozy komórek) na różne linie komórkowe, w tym na nowotwory płuc (A549), szyjki macicy (HeLa), prostaty (DU145) oraz wątroby (HepG2), a także na chłoniaka wielkomórkowego (ALCL) [101].



Rys.34. Struktury aktywnych pochodnych indolu (A) oraz pirymidyny (B) zawierających w strukturze pierścień triazolowy

Dodatkowo pochodne triazolowe (Rys. 35) wykazują obiecujące działanie przeciwgruźlicze, skutecznie oddziałując na *Mycobacterium tuberculosis*, co czyni je potencjalnymi kandydatami na nowe leki w terapii lekoopornej gruźlicy [102,103].

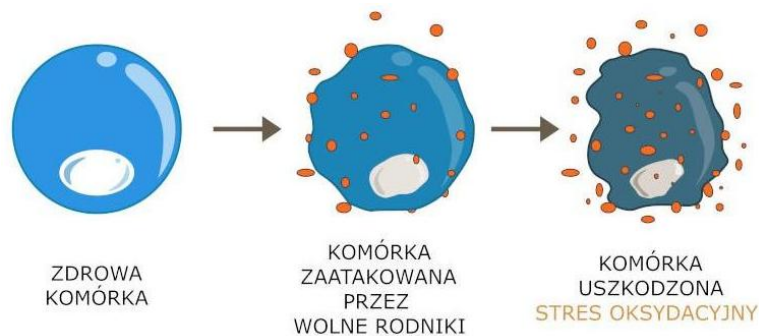


Rys.35. Pochodne triazolowe o aktywności przeciwgruźliczej

Wykazano również ich potencjał w modulowaniu szlaków zapalnych, dzięki czemu związki triazolowe mogą znaleźć zastosowanie jako inhibitory enzymów zapalnych (np. COX-2) [104]. Związki zawierające triazol wykazują także działanie przeciwwirusowe [105] oraz antybakteryjne [106]. Ze względu na swoją syntetyczną dostępność, kompatybilność chemiczną i wysoką aktywność biologiczną, triazole pozostają jednymi z najbardziej uniwersalnych i wszechstronnych elementów strukturalnych w chemii medycznej, szczególnie w projektowaniu związków hybrydowych o ukierunkowanej aktywności biologicznej.

2.8 Stres oksydacyjny

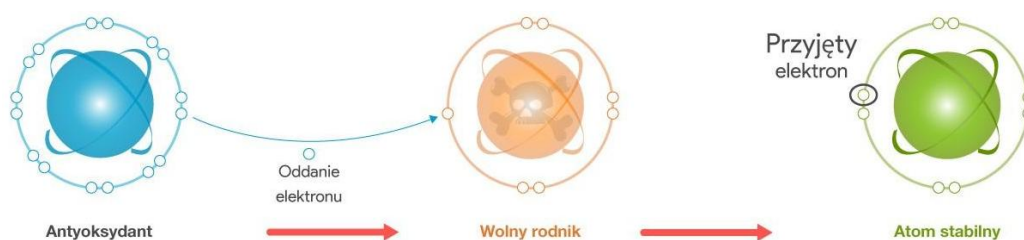
W czasach dynamicznego rozwoju cywilizacyjnego i urbanizacji społeczeństwo prowadzi coraz szybszy i bardziej intensywny tryb życia, co wiąże się z rosnącą ekspozycją na czynniki stresogenne oraz rozwojem tzw. chorób cywilizacyjnych. Przewlekły stres, nieprawidłowa dieta, zanieczyszczenie środowiska oraz postępujące zmiany klimatu prowadzą do zaburzeń funkcji fizjologicznych organizmu. Wszechobecny smog, obecność metali ciężkich, pestycydów oraz zmiany temperatury i wilgotności negatywnie wpływają nie tylko na układ odpornościowy człowieka, ale także na jego zdolność do neutralizacji reaktywnych form tlenu (ROS). Zsumowanie powyższych czynników skutkuje obniżoną odpornością na infekcje oraz zaburzeniem równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, co sprzyja rozwojowi przewlekłego stanu zapalnego i może prowadzić do poważnych konsekwencji zdrowotnych, w tym chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera [107,108]. Zaburzenie równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu a zdolnością organizmu do ich neutralizowania nazywane jest stresem oksydacyjnym [109] (Rys. 36).



Rys.36. Schematyczne przedstawienie degeneracji zdrowej komórki pod wpływem wolnych rodników

Źródło obrazu: <https://www.poczuciepiekna.pl/wszystkie-aktualnosci/353-co-to-jest-stres-oksydacyjny>

Efektem stresu oksydacyjnego może być peroksydacja lipidów, prowadząca do utraty integralności błon komórkowych, co skutkuje upośledzeniem funkcjonowania komórek. Innymi skutkami działania wolnych rodników są uszkodzenia białek oraz kwasów nukleinowych [110]. Do reaktywnych form tlenu należą m.in. rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), anion ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$), rodnik alkoksylowy ($\text{RO}\cdot$), nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik nadtlenkowy ($\text{ROO}\cdot$) – powstają one jako produkty uboczne procesów metabolicznych zachodzących w mitochondriach, a także pod wpływem czynników zewnętrznych, takich jak promieniowanie UV, zanieczyszczenia środowiskowe, stres, palenie tytoniu czy infekcje wirusowe i bakteryjne [111]. Stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu chorób cywilizacyjnych i przewlekłych, takich jak miażdżyca, cukrzyca, choroby neurodegeneracyjne, nowotwory, choroby autoimmunologiczne, a także procesy starzenia się [112].

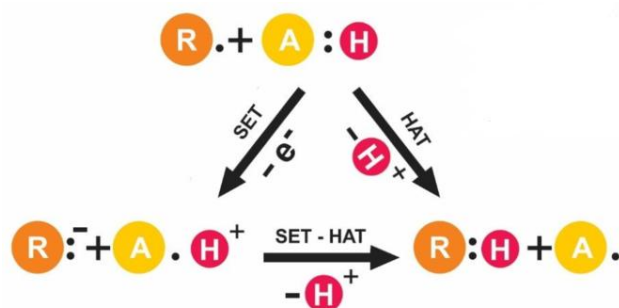


Rys.37. Schemat działania antyoksydantów

Źródło obrazu: <https://www.nutergia.com/pl/pl/zrozumiec-mikroodzywianie/jaka-jest-rola-antyoksydantow>

Związki neutralizujące reaktywne formy tlenu, w tym wolne rodniki, nazywane są antyoksydantami (Rys. 37). Wyróżnia się antyoksydanty wielkocząsteczkowe, takie jak enzymy, np. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) czy peroksydaza glutationowa (GPx), oraz małocząsteczkowe: witaminę C, witaminę E, glutation, melatoninę, kofeinę czy

polifenole. Antyoksydanty małowczątkowe można podzielić również na endogenne (syntetyzowane przez organizm) oraz egzogenne (dostarczane do organizmu z zewnątrz). Związki antyoksydacyjne mogą neutralizować wolne rodniki według kilku poznanych mechanizmów – HAT, SET (Rys. 38), RAF czy chelatowanie metali przejściowych odpowiedzialnych za inicjację reakcji rodnikowych [57, 113].



Rys.38. Mechanizm działania antyoksydacyjnego SET i HAT, gdzie R – rodnik A:H – antyoksydant

Źródło obrazu:

https://www.researchgate.net/publication/380911378_Methods_for_determining_in_vitro_antioxidant_capacity_Metodos_para_determinacao_de_atividade_antioxidante_in_vitro_Henriqueta_Talita_Guimaraes_Barboza_Izabela_Miranda_de_Castr

o

W patogenezie stresu oksydacyjnego istotną rolę odgrywają nie tylko czynniki środowiskowe, ale również patogeny, takie jak wirusy, bakterie czy komórki nowotworowe, które same generują reaktywne formy tlenu w procesie infekcji lub transformacji nowotworowej. Jednocześnie długotrwałe zaburzenie równowagi oksydacyjnej prowadzi do osłabienia układu immunologicznego, co zwiększa podatność organizmu na działanie wspomnianych patogenów i pogłębia błędne koło uszkodzeń oksydacyjnych.

2.9 Patogeny środowiskowe

W środowisku naturalnym organizmy roślinne i zwierzęce nieustannie stają w obliczu licznych zagrożeń środowiskowych. Jednymi z najbardziej powszechnych, a jednocześnie najtrudniejszych do wyeliminowania, są patogeny – bakterie, wirusy oraz grzyby mikroskopowe, które w sposób ciągły oddziałują na otaczające je organizmy. W warunkach naturalnych i rolniczych grzyby powodują poważne straty gospodarcze, prowadząc do masowych infekcji upraw, degradacji gleby, pogorszenia jakości plonów, a w skrajnych przypadkach do ich całkowitego zniszczenia. W środowisku człowieka te patogeny niejednokrotnie odpowiadają za choroby skóry, układu oddechowego, a także zakażenia ogólnoustrojowe, szczególnie niebezpieczne dla osób z osłabioną odpornością. Zagrożenia te

nabierają szczególnego znaczenia w dobie rosnącej liczby ludności na świecie oraz postępujących zmian klimatycznych, które sprzyjają rozprzestrzenianiu się mikroorganizmów chorobotwórczych. Zmiany te prowadzą do degradacji środowiska naturalnego i zachwiania równowagi ekosystemów, czyniąc organizmy żywe jeszcze bardziej podatnymi na ataki patogenów. Ponadto rosnące zapotrzebowanie na żywność wywiera presję na poszukiwanie coraz skuteczniejszych metod ochrony roślin i zwierząt przed chorobami.

Jednymi z patogenów środowiskowych są gatunki mikroskopowych grzybów: *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* i *Fusarium spp.*; każdy z nich powoduje choroby roślin uprawnych i jest szkodliwy dla człowieka.

Alternaria alternata to szeroko rozpowszechniony grzyb, który występuje w glebie, powietrzu oraz na resztkach roślinnych. Jest oportunistycznym patogenem roślin i ludzi, znanym przede wszystkim z powodowania plamistości liści, zgorzeli łodyg oraz gnicia owoców w licznych gatunkach uprawnych (Rys. 39). Grzyb produkuje różnorodne mykotoksyny, w tym alternariol i tenuazyne, które mają właściwości cytotoksyczne i mogą zagrażać zdrowiu ludzi i zwierząt. *A. alternata* ma zdolność do rozwoju w szerokim zakresie temperatur i wilgotności, co czyni go trudnym do zwalczania w warunkach naturalnych. Ze względu na swoje właściwości alergenne zarodniki tego grzyba są również istotnym czynnikiem ryzyka dla osób cierpiących na choroby układu oddechowego, takie jak astma czy alergiczny nieżyt nosa [114-116].



Rys.39. Zgorzel (z lewej) i plamistość liści (z prawej) – choroby wywołane patogenem z gatunku *Alternaria*

Źródła obrazów: https://agroAtlas.ru/en/content/diseases/Fabaceae/Fabaceae_Alternaria_alternata/index.html
[https://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/crop_prot_crop%20diseases veg potato_2.html](https://agritech.tnau.ac.in/crop_protection/crop_prot_crop%20diseases_veg_potato_2.html)

Botrytis cinerea, często nazywany szarą pleśnią (Rys. 40), jest jednym z najważniejszych grzybów patogennych atakujących wiele gatunków roślin uprawnych, w tym winorośl, truskawki, pomidory i sałatę. Uważany jest za typowego nekrotrofa, którego głównym mechanizmem infekcji jest wnikanie przez rany lub naturalne otwory roślin, po czym następuje

szybki rozrost grzybni i produkcja enzymów prowadzących do degradacji i śmierci tkanek gospodarza. *Botrytis cinerea* jest szczególnie destrukcyjny dla dojrzałych lub starzejących się tkanek roślin dwuliściennych. Zdarza się, że patogen przez długi czas pozostaje w stanie uśpienia, a infekcja rozwija się dopiero wtedy, gdy fizjologia gospodarza ulega zmianie i pojawiają się sprzyjające warunki środowiskowe.



Rys.40. Szara pleśń – choroba wywołwana przez *Botrytis cinerea*, odpowiedzialna za masowe psucie upraw, w tym truskawek i malin

Źródło obrazu: <https://m.espacepurlavie.ca/en/green-pages/diseases-pests-and-undesirable-plants/botrytis-blight-or-grey-mold>

Grzyb ten cechuje się dużą zdolnością adaptacyjną, a jego zarodniki mogą przetrwać w glebie, w resztkach roślinnych oraz na powierzchni liści. Oprócz strat gospodarczych, jakie powoduje, *B. cinerea* stanowi także poważny problem w przechowywaniu i transporcie produktów rolnych [117-119].

Grzyby z rodzaju *Fusarium* stanowią liczną i zróżnicowaną grupę patogenów, które infekują zarówno rośliny jak i ludzi. Gatunki takie jak *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* czy *Fusarium solani* są odpowiedzialne za wiele chorób roślinnych, w tym fuzariozy zbóż (Rys. 41), zgorzele korzeni oraz wędnięcie naczyniowe. Patogeny te wytwarzają szereg mykotoksyn, w tym fumonizyny, trikoteceny i zearalenon, które wykazują działanie cytotoksyczne, neurotoksyczne i kancerogenne. Z uwagi na zdolność do przetrwania w glebie oraz adaptacji do różnych warunków środowiskowych, rodzaj *Fusarium* jest trudny do całkowitego wyeliminowania z agrosystemów. Co więcej, niektóre szczepy wykazują oporność na środki grzybobójcze, co jeszcze bardziej komplikuje walkę z infekcjami. Poza rolnictwem gatunki te mogą powodować infekcje oportunistyczne u ludzi, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością [120-122].



*Rys. 41. Fuzarioza – choroba upraw roślinnych wywoływana przez patogeny z gatunku *Fusarium**

Źródło obrazu: <https://cals.cornell.edu/field-crops/soybeans/diseases-of-soybeans/fusarium-wilt>

W tym kontekście szczególnego znaczenia nabierają badania nad syntezą skutecznych środków przeciwdrobnoustrojowych – zwłaszcza takich, które będą jednocześnie bezpieczne dla środowiska i zdrowia człowieka.

3. Dyskusja wyników

3.1 Koniugaty kofeiny z pochodnymi uracylu i tiouracylu (I grupa pochodnych)

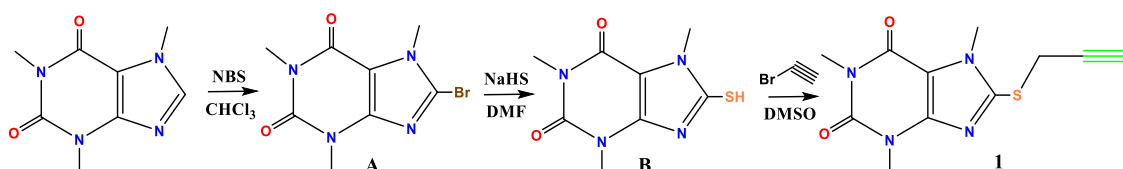
3.1.1 Synteza, analiza spektroskopowa

Uracyl, z uwagi na swoje naturalne występowanie, prostą budowę chemiczną i łatwość modyfikacji, jest często wykorzystywany jako związek wyjściowy w projektowaniu i syntezie nowych związków bioaktywnych. Pochodne uracylu stanowią rozbudowaną grupę związków o udokumentowanej aktywności biologicznej. Modyfikacje strukturalne, szczególnie tworzenie związków hybrydowych pochodnych uracylu i kofeiny, umożliwiają syntezę związków o wielokierunkowej aktywności biologicznej. Dlatego też pierwszą grupę otrzymanych przeze mnie związków stanowiły pochodne zawierające cząsteczkę kofeiny oraz ugrupowanie uracylowe lub tiouracylowe, połączone pierścieniem triazolowym. Głównym celem przeprowadzonych przeze mnie syntez było otrzymanie pochodnych wykazujących zarówno właściwości antyoksydacyjne, jak i przeciwgrzybiczne oraz przeciwbakteryjne, a także określenie zależności między rodzajem i położeniem podstawników w pierścieniu pirymidynowym a właściwościami biologicznymi otrzymanych cząsteczek. Ponadto w literaturze naukowej jest niewiele informacji na temat wykorzystania kofeiny w syntezach chemii klik [123]. Uznałem, że tworzenie nowych połączeń uracylowych 1,2,3-triazolowych z kofeiną i będzie interesującym kierunkiem badań.

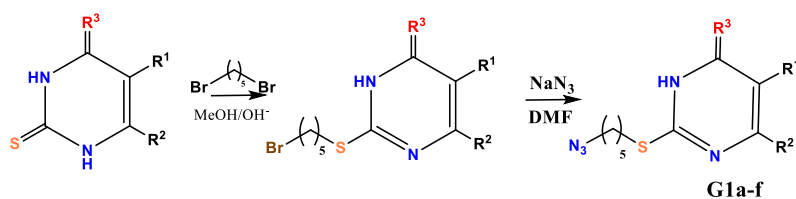
Korzystając z metody chemii click, otrzymałem siedem nowych koniugatów (związki **2–8**), różniących się zarówno położeniem, jak i rodzajem podstawnika w pierścieniu pirymidynowym (Tabela 1). Substratami w moich reakcjach były: pochodna propargilowa kofeiny, którą otrzymałem w trzech etapach (Schemat 4), oraz pochodne azydkowe 2-tiouracylu (Schemat 5) i 5-fluorouracylu (Schemat 6).

8-Bromokofeina (**A**) i 8-tiokofeina (**B**) to związki znane z literatury [14,124]. W wyniku reakcji 8-tiokofeiny z bromkiem propargilu otrzymałem pochodną **1**. Pochodne azydkowe (**G1a–g** – kolejność numeracji azydków pokrywa się z kolejnością otrzymanych pochodnych triazolowych) uzyskałem w wyniku reakcji dwuetapowej. W pierwszym etapie mieszałem odpowiednie pochodne uracylu z dibromopentanem. Otrzymany produkt poddałem reakcji z

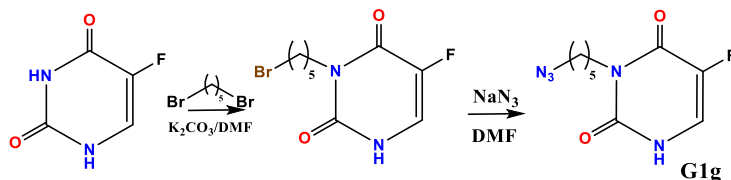
azydkiem sodu. Częsteczki połączyłem łącznikiem alkilowym o pięciu atomach węgla. Taką długość łańcucha uznałem za optymalną ze względu na efekty steryczne, zdolność wiązania w miejscach aktywnych enzymów oraz rozpuszczalność w wodzie [125]. W przypadku 2-tiouracylu grupa alkiloazydkowa została wprowadzona na atom siarki, natomiast w przypadku 5-fluorouracylu – na atom azotu. Synteza koniugatów **2–8** została przedstawiona na schemacie 7.



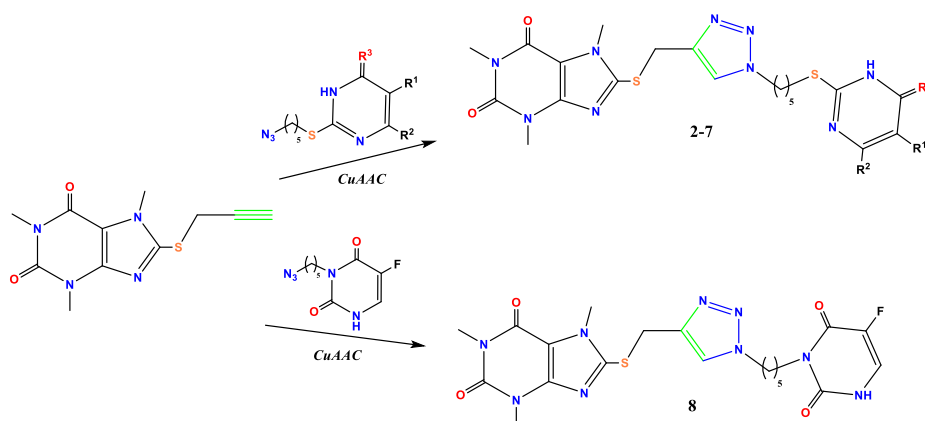
Schemat 4. Synteza 8-(prop-2-yn-1-ylsulfanylo)kofeiny (**1**)



Schemat 5. Synteza pochodnych azydkowych tiouracyli (**G1a-f**)



Schemat 6. Synteza pochodnej azydkowej 5-fluorouracylu (**G1g**)



Schemat 7. Synteza koniugatów kofeiny i pochodnych 2-tiouracylu (lub 5-fluorouracylu) z wykorzystaniem metody chemii click (związki **2-8**)

Tabela 1. Rodzaje podstawników użytych do syntezy pochodnych pirymidynowych

Nr związku	R ¹	R ²	R ³
2	H	H	O
3	H	Ph	O
4	H	Me	O
5	Pr	H	O
6	H	Pr	O
7	H	H	NH₂
8	F	H	O

Otrzymane związki zostały scharakteryzowane spektroskopowo. W widmach ¹H NMR wszystkich związków można zaobserwować sygnały protonów łańcucha alkilowego w zakresie 1,21–4,32 ppm. W zależności od rodzaju podstawnika w pierścieniu pirymidynowym sygnał protonu z pierścienia był obserwowany w zakresie 5,70–6,60 ppm, natomiast sygnał protonu grupy aminowej uracylu w zakresie 12,66–12,71 ppm. Sygnały protonu pierścienia triazolowego można zaobserwować w zakresie 7,93–8,14 ppm. Charakterystyczne sygnały w zakresie 3,20–3,70 ppm pochodzą od protonów grup metylowych kofeiny. W widmach ¹³C NMR wszystkich związków widoczne są sygnały w zakresie 150,6–155,6 ppm, świadczące o obecności grup karbonylowych kofeiny i uracylu; ponadto sygnały w zakresie 163,0–169,6 ppm pochodzą od atomu węgla grupy tionylowej w ugrupowaniu 2-tiouracylu. Sygnały od atomów węgla pierścienia triazolowego obserwuje się w zakresie 123,5–123,7 ppm oraz 142,4–142,5 ppm.

Na widmach FT-IR wszystkich związków widoczne jest charakterystyczne pasmo absorpcji przy 3050 cm⁻¹, pochodzące z wiązania =C-H w pierścieniu triazolowym. W zakresie 1650–1705 cm⁻¹ można zauważyć charakterystyczne pasma absorpcji wiązań C=O grup karbonylowych.

W widmach ESI-MS wszystkich otrzymanych koniugatów obecne są sygnały pochodzące od jonu (M+H)⁺; dla większości związków ich intensywność wynosiła 100%. Wyjątkiem są pochodna **3** (intensywność 10%) oraz związki **5** i **7** (intensywność odpowiednio 40% i 60%).

Widma ¹H i ¹³C NMR, ESI-MS oraz FT-IR wybranych pochodnych kofeiny znajdują się w Części Eksperymentalnej (Rozdział 4).

3.1.2 Ocena właściwości fizykochemicznych związków I grupy

Parametry fizykochemiczne związków, ich wchłanianie przez układ pokarmowy (GI Abs), zdolność do przekraczania bariery krew-mózg (BBB Perm) oraz rozpuszczalność w wodzie (logS) przedstawiłem w tabelach 2 i 3.

Tabela 2. Przewidywane właściwości fizykochemiczne syntetyzowanych związków obliczone za pomocą platformy SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 6 maja 2024)

Związek	MW [g/ml]	logP	HBD	HBA	TPSA [Å ²]	GI Abs	BBB Perm	Reguła Lipińskiego
2	503.6	1.47	1	7	188.88	Niska	Nie	Nie
3	579.7	2.67	1	7	188.88	Niska	Nie	Nie
4	517.6	1.81	1	7	188.88	Niska	Nie	Nie
5	545.7	2.45	1	7	188.88	Niska	Nie	Nie
6	545.7	2.51	1	7	188.88	Niska	Nie	Nie
7	502.7	0.90	2	7	193.54	Niska	Nie	Nie
8	505.5	1.06	1	8	172.69	Niska	Nie	Nie

MW - masa cząsteczkowa; logP – lipofilowość; HBA – liczba akceptorów wiązań wodorowych; HBD – liczba donorów wiązań wodorowych; TPSA – topologiczna powierzchnia polarna; GI Abs – wchłanianie w przewodzie pokarmowym BBB Perm – przenikanie przez barierę krew-mózg

Tabela 3. Przewidywana rozpuszczalność w wodzie nowych hybryd kofeinowo-uracylowych obliczona za pomocą platformy SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 6 maja 2024)

Związek	logS	Rozpuszczalność [mg/ml]	Rozpuszczalność
2	-4.13	1.2*10 ⁻¹	Umiarkowana
3	-6.01	4.4*10 ⁻³	Słaba
4	-4.49	6.04*10 ⁻²	Umiarkowana
5	-5.19	1.85*10 ⁻²	Słaba
6	-5.30	1.40*10 ⁻²	Słaba
7	-3.35	3.75*10 ⁻¹	Dobra
8	-3.40	3.80*10 ⁻¹	Umiarkowana

Otrzymane koniugaty charakteryzują się stosunkowo wysoką masą cząsteczkową, przekraczającą 500 g/mol. Ponadto posiadają dużą topologiczną powierzchnię polarną (TPSA), której wartości wynoszą od 172,69 Å² (dla związku **8**) do 193,54 Å² (dla związku **7**). Ze względu na wspomniane parametry strukturalne żaden ze związków z tej grupy nie spełnia reguły Lipińskiego, co sugeruje niską biodostępność po podaniu doustnym (GI Abs). Otrzymane pochodne wykazują również brak zdolności przenikania przez barierę krew-mózg (BBB Perm). Cząsteczki te posiadają w swojej strukturze od 7 do 8 akceptorów wiązań wodorowych (HBA) oraz od 1 do 2 donorów atomów wodoru (HBD). Związki wykazują umiarkowaną lipofilowość, przy czym współczynnik podziału (logP) mieści się w przedziale

od 0,9 do 2,67 (najbardziej lipofilowy jest związek **3** posiadający pierścień fenyłowy). Świadczy to o hydrofobowym charakterze cząsteczek. W większości przypadków przewidywana rozpuszczalność w wodzie jest słaba (związki **3, 5, 6**) lub umiarkowana (związki **2, 4, 8**). Jedynym wyjątkiem jest pochodna **7**, która wykazuje dobrą rozpuszczalność w wodzie. Podsumowując, bardzo słaba przewidywana absorpcja z przewodu pokarmowego oraz brak możliwości przekraczania kluczowych barier fizjologicznych prawdopodobnie wykluczają możliwość zastosowania tych pochodnych w postaci doustnych preparatów farmakologicznych.

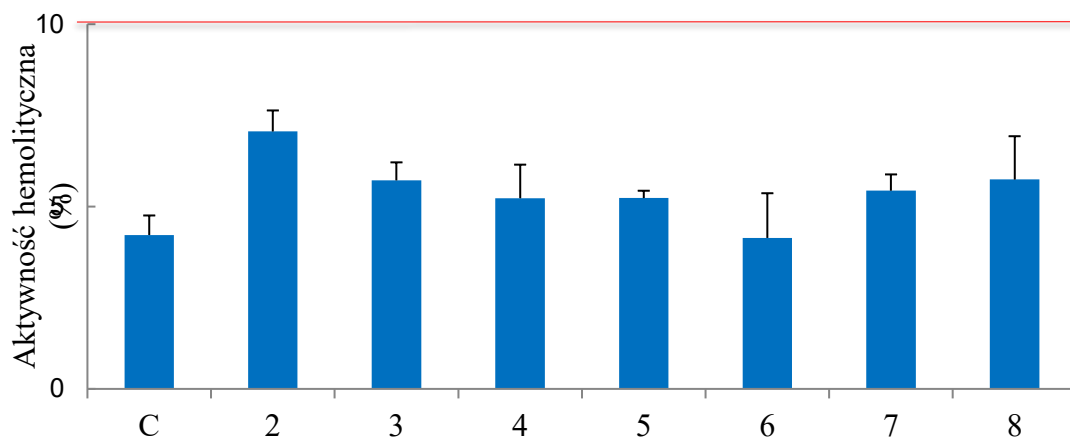
Warto jednak pamiętać, że Reguła Pięciu Lipińskiego służy głównie jako narzędzie wspomagające i nie jest bezwzględnym kryterium, ponieważ wiele zatwierdzonych leków nie spełnia wszystkich jej zasad w pełni [126].

3.1.3 Ocena aktywności biologicznej pochodnych I grupy

Otrzymane pochodne kofeiny i uracylu poddano wielokierunkowej ocenie biologicznej. Sprawdzano ich wpływ na błony komórkowe (hemokompatybilność), zdolności antyoksydacyjne, chelatujące oraz aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Aktywność hemolityczna pochodnych I grupy

Aktywność hemolityczna związków jest istotnym elementem oceny ich aktywności biologicznej, ponieważ mogą one mieć kontakt z układem krwionośnym w organizmie, a jej określenie pozwala ocenić ich wpływ na integralność błony erytrocytów. Hemoliza to proces, w którym błony erytrocytów ulegają uszkodzeniu w wyniku interakcji związków z ich składnikami. Prowadzi to do naruszenia integralności błony i uwolnienia hemoglobiny na zewnątrz komórki. Związki o aktywności hemolitycznej na poziomie mniejszym niż 10% mogą zostać uznane za hemokompatybilne (niewywołujące znacznej hemolizy) [127,128]. Na rysunku 42 przedstawiłem wartości aktywności hemolitycznej nowych związków. Kontrolą w przeprowadzonych badaniach był bufor fosforanowy (PBS), imitujący naturalne środowisko czerwonych krwinek w organizmie.



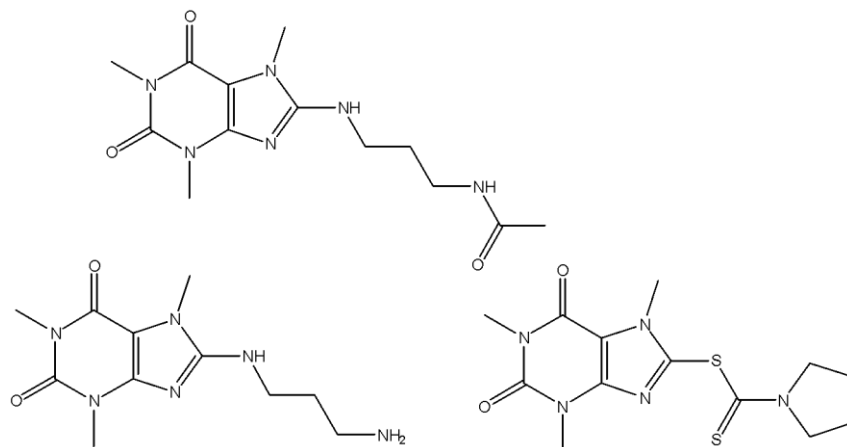
Rys.42. Wykres aktywności hemolitycznej związków 2–8 w stężeniu 0,01 mg/mL. (60min, 37°C). Przedstawione wyniki są wartościami średnimi $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$). C – kontrola, RBC (red blood cells – czerwone krwinki) w buforze fosforanowym PBS. Czerwona linia na poziomie 10% wskazuje granicę hemokompatybilności związków

Badania przeprowadzone w stężeniu 0,01 mg/mL wykazały, że wszystkie zsyntetyzowane pochodne z tej grupy są hemokompatybilne. Najwyższą aktywność hemolityczną ($7,06\% \pm 0,58$) wykazał związek **2**, zawierający w swojej strukturze niepodstawiony pierścień 2-tiouracylowy. Wprowadzenie podstawników do pierścienia 2-tiouracylu zmniejszało efekt hemolityczny, przy czym związek **6**, zawierający podstawnik n-propylowy w pozycji C-6 pierścienia pirymidynowego, wykazał najniższą aktywność hemolityczną ($4,14\% \pm 1,23$). Przedstawione wyniki badań wskazują, że modyfikacja strukturalna w obrębie pierścienia pirymidynowego wpływa na zdolność badanych związków do zaburzania struktury błony erytrocytów, z kolei sam rodzaj heteroatomu w pozycji 2 pierścienia (dla związków **2–7** – atom siarki, dla związku **8** – atom tlenu) nie ma decydującego wpływu na ten proces.

Ocena właściwości cytoprotekcyjnych związków I grupy względem erytrocytów ekspozowanych na działanie AAPH

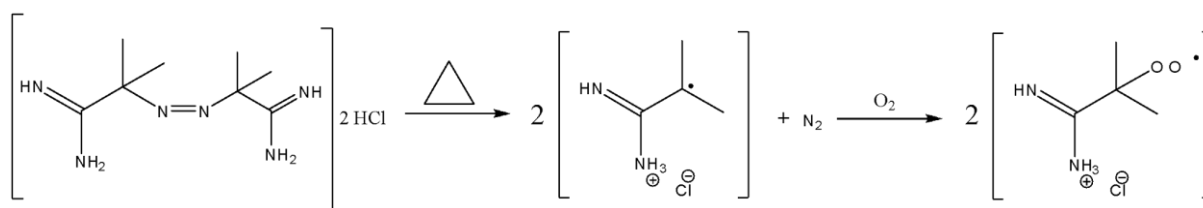
W komórkach zachodzi stała regulacja poziomu wolnych rodników i antyoksydantów, mająca na celu utrzymanie równowagi oksydacyjnej. Zaburzenie tej równowagi, spowodowane czynnikami zewnętrznymi i wewnętrznymi, prowadzi do rozwoju stresu oksydacyjnego oraz uszkodzenia struktury komórki. W związku z tym istotne jest poszukiwanie nowych związków o potencjale antyoksydacyjnym oraz ocena ich właściwości biologicznych. W tym celu wykorzystywane są testy *in vitro* stanowiące proste i skuteczne narzędzie do wstępnej oceny aktywności biologicznej związków.

W poprzednich latach otrzymano szereg pochodnych kofeiny [60,31], które skutecznie neutralizowały rodniki generowane przez AAPH (dihydrochlorek 2,2'-azobis(2-amidynopropanu)). Przykładem mogą być siarkowe oraz diaminowe pochodne kofeiny (Rys. 43). Dlatego też postanowiłem sprawdzić, czy otrzymane przeze mnie pochodne wykazą również aktywność cytoprotekcyjną.



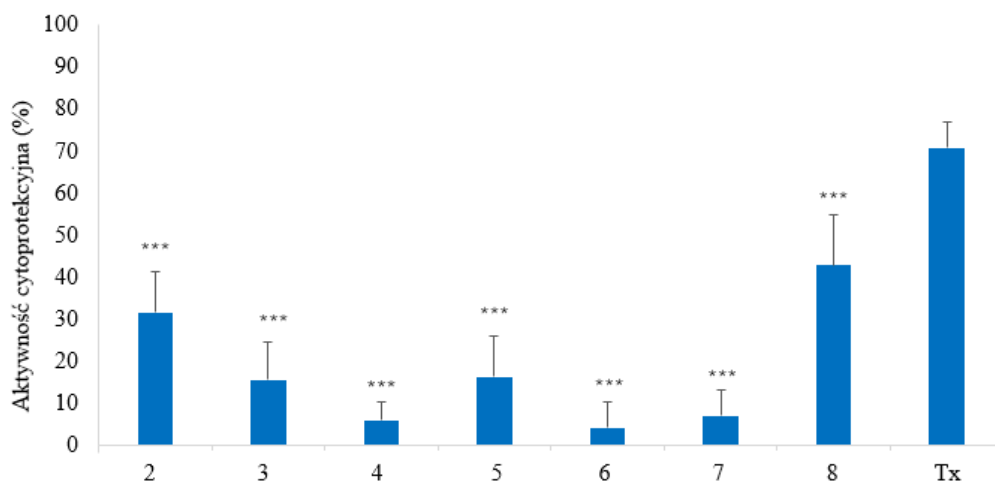
Rys.43. Przykłady siarkowych oraz diaminowych pochodnych neutralizujących rodniki generowane przez AAPH

AAPH powszechnie wykorzystywany jest w badaniach biologicznych jako induktor stresu oksydacyjnego w komórkach, m.in. w erytrocytach. Pod wpływem temperatury rozkłada się, wytwarzając przy tym rodniki nadtlenkowe (Rys. 44). Powstałe rodniki mogą powodować peroksydację lipidów i białek błonowych, niszczyć strukturę błony erytrocytów i w efekcie prowadzić do hemolizy.



Rys.44. Rozpad AAPH na rodniki i generowanie rodników nadtlenkowych

Wyniki dotyczące aktywności cytoprotekcyjnej otrzymanych pochodnych pierwszej grupy w stężeniu 0,01 mg/mL przedstawiłem na rysunku 45. Jako wzorzec zastosowano standardowy antyoksydant Trolox (Tx) – kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochroman-2-karboksylowy, pochodną witaminy E.



Rys.45. Wykres aktywności cytoprotekcyjnej pochodnych 2–8 w stężeniu 0,01 mg/mL w warunkach stresu oksydacyjnego. Wyniki przedstawione jako średnie wartości $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$) w porównaniu z aktywnością wzorca Troloxu (Tx) (***) $p < 0.001$

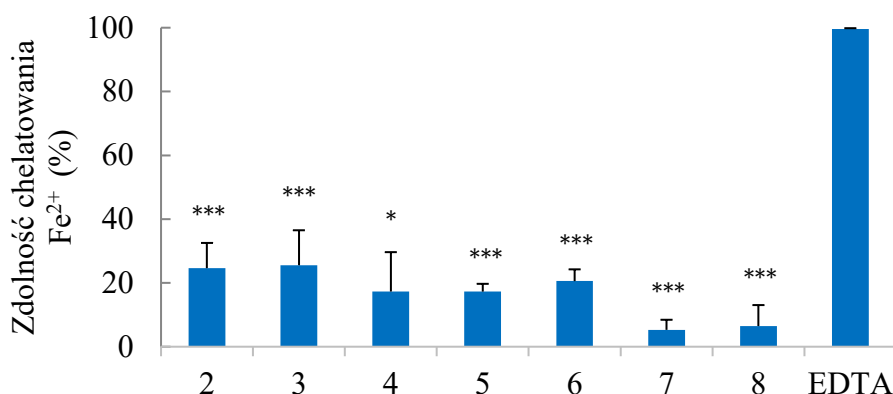
Analizując wyniki przedstawione na rysunku 45, można zauważyć, że nowo otrzymane pochodne tej grupy nie wykazały wysokiej aktywności cytoprotekcyjnej. Zaobserwowano jednak wyraźne zależności między ich budową a zdolnością do ochrony komórek. Pośród otrzymanych pochodnych najwyższą aktywność cytoprotekcyjną wykazał związek **8** ($42,88\% \pm 11,77$), zawierający w swojej strukturze pierścień uracylu podstawiony atomem fluoru w pozycji C-5. Przypuszcza się, że takie usytuowanie podstawnika ułatwia efektywniejszą stabilizację rodników podczas przenoszenia protonów ze względu na jego bliskie sąsiedztwo z grupą karbonylową. Stosunkowo dobrą aktywnością wykazał się również związek **2** ($31,61\% \pm 9,81$), zawierający niezmodyfikowany pierścień 2-tiouracylu.

Najniższą aktywność cytoprotekcyjną wykazały pochodne z alkilowymi podstawnikami w pozycji C-6. Są to: pochodna **4** z grupą metylową ($6,03\% \pm 4,82$) oraz związek **6** z grupą propylową ($4,26\% \pm 5,97$). Wyniki te uwiadamiają specyficzną regułę strukturalną. Grupy elektronodonorowe (takie jak łańcuchy alkilowe) wpływają niekorzystnie i drastycznie obniżają aktywność cytoprotekcyjną związków. Z kolei podstawniki elektronoakceptorowe zwiększają ich zdolność do skutecznej neutralizacji wolnych rodników [129].

Ze względu na charakterystyczną strukturę tych cząsteczek, obejmującą pierścień triazolowy, grupę pirymidynową oraz układ purynowy, sugeruje się, że te związki uczestniczą w neutralizacji rodników poprzez dwa główne mechanizmy: RAF, polegający na tworzeniu stabilnych adduktów rodnikowych [60], oraz SET, opierający się na transferze elektronów w obrębie układu aromatycznego [130].

Zdolność chelatowania Fe^{2+} pochodnych grupy I

Zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} jest ważnym czynnikiem w ocenie potencjału antyoksydacyjnego związków. Wysoka aktywność chelatowania spowalnia przebieg reakcji Habera-Weissa oraz reakcji Fentona, w której dochodzi do utleniania jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} oraz do utworzenia rodników hydroksylowych, które, reagując z lipidami, prowadzą do ich peroksydacji. Poniżej przedstawiłem wykres aktywności chelatującej nowych pochodnych kofeiny (Rys. 46).



Rys.46. Wykres aktywności chelatującej jonów żelaza(II) przez pochodne 2–8 oraz standard EDTA w stężeniu 0,01 mg/mL. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

Aktywność chelatująca analizowanych związków wykazywała zakres od niskiego do umiarkowanego poziomu, wynosząc od 5,28% do 25,55%. Wprowadzenie pierścienia triazolowego do struktury cząsteczki zwykle zwiększa jej zdolność do chelatowania jonów metali. W przypadku pochodnych 2–8 wprowadzenie pierścienia triazolowego jedynie w minimalnym stopniu poprawiło zdolności chelatujące w porównaniu z samą cząsteczką kofeiny ($11,25\% \pm 2,84$) [31]. Najwyższą aktywność ($25,55\% \pm 10,94$) wykazał związek 3, zawierający w swojej strukturze pierścień fenyłowy w pozycji C-6 pierścienia pirymidynowego, natomiast najniższą aktywność wykazał związek 7 ($5,28\% \pm 3,16$). Niską wartość aktywności chelatującej dla pochodnej 7 można przypisać zastąpieniu atomu tlenu atomem azotu w pozycji C-4 pierścienia pirymidynowego, co skutkuje zmniejszeniem liczby dostępnych wolnych par elektronowych uczestniczących w koordynacji jonów Fe^{2+} . Słabszy wynik związku 8 (o najwyższej aktywności cytoprotekcyjnej) tłumaczy obecność atomu halogenku w jego strukturze, która może sprzyjać tworzeniu oddziaływań międzycząsteczkowych, takich jak wiązania wodorowe, co ogranicza dostępność cząsteczki i tym samym zmniejsza jej zdolność do efektywnego chelatowania metali.

Aktywność przeciwgrzybicza i przeciwbakteryjna pochodnych I grupy

Przeprowadzono ocenę skuteczności I grupy pochodnych wobec patogenów środowiskowych. Uzyskane koniugaty nie wykazały aktywności bakteriobójczej. Zaobserwowano jednak istotny potencjał przeciwgrzybiczy. Aktywność przeciwgrzybicza została określona *in vitro* metodą studzienkową. Zdolność do hamowania wzrostu patogenów grzybiczych była zróżnicowana i zależała od konkretnego gatunku grzyba oraz od budowy związku (Tabela 4).

Tabela 4. Aktywność grzybobójcza związków 2–8. Strefy hamowania wzrostu: <9 mm (związki słabo aktywne); 10–15 mm (związki średnio aktywne); >15 mm (związki aktywne)

Związek	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Trichoderma atroviridae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
2	16	0	8	7	6,5	5,5
3	1	2,5	0	0	7	12
4	0	0	9	6	10	0
5	1	4	0	0	7	13,4
6	1,2	6,4	4,5	0	8	17
7	16	0	8,5	6,5	4	5,5
8	10,5	0	4	8	8	0

Związki 2 i 7 wykazały hamujące działanie wobec *Fusarium culmorum* – patogenu odpowiedzialnego za rozprzestrzenianie się fuzariozy w plonach rolnych, osiągając strefę zahamowania wzrostu wynoszącą 16 mm, co klasyfikuje je jako związki o wysokiej aktywności. Pochodna 6 okazała się najskuteczniejszym środkiem przeciwko grzybowi *Botrytis cinerea*, powodującemu rozwój szarej pleśni na owocach takich jak truskawki czy maliny, ze strefą zahamowania wynoszącą 17 mm. Dodatkowo, związki 3 i 5 wykazały wobec niego umiarkowaną aktywność (strefy zahamowania wynosiły odpowiednio 12 mm i 13,4 mm). Pozostałe badane szczepy grzybów (np. *Fusarium graminearum*, gatunki *Trichoderma* oraz *Alternaria alternata*) okazały się odporne na celowane działanie testowanych pochodnych kofeiny.

Przedstawione wyniki zostały opublikowane w pracy: M. Szlauzys, K. Ostrowski, D. Nowak, W. Prukała, J. Starzyk, B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska, *Hybrid Uracil Derivatives with Caffeine and Gramine Obtained via Click Chemistry as Potential Antioxidants and Inhibitors of Plant Pathogens*, *Molecules* 30 (2025) 2714. <https://doi.org/10.3390/molecules30132714>

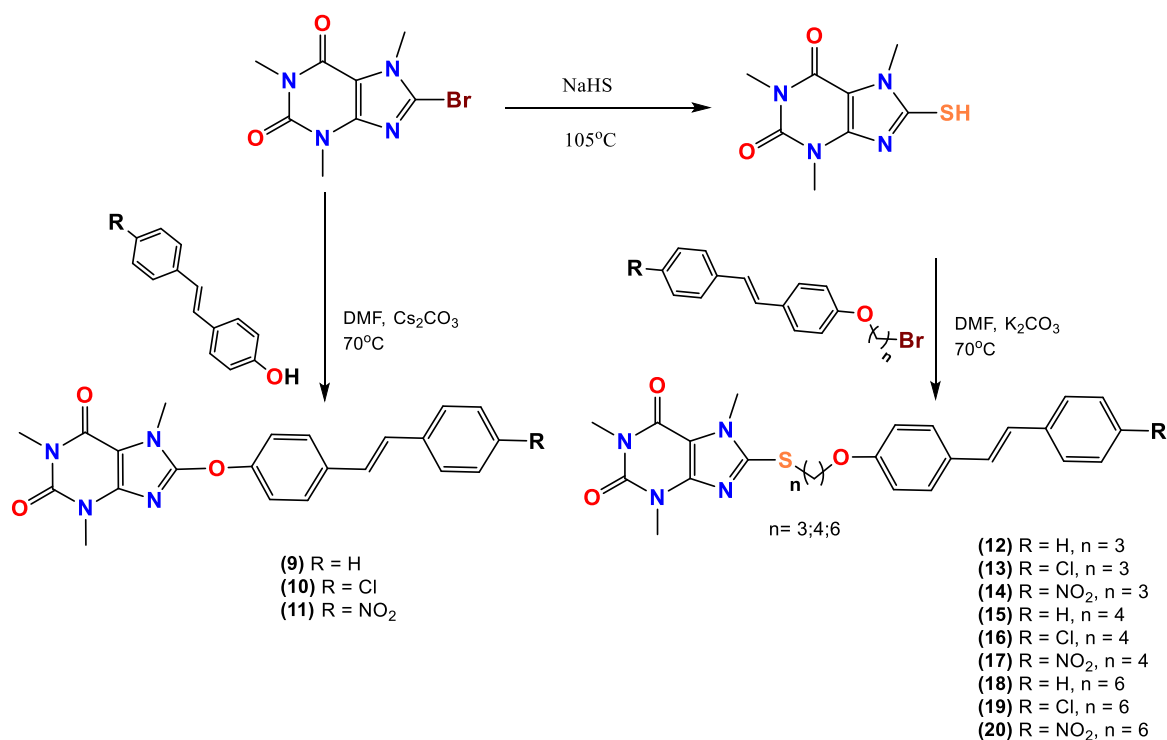
3.2 Koniugaty kofeiny z pochodnymi stilbenów (II grupa pochodnych)

3.2.1 Synteza, analiza spektroskopowa

Kolejną grupą pochodnych, które otrzymałem, są związki hybrydowe kofeiny i stilbenu. Zastosowanie strategii hybrydyzacji molekularnej, polegającej na połączeniu w jednej cząsteczce szkieletu kofeiny oraz ugrupowania stilbenowego, otwiera drogę do otrzymania związków o znacznie zwiększonym potencjale biologicznym. Przykładem literaturowym jest związek CSC, który działa jako antagonist receptorów A2A i inhibitor MAO-B, wykazując duży potencjał w terapii choroby Parkinsona [131]. Badania pokazują, że połączenie cząsteczki kofeiny ze zmodyfikowanymi grupami fenylowymi pozwala otrzymać związki o właściwościach inhibicyjnych wobec enzymów [132,133]

Głównym celem mojej pracy była synteza oraz kompleksowa ocena aktywności biologicznej nowej grupy koniugatów kofeinowo-stilbenowych. Pod względem strukturalnym nowe koniugaty można podzielić na dwie grupy. Pierwsza grupa obejmuje związki, w których ugrupowanie stilbenowe jest połączone z cząsteczką kofeiny poprzez atom tlenu. Druga grupa to hybrydy z dłuższym (mieszanym) łącznikiem siarkowo-tlenowym, zawierającym łańcuch węglowodorowy o zróżnicowanej długości. Zsyntezowane związki scharakteryzowałem spektroskopowo. Ponadto oceniono ich aktywność biologiczną, obejmującą zdolność hamowania enzymów, takich jak acetylocholinoesteraza (AChE) i α -glukozydaza, a także ich cytotoksyczne właściwości wobec linii komórkowych nowotworowych.

Syntezę nowych koniugatów kofeiny i stilbenu przeprowadziłem z wykorzystaniem dwóch odrębnych procedur, których dobór zależał od rodzaju łącznika wprowadzonego w pozycję C-8 szkieletu kofeiny. Związki wyjściowe (pochodne stilbenolu) użyte w reakcjach otrzymano zgodnie z wcześniej opublikowanymi metodami [134]. Związki **9–11**, hybrydy z łącznikiem tlenowym, otrzymałem w wyniku reakcji 8-bromokofeiny z odpowiednimi pochodnymi stilbenolu w DMF, z dodatkiem węglanu cezu. Z kolei związki **12–20**, hybrydy z łącznikiem siarkowo-tlenowym i łańcuchem alkilowym, otrzymałem w reakcji 8-tiokofeiny z bromoalkoksylowymi pochodnymi stilbenu w DMF, z dodatkiem węglanu potasu. Obie reakcje prowadziłem w temperaturze 70 °C (Schemat 8). Wśród pochodnych grupy **12–20** można wyodrębnić trzy serie związków o zróżnicowanych długościach łańcucha alkilowego ($n = 3$, $n = 4$, $n = 6$), które dodatkowo różnią się obecnością podstawników w ugrupowaniu stilbenowym (-Cl, -NO₂).



Schemat 8. Synteza związków hybrydowych kofeiny i pochodnych stilbenu

Strukturę nowo zsyntetyzowanych koniugatów jednoznacznie potwierdziłem za pomocą analiz spektroskopowych, w tym spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR i ¹³C NMR), spektroskopii w podczerwieni (FT-IR) oraz spektrometrii mas (EI-MS).

W widmach ¹H NMR wszystkich pochodnych obecne są trzy singlety w zakresie 3,35–4,10 ppm, pochodzące od protonów trzech grup metylowych cząsteczki kofeiny. Sygnały pochodzące od aromatycznych protonów stilbenu obserwuje się w zakresie 7,30–8,25 ppm, natomiast protony podwójnego wiązania w szkielecie stilbenu widoczne są jako singlety w przedziale 6,84–7,29 ppm.

W widmach związków zawierających łącznik węglowodorowy obecne są dodatkowe sygnały pochodzące od protonów alkilowych. Dla hybryd z krótkim łącznikiem (związki **12–14**) obecne są dwa triplety w przedziale 3,25–4,15 ppm oraz multiplet w zakresie 2,24–2,31 ppm. W przypadku pochodnych **15–17**, charakteryzujących się dłuższym łańcuchem alkilowym, dodatkowe sygnały występują w postaci multipletu w zakresie 1,96–2,32 ppm, natomiast dla hybryd o najdłuższym łańcuchu (pochodne **18–20**) obecne są dodatkowe multiplety w zakresie 1,51–1,86 ppm.

W widmach ^{13}C NMR otrzymanych pochodnych widoczne są sygnały pochodzące od grup karbonylowych kofeiny przy 150,6 i 159,7 ppm. Sygnały aromatycznych atomów węgla stilbenu oraz atomów węgla wiązania podwójnego znajdują się w zakresie 114,6–144,3 ppm. Sygnały atomów węgla grup metylowych kofeiny obserwuje się w zakresie 27,8–30,4 ppm, natomiast atomów węgla łączników alkilowych w zakresie 25,5–67,7 ppm.

W widmach FT-IR analizowanych związków obecne są pasma absorpcji przy 1920–1810 cm^{-1} , przypisywane pierścieniom aromatycznym stilbenu, a także pasmo absorpcji przy 3060–3020 cm^{-1} pochodzące od podwójnego wiązania stilbenowego. Pasma drgań rozciągających wiązań C–H ugrupowań alkilowych występują w zakresie 2960–2880 cm^{-1} . Charakterystyczne pasmo drgań rozciągających dla grup karbonylowych (C=O) występuje w zakresie 1700–1650 cm^{-1} .

W widmach masowych (EI-MS) wszystkich pochodnych obecne są sygnały pochodzące od jonów molekularnych o intensywności od 10% do 100%.

Widma ^1H i ^{13}C NMR, EI-MS oraz FT-IR wybranych pochodnych kofeiny II grupy znajdują się w Części Eksperymentalnej (rozdział 4).

3.2.2 Ocena właściwości fizykochemicznych związków II grupy

Parametry ADME oraz właściwości fizykochemiczne hybryd kofeinowo-stilbenowych przedstawiłem w tabeli 5. Zsyntetyzowane związki w większości spełniają regułę Lipińskiego (z wyjątkiem pochodnej **19**), co sugeruje ich potencjalne zastosowanie jako leki doustne. Masy cząsteczkowe (MW) mieszczą się w zakresie od 388 do 549 g/mol, a liczba donorów wiązań wodorowych (HBD) dla wszystkich analizowanych pochodnych wynosi 0. Większość nowych koniugatów charakteryzuje się wysokim przewidywanym wchłanianiem z przewodu pokarmowego. Wyjątkiem są związki **14**, **17** oraz **20**, dla których wchłanianie zostało określone jako niskie. Według parametrów TPSA (topologicznej powierzchni polarnej), wymienione trzy związki przekraczają umowną granicę 140 $\text{\AA}^2$ (wartość 142,17 $\text{\AA}^2$), co może stanowić teoretyczną barierę ograniczającą ich stosowanie drogą doustną. Zdolność do przekraczania bariery krew–mózg (BBB) jest kluczowym parametrem w kontekście leków skierowanych na schorzenia neurologiczne (np. chorobę Alzheimera). Z analiz *in silico* wynika, że tylko hybryda **9** jest w stanie pokonać tę barierę. Pozostałe pochodne (**10–20**) nie przenikają bariery krew–mózg. Związki z tej grupy charakteryzują się silnie hydrofobowym charakterem, a ich współczynnik podziału (logP) osiąga wysokie wartości w przedziale od 2,48 do 5,52.

Tabela 5. Przewidywane właściwości fizykochemiczne syntetyzowanych związków obliczone za pomocą platformy SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 6 września 2024)

Nr	MW [g/mol]	LogP	HBD	HBA	TPSA [Å²]	GI Abs	BBB Perm	Reguła Lipńskiego
9	388	3,2	0	4	71,05	Wysoka	Tak	Tak
10	423	3,76	0	4	71,05	Wysoka	Nie	Tak
11	433	2,48	0	6	116,87	Wysoka	Nie	Tak
12	461	4,02	0	4	96,35	Wysoka	Nie	Tak
13	497	4,53	0	4	96,35	Wysoka	Nie	Tak
14	506	3,33	0	6	142,17	Wysoka	Nie	Tak
15	476	4,35	0	4	96,35	Niska	Nie	Tak
16	511	4,88	0	4	96,35	Wysoka	Nie	Tak
17	521	3,64	0	6	142,17	Niska	Nie	Tak
18	503	5,00	0	4	96,35	Wysoka	Nie	Tak
19	541	5,52	0	4	96,35	Wysoka	Nie	Nie
20	549	4,25	0	6	142,17	Niska	Nie	Tak

*MW – masa cząsteczkowa; HBA – liczba akceptorów wiązań wodorowych; HBD – liczba donorów wiązań wodorowych; PSA – powierzchnia polarna; GI abs. – Wchłanianie w przewodzie pokarmowym
BBBperm – przenikanie przez barierę krew-mózg*

Tabela 6 prezentuje dane dotyczące rozpuszczalności hybryd, wskazując na jej ograniczoną wartość w większości przypadków, przy wyraźnym wpływie zastosowanego łącznika. Koniugaty z łącznikiem tlenowym, bez dodatkowego łańcucha węglowego (związki **9–11**), wykazują umiarkowaną rozpuszczalność w wodzie. Nawet najkrótszy łańcuch (3 atomy węgla) znacznie obniża rozpuszczalność związku. W efekcie wszystkie pozostałe hybrydy (związki **12–20**) zostały sklasyfikowane jako słabo rozpuszczalne.

Tabela 6. Przewidywana rozpuszczalność w wodzie nowych hybryd kofeinowo-pyrazolowych obliczona za pomocą platformy SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 6 września 2024)

Nr	LogS	Rozpuszczalność w wodzie	Klasa rozpuszczalności
9	-4,88	3,96*10 ⁻³	Umiarkowana
10	-5,54	1,23*10 ⁻³	Umiarkowana
11	-5,13	4,38*10 ⁻³	Umiarkowana
12	-6,46	1,6*10 ⁻⁴	Słaba
13	-7,11	3,9*10 ⁻⁵	Słaba
14	-7,25	2,87*10 ⁻⁵	Słaba
15	-6,83	7,13*10 ⁻⁵	Słaba
16	-7,48	1,7*10 ⁻⁵	Słaba
17	-7,61	1,28*10 ⁻⁵	Słaba
18	-7,57	1,35*10 ⁻⁵	Słaba
19	-8,23	3,2*10 ⁻⁶	Słaba
20	-8,36	2,41*10 ⁻⁶	Słaba

Podobnie jak w przypadku koniugatów kofeiny z pochodnymi uracylu, warto pamiętać, że obliczenia *in silico* służą jako narzędzie wspomagające i nie stanowią ostatecznego kryterium oceny potencjału leków. Niemniej jednak konieczna jest dalsza optymalizacja struktur pochodnych, aby poprawić ich zdolność przenikania przez barierę krew–mózg.

3.2.3 Ocena aktywności biologicznej zsyntetyzowanych biokoniugatów

Badania inhibicji enzymów: acetylocholinoesterazy (AChE) i α -glukozydazy (α -Glu)

Wyniki badań inhibicji enzymów przez nowo zsyntetyzowane hybrydy kofeinowo-stilbenowe wobec acetylocholinoesterazy (AChE) oraz α -glukozydazy (α -Glu), wraz z wartościami IC_{50} (stężenie hamujące 50% aktywności enzymu, wyrażone w μM), przedstawiono na rysunku 47. Zsyntezowane hybrydy kofeiny i stilbenu wykazały obiecujące właściwości inhibicyjne wobec powyższych enzymów, przy jednoczesnym wykazaniu zróżnicowanych preferencji strukturalnych dla każdego z nich.

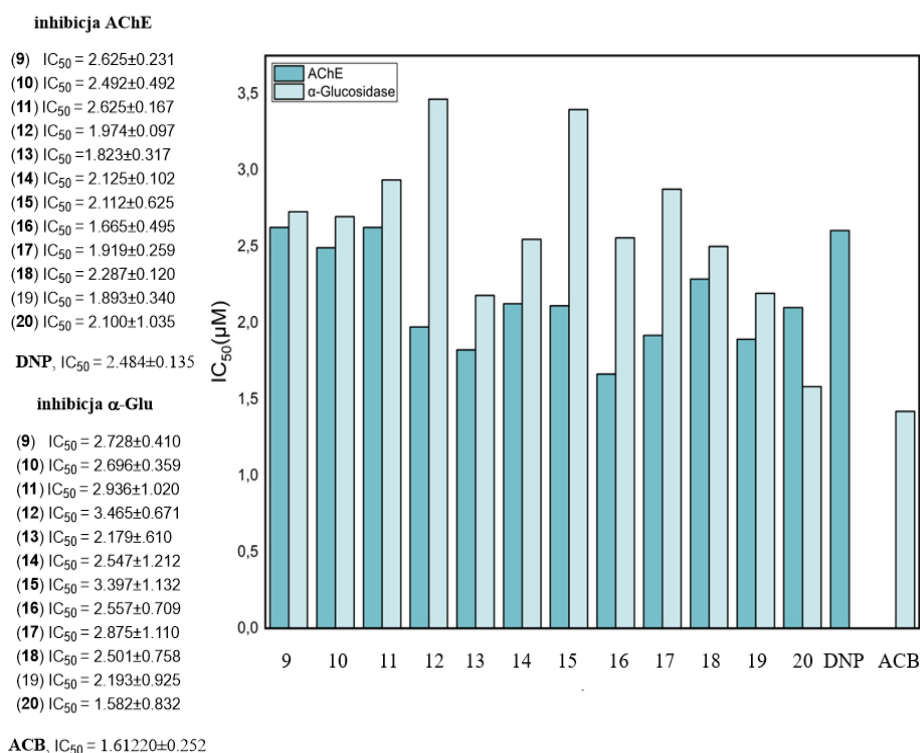
Większość koniugatów hamowała AChE przy wartościach IC_{50} w zakresie od 1,82 do 2,63 μM , co czyni je związkami skuteczniejszymi niż lek referencyjny – dinitrofenol (DNP), dla którego wartość IC_{50} wynosi $2,484 \pm 0,135 \mu M$. Wśród badanych związków najskuteczniejszymi inhibitorami AChE okazały się hybryda **13** (zawierająca atom chloru, $n = 3$, $IC_{50} = 1,823 \pm 0,317 \mu M$) oraz hybryda **14** (zawierająca grupę nitrową, $n = 3$, $IC_{50} = 1,225 \pm 0,102 \mu M$). Analiza SAR dla enzymu AChE wykazała, że kluczowymi czynnikami wpływającymi na aktywność związków są długość łańcucha alkilowego łączącego cząsteczkę kofeiny ze stilbenem oraz rodzaj podstawnika w cząsteczce stilbenu. Wyniki badań ujawniły, że najlepsze rezultaty osiąga się w przypadku krótkiego łańcucha ($n = 3$), podczas gdy jego wydłużenie (do $n = 4$ i $n = 6$) powoduje obniżenie właściwości hamujących u większości hybryd. Przypuszcza się, że obecność podstawników elektronoakceptorowych (-Cl, -NO₂) sprzyja korzystnemu ułożeniu cząsteczki w miejscu aktywnym enzymu.

W przypadku hamowania enzymu α -Glu skuteczność analizowanych hybryd (**9–20**) mieściła się w zakresie IC_{50} od 1,58 do 3,47 μM . Najwyższą aktywność wykazała hybryda **20** z łącznikiem sześciowęglowym ($n=6$) oraz podstawnikiem nitrowym. Jej wynik IC_{50} ($1,582 \pm 0,832 \mu M$) był porównywalny z wartością IC_{50} wyznaczoną dla inhibitora referencyjnego, akarbozy ($1,612 \pm 0,252 \mu M$).

Warto podkreślić, że strukturalne wymagania skutecznego hamowania α -Glu różnią się od tych dla AChE. Najlepsze rezultaty w hamowaniu α -Glu uzyskano dla związków z najdłuższym

łącznikiem alkilowym (n=6) z grupą nitrową, co przypuszczalnie zapewnia optymalną konfigurację do dokowania w hydrofobowych kieszeniach enzymu. Związki o krótkim łańcuchu alkilowym, bez grup elektronoakceptorowych (np. hybryda **12** (R=H, n=3) czy hybryda **15** (R=H, n=4)), wykazywały najsłabsze działanie w tym teście.

Podsumowując, w badaniach wykazano, że opracowanie skutecznego leku o potencjalnym zastosowaniu zarówno w terapii demencji, jak i cukrzycy wymaga znalezienia kompromisu w strukturze — konieczne jest zrównoważenie długości łańcucha alkilowego i właściwości elektronowych w części stilbenowej związku.



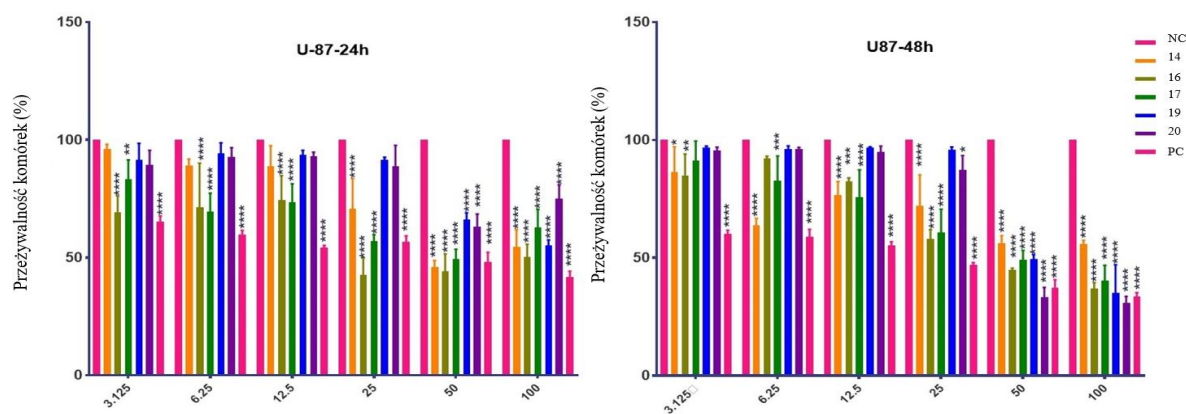
Rys.47. Wartości IC_{50} oraz zdolność inhibicji enzymów AChE i α -Glu przez związki **9-20** względem wzorca DNP (dinitrofenolu) dla AChE oraz ACB (akarbozy) dla α -Glu (źródło: *Design, Synthesis, Spectroscopic Characterization, Enzyme Inhibitory and Anticancer Evaluation of Novel Caffeine-Stilbene Hybrids*, praca w przygotowaniu)

Aktywność cytotoksyczna pochodnych II grupy wobec komórek nowotworowych

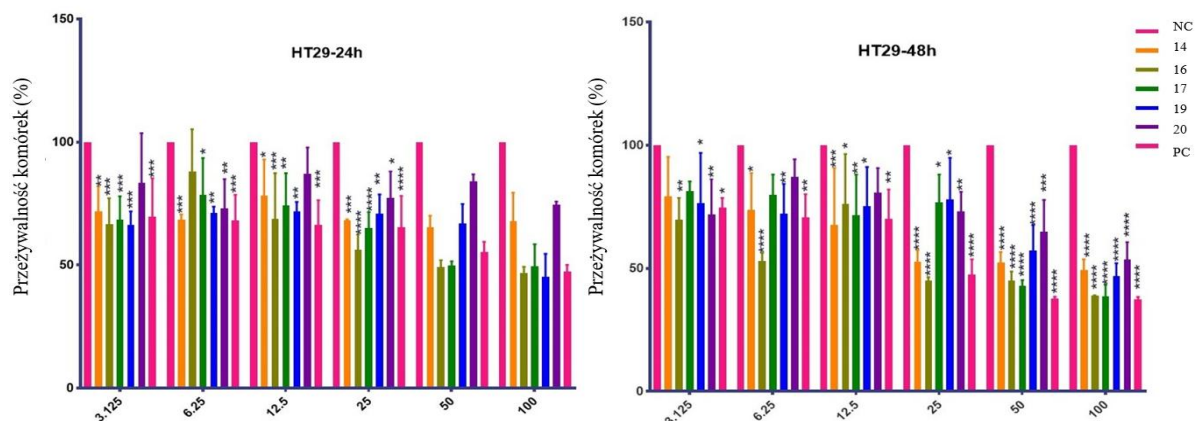
Wyselekcjonowane w badaniach enzymatycznych hybrydy kofeiny i stilbenu zostały dodatkowo poddane testom cytotoksyczności w celu oceny ich potencjału antyproliferacyjnego. Badania te przeprowadzono na dwóch liniach komórek nowotworowych: U-87 MG (glejak wielopostaciowy) oraz HT29 (gruczolakorak jelita grubego), analizując efekty po 24 i 48 godzinach ekspozycji na badane związki. Wykresy przeżywalności komórek

nowotworowych U87 po 24 i 48 godzinach, wyrażone w procentach, przedstawiono na rysunku 48, a dla komórek nowotworowych HT29 na rysunku 49. Najwyższą cytotoksyczność wobec komórek glejaka U-87 MG wykazała pochodna **16**, osiągając wartości IC_{50} na poziomie 31,78 μM po 24 godzinach oraz 44,78 μM po 48 godzinach. Mimo że parametry te ustępowały wynikom referencyjnego leku (5-fluorouracylu), hybryda **16** była najbardziej obiecującym koniugatem w analizowanej grupie. Umiarkowaną skuteczność wobec komórek glejaka wykazała pochodna **17**, nieco słabszą – związek **14**, natomiast najniższą aktywność – odznaczającą się bardzo wysokimi wartościami IC_{50} (rzędu 124,8 μM oraz 174,2 μM w teście 24 h) – odnotowano dla związków **19** i **20**.

W badaniach przeprowadzonych na linii komórek gruczolaka jelita grubego (HT29) najskuteczniejszą pochodną okazała się pochodna **16**, wykazując najwyższy potencjał antyproliferacyjny. Wartość IC_{50} dla tego związku po 24-godzinym okresie inkubacji wyniosła 41,74 μM , podczas gdy po przedłużeniu tego czasu do 48 godzin wartość ta obniżyła się do 25,63 μM , zbliżając się do poziomu wartości leku referencyjnego 5-Fu (IC_{50} : 26,55 μM). Na szczególną uwagę zasługuje profil działania pochodnej **14**. Po 24 godzinach inkubacji jej aktywność była stosunkowo niska (IC_{50} = 91,85 μM). Jednak przedłużenie ekspozycji do 48 godzin skutkowało ponad dwukrotną poprawą skuteczności (IC_{50} = 40,61 μM). Podobnie jak w przypadku komórek glejaka, związki **17** i **19** wykazały umiarkowaną cytotoksyczność wobec HT29, a hybryda **20** była najmniej aktywna.



Rys.48. Wykresy przeżywalności komórek nowotworowych U87 po 24 i 48 godzinach w obecności wybranych związków, wyrażone w procentach. PC oznacza kontrolę dodatnią (5-Fluorouracyl), a NC — kontrolę ujemną. (**** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,0005$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) (źródło: Design, Synthesis, Spectroscopic Characterization, Enzyme Inhibitory and Anticancer Evaluation of Novel Caffeine-Stilbene Hybrids, praca w przygotowaniu)



Rys.49. Wykresy przeżywalności komórek nowotworowych HT-29 po 24 i 48 godzinach w obecności wybranych związków, wyrażone w procentach. PC oznacza kontrolę dodatnią (5-Fluorouracyl), a NC — kontrolę ujemną. (**** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,0005$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) (źródło: *Design, Synthesis, Spectroscopic Characterization, Enzyme Inhibitory and Anticancer Evaluation of Novel Caffeine-Stilbene Hybrids*, praca w przygotowaniu)

Przeprowadzone badania dowodzą, że aktywność cytotoksyczna badanych koniugatów zależy od ich struktury chemicznej, typu nowotworu oraz czasu, przez który komórki są wystawione na działanie tych substancji. Istotny spadek wartości IC_{50} (co oznacza wzrost skuteczności), zaobserwowany po 48 godzinach, szczególnie widoczny dla hybrydy **14**, dowodzi, że cytotoksyczny efekt nowych koniugatów kofeiny i stilbenu rozwija się stopniowo, a przedłużona ekspozycja komórek nowotworowych na te substancje znacząco potęguje ich ostateczne działanie antyproliferacyjne

3.3 Koniugaty kofeiny z pochodnymi imidazoli i tioimidazoli (III grupa pochodnych)

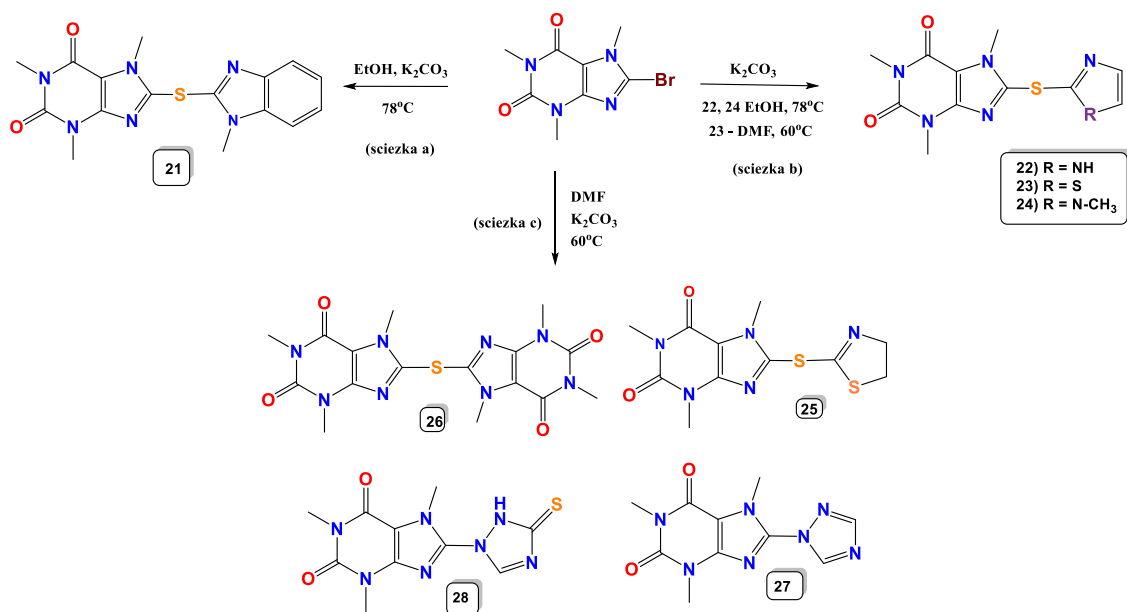
3.3.1 Synteza, analiza spektroskopowa

Trzecia grupa zsyntetyzowanych przeze mnie związków obejmuje pochodne kofeiny zawierające w swojej strukturze ugrupowania imidazolowe (tiazolowe), benzimidazolowe (benzotiazolowe), ich pochodne albo pierścień triazolowy. Imidazol i benzimidazol to związki heterocykliczne powszechnie występujące zarówno w naturze, jak i w wielu biologicznie aktywnych związkach syntetycznych. Z kolei benzimidazole i benzotiazole stanowią niezwykle ważne grupy farmakoforów w chemii medycznej [135]. Wykazują one szerokie spektrum działania, m.in. właściwości antyoksydacyjne oraz skuteczność w walce z różnymi patogenami [136].

Celem moich badań była przede wszystkim ocena aktywności biologicznej nowych pochodnych kofeiny oraz określenie wpływu rodzaju heteroatomu znajdującego się w pierścieniu azolowym na tę aktywność. Dodatkowo przeprowadziłem szczegółową analizę mającą na celu porównanie potencjału cytoprotekcyjnego, przeciwrzybiczego oraz antibakteryjnego pomiędzy wybranymi pochodnymi azolowymi a benzazolowymi.

Związki **21–28** otrzymałem w wyniku reakcji substytucji nukleofilowej przeprowadzonej w różnych warunkach (ścieżki a, b, c) z użyciem 8-bromokofeiny oraz odpowiednich pochodnych azolowych: 1-metylo-1*H*-benzimidazol-2-tiolem (związek **21**, ścieżka a), 2-merkaptimidazolem, 2-merkaptotiazolem, 1-metylo-2-merkaptimidazolem (związki **22–24**, ścieżka b), 2-tiazoliną, 1,2,4-triazolem oraz 3-merkaptio-1,2,4-triazolem (związki **25**, **27** i **28**, ścieżka c) (schemat 9).

W otrzymanych pochodnych pierścieni tioazolowy i benzotioazolowy są połączone z cząsteczką kofeiny przez atom siarki (związki **21–25**), natomiast pierścień triazolu jest bezpośrednio związany z kofeiną (związki **27**, **28**). Związek **26**, niezawierający w swojej strukturze pierścienia azolowego, otrzymałem jako produkt uboczny podczas syntezy związków **21**, **22** i **24**. Uzyskałem go również w reakcji 8-bromokofeiny z 8-tiokofeiną (DMF, 60°C, K₂CO₃).



Schemat 9. Schemat otrzymywania pochodnych azolowych kofeiny

Strukturę otrzymanych związków potwierdziłem metodami spektroskopowymi: ^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR oraz EI-MS.

W widmach ^1H NMR wszystkich pochodnych obecne są sygnały w zakresie 3,00–4,14 ppm odpowiadające protonom grup metylowych cząsteczki kofeiny. Sygnały protonów pierścienia azolowego związku **23** występują w zakresie 7,40–7,75 ppm, natomiast w związku **26** są obecne jako tryplety przy 3,46 i 4,24 ppm. Sygnały protonów pierścienia triazolu są obecne jako singlety przy 8,48 i 9,27 ppm dla związku **27** oraz przy 8,56 ppm dla związku **28**. W zakresie 7,30–7,70 ppm występują sygnały protonów pierścieni aromatycznych. Sygnały pochodzące od protonów grupy *N*-metylowej obecnej w związkach **21** i **24** są widoczne w zakresie 4,09–4,12 ppm.

W widmach ^{13}C NMR wszystkich związków, sygnały w zakresie 20–40 ppm pochodzą od atomów węgla trzech grup metylowych w cząsteczce kofeiny. Dodatkowo przy około 151 i 154 ppm można zauważyć sygnały odpowiadające atomom węgla w grupie karbonylowej. Sygnały atomów węgla C-8 cząsteczki kofeiny są obecne przy około 147 ppm w związkach z łącznikiem siarkowym (**21–26**) oraz przy około 150 ppm w pochodnych triazolowych (**27** i **28**). Sygnały atomów węgla pierścieni aromatycznych są obecne w zakresie 110–120 ppm, natomiast sygnały atomów węgla pierścieni triazolu (związków **27** i **28**) w zakresie 139–142 ppm oraz 150–176 ppm.

W widmach FT-IR wszystkich związków obecne są pasma absorpcji w zakresie 1708–1654 cm^{-1} , które przypisuje się drganiom rozciągającym grupy karbonylowej cząsteczki kofeiny. Ponadto pasma absorpcji wiązań podwójnych w szkielecie ksantyny, pierścieni heterocyklicznych oraz pierścieni aromatycznych występują w zakresie 3188–3000 cm^{-1} . Związki **27** i **28** wykazują pasma absorpcji w zakresie 3110–3129 cm^{-1} oraz trzy pasma absorpcji w zakresach 1513, 1408 i 1378 cm^{-1} , związane z obecnością pierścienia triazolu. W widmach EI-MS wszystkich związków można zauważyć sygnały odpowiadające jonom molekularnym, których względna intensywność mieści się w zakresie od 55 do 100%, z wyjątkiem związku **24**, dla którego intensywność ta wynosiła tylko 5%.

Widma ^1H i ^{13}C NMR, EI-MS oraz FT-IR wybranych pochodnych kofeiny III grupy znajdują się w Części Eksperymentalnej (Rozdział 4).

3.3.2 Ocena właściwości fizykochemicznych pochodnych III grupy

Właściwości fizykochemiczne i parametry ADME nowo zsyntetyzowanych pochodnych kofeiny z grupy trzeciej (związki **21–28**) określiłem za pomocą oprogramowania SwissADME, a uzyskane wyniki przedstawiłem w tabeli 7. Otrzymane wyniki wskazują na ogólnie korzystny profil farmakokinetyczny analizowanych struktur. Wszystkie otrzymane związki spełniają regułę Lipińskiego. W ich strukturach znajduje się od 4 do 6 akceptorów wiązań wodorowych (HBA) oraz od 0 do 1 donora takich wiązań (HBD). Żaden z analizowanych związków nie wykazuje zdolności przenikania przez barierę krew–mózg. Charakteryzują się one niskim prawdopodobieństwem pasywnego przenikania. Większość badanych cząsteczek wykazuje wysoką przewidywaną wchłanianiałość z układu pokarmowego, co może sprzyjać ich potencjalnemu zastosowaniu w postaci leków doustnych. Wyjątkami pod względem dobrego wchłaniania są związki **26** i **28**, dla których parametr GI abs oceniono jako niski. Jest to spowodowane tym, że przekraczają one powszechnie akceptowaną dla leków doustnych granicę powierzchni polarnej wynoszącą 140 $\text{\AA}^2$ – dla związku **26** wartość TPSA wynosi 148,94 $\text{\AA}^2$, a dla związku **28** osiąga 156,63 $\text{\AA}^2$, co wskazuje na potencjalnie ograniczoną biodostępność doustną. Pozostałe pochodne charakteryzują się optymalnym zakresem TPSA wynoszącym od 102,72 do 128,25 $\text{\AA}^2$. Dla wszystkich nowych pochodnych z tej grupy przewiduje się dobrą rozpuszczalność w wodzie, co świadczy o nieco bardziej hydrofilowym charakterze tych cząsteczek. Badane związki wykazują umiarkowaną lipofilowość, a ich współczynnik podziału (LogP) waha się w przedziale od 2,06 (związek **27**) do 3,08 (związek **26**).

Tabela 7. Przewidywane właściwości fizykochemiczne oraz parametry ADME syntetyzowanych związków obliczone za pomocą SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 21 listopada 2024)

Związek	MW	LogP	HBD	HBA	TPSA [Å ²]	GI abs	BBBperm	Reguła Lipińskiego	Rozpuszczalność w wodzie
21	358.42	2.75	0	4	102.72	Wysoka	Nie	Tak	Dobra
22	292.32	2.25	1	4	115.80	Wysoka	Nie	Tak	Dobra
23	309.37	2.65	0	4	128.25	Wysoka	Nie	Tak	Dobra
24	306.34	2.49	0	4	104.94	Wysoka	Nie	Tak	Dobra
25	311.38	2.76	0	4	124.78	Wysoka	Nie	Tak	Dobra
26	418.43	3.08	0	6	148.94	Niska	Nie	Tak	Dobra
27	293.31	2.06	0	5	117.83	Wysoka	Nie	Tak	Dobra
28	325.37	2.38	0	5	156.63	Niska	Nie	Tak	Dobra

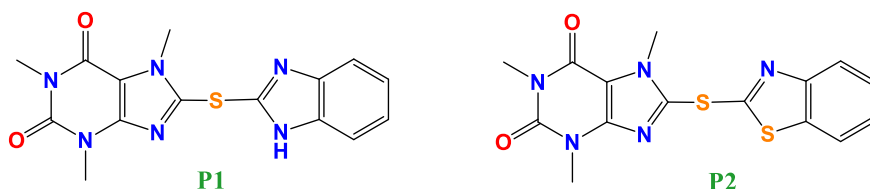
MW – masa cząsteczkowa; *HBA* – liczba akceptorów wiązań wodorowych; *HBD* – liczba donorów wiązań wodorowych; *PSA* – powierzchnia polarna; *GI abs.* – wchłanianie w przewodzie pokarmowym; *BBBperm* – przenikanie przez barierę krew-mózg

3.3.3 Ocena aktywności biologicznej pochodnych III grupy

Aktywność hemolityczna pochodnych III grupy

Związki otrzymane w ramach pracy doktorskiej wykazały zróżnicowaną aktywność hemolityczną w badanym stężeniu 0,1 mg/mL wahającą się od 4,13% ± 0,89 (związek **22**) do 12,24% ± 0,73 (związek **25**) (Rys. 45).

Ponieważ dwie inne pochodne z tej samej grupy związków: 8-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)thio)-1,3,7-trimethyl-1*H*-purine-2,6(3*H*,7*H*)-dione (**P1**) oraz 8-(benzo[*d*]thiazol-2-ylthio)-1,3,7-trimethyl-1*H*-purine-2,6(3*H*,7*H*)-dione (**P2**) (Rys.50) zostały wcześniej otrzymane w naszym laboratorium a ich właściwości hemolityczne oraz cytoprotekcyjne zostały zbadane dołączyłem je do niniejszego opracowania w celu lepszego zobrazowania wpływu pierścienia benzazolowego na aktywność biologiczną związków. Ponieważ nie są to związki otrzymane w ramach pracy doktorskiej, oznaczyłem je **kolorem**.

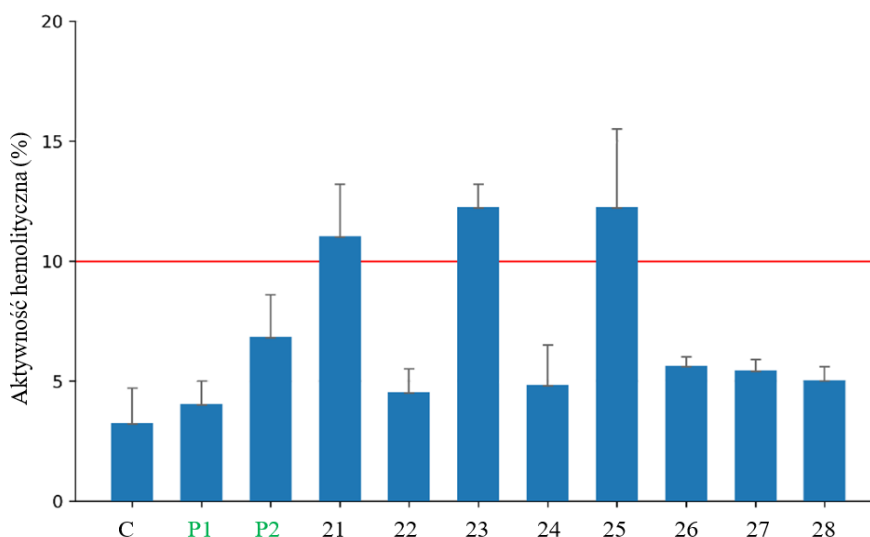


Rys.50. Struktura związków **P1** i **P2**

Większość badanych związków nie wykazała znaczącej hemolizy erytrocytów. Związki **22**, **24** oraz **26–28** (m.in. te zawierające pierścień imidazolowy lub triazolowy) wykazywały aktywność hemolityczną na poziomie około 5%, co jest wynikiem zbliżonym do naturalnego zachowania kontrolnych krwinek czerwonych inkubowanych w buforze PBS. Należy także zaznaczyć, że sama kofeina, stosowana w tym samym stężeniu, nie wykazywała aktywności hemolitycznej [31], podobnie jak wcześniej otrzymane pochodne **P1** i **P2** z tej samej grupy.

Aktywność hemolityczną przekraczającą bezpieczny próg 10% (co prowadzi do łagodnej hemolizy) odnotowano jedynie dla trzech pochodnych: **21**, **23** i **25**. Zwiększona toksyczność tych cząsteczek wynika z ich umiarkowanej lipofilowości (wartości logP wynoszące odpowiednio 2,75, 2,65 oraz 2,76), a także z wartości powierzchni polarnej wynoszących odpowiednio 102,72, 128,25 i 124,78, co sprzyja silniejszym oddziaływaniom z błoną erytrocytów.

Analiza zależności pomiędzy budową a aktywnością wskazuje, że dwa główne czynniki strukturalne wpływające na zwiększenie aktywności hemolitycznej związków to obecność grupy *N*-metylowej lub atomu siarki w pierścieniu pięcioczłonowym. W pierścieniu benzimidazolowym związku **21** grupa *N*-metylowa znacząco podnosi hydrofobowość cząsteczki, co skutkuje silniejszymi, niekorzystnymi interakcjami związku z błoną komórkową. W przypadku związku **23** obecność dodatkowego atomu siarki sprawia, że struktura jest bardziej podatna na reakcje utleniania–redukcji, co z kolei może prowadzić do zwiększonej produkcji wolnych rodników, które bezpośrednio uszkadzają błonę komórkową.



Rys.51. Aktywność hemolityczna związków **P1**, **P2**, **21–28** w stężeniu 0,1 mg/mL (60 min, 37 °C). Przedstawione wyniki są wartościami średnimi $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$). C – kontrola, RBC (red blood cells – czerwone krwinki) w buforze fosforanowym PBS. Czerwona linia na poziomie 10% wskazuje granicę hemokompatybilności związków

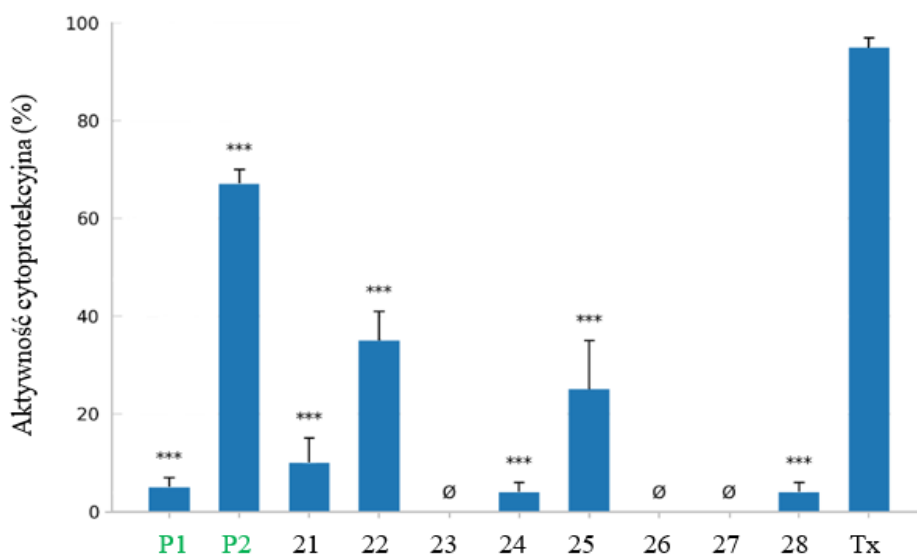
Ocena właściwości cytoprotekcyjnych związków III grupy względem erytrocytów ekspozowanych na działanie AAPH

W analizie właściwości cytoprotekcyjnych związków uwzględniłem również otrzymane wcześniej pochodne z tej samej grupy (**P1** i **P2**), co pozwoliło na dokładniejsze określenie zależności między budową a aktywnością (SAR). Wartości aktywności cytoprotekcyjnej pochodnych **21–28** oraz związków **P1** i **P2** przedstawiłem na rysunku 46. Uzyskane wyniki sugerują, że otrzymane przeze mnie pochodne kofeiny (związki **21–28**) nie są wysoce skutecznymi antyoksydantami w przeprowadzonych testach i w większości słabo chronią komórki przed hemolizą wywołaną stresem oksydacyjnym.

Spośród badanych związków otrzymanych w ramach pracy doktorskiej najwyższą aktywność cytoprotekcyjną wykazały związki **22** ($35,4\% \pm 7,9$) oraz **25** ($24,89\% \pm 10,65$). Wysoka aktywność cytoprotekcyjna związku **22** wynika prawdopodobnie z jego optymalnych właściwości fizykochemicznych, takich jak umiarkowana lipofilowość, odpowiednia polarność oraz wysoka biodostępność (Tabela 7). Najwyższą aktywność cytoprotekcyjną w całym zestawieniu ($67,39\% \pm 2,12$) wykazała pochodna **P2** otrzymana wcześniej w naszym laboratorium. Niskie wartości aktywności cytoprotekcyjnej (od 5,66% do 10,46%) zaobserwowano dla związków **21**, **24** i **28**. Z kolei związki **23**, **26** i **27** okazały się całkowicie

nieaktywne, nie wykazując żadnego działania ochronnego (oznaczone jako $\emptyset$) przeciw hemolizie wywołanej przez wolne rodniki.

Analiza wyników dla wszystkich pochodnych, w tym związków **P1** i **P2**, pokazuje niezwykle interesującą, przeciwną rolę atomu siarki w zależności od reszty układu. W grupie związków benzazolowych (**P1**, **P2** i **21**) obecność atomu siarki znacząco zwiększa ich potencjał antyoksydacyjny. Najwyższą aktywność cytoprotekcyjną odnotowano dla pochodnej **P2**; związki **P1** i **21** nie wykazują tej aktywności. Zupełnie odwrotny efekt występuje w układach azolowych (związki **22–24**) – tutaj obecność siarki obniża właściwości cytoprotekcyjne, czego dowodem jest całkowity brak aktywności związku **23**. Z kolei zastąpienie pierścienia imidazolu pierścieniem benzazolu zazwyczaj osłabia aktywność antyoksydacyjną cząsteczki, niemniej jednak od tej reguły istnieje wyjątek – w przypadku pochodnych tioazolowych obserwuje się efekt odwrotny. Ponadto podstawienie wolnego atomu azotu w pierścieniu azolowym grupą metylową istotnie obniża potencjał ochronny tych związków. Wynik ten potwierdza, iż procesy neutralizacji wolnych rodników w przypadku tych pochodnych najprawdopodobniej przebiegają poprzez mechanizm przeniesienia atomu wodoru (HAT – Hydrogen Atom Transfer). Podstawienie atomu azotu uniemożliwia prawidłowy przebieg tego procesu.



Rys.52. Wykres aktywności cytoprotekcyjnej pochodnych **P1**, **P2** **21–28** w stężeniu 0,1 mg/mL w warunkach stresu oksydacyjnego. Wyniki przedstawione jako średnia wartość $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$) w porównaniu z aktywnością wzorca Troloxu (Tx) (***) $p < 0,001$, $\emptyset$ – wskazuje na brak stwierdzonej aktywności)

Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybiczna pochodnych III grupy

Nowo otrzymane pochodne kofeiny z trzeciej grupy (związki **21–28**) poddano testom *in vitro* w celu oceny ich potencjału przeciwdrobnoustrojowego wobec wybranych patogenów. Testy przeprowadzono z użyciem szczepów bakterii *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas fluorescens*, a także grzybów z gatunków *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* i *Botrytis cinerea*.

Większość badanych związków nie wykazała aktywności bakteriobójczej. Jedynym wyjątkiem był związek **25**, dla którego zaobserwowano słabą aktywność przeciwko bakteriom *M. luteus*. Analiza aktywności przeciwgrzybiczej (Tabela 8) wykazała, że otrzymane pochodne wykazały znacznie większy potencjał w hamowaniu rozwoju grzybów niż bakterii. Związki **26** i **28** wykazywały najsilniejszą zdolność hamowania rozwoju grzybów z gatunku *B. cinerea*, osiągając strefy zahamowania wzrostu odpowiednio 20 mm i 15 mm (co klasyfikuje je jako związki silnie aktywne). Obiecujące właściwości wobec tego grzyba wykazał związek **27** (strefa zahamowania wzrostu: 12 mm). Znaczące zahamowanie wzrostu *Trichoderma atroviride* zaobserwowano dla związków **21**, **22**, **24** oraz **25**, z zakresami zahamowania od 10 do 15 mm, co świadczy o ich średniej aktywności. Ponadto zaobserwowano wyraźny efekt hamujący ze strony związków **26**, **27** i **28** na rozwój *Alternaria alternata*. Należy podkreślić, że związek **23** (nieujęty w tabeli) nie wykazał aktywności wobec żadnego z testowanych mikroorganizmów, zarówno grzybów, jak i bakterii.

Tabela 8. Aktywność grzybobójcza związków **21–28**. Strefy hamowania wzrostu: <9 mm (związki słabo aktywne); 10–15 mm (związki średnio aktywne); >15 mm (związki aktywne)

Związek	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Trichoderma atroviridae</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
21	4,3	10,0	3,0	1,8	2,5
22	5,0	11,0	4,0	3,3	3,5
24	4,5	11,0	4,0	3,5	4,8
25	6,0	10,0	3,0	4,5	7,8
26	1,0	0	2,0	8,0	20
27	1,8	0	2,0	7,5	12
28	1,0	4,0	2,0	8,0	15

Przedstawione wyniki zostały opublikowane w **Journal of Molecular Structure (2026)**: K. Ostrowski, A. Sierakowska, D. Grzonka, M. Goldyn, D. Nowak, J. Starzyk, B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska, *Synthesis, structure and evaluation of antifungal and cytoprotective activities of caffeine–azole hybrids*, doi: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2026.147221>

3.4 Koniugaty kofeiny z pochodnymi pirazoli (IV grupa pochodnych)

3.4.1 Synteza, analiza spektroskopowa

Ostatnia grupa pochodnych kofeiny, którą otrzymałem, to koniugaty z pochodnymi pirazolu. Pierścień pirazolu, zawierający dwa sąsiadujące atomy azotu, wykazuje szeroki zakres aktywności biologicznej, w tym hamowanie enzymów [137], neutralizację wolnych rodników [138,139] oraz potencjał przeciwnowotworowy [140,141]. Z tego powodu uważa się go za kluczowy element w strukturze związków hybrydowych [89,142–143]. W literaturze podkreśla się, że połączenie pierścienia pirazolu ze szkieletem ksantynowym (kofeina) jest obiecującym kierunkiem badań mających na celu poprawę właściwości farmakologicznych tych związków [137–138, 144–147].

Do badań wybrałem kilkanaście pochodnych pirazolowych zawierających zarówno podstawniki elektronodonorowe, jak i elektronoakceptorowe w pozycjach C-3, C-4 lub C-5 pierścienia pirazolu. Umożliwiło to przeprowadzenie szczegółowych badań zależności między strukturą tych związków a ich aktywnością. Celem pracy było również zbadanie wpływu wybranych grup funkcyjnych na właściwości elektronowe, reaktywność chemiczną oraz aktywność biologiczną otrzymanych koniugatów.

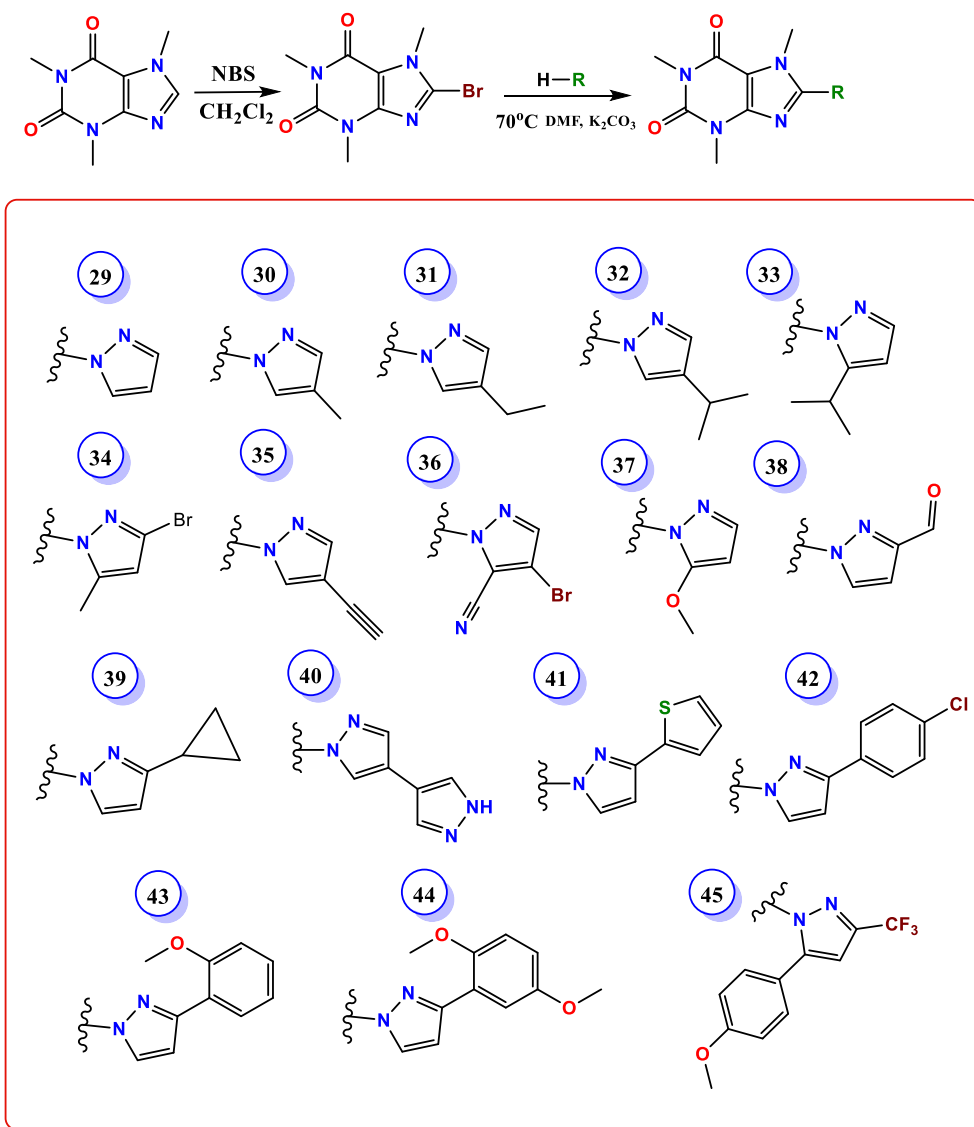
W wyniku przeprowadzonych reakcji uzyskałem 17 związków hybrydowych (**28–44**). Dwie pochodne (**28** i **29**) są znane z literatury [142]; jednakże otrzymano je innymi metodami, a ich aktywność biologiczna nie została badana.

Wszystkie pochodne IV grupy otrzymałem w wyniku reakcji substytucji nukleofilowej 8-bromokofeiny z odpowiednią pochodną pirazolu w DMF z użyciem K_2CO_3 (Schemat 12).

W wyniku reakcji 8-bromokofeiny z 5-izopropyl-1H-pirazolem oraz 5-metoksy-1H-pirazolem otrzymałem kolejno związki **33** i **37**, które zawierają odpowiednio grupę izopropylową lub metoksyłową w pozycji 3 pierścienia pirazolowego. Wynika to prawdopodobnie z oddziaływań międzycząsteczkowych, warunków reakcji lub preferencji podstawnika [148,149], ponieważ nie zaobserwowałem innych produktów reakcji

Strukturę otrzymanych związków potwierdziłem, wykorzystując metody spektroskopowe: ^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR oraz EI-MS.

W przeprowadzonych syntezach używałem komercyjnych pochodnych pirazolowych o czystości od 90% do 98%. Wstępna analiza spektroskopowa otrzymanych produktów nie wykazała obecności zanieczyszczeń. Jednak późniejsza analiza krystalograficzna (rozdział 3.4.2) wykazała, że w strukturze związku **41** stwierdzono obecność zanieczyszczeń występujących w zakupionym substracie. W związku z tym zdecydowałem się powtórzyć syntezę tej pochodnej, korzystając ze substratu pirazolowego zakupionego u innego dostawcy. Po wykonaniu analizy spektroskopowej ponownie zsyntetyzowany związek **41** został wykorzystany w badaniach biologicznych.



Schemat 10. Schemat syntezy związków hybrydowych kofeiny i pirazolu

W widmach ^1H NMR wszystkich pochodnych obecne są charakterystyczne sygnały pochodzące od atomów wodoru w pierścieniu pirazolu (w zakresie od 6,54 do 8,30 ppm) oraz protonów grup metylowych szkieletu kofeiny (w zakresie od 3,30 do 4,12 ppm). Ponadto potwierdzono obecność specyficznych podstawników w wybranych pochodnych. Widmo ^1H NMR związku **37** zawiera sygnał przy 10,10 ppm, który przypisuje się protonowi grupy aldehydowej. Z kolei w widmie związku **39** obserwuje się sygnał przy 12,98 ppm, odpowiadający protonom drugorzędowej grupy aminowej. Protony aromatyczne związków **41–44** występują w zakresie od 7,83 do 7,18 ppm, natomiast sygnały pochodzące od protonów pierścienia tiofenu w związku **40** mieszczą się w przedziale 7,35–7,44 ppm. Sygnały pochodzące od protonów grup metoksyowych (związki **36, 42–44**) są obecne w zakresie 3,42–4,41 ppm, natomiast protony grup alifatycznych (związki **29–33**) dają sygnały w zakresie 1,25–3,11 ppm.

W widmach ^{13}C NMR wszystkich związków zaobserwowano charakterystyczne sygnały atomów węgla cząsteczki kofeiny oraz pierścienia pirazolowego. Sygnały pochodzące od atomów węgla kofeiny występują w zakresie 151,5–155,1 ppm, podczas gdy sygnały atomów węgla grup metylowych obserwuje się w zakresie 27,9–34,9 ppm. Charakterystyczne sygnały atomów węgla pierścienia pirazolowego występują w zakresach 127,2–143,7 ppm oraz 105,6–109,8 ppm. Dodatkowo w widmie związku **37** zaobserwowano sygnał przy 185,7 ppm, odpowiadający atomowi węgla karbonyłowego w grupie aldehydowej. W widmach związków **41–44** obecne są sygnały aromatycznych atomów węgla w zakresie 111,5–130,3 ppm. W przypadku związku **40** obecność pierścienia tiofenu potwierdzono na podstawie sygnałów atomów węgla w zakresie 126,1–143,2 ppm. Ponadto w widmach związków **29–33** widoczne są sygnały atomów węgla w przedziale 8,6–24,2 ppm, odpowiadające grupom alifatycznym.

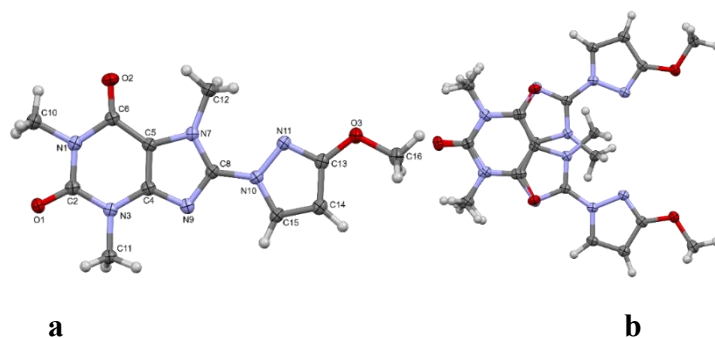
W widmach FT-IR wszystkich pochodnych zaobserwowano pasma w zakresie 3143–3119 cm^{-1} , które odpowiadają drganiom rozciągającym wiązań C–H w pierścieniu pirazolu. Pasma absorpcji w zakresie 1720–1653 cm^{-1} wskazują na drgania rozciągające wiązań C=O w grupach karbonylowych cząsteczki kofeiny. Obecność grup alifatycznych potwierdzają pasma w zakresach 2977–2950 cm^{-1} i 1478–1453 cm^{-1} , natomiast pasmo absorpcji przy 2257 cm^{-1} , obecne w widmie związku **35**, potwierdza obecność grupy nitrylowej ($-\text{C}\equiv\text{N}$). W widmie związku **39** pasmo absorpcji w zakresie 3412–3243 cm^{-1} świadczy o obecności grupy N–H. Z kolei widmo związku **34** zawiera pasma w zakresie 3246 cm^{-1} i 2111 cm^{-1} , które potwierdzają obecność wiązania potrójnego węgiel–węgiel ($-\text{C}\equiv\text{C}-$).

W widmach masowych (EI-MS) wszystkich pochodnych obecny jest sygnał pochodzący od jonu molekularnego o intensywności względnej 100%.

Widma ^1H i ^{13}C NMR, EI-MS oraz FT-IR wybranych pochodnych kofeiny znajdują się w Części Eksperymentalnej (Rozdział 4).

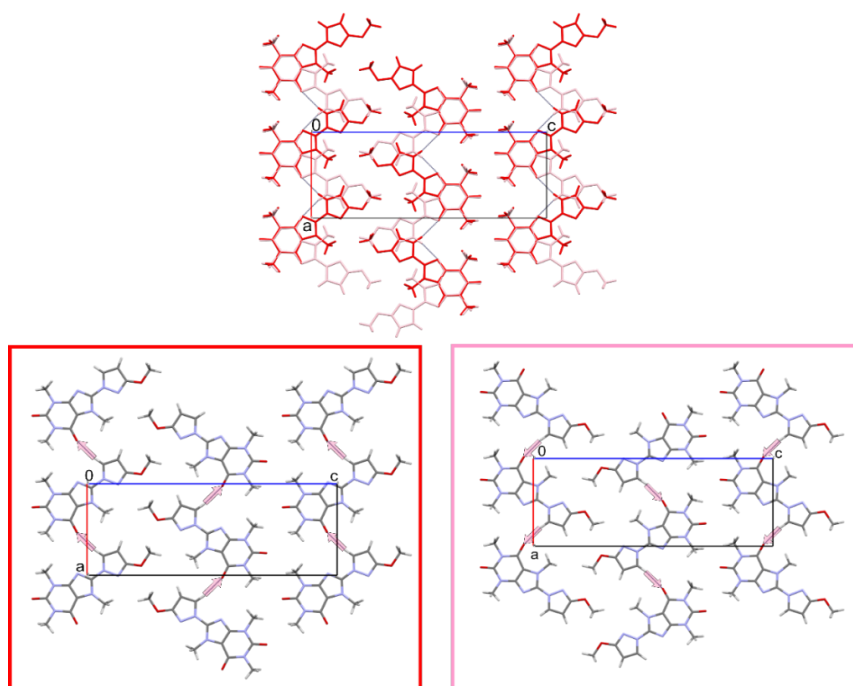
3.4.2 Struktura krystalograficzna pochodnych **37** i **41A**

Struktura krystalograficzna została określona dla pochodnych **37** i **41A** (związek otrzymany w pierwszej syntezie). Związek **37** krystalizuje w układzie ortorombicznym, w grupie przestrzennej *Pnma*. Analiza krystalograficzna wykazała, że cząsteczka tego związku jest niemal całkowicie płaska, z wyjątkiem atomów wodoru w grupach metylowych. W kryształach cząsteczki związku **37** występują w dwóch ułożeniach (głównym i mniejszościowym) w stosunku 9:1 (Rys.53).

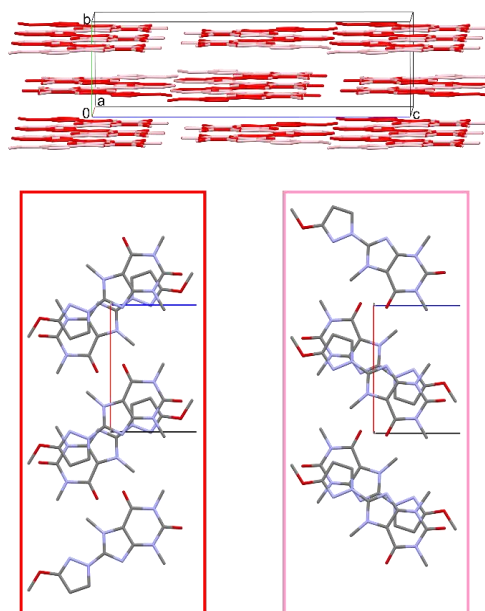


Rys.53. Struktura krystalograficzna związku **37** wraz z numeracją atomów. a) główny element kryształu; b) dwie alternatywne pozycje cząsteczki w kryształach, których występowanie szacuje się na 50% (źródło: *Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential*, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)

Upakowanie w kryształach jest głównie determinowane przez oddziaływania typu „stacking” (układanie w stosy), wspomagane przez wiązania wodorowe typu C–H $\cdots$ O. Zaobserwowano interesującą zależność polegającą na tym, że kierunek wiązań wodorowych tworzonych przez składnik mniejszościowy jest przeciwny do kierunku wiązań wodorowych tworzonych przez składnik główny (Rys.54). Ponadto cząsteczki układają się w sposób warstwowy (Rys.55).

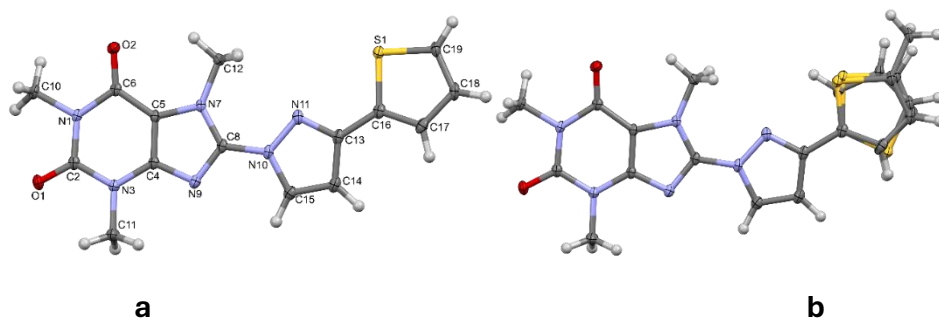


Rys.54. Ułożenie cząsteczki związku 37 w kryształach. Rysunek górny przedstawia nieuporządkowane składniki: główny składnik oznaczony kolorem czerwonym, a składnik poboczny kolorem różowym. Na rysunku dolnym pokazano dwa elementy: główny w lewym dolnym rogu oraz poboczny w prawym dolnym rogu. (źródło: Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)



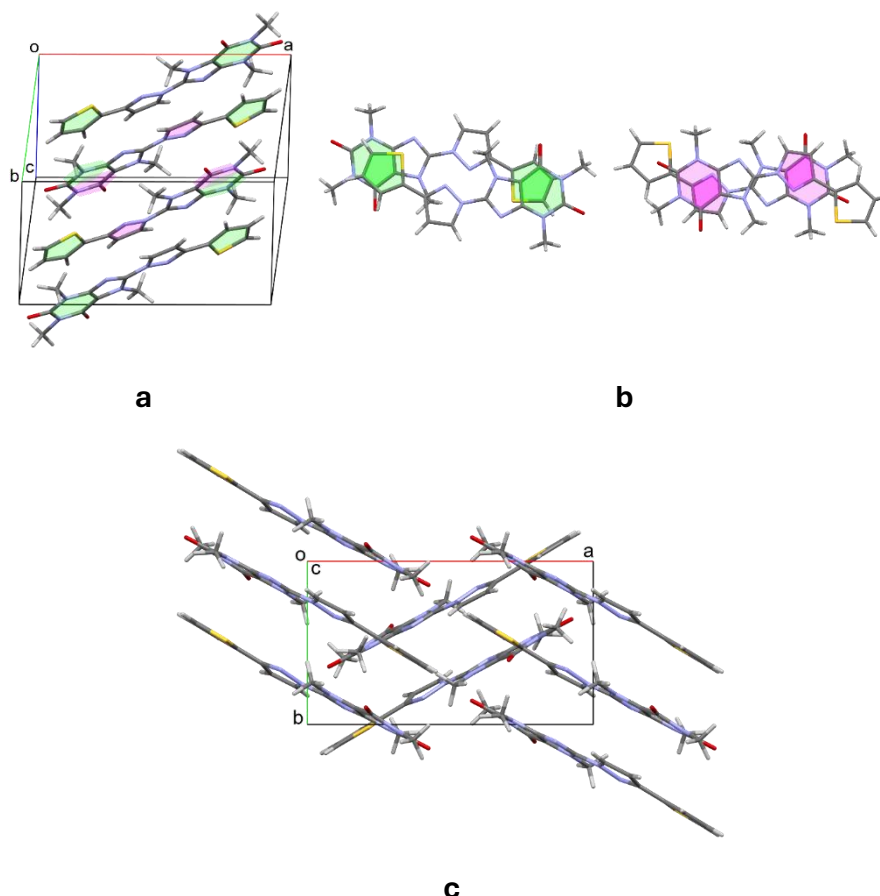
Rys.55. Część górna: warstwowy układ cząsteczek w kryształach. Główne i poboczne składniki są rozróżniane kolorem (czerwonym dla głównych i różowym dla pobocznych). Część dolna: rodzaj nakładania się cząsteczek (po lewej: składnik główny, po prawej: składnik poboczny). (źródło: Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)

Pochodna **41A** krystalizuje w układzie monocyklicznym, w grupie przestrzennej $P2_1/n$. Podobnie jak w poprzednim przypadku, układ tiofeno-pirazolowy jest umiejscowiony w tej samej płaszczyźnie co szkielet kofeiny, co sprawia, że cała cząsteczka jest płaska. Kryształy tego związku wykazują dwa rodzaje nieuporządkowania: pozycyjne, w których fragment tiofenu może przyjmować względem jednego z atomów azotu w pirazolu pozycję dominującą lub mniejszościową anty, oraz podstawieniowe, wynikające z obecności zanieczyszczeń w komercyjnej pochodnej pirazolu – około 10% cząsteczek zawiera w swojej strukturze fragment 2-metylotiotiofenu zamiast oczekiwanego tiofenu. W rezultacie stosunek trzech wariantów ułożenia w tym samym miejscu krystalograficznym wynosi odpowiednio 85:5:10. Struktura dominującego składnika kryształu jest przedstawiona na Rys.56a, natomiast na Rys.56b pokazano nakładanie się trzech składników zajmujących to samo miejsce w sieci krystalograficznej.



Rys.56. (a) Perspektywiczny widok cząsteczki związku **41A** występującej w kryształach wraz z numeracją atomów. (b) Nakładanie się trzech składników kryształu zajmujących to samo miejsce krystalograficzne, będące wynikiem nieuporządkowania pozycyjnego i substytucyjnego. (źródło: *Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential*, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)

Upakowanie przestrzenne związku **41A** różni się diametralnie od upakowania przestrzennego związku **37**. Zamiast warstw cząsteczki łączą się ze sobą czołowo (face-stacking), tworząc kolumnowe stosy (Rys.57a i Rys.57b). Kolumny te układają się w przestrzeni, tworząc trójwymiarową strukturę przypominającą siatkę (grid-like structure) (Rys. 57c).



Rys.57. (a) Słupowa struktura utworzona przez cząsteczki związku **41A**. Zielony i różowy kolor odróżnia dwa typy nakładania się cząsteczek; (b) widok prostopadły do stosu ilustruje stopień częściowego pokrycia cząsteczek; (c) struktura krystaliczna widziana wzdłuż osi [001] ukazuje układ 'siatki' stosów nachylonych do siebie pod kątem $59,2^\circ$. Dla przejrzystości pokazano tylko główny składnik nieuporządkowania. (źródło: Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)

Podsumowując, mimo że obie cząsteczki są niemal całkowicie płaskie, tworzą w kryształach zupełnie różne układy. Związek **37** ma charakterystyczną warstwową strukturę, podczas gdy związek **41A** tworzy zorganizowaną, trójwymiarową sieć.

3.4.3 Ocena właściwości fizykochemicznych związków IV grupy

Parametry fizykochemiczne nowo zsyntetyzowanych związków, ich zdolność do przekraczania bariery krew–mózg, wchłanianie przez układ pokarmowy oraz rozpuszczalność w wodzie przedstawiono poniżej w tabelach 9 i 10.

Tabela 9. Przewidywane właściwości fizykochemiczne syntetyzowanych związków obliczone za pomocą platformy SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 14 stycznia 2025)

Nr	MW [g/mol]	LogP	HBD	HBA	TPSA [Å²]	GI Abs	BBB Perm	Reguła Lipńskiego
29	260	0.13	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
30	274	0.59	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
31	288	0.90	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
32	302	1.20	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
33	302	1.21	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
34	353	1.28	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
35	284	0.62	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
36	364	0.73	0	5	103.43	Wysoka	Nie	Tak
37	290	0.39	0	5	88.87	Wysoka	Nie	Tak
38	288	-0.05	0	5	96.71	Wysoka	Nie	Tak
39	300	0.98	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
40	326	0.31	1	5	108.32	Wysoka	Nie	Tak
41	342	1.61	0	4	107.88	Wysoka	Nie	Tak
42	370	2.17	0	4	79.64	Wysoka	Nie	Tak
43	366	1.63	0	5	88.87	Wysoka	Nie	Tak
44	396	1.64	0	6	98.63	Wysoka	Nie	Tak
45	434	2.61	0	8	88.87	Wysoka	Nie	Tak

MW – masa cząsteczkowa; HBA – liczba akceptorów wiązań wodorowych; HBD – liczba donorów wiązań wodorowych; PSA – powierzchnia polarna; GI abs. – Wchłanianie w przewodzie pokarmowym
BBB – przenikanie przez barierę krew–mózg

Tabela 10. Przewidywana rozpuszczalność w wodzie nowych hybryd kofeinowo-pyrazolowych obliczona za pomocą platformy SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) (dostęp 14 stycznia 2025)

Nr	LogS	Rozpuszczalność w wodzie	Klasa rozpuszczalności
29	-1.20	2.12*10 ¹	Rozpuszczalny
30	-1.47	9.24	Rozpuszczalny
31	-1.92	3.47*10 ¹	Rozpuszczalny
32	-2.26	1.66	Rozpuszczalny
33	-2.29	1.54	Rozpuszczalny
34	-2.57	9.45*10 ⁻¹	Rozpuszczalny
35	-1.35	1.20*10 ¹	Rozpuszczalny
36	-2.36	1.60	Rozpuszczalny
37	-1.60	7.22	Rozpuszczalny
38	-0.89	3.74*10 ¹	Rozpuszczalny
39	-1.69	6.12	Rozpuszczalny
40	-1.61	8.05	Rozpuszczalny
41	-3.11	2.63*10 ⁻¹	Rozpuszczalny
42	-3.47	1.27*10 ⁻¹	Rozpuszczalny
43	-2.97	3.89*10 ⁻¹	Rozpuszczalny
44	-3.15	2.83*10 ⁻¹	Rozpuszczalny
45	-3.93	5.12*10 ⁻²	Umiarkowanie rozpuszczalny

Otrzymane wyniki potwierdzają, że analizowane związki charakteryzują się korzystnym profilem fizyko-chemicznym. Wszystkie zbadane pochodne w pełni spełniają kryteria reguły Lipińskiego, co jest kluczowe w projektowaniu leków doustnych.

Powierzchnia polarna wszystkich związków wynosi mniej niż $140 \text{ \AA}^2$ (mieści się w przedziale od $79,64 \text{ \AA}^2$ do $108,32 \text{ \AA}^2$), co sugeruje ich zdolność przenikania przez błony biologiczne. Niska masa cząsteczkowa sprzyja temu procesowi. Większość badanych pochodnych ma niski parametr logP, oscylujący w granicach od -0,05 do 2,61, co wskazuje na ich hydrofilowy charakter. Związki te charakteryzują się również odpowiednią sztywnością cząsteczki – w badanych strukturach występują maksymalnie 4 wiązania rotacyjne, przy czym liczba ta nie powinna przekraczać 10 [150]. Cząsteczki posiadają relatywnie niewiele donorów wiązań wodorowych (0 lub 1) oraz odpowiednią liczbę akceptorów wiązań wodorowych (HBA w zakresie od 4 do 8). Wszystkie zsyntetyzowane związki charakteryzują się wysoką przyswajalnością z przewodu pokarmowego. Z drugiej strony, pomimo odpowiednich parametrów przenikalności (np. TPSA czy logP), żadna z pochodnych nie jest w stanie przekroczyć bariery krew–mózg. Ponieważ głównym celem syntezy tych hybryd jest ich potencjalne użycie jako inhibitorów enzymu AChE oraz przeciwko komórkom glejaka mózgu U87, niska przenikalność przez barierę krew–mózg (BBB) stanowi istotną przeszkodę w ich praktycznym zastosowaniu. Jednakże warto pamiętać, że obliczenia *in silico* opierają się na modelach statystycznych i są głównie narzędziami uzupełniającymi; nie stanowią one ścisłych barier dla kandydatów na leki.

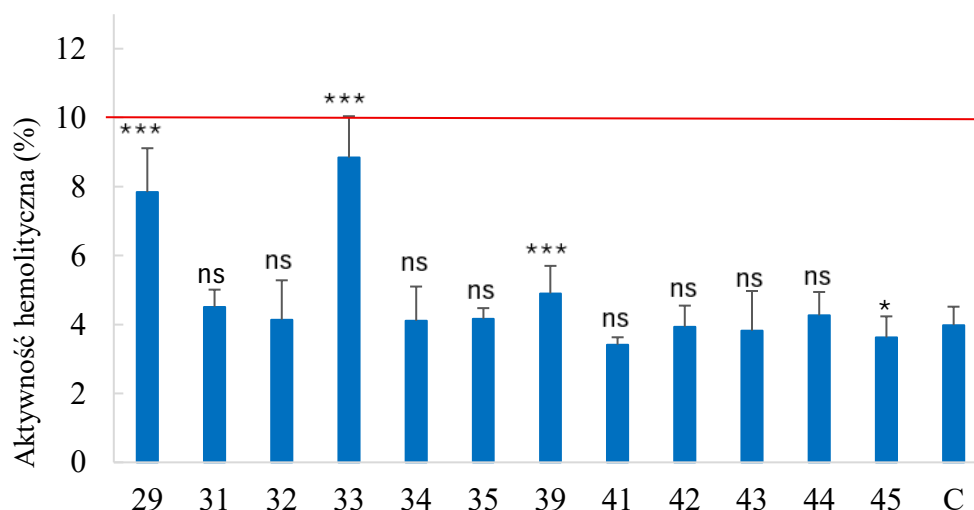
Dodatkowo kluczowym wyzwaniem przy opracowywaniu nowych związków bioaktywnych jest zapewnienie ich właściwej rozpuszczalności w wodzie, co ma istotne znaczenie dla wchłaniania, dystrybucji i biodostępności leku w organizmie [151]. Przeważająca większość związków została sklasyfikowana jako dobrze rozpuszczalna w wodzie (wartości LogS od -0,89 do -3,47). Jedynym odstępstwem jest najcięższy w grupie związek **44** (MW = 434 g/mol, LogS = -3,93), który został uznany za „umiarkowanie rozpuszczalny”.

3.4.4 Ocena aktywności biologicznej pochodnych IV grupy

Aktywność hemolityczna pochodnych IV grupy

Z powodu zróżnicowania rozpuszczalności otrzymanych związków nie wszystkie zostały uwzględnione w badaniach.

Większość przebadanych związków wykazała wysoką hemokompatybilność, powodując hemolizę na poziomie poniżej 5% przy stężeniu 0,1 mg/mL (Rys.58). Uznana w badaniu granica hemokompatybilności wynosi 10%, co oznacza, że badane związki są bezpieczne dla erytrocytów ludzkich. Najniższy poziom aktywności odnotowano dla związku **41** ($3,41\% \pm 0,22$), który zawiera pierścień pirazolu podstawiony grupą tiofenową. Tylko dwie z badanych pochodnych przekroczyły barierę 5% hemolizy. Był to związek **33** ($8,84\% \pm 1,20$), zawierający pierścień pirazolu z grupą izopropylową w pozycji C-3 oraz związek **29** ($7,84\% \pm 1,27$), posiadający niepodstawiony pierścień pirazolowy. Otrzymane wyniki wyraźnie wskazują, że na aktywność hemolityczną wpływ ma nie tylko sama obecność danego podstawnika, ale także jego dokładne położenie w pierścieniu pirazolu. Najlepiej obrazuje to przykład pochodnych z grupą izopropylową. Gdy podstawnik ten znajduje się w pozycji C-3 (związek **33**), wywołuje najwyższą hemolizę w całej grupie (8,84%). Obecność tego podstawnika w pozycji C-4 (związek **32**) powoduje spadek aktywności hemolitycznej o ponad połowę do wartości 4,14%.

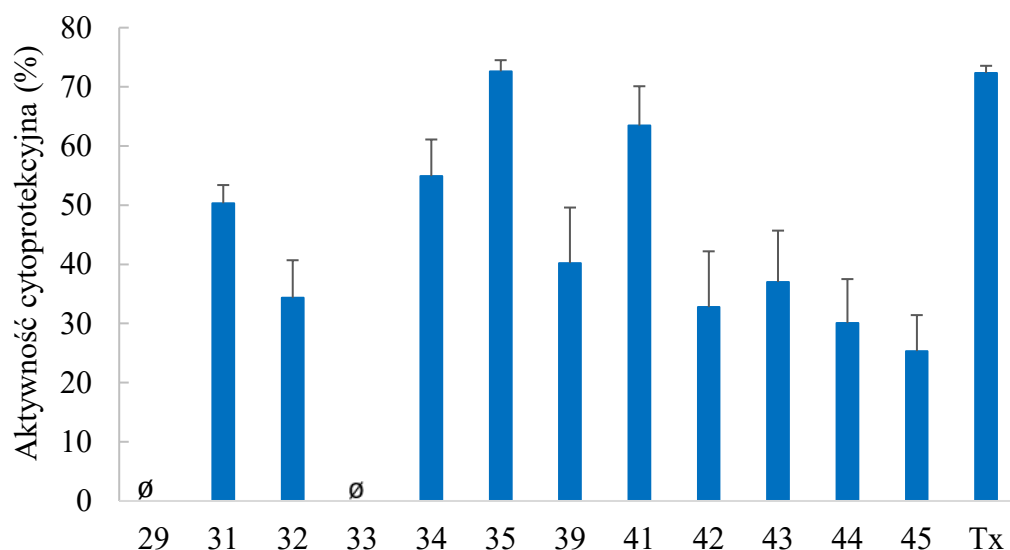


Rys.58. Wykres aktywności hemolitycznej wybranych związków spośród **28–45** w stężeniu 0,1 mg/mL. 60 min., 37 °C. Przedstawione wyniki są wartościami średnimi $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$), C – kontrola, RBC w buforze PBS. Czerwona linia na poziomie 10% wskazuje granicę hemokompatybilności związków

Ocena właściwości cytoprotekcyjnych związków IV grupy względem erytrocytów ekspozowanych na działanie AAPH

Wartości aktywności cytoprotekcyjnej pochodnych z grupy **29–45** przedstawiłem na Rys.59. Spośród przebadanych związków najwyższą aktywność cytoprotekcyjną ($72,62\% \pm 1,89$) wykazał związek **35**, zawierający pierścień pirazolu z grupą etynyłową w pozycji C-4. Wynik ten jest niemal identyczny z wartością otrzymaną dla referencyjnego antyoksydantu Troloxu ($72,33\% \pm 1,22$). Pochodna **41**, z pierścieniem pirazolu podstawionym grupą tiofenu, zapewniła ochronę na poziomie $63,44\% \pm 6,66$. Związek **34**, posiadający pierścień 3-bromo-5-metylo-pirazolowy, wykazał protekcję na poziomie $54,90\% \pm 6,20$. Dla porównania, najniższą aktywność cytoprotekcyjną odnotowano dla związku **45** ($25,33\% \pm 6,09$). Ponadto badania wykazały, że związki **29** (z niepodstawionym pierścieniem pirazolowym) oraz **33** (z grupą izopropylową w pozycji C-3), które powodowały największą hemolizę, w ogóle nie wykazały działania ochronnego przed stresem oksydacyjnym (oznaczone jako $\emptyset$).

Analiza wyników jednoznacznie wskazuje, że precyzyjny dobór rodzaju podstawnika oraz jego położenie w pierścieniu pirazolu są kluczowe w procesie projektowania związków o właściwościach antyoksydacyjnych, które nie uszkadzają błony komórkowej.



Rys.59. Wykres aktywności cytoprotekcyjnej wybranych pochodnych spośród związków **29–45** w stężeniu $0,1 \text{ mg/mL}$ w warunkach stresu oksydacyjnego (60 mM AAPH , 240 min , 37°C). Wyniki przedstawione jako średnia wartość $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$) w porównaniu z aktywnością wzorca Troloxu (Tx) (***) $p < 0.001$

Badania inhibicji enzymów: acetylocholinoesterazy (AChE) i α -glukozydazy (α -Glu)

Wyniki badań inhibicji enzymów AChE oraz α -glukozydazy przedstawiono na Rys. 60. Wartości IC_{50} inhibicji AChE dla badanych związków mieściły się w przedziale od $2,193 \pm 0,145$ do $4,277 \pm 1,028$ μ M. Spośród przebadanych związków pochodna **36**, zawierająca pierścień 4-bromo-5-cyjanopirazolowy, okazała się najsilniejszym inhibitorem AChE ($IC_{50} = 2,193 \pm 0,145$ μ M), działając skuteczniej niż lek referencyjny – 2,4-dinitrofenol (DNP, $IC_{50} = 2,475 \pm 0,387$ μ M). Najmniej skutecznym inhibitorem był związek **38** z grupą formylową ($IC_{50} = 4,277 \pm 1,028$ μ M), wykazujący działanie dwukrotnie słabsze niż pochodna **36**.

Porównując wartości IC_{50} związków **29** (4-metylopirazol, $IC_{50} = 4,100 \pm 0,148$ μ M), **30** (4-etylopirazol, $IC_{50} = 3,347 \pm 0,495$ μ M) oraz **31** (4-izopropylpirazol, $IC_{50} = 4,250 \pm 0,681$ μ M), można zauważyć, że rodzaj łańcucha alkilowego w pierścieniu pirazolu wpływa na ich aktywność.

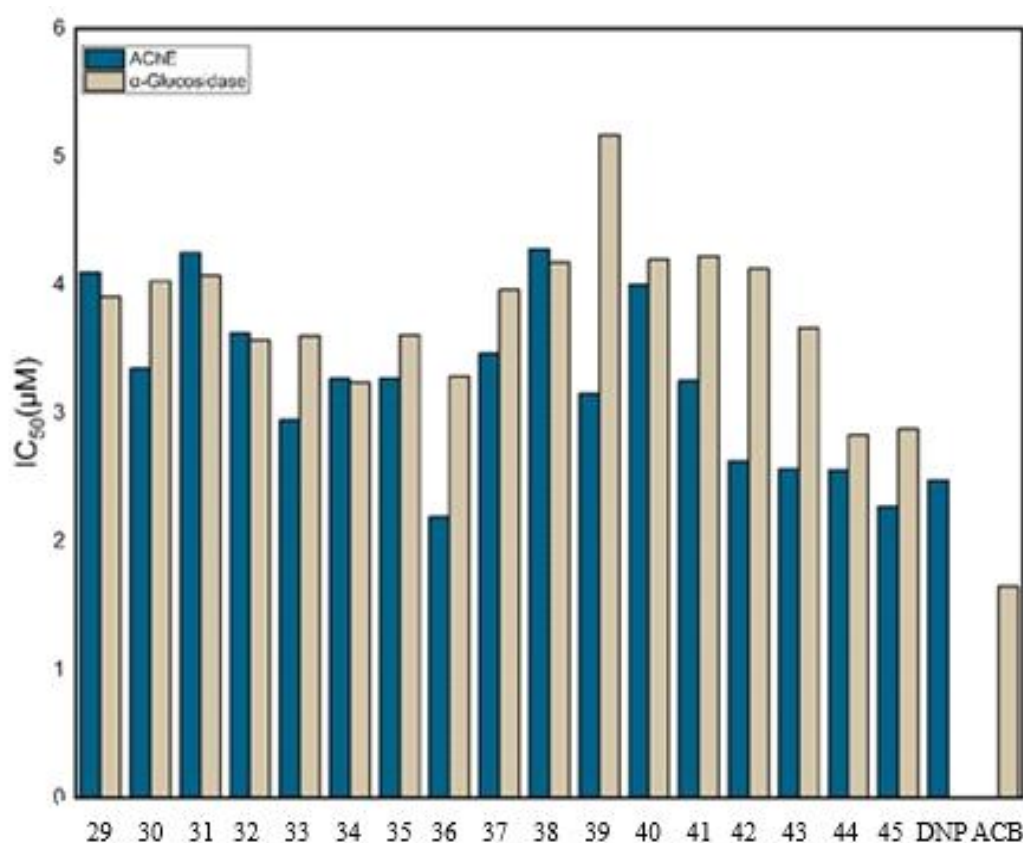
Porównanie aktywności związków **36** (z grupą cyjanową –CN, $IC_{50} = 2,193 \pm 0,145$ μ M), **38** (z grupą formylową –CHO, $IC_{50} = 4,277 \pm 1,028$ μ M) i **40** (dwa pierścienie pirazolowe, $IC_{50} = 4,005 \pm 1,105$ μ M) pokazuje, że wpływ na inhibicję acetylocholinesterazy zależy w dużej mierze od rodzaju i położenia podstawników. Ze względu na charakter elektronowoakceptorowy i niewielką objętość steryczną grupy cyjanowej, związek **36** wykazał znacznie silniejszą inhibicję enzymu — około dwukrotnie większą niż związek **38** z grupą formylową oraz około 1,85 raza większą niż związek **40** zawierający dwa pierścienie pirazolowe.

Wartości IC_{50} inhibicji α -glukozydazy dla analizowanych koniugatów mieściły się w zakresie od $2,828 \pm 1,098$ do $5,171 \pm 1,125$ μ M, co wskazuje, że badane związki wykazywały mniejszą aktywność w porównaniu z wzorcem, tj. akarbozą ($IC_{50} = 1,650 \pm 0,782$ μ M). Najsilniejsze hamowanie α -glukozydazy wykazały związki **44** ($IC_{50} = 2,828 \pm 1,098$ μ M) oraz **45** ($IC_{50} = 2,875 \pm 0,291$ μ M), natomiast najmniej aktywny okazał się związek **39** ($IC_{50} = 5,171 \pm 1,125$ μ M).

Analiza wartości IC_{50} dla związków **36**, **38** i **40** wykazała odmienną zależność strukturalną niż w przypadku AChE. Obecność podstawnika cyjanowego w związku **36** nie podniosła znacząco efektywności hamowania α -glukozydazy; aktywność była tylko około 1,3-krotnie wyższa niż w przypadku związków **38** i **40**. Oznacza to, że obecność grupy cyjanowej bardziej sprzyja oddziaływaniu z AChE niż z α -glukozydazą.

Pochodne **42–45** charakteryzują się najbardziej zrównoważonym profilem działania wobec obu analizowanych enzymów. Jest to szczególnie widoczne dla pochodnych **44** ($IC_{50} = 2,557 \pm 1,045 \mu M$ dla AChE oraz $2,828 \pm 1,098 \mu M$ dla α -glukozydazy) i **45** ($IC_{50} = 2,272 \pm 0,185 \mu M$ dla AChE oraz $2,875 \pm 0,291 \mu M$ dla α -glukozydazy).

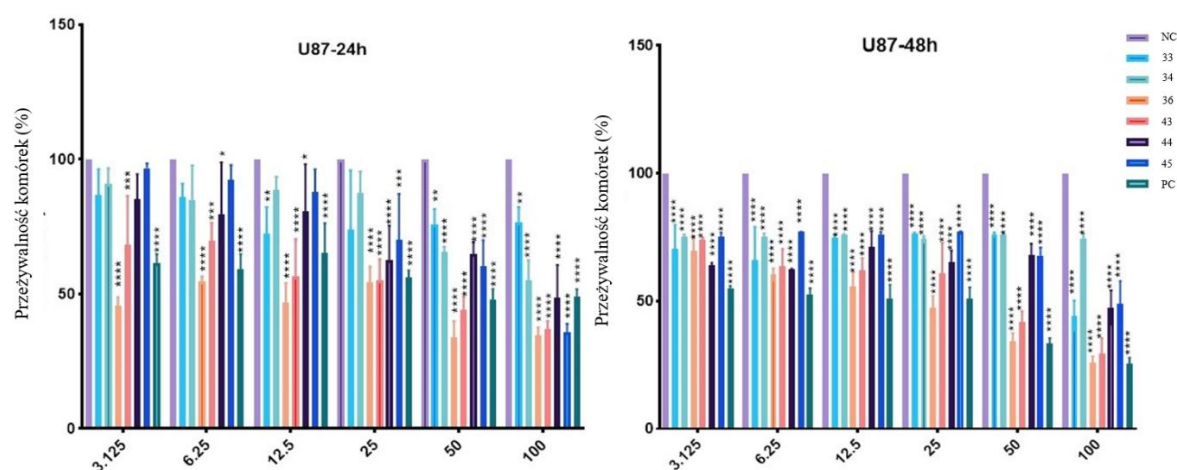
Pochodna **42**, zawierająca atom chloru ($IC_{50} = 2,625 \pm 0,4 \mu M$), wykazała nieznacznie słabszą inhibicję enzymu AChE, o około 1,1 raza w porównaniu ze związkiem **44**, z podstawnikiem metoksyowym ($IC_{50} = 2,557 \pm 1,045 \mu M$). To sugeruje, że elektrodonorowe grupy metoksyowe mogą nieznacznie zwiększać powinowactwo do enzymu AChE, prawdopodobnie poprzez zwiększenie gęstości elektronowej w obrębie układu aromatycznego [152].



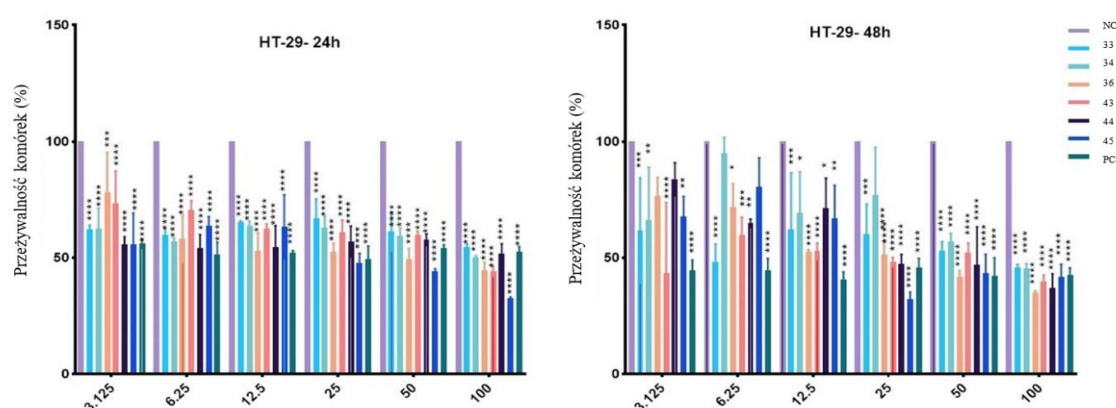
Rys. 60. Zdolność inhibicji enzymów AChE i α -Glu przez związki **29–45** względem wzorca DNP (dinitrofenolu) dla AChE oraz ACB (akarbozy) dla α -Glu (źródło: *Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential*, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)

Aktywność cytotoksyczna pochodnych IV grupy wobec komórek nowotworowych

Wstępne określenie aktywności cytotoksycznej wybranych hybryd kofeinowo-pirazolowych przeprowadzono metodą wizualizacji komórek (MTT). Testy wykonano na dwóch liniach komórkowych: U87 (komórkach glejaka mózgu) oraz HT29 (komórkach nowotworu jelita grubego), analizując cytotoksyczność po 24 i 48 godzinach ekspozycji. Jako lek referencyjny zastosowano 5-fluorouracyl. Wyniki badań przedstawiono na rysunkach 61 i 62, zamieszczonych poniżej.



Rys.61. Wykresy procentowej żywotności komórek nowotworowych U87 po 24 i 48 godzinach w obecności wybranych związków. PC oznacza kontrolę dodatnią (5-Fluorouracyl), a NC — kontrolę ujemną. (**** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,0005$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) (źródło: Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)



Rys.62. Wykresy procentowej żywotności komórek nowotworowych HT-29 po 24 i 48 godzinach w obecności wybranych związków. PC oznacza kontrolę dodatnią (5-Fluorouracyl), a NC — kontrolę ujemną. (**** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,0005$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$) (źródło: Caffeine-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and biological evaluation of their hemolytic activity, antioxidant activity, enzyme inhibitory effects, and anticancer potential, K. Ostrowski, B. Jasiewicz, B. Warżajtis, L. Mrówczyńska, F. Türkan, E. Oguz, A. Cetin, praca w przygotowaniu)

Otrzymane wyniki wskazują, że najwyższym potencjałem cytotoksycznym względem linii U87 (glejaka mózgu) wykazał się związek **36** którego wartości IC_{50} wynosiły 15,22 μM i 17,11 μM , kolejno po 24 i 48 godzinach ekspozycji. Pochodna ta po 24 godzinach ekspozycji była około 2,6-krotnie silniejsza niż fluorouracyl, dla którego IC_{50} wynosi 40,05 μM . Taka skuteczność związku może wynikać z silnego efektu elektroakceptorowego podstawników oraz z planarnej struktury cząsteczki. Związek **43**, zawierający podstawnik 2-metoksybenzenowy, był drugim najefektywniejszym związkiem o działaniu cytotoksycznym. Jego wartości IC_{50} wynosiły 37,8 μM po 24 godzinach i 26,76 μM po 48 godzinach. Prawie 1,5-krotne zwiększenie aktywności po 24 godzinach sugeruje, że mechanizm jego działania opiera się na czasowej, kumulacyjnej cytotoksyczności wobec komórek U87. Należy również podkreślić, że związek ten wykazywał niską cytotoksyczność wobec erytrocytów ludzkich. Pozostałe z badanych związków wykazały niską aktywność, osiągając wysokie wartości IC_{50} : związek **33** – (24h- IC_{50} = 153,8 μM , 48h- IC_{50} = 76,38 μM), związek **34** – (24h- IC_{50} = 194,3 μM , 48h- IC_{50} = 147 μM), związek **44** – (24h- IC_{50} = 136 μM , 48h- IC_{50} = 78,69 μM).

Wyniki cytotoksyczności związków względem linii HT29 wskazują, że ich mechanizmy działania różnią się od tych obserwowanych na linii U87, co odzwierciedla wpływ rodzaju nowotworu na biologiczną aktywność badanych związków. Związek **36** okazał się najskuteczniejszy w tym przypadku, osiągając IC_{50} = 51,89 μM po 24 h i IC_{50} = 47,07 μM po 48 h, co oznacza, że jego aktywność jest około 3,5-krotnie niższa w porównaniu z linią U87. Kolejnym skutecznym związkiem był związek **44**, zawierający podstawnik 1,4-dimetoksybenzenowy, z IC_{50} = 42,17 μM po 24 h i IC_{50} = 48,14 μM po 48 h. Wartości te są zbliżone do wartości wzorca.

Powyższe wyniki wskazują na związek między rodzajem podstawnika w pierścieniu pirazolowym a zaobserwowaną cytotoksycznością. Rodzaj podstawnika wpływa na właściwości elektronowe cząsteczki oraz jej potencjalną zawadę przestrzenną, co może wpływać na skuteczność transportu tych substancji przez błony komórkowe, na przykład przez błonę komórkową U87. Aktywność poszczególnych pochodnych zależy także od rodzaju linii komórkowej. Na przykład związek **44** wykazał słabe właściwości cytotoksyczne wobec glejaka mózgu (U87), lecz w przypadku nowotworu jelita grubego (HT29) jego aktywność znacznie wzrosła, osiągając poziom porównywalny z aktywnością 5-fluorouracylu.

4. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

4.1 Odczynniki

Odczynniki wykorzystane do syntez laboratoryjnych zostały pozyskane z różnych źródeł.

Grupa I – Większość substratów (pochodnych uracylowych i tiouracylowych) została pozyskana drogą komercyjną (Sigma-Aldrich/Merck; czystość 95–99%). Substraty przeznaczone do syntezy związków **4** i **7** zostały otrzymane w ramach współpracy z prof. UAM dr hab. Wiesławem Pukałą. Przed rozpoczęciem procesu syntezy przeprowadzono również analizy chromatograficzne oraz spektroskopowe, które potwierdziły czystość otrzymanych związków.

Grupa II – Pochodne stilbenolu zostały otrzymane w ramach współpracy z prof. UAM dr hab. Wiesławem Pukałą. Przed rozpoczęciem syntezy przeprowadzono analizę chromatograficzną oraz spektroskopową, potwierdzającą czystość otrzymanych związków.

Grupa III – Wszystkie użyte odczynniki podczas syntezy zostały nabyte drogą komercyjną od firmy Sigma-Aldrich/Merck o czystości 95–99%.

Grupa IV – Odczynniki zostały nabyte od firm Sigma-Aldrich/Merck, Angene Chemical, Fluorochem, Apollo Scientific oraz BLBpharm. Czystość nabytych odczynników mieściła się w zakresie od 90% do 98%.

4.2 Metody

Wszystkie syntezy zostały przeprowadzone w Zakładzie Produktów Bioaktywnych Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Przeprowadziłem samodzielną analizę spektroskopii w podczerwieni. Widma zostały zarejestrowane na urządzeniu Nicolet iS 5 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), z użyciem tła KBr. Dalsze analizy spektroskopowe i pomiary wykonano w Centralnym Laboratorium Aparaturowo-Badawczym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

NMR

Widma ^1H NMR oraz ^{13}C NMR związków otrzymanych w ramach pracy doktorskiej zarejestrowano na spektrometrze Varian 400, z użyciem CDCl_3 lub $\text{DMSO}-d_6$ jako

rozpuszczalników oraz TMS (tetrametylosilan) jako wzorca wewnętrznego. Przesunięcia chemiczne zarejestrowano w jednostkach ppm (*parts per million*).

EI-MS

Widma masowe EI zarejestrowano na spektrometrze Bruker 320MS/420GCGC-MS.

ESI-MS

Widma masowe ESI zarejestrowano na chromatografie Waters HPLC/MS.

Analiza elementarna

Analiza elementarna (zawartość pierwiastków: węgla, wodoru, azotu, tlenu i siarki) została wykonana na aparacie Vario EL III (Shimadzu, Kyoto, Japonia).

Postęp reakcji kontrolowałem chromatograficznie, wykorzystując chromatografię cienkowarstwową (TLC). Chromatografia cienkowarstwowa była wykonywana na płytkach pokrytych żelom krzemionkowym (silica gel) 60 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) ze wskaźnikiem fluorescencyjnym (254 nm) i wizualizowana pod światłem UV. Skład użytych eluentów podczas analizy różnił się, w zależności od grupy syntetyzowanych związków:

Grupa I

- Faza PE: EtOAc 3:7 (eter naftowy : octan etylu 3:7) używana była podczas syntezy 8-bromokofeiny, 8-tiokofeiny oraz związków **1–8**
- Faza CHCl₃: EtOAc, 1:1 została użyta w trakcie monitorowania syntezy związków **GIa–GI_f**
- Faza CHCl₃: MeOH 15:1 posłużyła do analizy związku **GI_g**

Grupa II

- Faza CHCl₃: AcOEt 1:1 służyła do monitorowania przebiegu syntez związków **9–20**

Grupa III

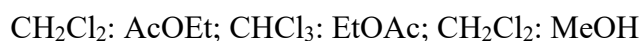
- Faza PE: EtOAc 3:7 (eter naftowy : octan etylu 3:7) używana była podczas syntezy 8-bromokofeiny oraz związków **21–28**

Grupa IV

- Faza PE: EtOAc 3:7 (eter naftowy : octan etylu 3:7) używana była podczas syntezy 8-bromokofeiny oraz związków **29–45**

Oczyszczanie związków z zastosowaniem chromatografii kolumnowej

Syntezę kończyłem oczyszczaniem surowego produktu z pozostałości substratów lub produktów ubocznych, wykorzystując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej z żelem krzemionkowym jako fazą stacjonarną o ziarnistości (60–200 Å); fazę ruchomą stanowiła natomiast mieszanina rozpuszczalników organicznych o składzie zależnym od oczyszczanego związku. W trakcie pracy użyłem następujących eluentów do gradientowej chromatografii kolumnowej:



Otrzymane i oczyszczone związki zostały poddane serii badań biologicznych.

We współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu zbadano aktywność hemolityczną, cytoprotekcyjną oraz chelatującą jony Fe^{2+} .

We współpracy z Katedrą Gleboznawstwa i Mikrobiologii Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego określono aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną.

We współpracy z Wydziałem Chemii Uniwersytetu Van Yüzüncü Yıl w Van, w Turcji, określono cytotoksyczność pochodnych wobec linii komórkowych U87 i HT29 oraz ich zdolność do inhibicji enzymów: acetylocholinoesterazy (AChE) i α -glukozydazy.

4.2.1 Procedury metodyki badania aktywności biologicznej otrzymanych związków

Przygotowanie czerwonych krwinek ludzkich

Wszystkie metody przeprowadzono zgodnie z odpowiednimi wytycznymi i przepisami, a Komisja Bioetyczna zatwierdziła wszystkie protokoły eksperymentalne dotyczące badań naukowych na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (nr umowy ZP/2867/D/21). Koncentraty ludzkich czerwonych krwinek (RBC) (65% hematokrytu) zakupiono w Banku Krwi w Poznaniu bez kontaktu z dawcami krwi. RBC płukano trzykrotnie (3000 obr./min, 10 min, +4 °C) w roztworze soli fizjologicznej i buforu fosforanowego o pH 7,4 (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 i 1,76 mM KH_2PO_4) z dodatkiem 10 mM glukozy. Po przemyciu erytrocyty zawieszono w buforze PBS w stężeniu $1,65 \times 10^9$ komórek/ml (15% hematokrytu), przechowywano w temperaturze +4 °C i zużyto w ciągu 5 godzin.

Badania aktywności hemolitycznej

Aktywność hemolityczną nowo zsyntetyzowanych związków badano zgodnie z protokołem [153]. Krwinki czerwone ($1,65 \times 10^8$ komórek/ml, 1,5% hematokrytu) inkubowano z badanymi związkami w stężeniu 0,01 mg/ml przez 60 minut w temperaturze 37°C, z wytrząsaniem. Krwinki czerwone inkubowane w buforze PBS oraz w lodowatej wodzie stanowiły odpowiednio kontrolę negatywną i pozytywną. Każdą próbkę przygotowano trzykrotnie, a eksperyment przeprowadzono również trzykrotnie. Po inkubacji próbki natychmiast umieszczono w lodzie, aby zahamować proces hemolizy. Następnie do każdej próbki dodano odpowiednią objętość buforu PBS, aby uzyskać wystarczającą objętość supernatantu do pomiaru absorbancji (Ab). Po wirowaniu (4000 obr./min, 5 min, +4°C) absorbancję supernatantów mierzono przy 540 nm za pomocą spektrofotometru. Aktywność hemolityczną każdego związku obliczono według wzoru:

$$\text{Aktywność hemolityczna (\%)} = \text{Ab}_{\text{próbka badana}} / \text{Ab}_{\text{kontrola pozytywna}} \times 100$$

Gdzie pozytywna kontrola to absorbancja supernatantu RBC w lodowatej wodzie (100% hemolizy). Wyniki przedstawiono jako średnia wartość $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$)

Badania aktywności cytoprotekcyjnej

Krwinki czerwone ($1,65 \times 10^8$ komórek/mL, 1,5% hematokrytu) poddano wstępnej inkubacji (wytrząsanie przez 20 min w temperaturze 37°C) w buforze PBS (pH 7,4) uzupełnionym o 10 mmol glukozy oraz o badane związki w stężeniu 0,01 mg/mL. Jako standard zastosowano Trolox (rozpuszczalną w wodzie pochodną witaminy E) w tym samym stężeniu (0,01 mg/mL). Po wstępnej inkubacji dodano 1 M dichlorowodorku 2,2'-azobis[2-metylopropionamidyny] (AAPH), hydrofilowego generatora wolnych rodników, w celu uzyskania stężenia końcowego 60 mmol/ml. Każdą próbkę przygotowano trzykrotnie; próby również powtarzano trzykrotnie. Próbkę inkubowano przez kolejne 240 minut, wytrząsając je w temperaturze 37°C. Krwinki czerwone inkubowane w samym buforze PBS oraz w obecności AAPH posłużyły jako kontrola negatywna i pozytywna. Po inkubacji próbki natychmiast umieszczono na lodzie, aby zahamować hemolizę wywołaną stresem oksydacyjnym. Następnie do każdej próbki dodano odpowiednią objętość buforu PBS, aby uzyskać wystarczającą objętość supernatantu do pomiaru absorbancji (Ab). Po odwirowaniu (4000 obr./min, 5 min, +4°C) absorbancję supernatantów mierzono przy 540 nm za pomocą spektrofotometru. Hamowanie hemolizy indukowanej AAPH przez badane związki i Trolox obliczono za pomocą następującego równania:

$$\text{Hamowanie hemolizy oksydacyjnej (\%)} = 100 - [(Ab_{\text{próbka+AAPH}} / Ab_{\text{AAPH}}) \times 100]$$

gdzie $Ab_{\text{próbka}}$ to wartość absorbancji uzyskana z próbek inkubowanych z badanymi związkami lub Troloxem i AAPH, Ab_{AAPH} to wartość absorbancji uzyskana z próbek inkubowanych wyłącznie z AAPH. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$).

Badania zdolności chelatowania jonów żelaza (II)

Aktywność chelatującą oceniano poprzez hamowanie tworzenia kompleksu ferrozyny z jonami Fe^{2+} po inkubacji badanych związków z jonami Fe^{2+} . Eksperyment przeprowadzono dwukrotnie. Zdolność chelatowania Fe^{2+} określono na podstawie absorbancji kompleksu przy 562 nm. Do roztworu $FeCl_2$ o stężeniu 0,6 mM (0,02 mL) dodano badane związki w stężeniu 0,1 mg/mL w 0,2 ml EtOH. Jako standardowy środek chelatujący zastosowano EDTA. Reakcję rozpoczęto od dodania 5 mmol ferrozyny (0,04 mL) w EtOH, a następnie natychmiast energicznie wytrząsano. Próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po inkubacji absorbancję (Ab) roztworów mierzono spektrofotometrem przy 562 nm. Procent zahamowania tworzenia kompleksu ferrozyna- Fe^{2+} obliczono za pomocą równania:

$$\text{Aktywność chelatująca } Fe^{2+} (\%) = [1 - (Ab_1 - Ab_0)] \times 100$$

gdzie Ab_0 to absorbancja próbki bez badanego związku, a Ab_1 to absorbancja w obecności badanego związku lub EDTA. Wyniki przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 9$).

Badania aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej

Aktywność przeciwgrzybiczą związków oznaczono wobec *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* i *Botrytis cinerea*. Właściwości przeciwbakteryjne związków oznaczono wobec wybranych bakterii: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens*. Wszystkie kultury mikroorganizmów uzyskano z kolekcji czystych kultur Katedry Mikrobiologii Wydziału Gleboznawstwa i Mikrobiologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Do oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych związków zastosowano metodę dyfuzji studzienkowej. Do testów bakteryjnych użyto pożywki bulionowej, a do hodowli pleśni agaru ziemniaczano-dekstrozowego (PDA). Następnie 6 mL każdej z płynnych pożywek wylano na sterylne szalki Petriego i pozostawiono do zestalenia. W kolejnym kroku na powierzchni każdej płytki umieszczono dwa sterylne szklane pierścienie o średnicy 0,5 cm, dodano 20 ml każdego płynnego podłoża zawierającego zawiesiny

testowanych mikroorganizmów. Końcowa zawiesina bakteryjna miała gęstość 107 komórek/cm³, uzyskaną w wyniku 48-godzinnych hodowli na pożywce, a zawiesina grzybów miała gęstość 108 zarodników/cm³, uzyskaną w wyniku 5-dniowych hodowli na PDA. Po zestaleniu się podłoża szklane pierścienie usunięto ołówkiem, pozostawiając po dwa dołki na każdej płytce. Następnie do jednego dołka dodano 0,1 mL związku rozpuszczonego w czystym DMSO; drugi dołek zawierał czyste DMSO i służył jako kontrola. Każdy związek badano w czterech powtórzeniach. Płytki inkubowano w termostacie w temperaturze 27°C w przypadku hodowli *M. luteus*, *B. subtilis* i *P. fluorescens*, a także w temperaturze 37°C w przypadku hodowli *E. coli* przez 48 godzin. Wszystkie hodowle grzybów inkubowano w termostacie w temperaturze 24°C przez pięć dni. Po zakończeniu inkubacji średnice zahamowanego wzrostu badanych szczepów zmierzono suwmiarką.

Analiza statystyczna

W przypadku właściwości antyoksydacyjnych i cytoprotekcyjnych dane przedstawiono jako wartość średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD) wyników trzech niezależnych eksperymentów, przy czym każdą próbkę pobrano trzykrotnie ($n = 9$). Do porównania aktywności pochodnych z aktywnością wzorców, odpowiednio Troloxu lub EDTA, zastosowano sparowany test *t*-Studenta. Istotność statystyczną zdefiniowano jako $p < 0,05$. Różnica nieistotna statystycznie jest oznaczona jako n.s.

Analiza struktur krystalograficznych

Pomiar dyfrakcji rentgenowskiej pojedynczego kryształu przeprowadzono z monochromatycznym promieniowaniem CuK α na dyfraktometrze Bruker D8 QUEST KAPPA z detektorem Bruker PHOTON III CPAD. Dane przetworzono za pomocą oprogramowania SAINT V8.41 [154]. Strukturę kryształu rozwiązano metodami bezpośrednimi za pomocą oprogramowania SHELXT-2018/2 [155] oraz SHELXL [156].

Przygotowanie linii komórek nowotworowych

Ludzką linię komórkową glejaka wielopostaciowego U87 MG (HTB-14) oraz ludzką linię komórkową gruczolakoraka jelita grubego HT-29 (HTB-38) dostarczył Wydział Biologii Medycznej Uniwersytetu Van Yüzüncü Yıl w Turcji. Komórki hodowano w kolbach do hodowli tkankowej T-25 i T-75 zawierających minimalną pożywkę esencjalną Eagle'a (EMEM) uzupełnioną o 10% surowicę płodową bydlęcą (FBS), 1% penicylinę i streptomycynę oraz 1% L-glutaminę. Pożywkę hodowlaną wymieniano 2–3 razy w tygodniu, aby zapewnić

optymalne warunki wzrostu. Wszystkie procedury związane z hodowlą komórek, w tym namnażanie i subkulturowanie, przeprowadzano w warunkach sterylnych w komorze bezpieczeństwa biologicznego klasy II. Komórki inkubowano w temperaturze 37°C w nawilżonej atmosferze zawierającej 5% CO₂ do momentu osiągnięcia odpowiedniej konfluencji. W celu rutynowego pasażowania komórki przylegające oddzielano za pomocą roztworu trypsyny z EDTA. Żywotność i liczbę komórek oceniano za pomocą testu wykluczenia błękitu trypanowego. Przed 48-godzinnymi badaniami cytotoksyczności przeprowadzono testy proliferacji w celu określenia optymalnej gęstości wysiewu dla każdej linii komórkowej. Komórki rozcieńczano szeregowo i wysiewano do 96-dołkowych mikropłytek w gęstościach od 1×10^5 do $1,5625 \times 10^3$ komórek na dołek w końcowej objętości 100 µL. Po 96 godzinach inkubacji do każdej studzienki dodano 10 µl odczynnika tetrazoliowego WST-8, a płytki inkubowano przez kolejne 30 minut w temperaturze 37°C. Wartości absorbancji zmierzono przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Proliferację komórek określono ilościowo na podstawie danych dotyczących absorbancji przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism. [152, 157]

Badania cytotoksyczności

Związki organiczne wykorzystane w niniejszym badaniu (5 mg) rozpuszczono w 5 mL DMSO w celu przygotowania roztworów macierzystych, które przechowywano w temperaturze -80°C do momentu użycia. Po określeniu żywotności komórek i zliczeniu ich liczby metodą wykluczenia błękitu trypanowego, komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w zoptymalizowanych gęstościach ustalonych we wstępnych eksperymentach dotyczących proliferacji. Zabiegi przeprowadzono w trzech powtórzeniach w zakresie stężeń od 5 nM do 100 µM, a eksperymenty wykonano dla okresów ekspozycji wynoszących 24 i 48 godzin. Po początkowym 24-godzinnym okresie przylegania komórek pożywkę hodowlaną ostrożnie usunięto i zastąpiono świeżą pożywką zawierającą badane związki w końcowym stężeniu 100 µM, przygotowaną w DMSO. Następnie komórki inkubowano przez wyznaczone czasy ekspozycji (24 i 48 h). Pod koniec każdego okresu inkubacji do każdej studzienki dodano 10 µL odczynnika WST-8, a płytki inkubowano dalej w temperaturze 37°C przez 30 minut, aby umożliwić powstawanie pomarańczowego produktu formazanu. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy 450 nm, a żywotność komórek obliczano poprzez porównanie grup poddanych działaniu związków z grupami kontrolnymi, w których nie występował związek aktywny [158, 159]. Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w trzech powtórzeniach, aby

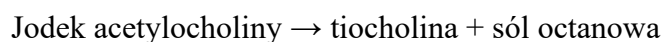
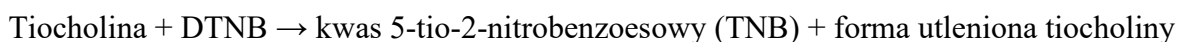
zapewnić powtarzalność wyników. Wartości IC_{50} określono za pomocą oprogramowania GraphPad Prism.

Żywotność komórek (%) została określona zgodnie z poniższym równaniem:

$$\text{Żywotność komórek (\%)} = (A_{\text{próbka}} / A_{\text{kontrola}}) \times 100$$

Badania inhibicji acetylocholinoesterazy

Aktywność enzymatyczną oznaczono spektrofotometrycznie metodą Ellmana [160]. W tym teście tiocholina reaguje z 5,5'-ditiabis(kwasem 2-nitrobenzoesowym) (DTNB), co prowadzi do powstania kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego (TNB), anionu o żółtej barwie. Szybkość tworzenia się TNB, która jest wprost proporcjonalna do aktywności AChE, monitorowano poprzez pomiar absorbancji przy 412 nm [161, 162]. Reakcję tę można podsumować w następujący sposób:



Badania inhibicji alfa-glukozydazy

Aktywność hamującą α -glukozydazy badanych związków organicznych oceniono zgodnie ze zmodyfikowaną procedurą opisaną przez Bachhawat i in. (2011) [163]. Efekty hamujące określono metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem p-nitrofenylo- α -D-glukopiranozydu (pNPG) jako substratu. Mieszanina reakcyjna zawierała bufor fosforanowy (50 mM, pH 6,9), roztwór enzymu α -glukozydazy (1 U/mL) oraz różne stężenia badanych związków. Mieszaninę poddano wstępnej inkubacji w temperaturze 37°C przez 10 minut, aby umożliwić interakcję między enzymem a potencjalnymi inhibitorami. Reakcję enzymatyczną zainicjowano dodaniem pNPG (3 mM) i pozostawiono do przebiegu w temperaturze 37°C przez 30 minut. Reakcję zatrzymano, dodając roztwór węgla sodu (0,1 M), co jednocześnie ułatwiło pojawienie się zabarwienia. Uwolniony p-nitrofenol, odpowiedzialny za żółte zabarwienie, został oznaczony spektrofotometrycznie przy 405 nm [164]. Jako kontrolę pozytywną zastosowano akarbozę (ACB). Wartości IC_{50} obliczono na podstawie zależności dawka–odpowiedź przy użyciu analizy regresji opartej na procentowym hamowaniu w funkcji stężenia związków.

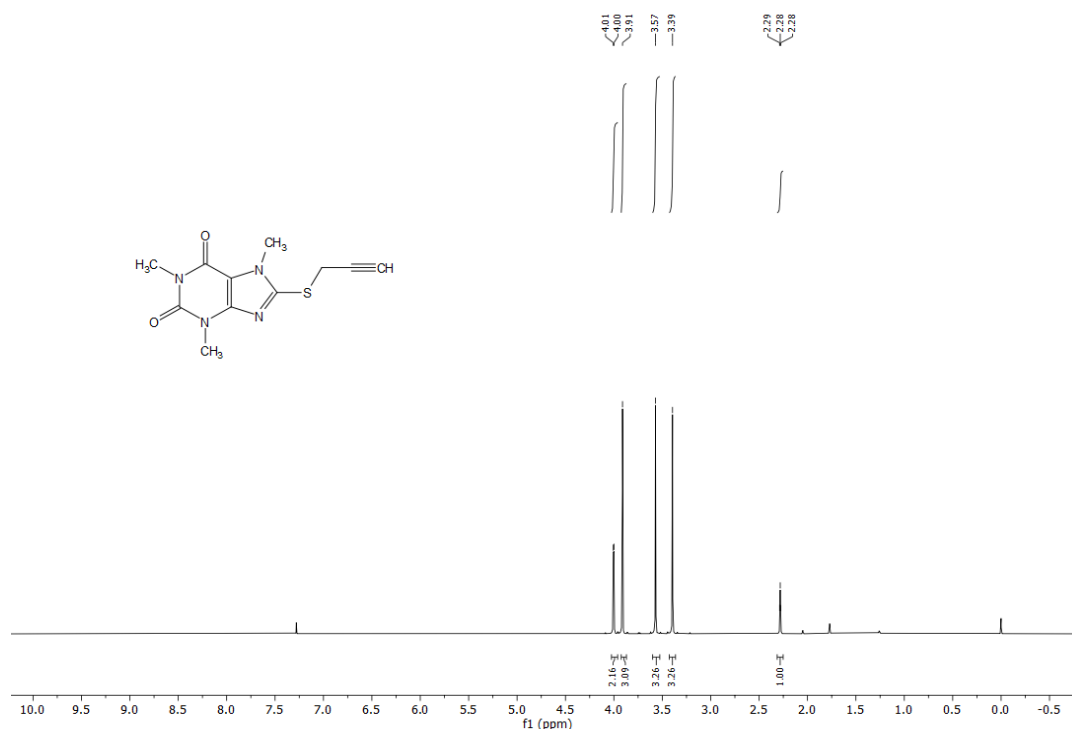
4.3 Synteza triazolowych pochodnych kofeiny z dołączonym ugrupowaniem uracylowym – Grupa I (związki 2–8)

Związek 1

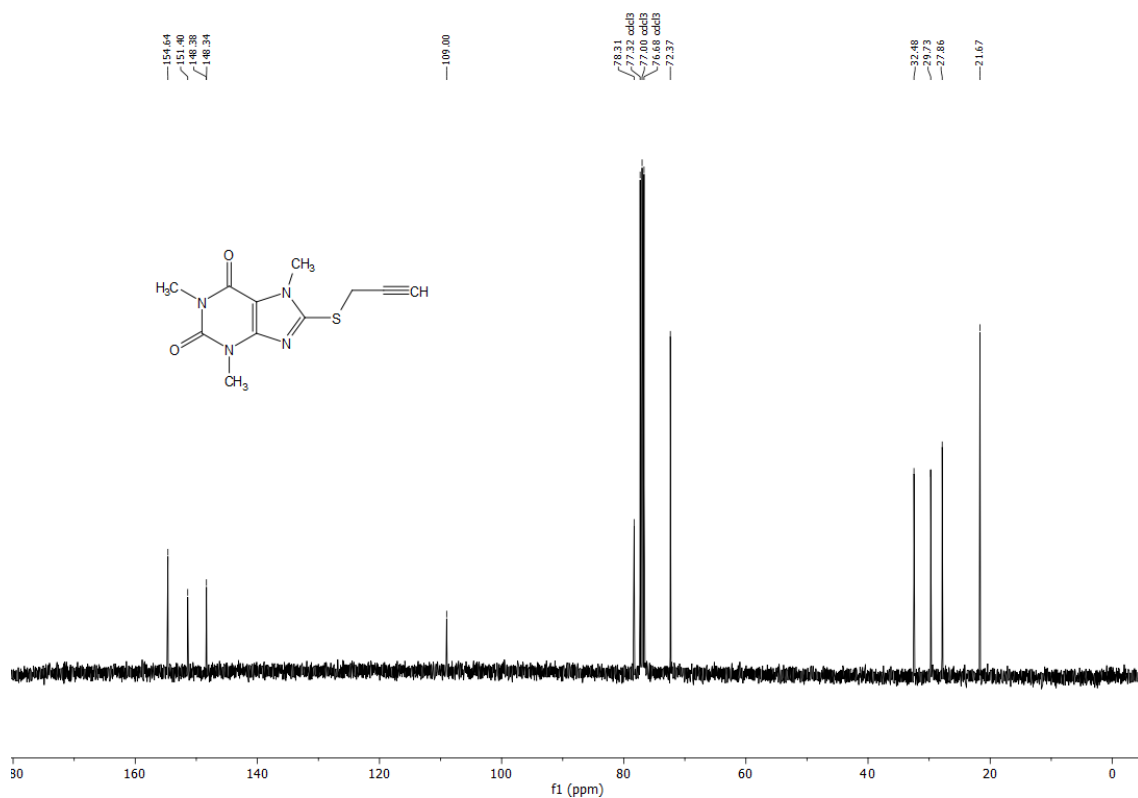
8-(prop-2-yn-1-ylosulfanylo)kofeina

Do roztworu 8-tiokofeiny (1 mmol) w DMF (dimetyloformamid) (6 mL) dodałem K₂CO₃ (2 mmol). Mieszaninę mieszałem przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie wkropliłem bromek propargilu (1,5 mmol). Mieszaninę reakcyjną mieszałem przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE: EtOAc 3:7). Po zakończeniu reakcji dodałem wodę (18 mL), a surowy produkt wytrącił się w postaci brązowego osadu, który następnie oczyściłem metodą chromatografii kolumnowej (CHCl₃: EtOAc 10:1).

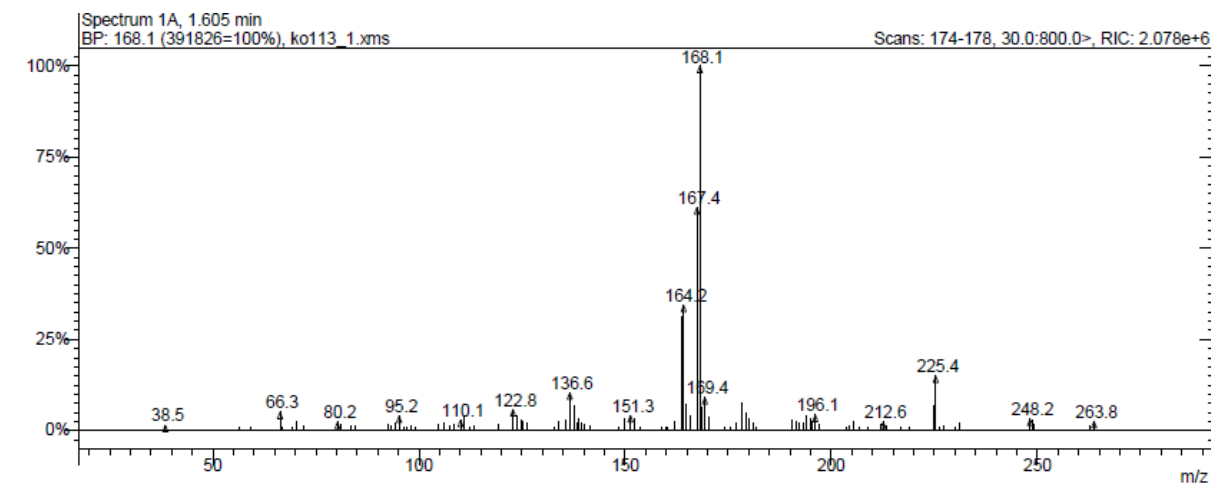
Brązowe ciało stałe (222 mg, 87%); t.t. 176–177 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4,00 (d, *J* = 2,6 Hz, 2H), 3,91 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 2,28 (t, *J* = 2,6 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 154,6, 151,4, 148,4, 148,3, 109,0, 78,3, 72,4, 32,5, 29,7, 27,9, 21,7. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3446,58, 3277,04, 2932,66, 1701,28, 1670,26, 1538,51, 1364,42, 756,85. EI-MS (*m/z*, int%) 263 ([M]⁺, 10%).



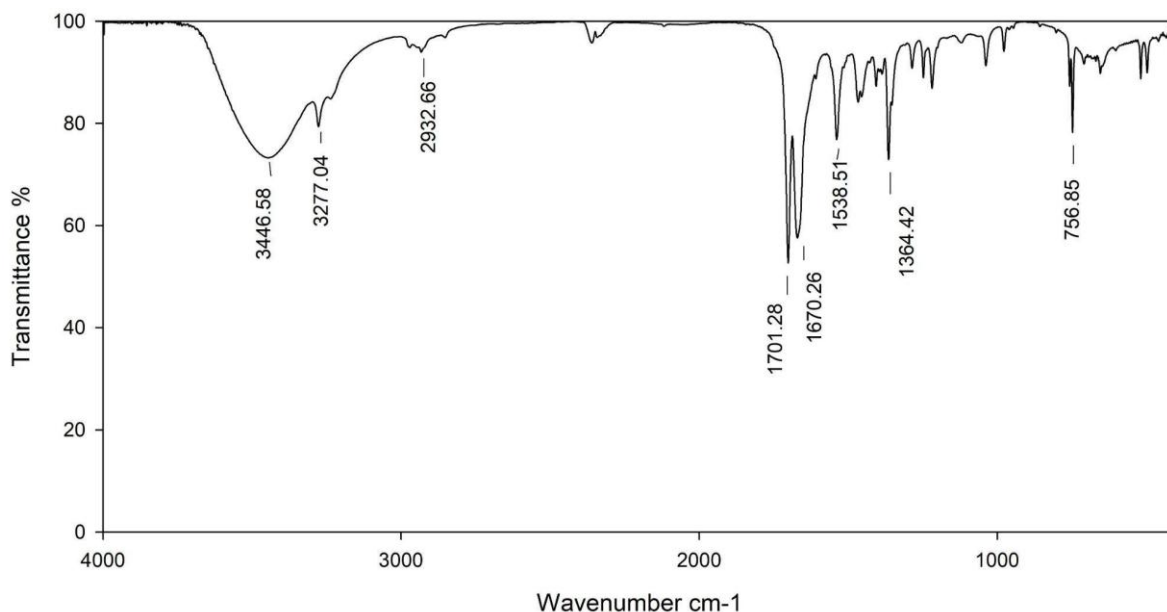
Rys. E1.1. Widmo ¹H NMR związku 1



Rys. E1.2 Widmo ¹³C NMR związku 1



Rys. E1.3. Widmo EI-MS związku 1



Rys. E1.4. Widmo FT-IR związku **1**

Związki G1.a–g

Odpowiednie pochodne uracylu z łańcuchem bromopentanowym (1 mmol) rozpuściłem w 2 mL DMF, a azydek sodu (5 mmol) w wodzie. Zmieszałem oba roztwory. Reakcję grzałem przez 8 h i mieszałem przez kolejne 24 h. Przebieg reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie dodałem 5 mL wody, otrzymaną mieszaninę ekstrahowałem Et₂O (3 x 40 mL), przemyłem wodą (3 x 40 mL) oraz solanką (120 mL). Połączone ekstrakty organiczne suszyłem nad bezwodnym Na₂SO₄; rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem.

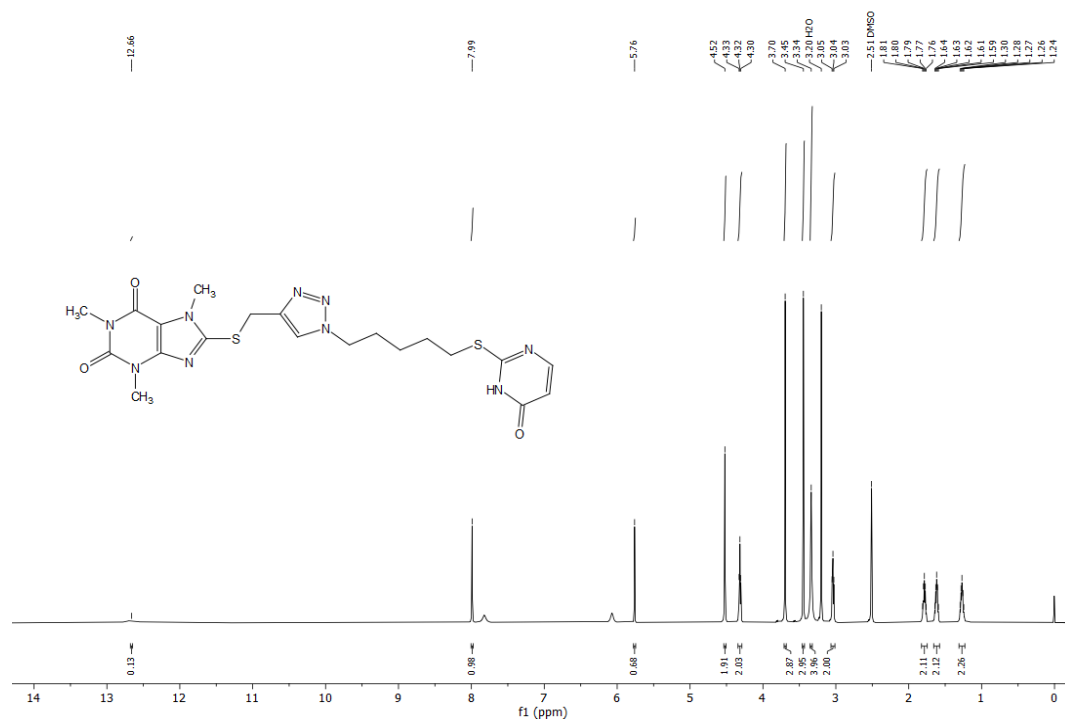
Związek 2

8-(((1-(5-((6-okso-1,6-dihydropirymidyn-2-yl)sulfanylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)metylo)sulfanylo)kofeina

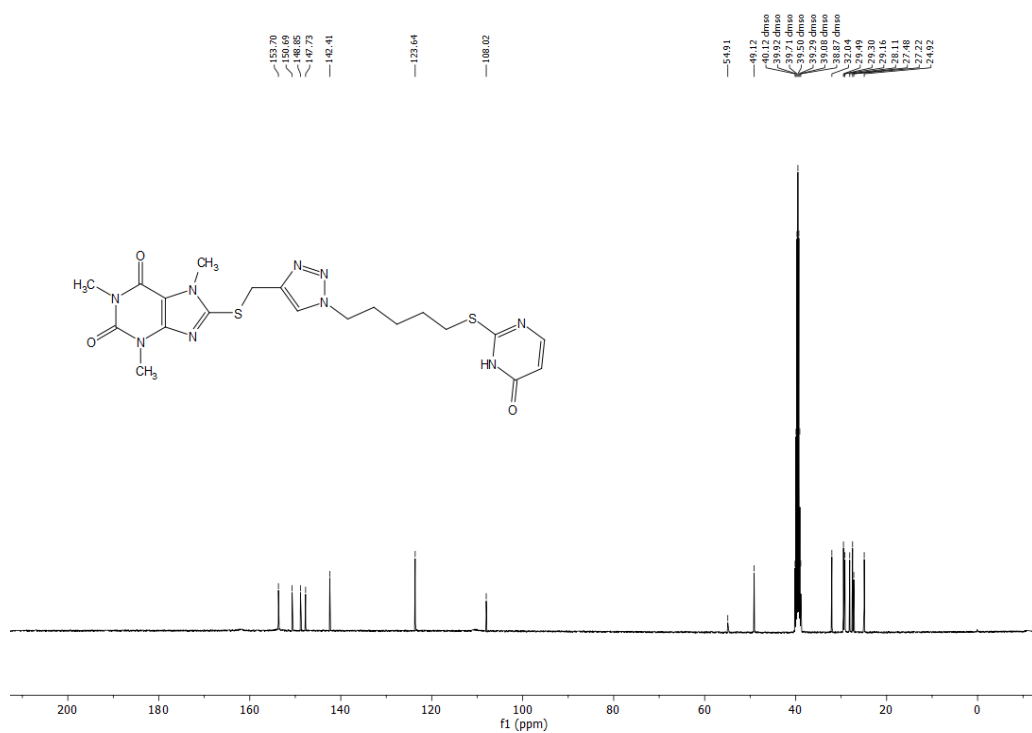
1 mmol związku **3** rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.a** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami CuSO₄·5H₂O (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE:AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody. Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3 x 40 mL). Ekstrakty przemyłem wodą (3 x 40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy

produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂: MeOH).

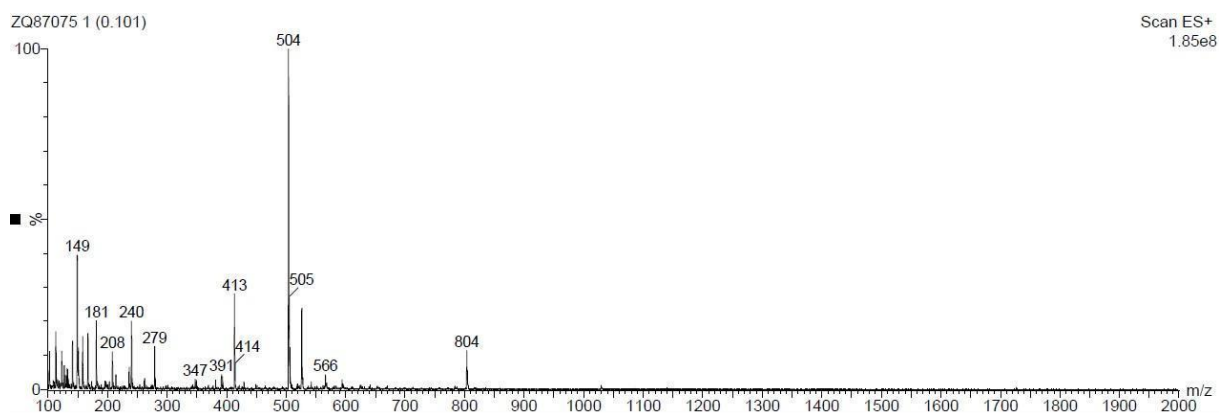
Białe ciało stałe (272 mg, 54%); t.t. 265–266 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,66 (s, 1H), 7,99 (s, 2H), 5,76 (s, 1H), 4,52 (s, 2H), 4,32 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,04 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,79 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,62 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,27 (q, *J* = 7,5 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 153,7 (2x), 150,7, 148,9, 147,7, 142,4, 123,6 (2x), 108,0, 54,9, 49,1, 38,9, 32,0, 29,5, 29,3, 29,2, 28,1, 27,5, 27,2, 24,9. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3428,77, 2923,31, 2852,56, 1704,07, 1655,29, 1537,96, 1456,21, 1365,96, 1271,40, 1217,41, 1170,79, 980,75, 745,93. ESI-MS (MeOH) (*m/z*, % int.) 504 ([M+H]⁺, 100%).



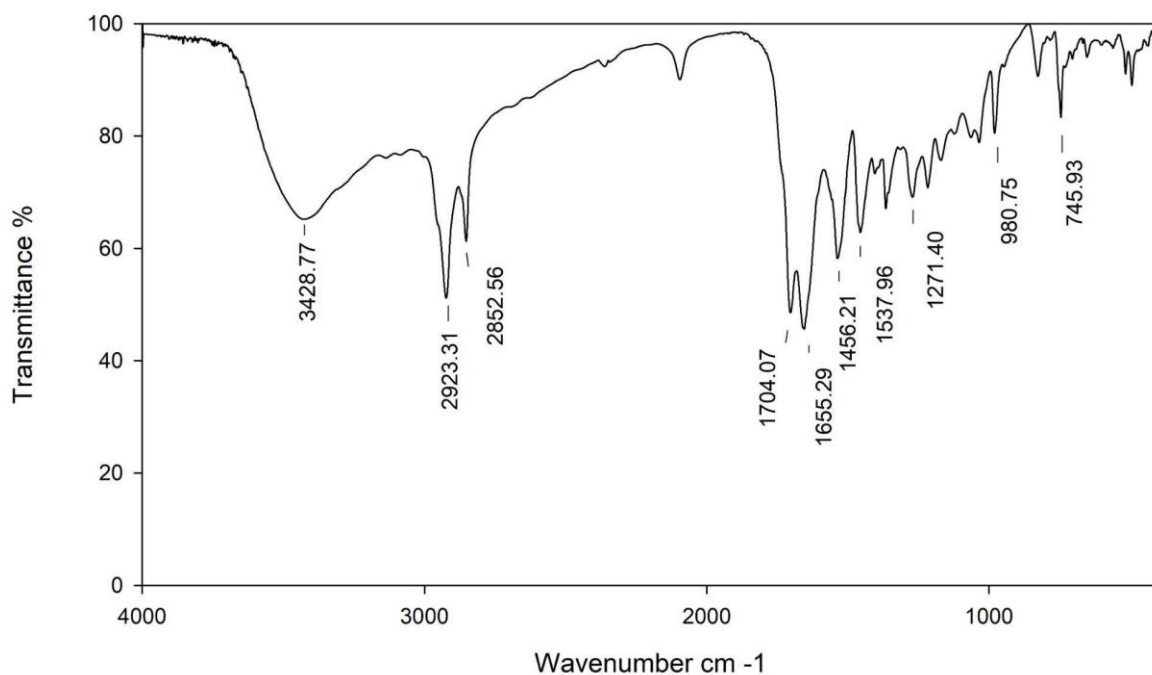
Rys. E2.1. Widmo ¹H NMR związku 2



Rys. E2.2. Widmo ^{13}C NMR związku 2



Rys. E2.3. Widmo ESI-MS związku 2



Rys. E2.4. Widmo FT-IR związku 2

Związek 3

8-(((1-(5-((6-okso-4-fenyl-1,6-dihydropirymidyn-2-ylo)sulfanylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol związku **3** rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.b** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami CuSO₄·5H₂O (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE:AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody. Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3 × 40 mL). Ekstrakty następnie przemyłem wodą (3 × 40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂: MeOH).

Białe ciało stałe (137 mg, 25%); t.t. 259–260 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,71 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,40 (m, 5H), 7,60 (s, 1H), 4,52 (s, 2H), 4,31 (t, J = 7,0 Hz, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 3,20 (s, 3H), 3,04 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 1,78 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,68–1,52 (m, 2H), 1,33–1,21 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 155,6, 153,8 (2x), 150,7, 148,8, 147,8, 142,4, 135,9, 130,5, 128,7 (2x), 126,6 (2x), 123,7 (2x), 108,1, 54,9, 49,2, 32,0, 29,5, 29,5, 29,3,

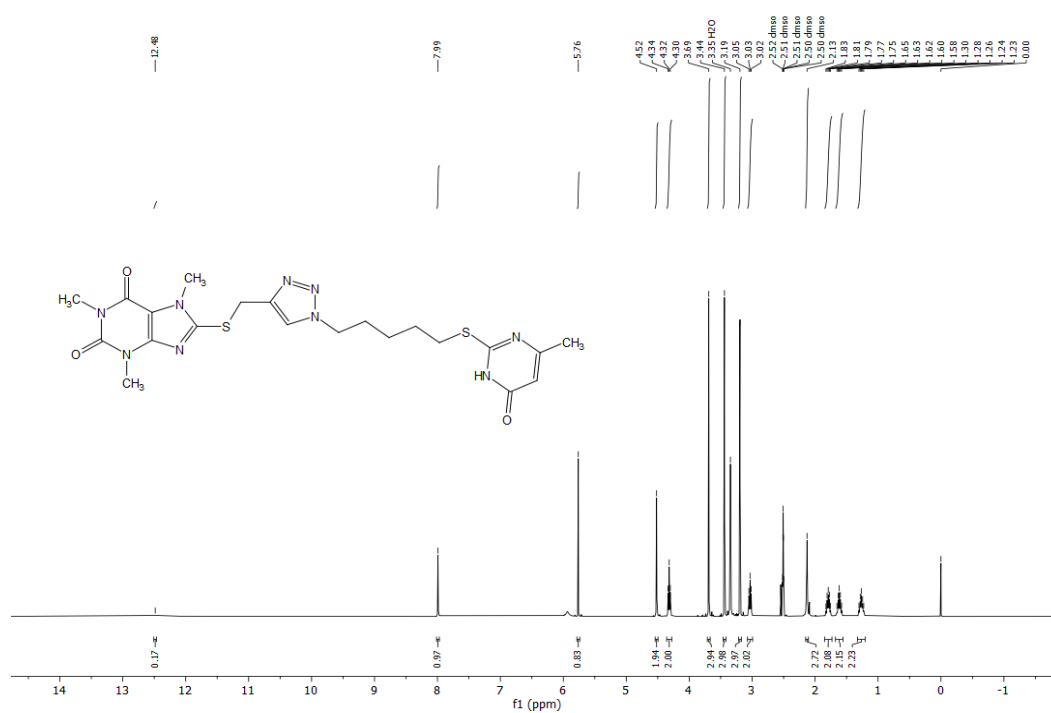
28,3, 27,4, 27,1, 25,1. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3444,54, 2929,63, 2868,77, 1703,31, 1662,81, 1538,51, 1366,36, 1220,35, 971,70, 746,75. ESI-MS (MeOH) (m/z , % int.) 568, ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100%).

Związek 4

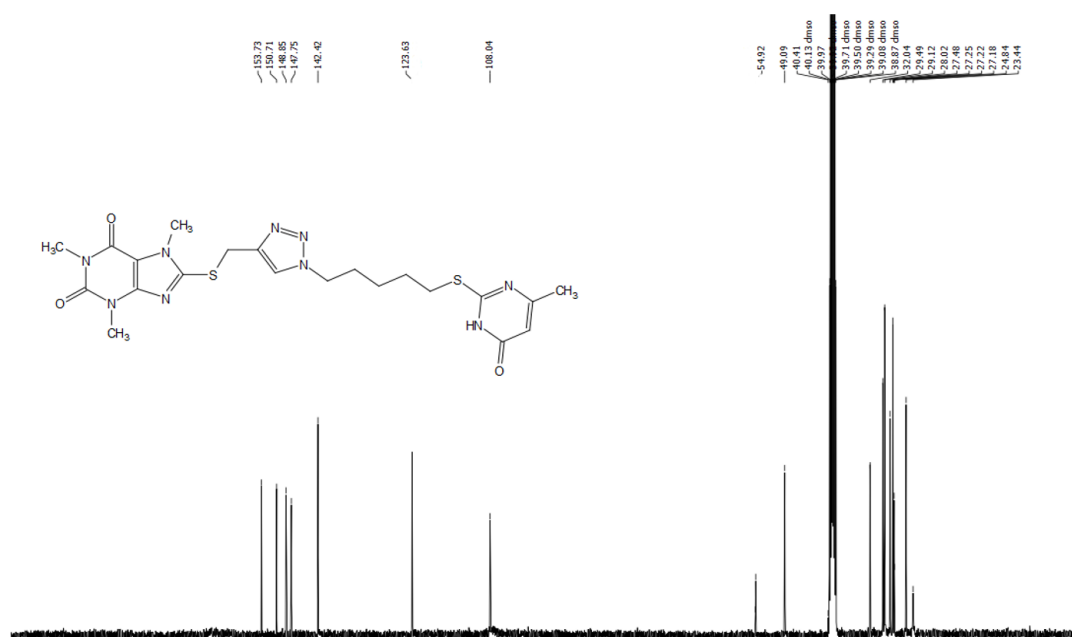
8-(((1-(5-((4-metylo-6-okso-1,6-dihydropirymidyn-2-ylo)sulfanylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol związku **3** rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.c** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE:AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody. Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3×40 mL). Ekstrakty następnie przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH_2Cl_2 : MeOH).

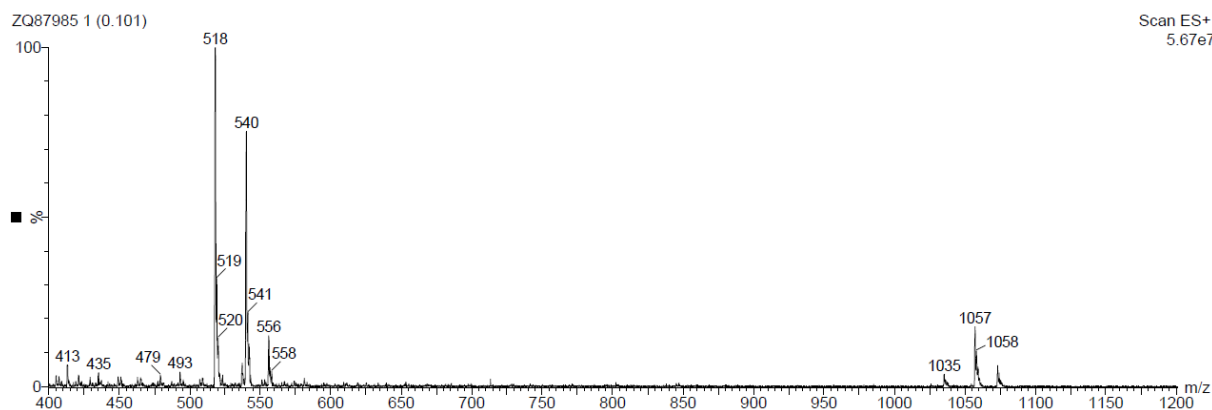
Białe ciało stałe (414 mg, 78%); t.t. 268–269 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,48 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,52 (s, 2H), 4,32 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,44 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 3,03 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,13 (s, 3H), 1,79 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,62 (q, $J = 7,4$ Hz, 2H), 1,26 (q, $J = 7,5, 7,0$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 153,7, 150,7, 148,9, 147,8, 142,4, 123,6, 108,0, 54,9, 49,1, 40,4, 40,0, 32,0, 29,5, 29,1, 28,0, 27,5, 27,3, 27,2, 27,2, 24,8, 23,4. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3435,12, 3145,48, 2938,29, 2860,79, 2738,65, 1698,32, 1660,59, 1537,85, 1464,37, 1365,29, 1218,27, 1178,17, 953,36, 752,68. ESI-MS (MeOH) (m/z , % int.) 518, ($[\text{M} + \text{H}]^+$, 100%), 540, ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 80%).



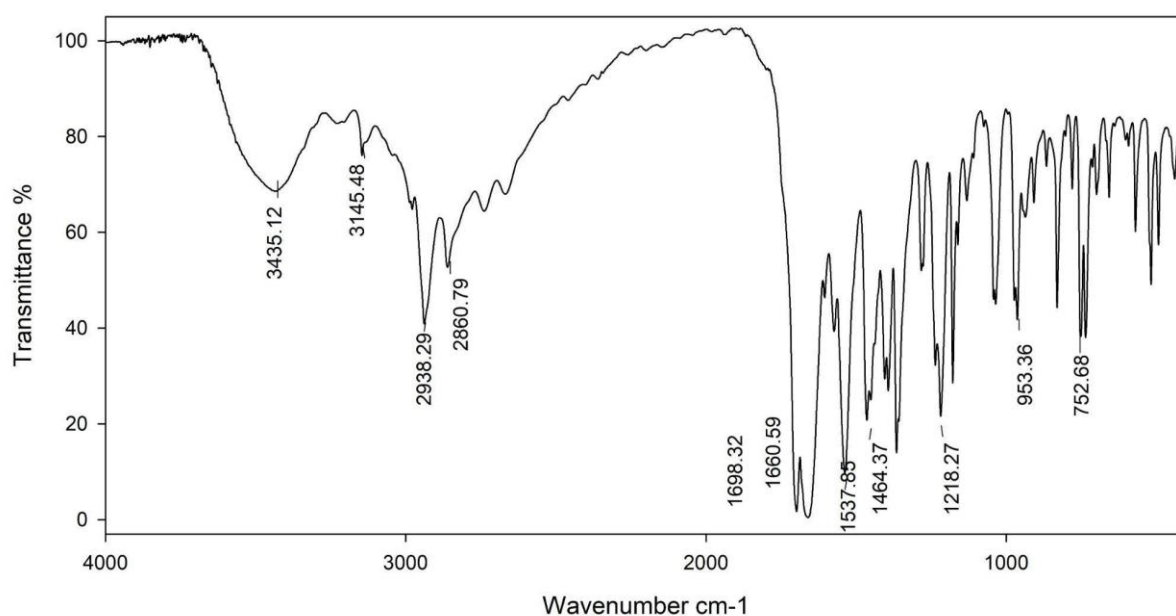
Rys. E3.1. Widmo ¹H NMR związku 4



Rys. E3.2. Widmo ¹³C NMR związku 4



Rys. E3.3. Widmo ESI-MS związku 4



Rys. E3.4. Widmo FT-IR związku 4

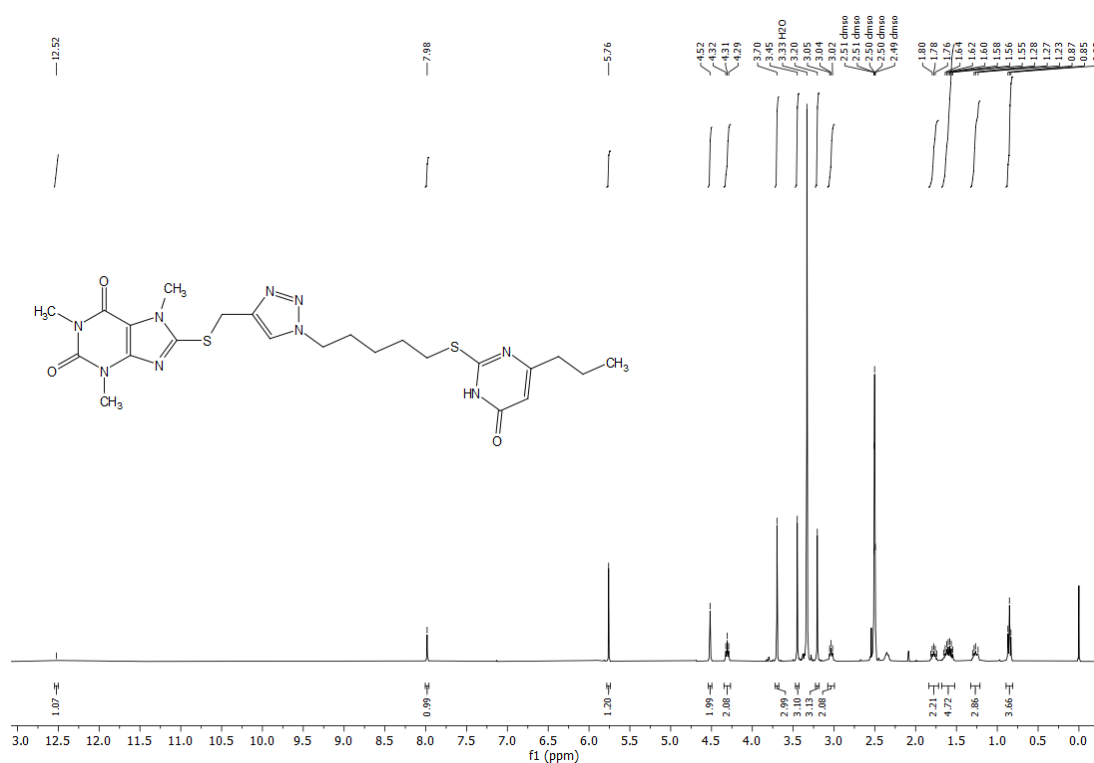
Związek 5

8-(((1-[5-((6-okso-5-propylo-1,6-dihdropirymidyn-2-ylo)sulfanylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)sulfanylo)kofeina

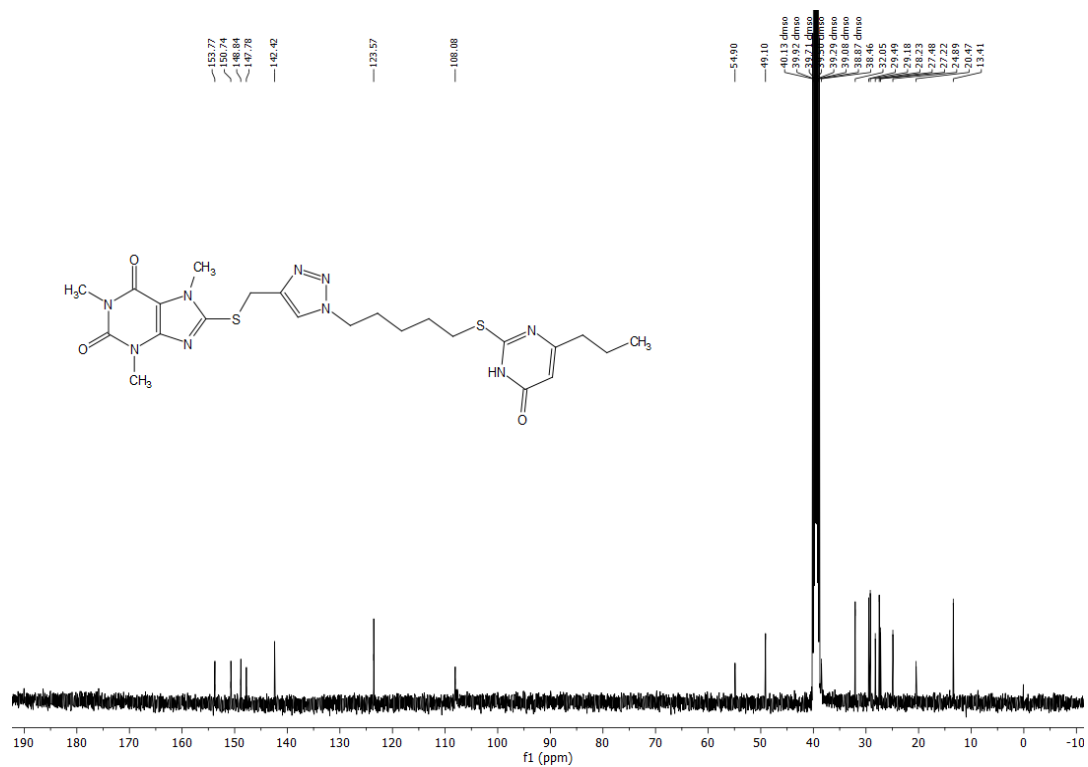
1 mmol związku **3** rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.d** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE:AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody. Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3×40 mL). Ekstrakty następnie

przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH_2Cl_2 : MeOH).

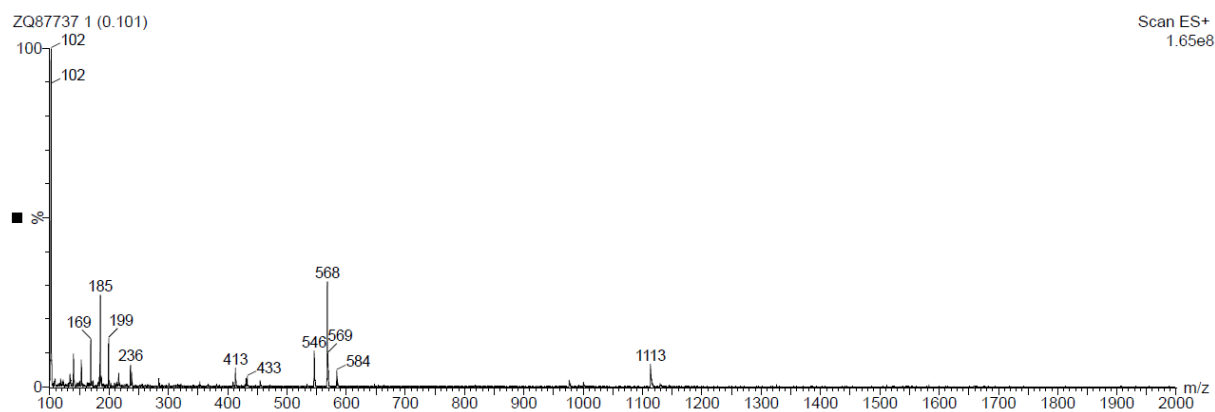
Białe ciało stałe (98 mg, 18%); t.t 264–265 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,62 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,52 (s, 2H), 4,31 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,44 (s, 3H), 3,20 (s, 3H), 3,02 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,23 (s, 2H), 1,81–1,72 (m, 2H), 1,64–1,57 (m, 2H), 1,47 (q, $J = 7,7$ Hz, 2H), 1,25 (d, $J = 11,6$ Hz, 2H), 0,85 (d, $J = 7,3$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 153,7, 150,7, 150,0, 148,8, 147,8, 142,5 (2x), 123,7, 108,0, 54,9, 49,1, 32,1 (2x), 29,5, 29,1, 28,1 (2x), 27,5, 27,2, 24,9 (2x), 21,1, 13,7. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3445,71, 3147,65, 2941,36, 2865,06, 1700,11, 1664,16, 1537,20, 1462,94, 1365,68, 1214,00, 1170,03, 992,35, 754,87. ESI-MS (MeOH) (m/z , % int.) 568, ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 40%).



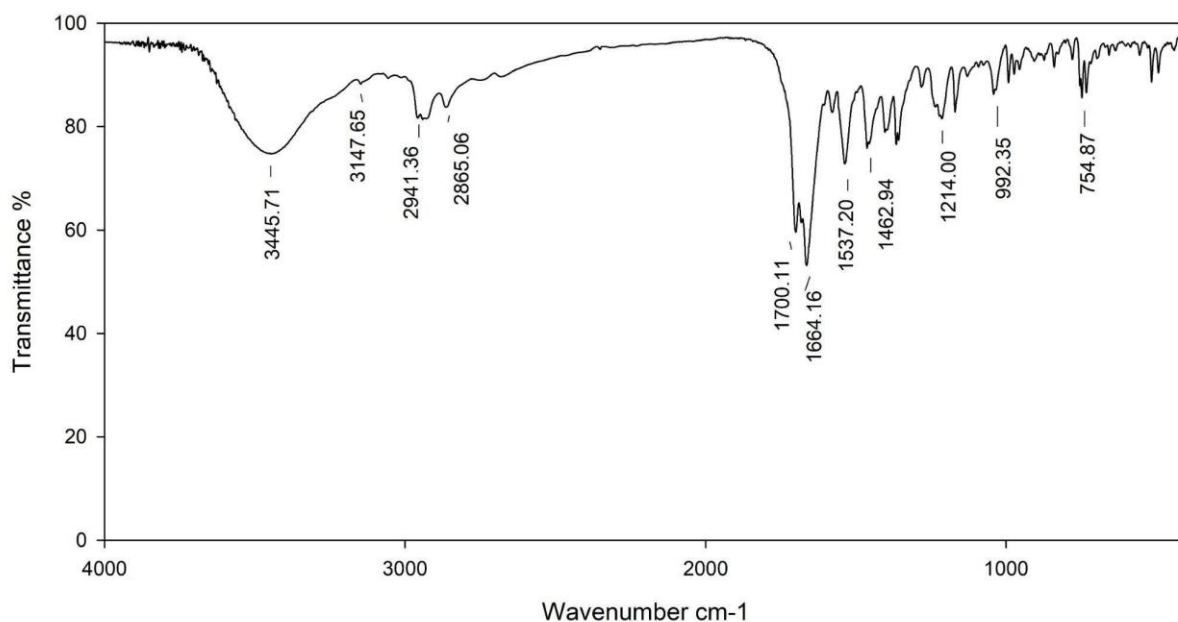
Rys. E4.1. Widmo ^1H NMR związku 5



Rys. E4.2. Widmo ¹³C NMR związku 5



Rys. E4.3. Widmo ESI-MS związku 5



Rys. E4.4. Widmo FT-IR związku 5

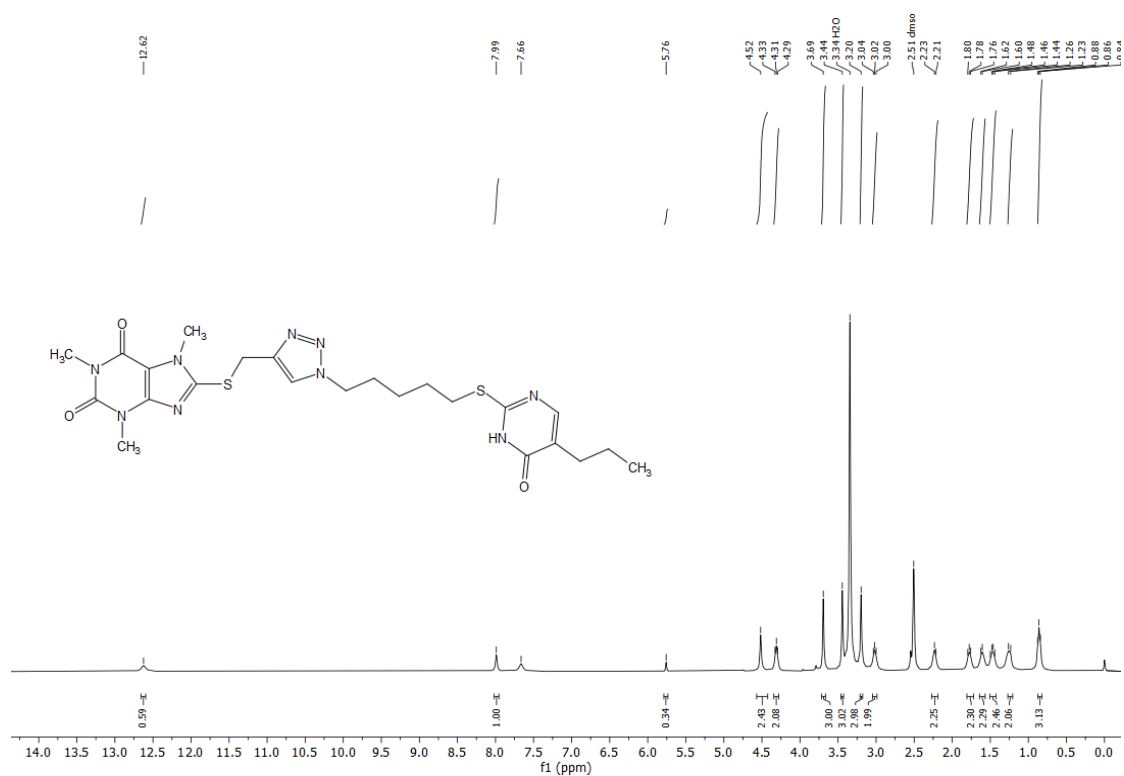
Związek 6

8-(((1-(5-(((6-okso-6-propylo-1,6-dihydropirymidyn-2-ylo)sulfanylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)sulfanylo)kofeina

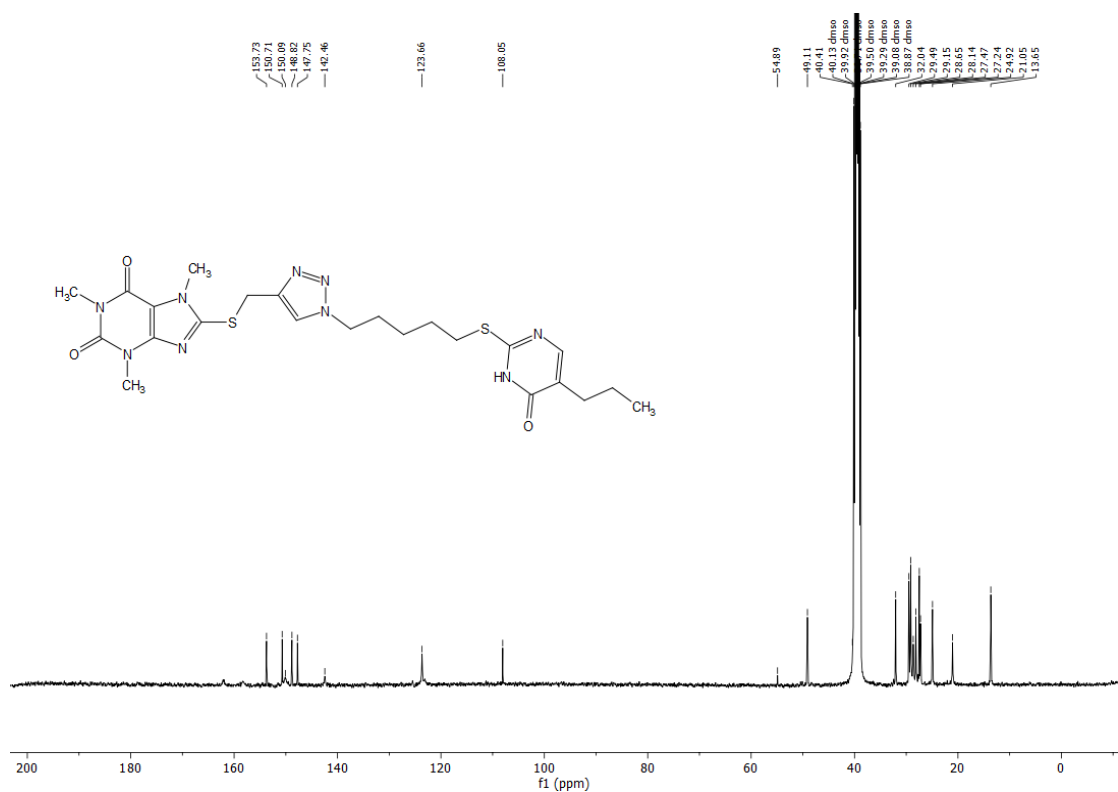
1 mmol związku **3** rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.e** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE:AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody. Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3×40 mL). Ekstrakty następnie przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH_2Cl_2 : MeOH).

Białe ciało stałe (137 mg, 25%); t.t. 259–260 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,62 (s, 1H), 7,98 (s, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,52 (s, 2H), 4,31 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 3,70 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 3,20 (s, 3H), 3,04 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H), 1,78 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 1,68–1,52 (m, 5H), 1,33–1,21 (m, 3H), 0,85 (t, $J = 7,4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 153,8, 150,7, 150,1, 148,8, 147,8, 142,4, 123,6, 108,1, 54,9, 49,1, 40,4, 32,1, 29,5 (2x), 29,2, 28,7, 28,1, 27,5 (2x), 27,2, 24,9, 20,5, 13,4. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3444,54, 2929,63, 2868,77, 1703,31, 1662,81,

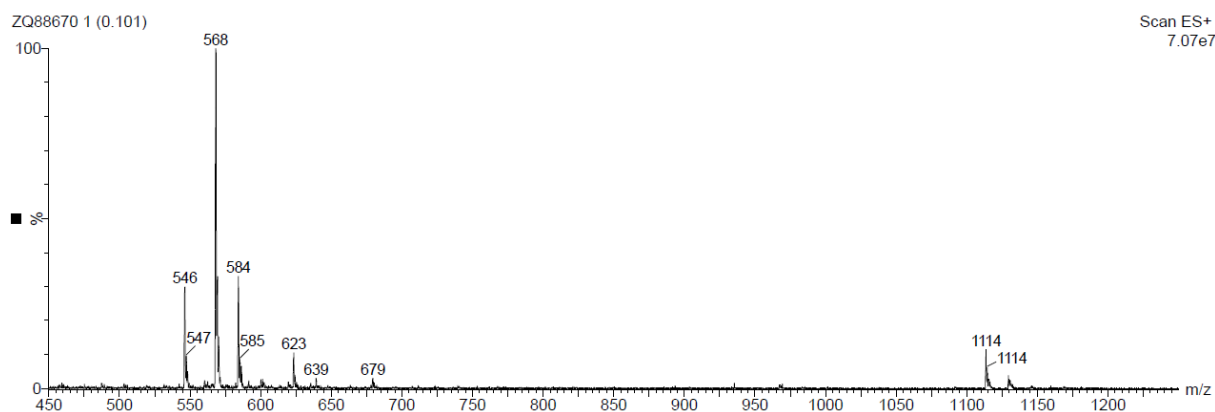
1538,51, 1366,36, 1220,35, 971,70, 746,75. ESI-MS (MeOH) (m/z, % int.) 568, ([M + Na]⁺, 100%).



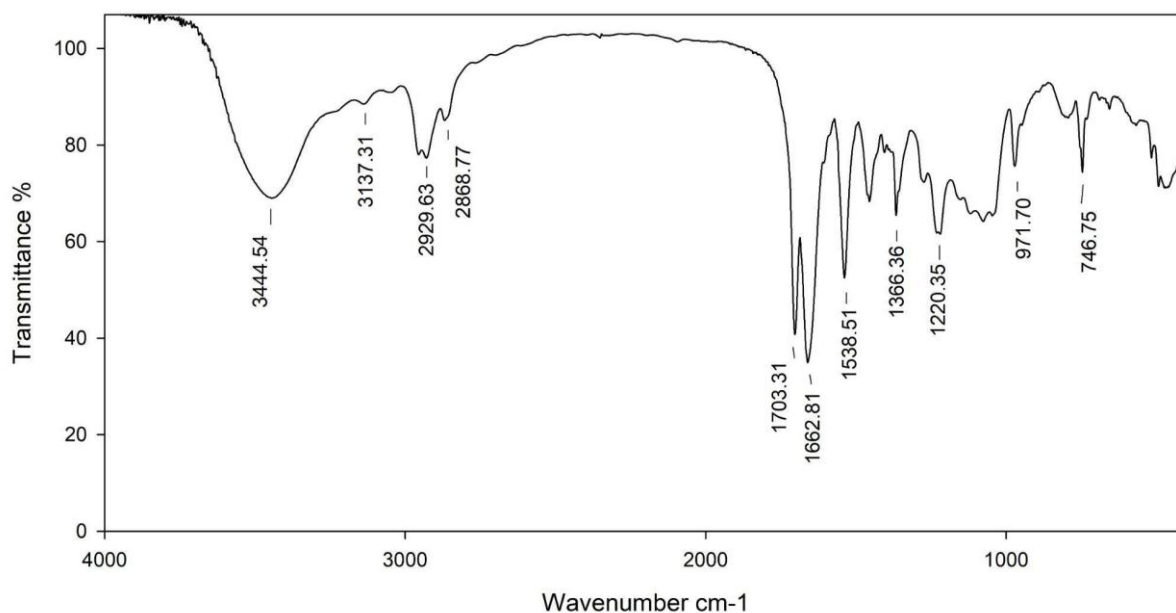
Rys. E5.1. Widmo ¹H NMR związku 6



Rys. E5.2. Widmo ¹³C NMR związku 6



Rys. E5.3. Widmo ESI-MS związku 6



Rys. E5.4. Widmo FT-IR związku 6

Związek 7

8-(((1-(5-((6-amino-1,6-dihydropyrimidin-2-yl)sulfanylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)metylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol związku 3 rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.f** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE; AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody.

Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3×40 mL). Ekstrakty następnie przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH_2Cl_2 : MeOH).

Białe ciało stałe (180 mg, 36%); t.t. 266–267 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 12,61 (s, 1H), 7,99 (s, 1H), 7,87 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 6,87 (s, 1H), 6,11 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H), 5,76 (s, 1H), 4,52 (d, $J = 3,8$ Hz, 2H), 4,31 (t, $J = 7,1$ Hz, 2H), 3,69 (s, 3H), 3,44 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 2,93 (t, $J = 7,3$ Hz, 2H), 1,77 (q, $J = 10,6, 9,0$ Hz, 2H), 1,59 (q, $J = 7,5$ Hz, 2H), 1,36–1,21 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 169,7, 163,0, 154,8, 153,7, 150,7, 148,9, 147,7, 142,4, 123,6, 108,0, 101,1, 54,9, 49,2, 32,0, 29,5, 29,3, 28,5, 27,5, 25,1, 22,6. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3419,36, 3337,56, 3195,83, 2931,89, 2857,46, 1701,66, 1652,91, 1579,64, 1540,22, 1463,43, 1366,64, 1246,83, 1215,62, 974,49, 747,69. ESI-MS (MeOH) (m/z , % int.) 525, ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 60%).

Związek 8

8-(((1-(5-(5-fluoro-2,4-diokso-3,4-dihydropirymidin-1(2H)-ylo)pentyl)-1H-1,2,3-triazol-4-ylo)metylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol związku **3** rozpuściłem w 10 mL DMSO, a następnie dodałem do roztworu azydkową pochodną **G1.g** (1 mmol). Do mieszaniny dodawałem porcjami $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5 mg) oraz askorbinian sodu (13 mg), rozpuszczone w 0,5 mL wody. Reakcję mieszałem przez godzinę w temperaturze pokojowej, a jej przebieg monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (PE; AcOEt 3:7). Reakcję zakończyłem dodaniem 30 mL wody. Następnie ekstrahowałem produkt, używając AcOEt (3×40 mL). Ekstrakty następnie przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (100 mL). Rozpuszczalnik odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując surowy produkt, który następnie oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CH_2Cl_2 : MeOH).

Białe ciało stałe (251 mg, 48%); t.t. 248–249 °C; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 11,95 (s, 1H), 8,14–8,11 (t, 1H), 7,95 (s, 1H), 4,50 (s, 2H), 4,30–4,25 (t, 2H), 3,78–3,74 (t, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,43 (t, 3H), 3,32 (s, 3H), 1,77–1,73 (m, 2H), 1,53–1,48 (m, 2H), 1,30–1,25 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 156,7, 153,7, 150,6, 149,3, 148,9, 147,7, 142,4, 140,1, 137,8, 128,8, 123,5, 108,0, 49,1, 32,0, 29,3, 27,4, 27,1, 26,2, 23,0, 22,5. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3463,68, 2948,1, 1713,68, 1660,94, 1550,12, 1371,15, 1034,54, 756,03. ESI-MS (MeOH) (m/z , % int.) 523, ($[\text{M} + \text{Na}]^+$, 100%).

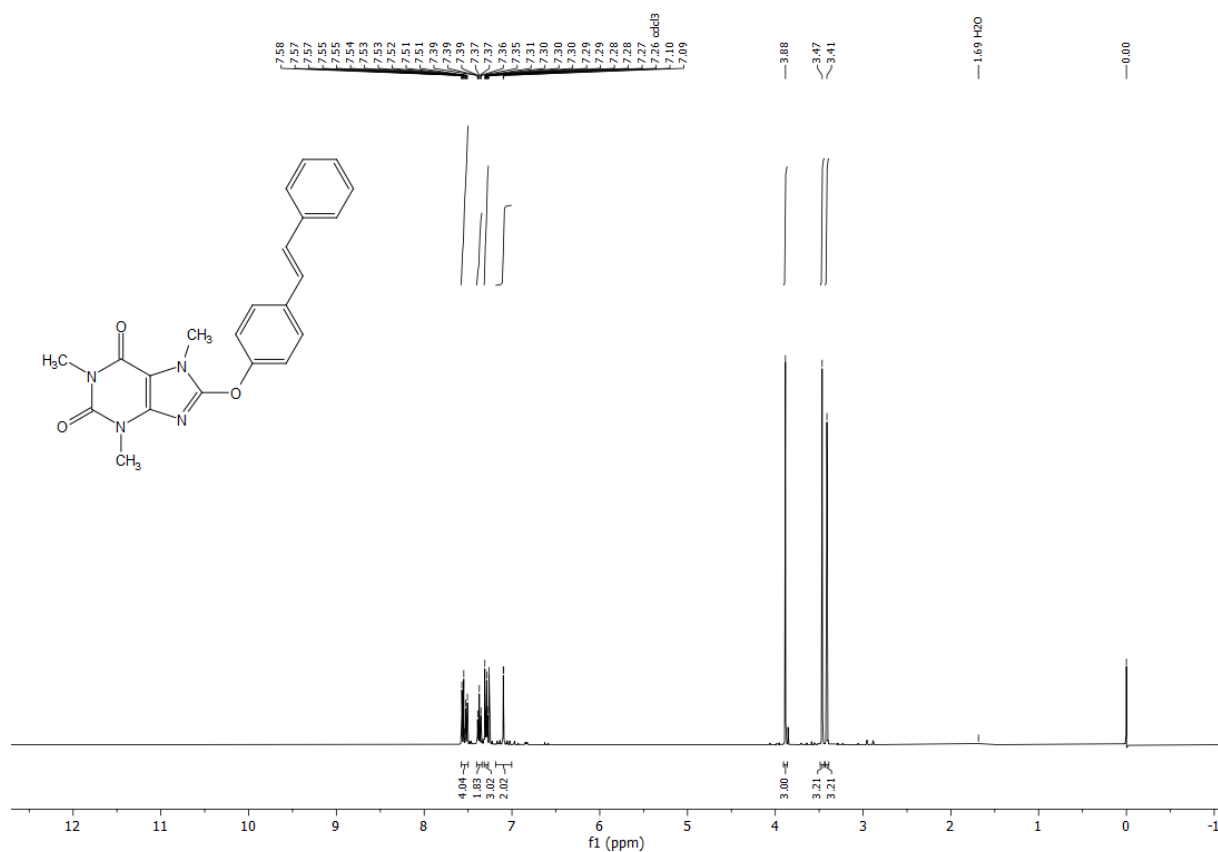
4.4 Synteza i dane spektroskopowe pochodnych kofeiny z ugrupowaniem stilbenowym – Grupa II (związki 9–20)

Związek 9

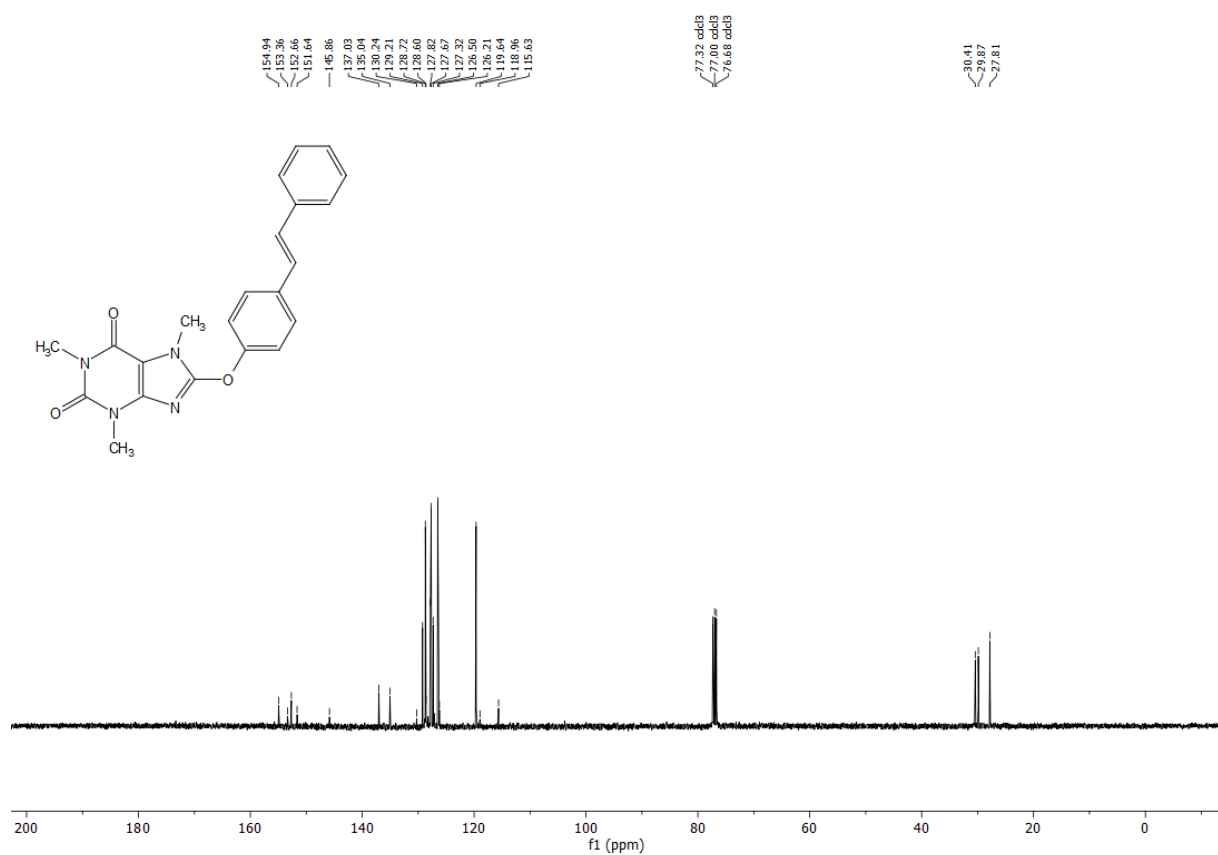
(E)-8-(4-styrylofenoksy)kofeina

Pochodną stilbenu (*4*-hydroksystilben) (1 mmol) rozpuściłem w 5 mL DMF, następnie dodałem Cs₂CO₃ (2 mmol) i mieszałem przez 30 min. Po tym czasie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i mieszałem przez następne 72 h, monitorując postęp reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem wody (20 mL), a całość ekstrahowałem CHCl₃ (3 × 40 mL). Połączone ekstrakty organiczne przemyłem wodą (3 × 40 mL) oraz solanką (120 mL). Ekstrakt suszyłem nad bezwodnym Na₂SO₄ i usunąłem rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłem gradientową chromatografią kolumnową.

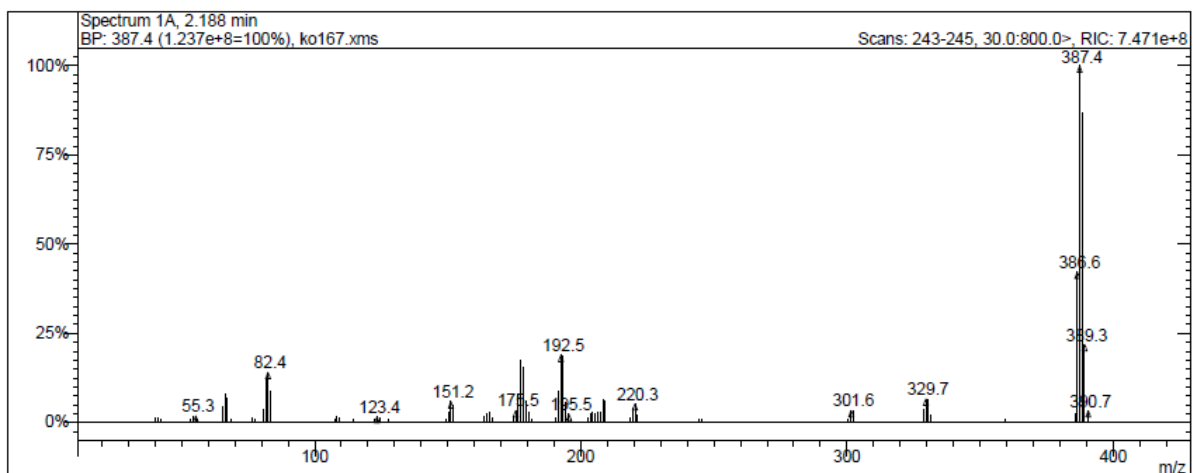
Białe ciało stałe (215 mg, 56%); t.t. 216–217 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,58 – 7,50 (m, 4H), 7,40 – 7,34 (m, 2H), 7,32 – 7,27 (m, 3H), 7,10 (d, *J* = 1,9 Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,41 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 154,9, 153,4, 152,7, 151,6, 145,9, 137,0, 135,0, 130,2, 129,2, 128,7, 128,6, 127,8, 127,7, 127,3, 126,5, 126,2, 119,6, 119,0, 115,6, 30,4, 29,9, 27,8. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3066, 2955, 2873, 1696, 1664, 1510, 1449, 1238, 1204, 1042, 968, 875, 757. EI-MS (*m/z*, % int): 387 ([M], 100%).



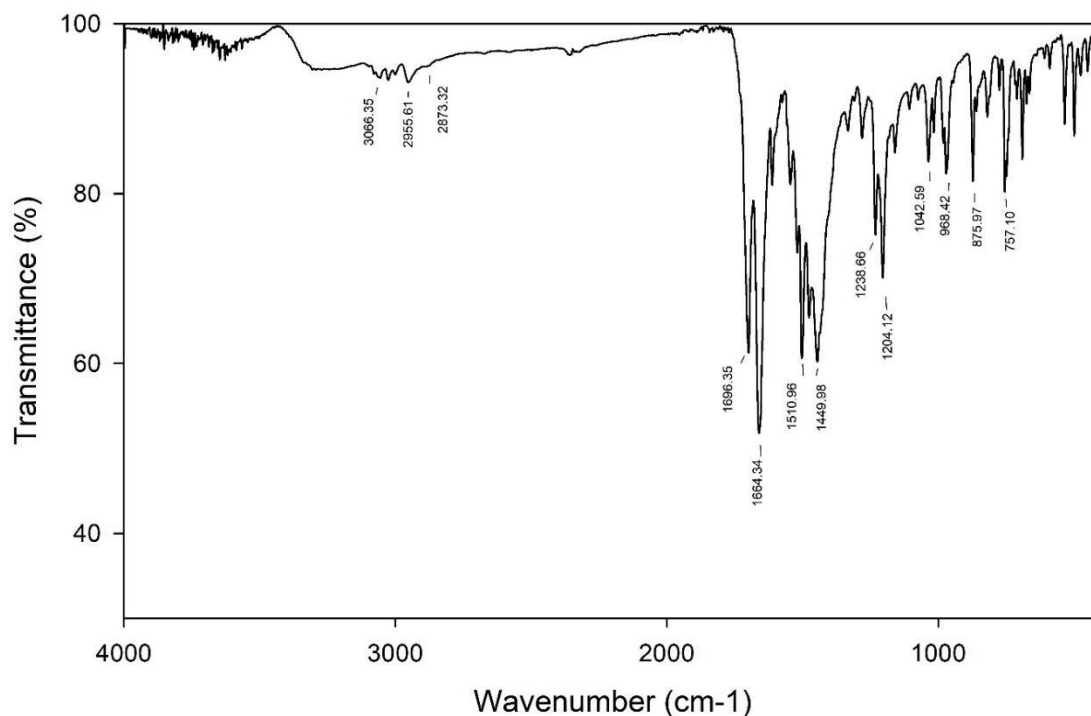
Rys. E6.1. Widmo ^1H NMR związku **9**



Rys. E6.2. Widmo ^{13}C NMR związku **9**



Rys. E6.3. Widmo EI-MS związku **9**



Rys. E6.4. Widmo FT-IR związku **9**

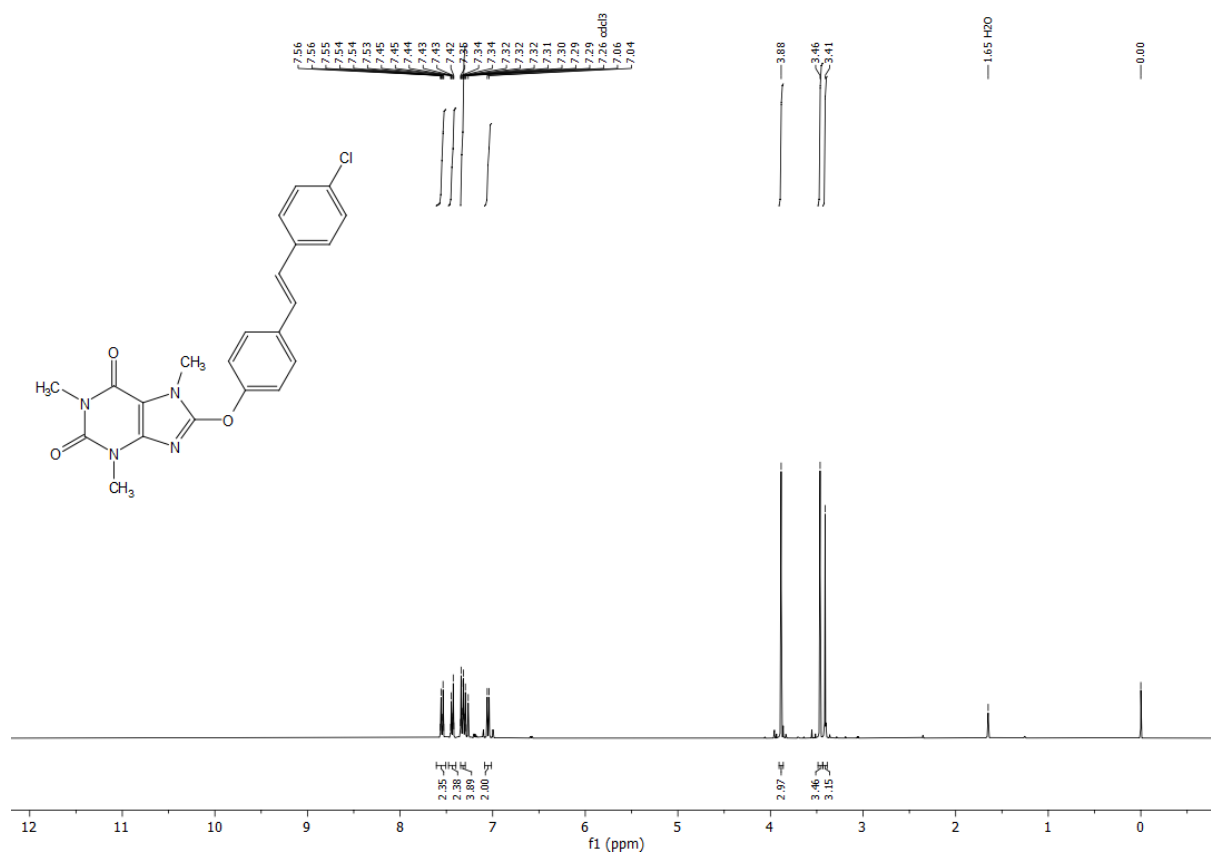
Związek **10**

(E)-8-(4-(4-chlorostyrylo)fenoksy)kofeina

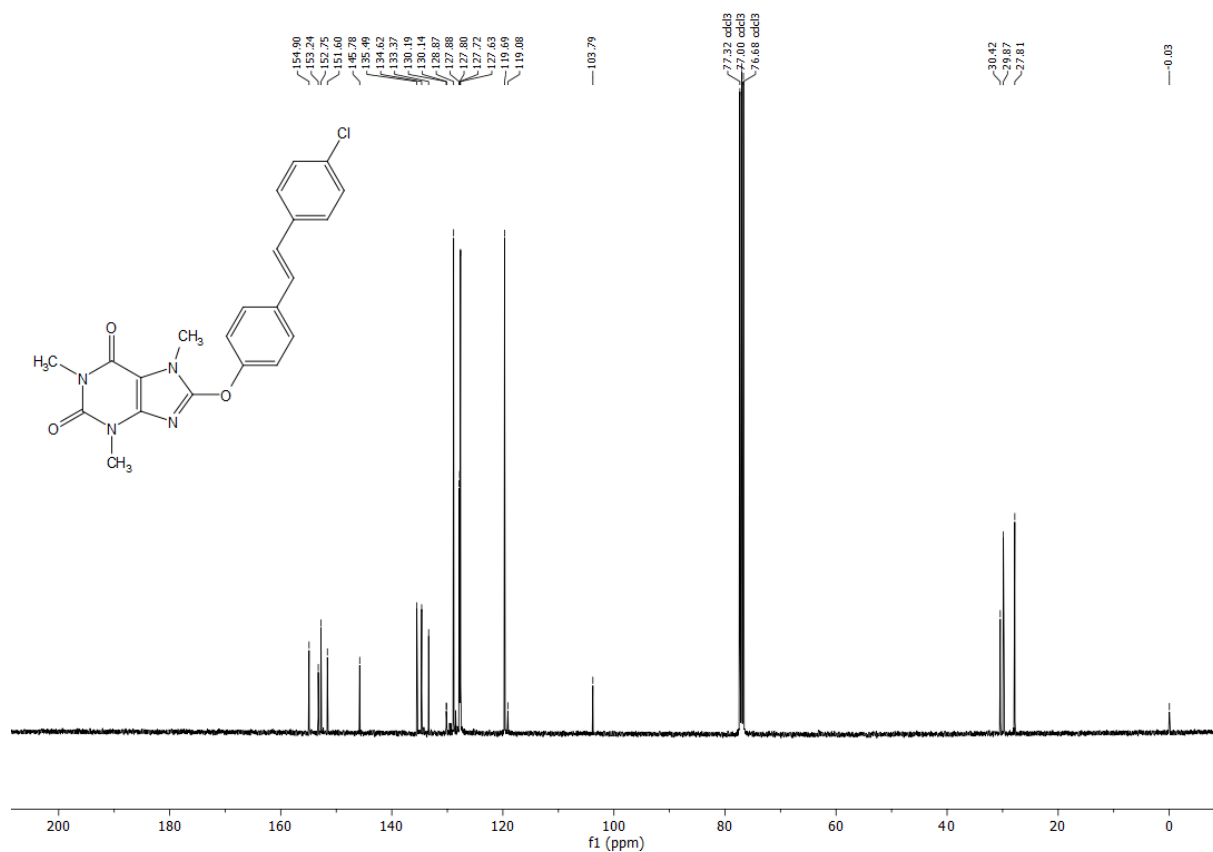
Pochodną stilbenu (*4'*-chloro-4-hydroksystilben) (1 mmol) rozpuściłem w 5 mL DMF, następnie dodałem Cs₂CO₃ (2 mmol) i mieszałem przez 30 min. Po tym czasie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i mieszałem przez następne 72 h, monitorując postęp reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem wody (20 mL), a

całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty organiczne przemylem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Ekstrakt suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 i usunąłem rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłem gradientową chromatografią kolumnową.

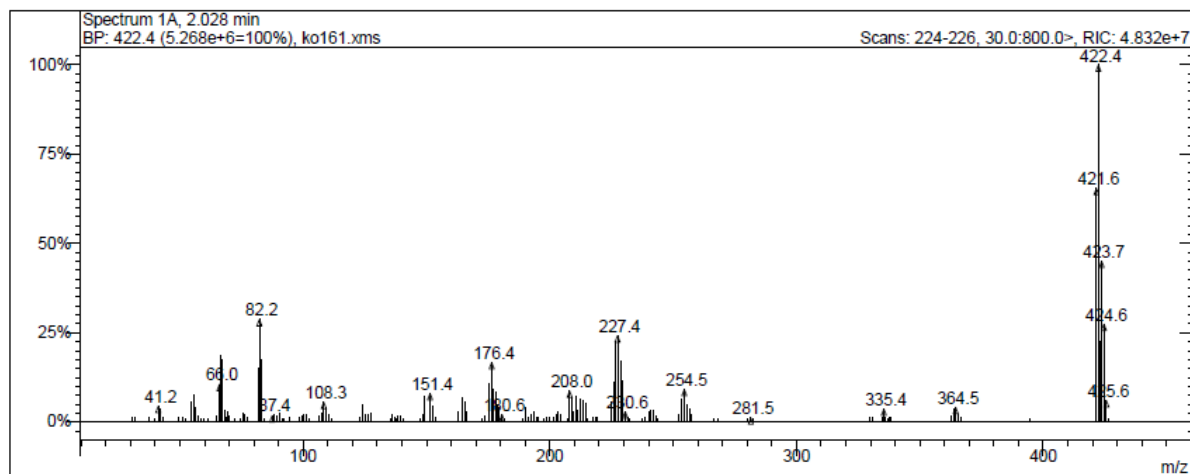
Białe ciało stałe (93 mg, 22%); t.t. 222–223 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,61 – 7,51 (m, 2H), 7,48 – 7,40 (m, 2H), 7,35 – 7,30 (m, 4H), 7,05 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H), 3,88 (s, 3H), 3,46 (s, 3H), 3,41 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154,9, 153,2, 152,8, 151,6, 145,8, 135,4, 134,6, 133,4, 130,2, 130,1, 128,9 (2x), 127,9, 127,8, 127,7, 127,6, 119,7, 119,1, 103,8, 30,4, 29,9, 27,8. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3437, 3014, 2952, 1710, 1658, 1503, 1445, 1205, 1089, 973, 754, 503. EI-MS (m/z , % int): 422 ($[\text{M}]$, 100%).



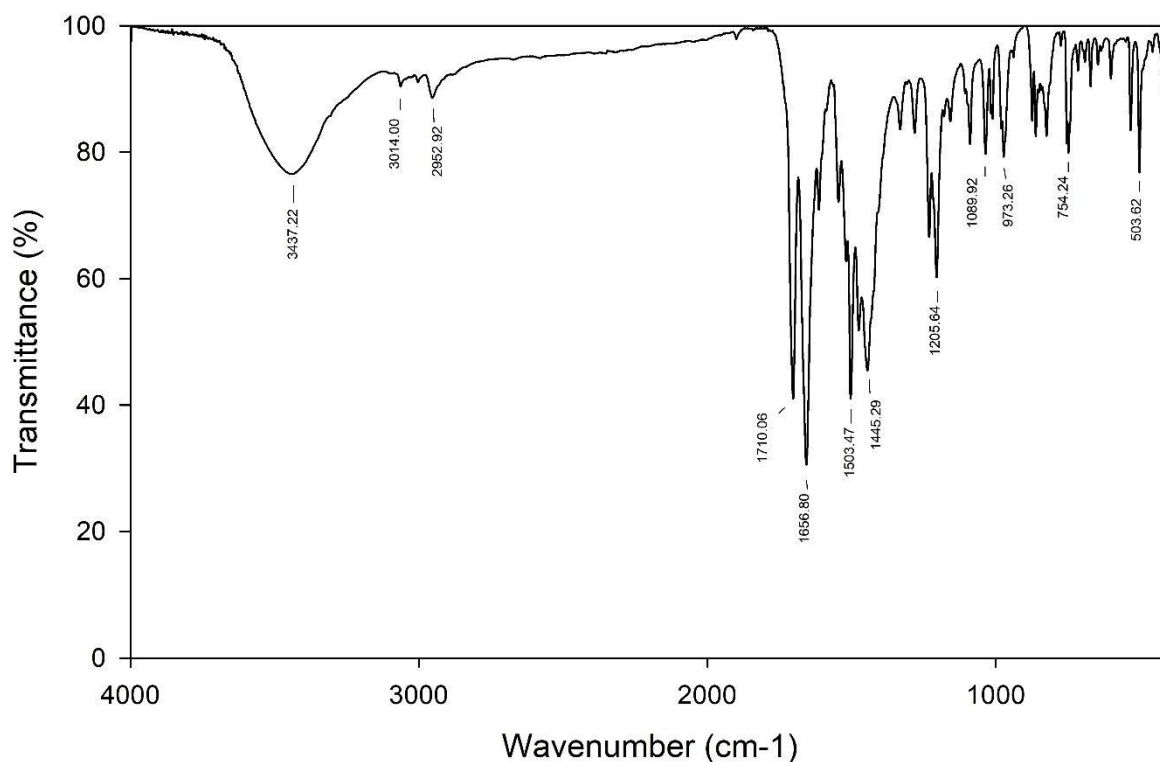
Rys. E7.1. Widmo ^1H NMR związku **10**



Rys. E7.2. Widmo ^{13}C NMR związku **10**



Rys. E7.3. Widmo EI-MS związku **10**



Rys. E7.4. Widmo FT-IR związku **10**

Związek 11

(E)-8-(4-(4-nitrostyrylo)fenoksy)kofeina

Pochodną stilbenu (*4*-hydroksy-4'-nitro-stilben) (1 mmol) rozpuściłem w 5 mL DMF, następnie dodałem Cs₂CO₃ (2 mmol) i mieszałem przez 30 min. Po tym czasie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i mieszałem przez następne 72 h, monitorując postęp reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem wody (20 mL), a całość ekstrahowałem CHCl₃ (3 × 40 mL). Połączone ekstrakty organiczne przemyłem wodą (3 × 40 mL) oraz solanką (120 mL). Ekstrakt suszyłem nad bezwodnym Na₂SO₄ i usunąłem rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyściłem gradientową chromatografią kolumnową (CHCl₃:AcOEt).

Żółtawe ciało stałe (110 mg, 25%); t.t. 228–229 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,30 – 8,19 (m, 2H), 7,66 – 7,59 (m, 4H), 7,38 – 7,34 (m, 2H), 7,29 – 7,25 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 16,3 Hz, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,47 (s, 3H), 3,41 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 154,9, 153,5, 153,0, 151,6, 146,9, 145,8, 143,5, 133,8, 131,9, 128,3 (2x), 126,9 (2x), 126,7, 124,2 (2x),

Chemical structure of compound 10: CN1C=NC2=C(N1C)C(=O)N(C)C2Oc3ccc(cc3)/C=C/c4ccc(cc4)[N+](=O)[O-]

¹H NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The x-axis represents the chemical shift in ppm (f1 (ppm)), ranging from 0 to 14. The spectrum shows several peaks, with integration values provided below the main signals.

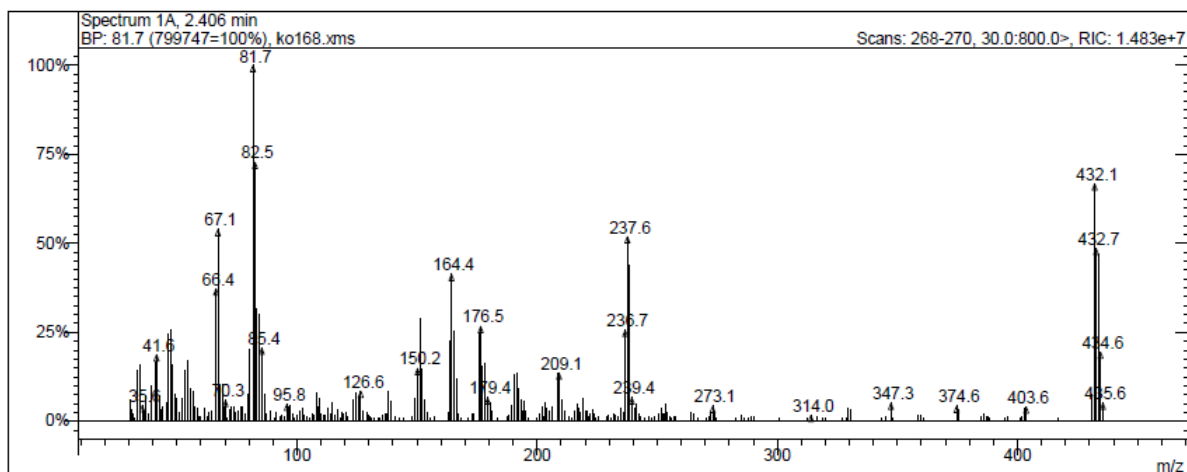
Integration values (from left to right): 2.22, 4.31, 2.15, 1.11, 3.06, 3.40, 3.00.

Reference peak: 1.63 H₂O.

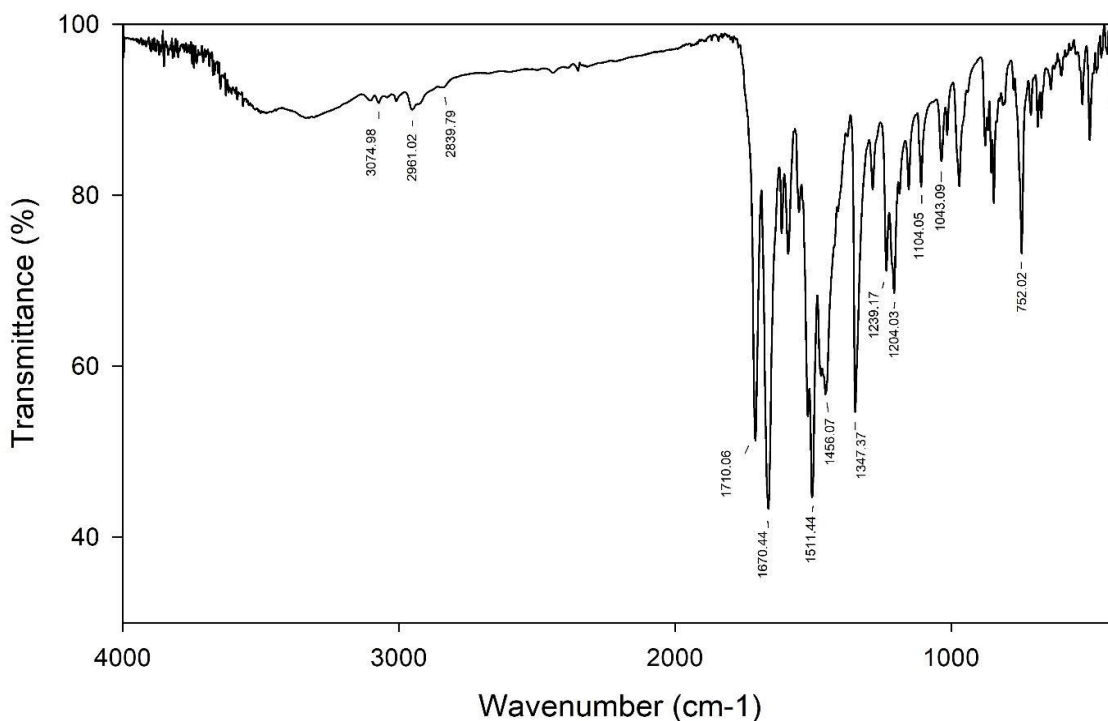
Chemical structure of compound 10: CN1C=NC2=C1C(=O)N(C)C2=Oc3ccc(cc3)/C=C/c4ccc(cc4)[N+](=O)[O-]

¹³C NMR spectrum (CDCl₃) of compound 10. The spectrum shows peaks at the following chemical shifts (ppm): 165.97, 165.94, 165.04, 151.61, 146.88, 146.72, 143.52, 133.79, 131.85, 131.80, 126.86, 126.70, 124.18, 119.92, 102.86, 77.32, 77.03, 76.68, 76.43, 76.19, 75.94, 37.68, 37.63, 37.58, 37.53, 37.48, 37.43, 37.38, 37.33, 37.28, 37.23, 37.18, 37.13, 37.08, 37.03, 36.98, 36.93, 36.88, 36.83, 36.78, 36.73, 36.68, 36.63, 36.58, 36.53, 36.48, 36.43, 36.38, 36.33, 36.28, 36.23, 36.18, 36.13, 36.08, 36.03, 35.98, 35.93, 35.88, 35.83, 35.78, 35.73, 35.68, 35.63, 35.58, 35.53, 35.48, 35.43, 35.38, 35.33, 35.28, 35.23, 35.18, 35.13, 35.08, 35.03, 34.98, 34.93, 34.88, 34.83, 34.78, 34.73, 34.68, 34.63, 34.58, 34.53, 34.48, 34.43, 34.38, 34.33, 34.28, 34.23, 34.18, 34.13, 34.08, 34.03, 33.98, 33.93, 33.88, 33.83, 33.78, 33.73, 33.68, 33.63, 33.58, 33.53, 33.48, 33.43, 33.38, 33.33, 33.28, 33.23, 33.18, 33.13, 33.08, 33.03, 32.98, 32.93, 32.88, 32.83, 32.78, 32.73, 32.68, 32.63, 32.58, 32.53, 32.48, 32.43, 32.38, 32.33, 32.28, 32.23, 32.18, 32.13, 32.08, 32.03, 31.98, 31.93, 31.88, 31.83, 31.78, 31.73, 31.68, 31.63, 31.58, 31.53, 31.48, 31.43, 31.38, 31.33, 31.28, 31.23, 31.18, 31.13, 31.08, 31.03, 30.98, 30.93, 30.88, 30.83, 30.78, 30.73, 30.68, 30.63, 30.58, 30.53, 30.48, 30.43, 30.38, 30.33, 30.28, 30.23, 30.18, 30.13, 30.08, 30.03, 29.98, 29.93, 29.88, 29.83, 29.78, 29.73, 29.68, 29.63, 29.58, 29.53, 29.48, 29.43, 29.38, 29.33, 29.28, 29.23, 29.18, 29.13, 29.08, 29.03, 28.98, 28.93, 28.88, 28.83, 28.78, 28.73, 28.68, 28.63, 28.58, 28.53, 28.48, 28.43, 28.38, 28.33, 28.28, 28.23, 28.18, 28.13, 28.08, 28.03, 27.98, 27.93, 27.88, 27.83, 27.78, 27.73, 27.68, 27.63, 27.58, 27.53, 27.48, 27.43, 27.38, 27.33, 27.28, 27.23, 27.18, 27.13, 27.08, 27.03, 26.98, 26.93, 26.88, 26.83, 26.78, 26.73, 26.68, 26.63, 26.58, 26.53, 26.48, 26.43, 26.38, 26.33, 26.28, 26.23, 26.18, 26.13, 26.08, 26.03, 25.98, 25.93, 25.88, 25.83, 25.78, 25.73, 25.68, 25.63, 25.58, 25.53, 25.48, 25.43, 25.38, 25.33, 25.28, 25.23, 25.18, 25.13, 25.08, 25.03, 24.98, 24.93, 24.88, 24.83, 24.78, 24.73, 24.68, 24.63, 24.58, 24.53, 24.48, 24.43, 24.38, 24.33, 24.28, 24.23, 24.18, 24.13, 24.08, 24.03, 23.98, 23.93, 23.88, 23.83, 23.78, 23.73, 23.68, 23.63, 23.58, 23.53, 23.48, 23.43, 23.38, 23.33, 23.28, 23.23, 23.18, 23.13, 23.08, 23.03, 22.98, 22.93, 22.88, 22.83, 22.78, 22.73, 22.68, 22.63, 22.58, 22.53, 22.48, 22.43, 22.38, 22.33, 22.28, 22.23, 22.18, 22.13, 22.08, 22.03, 21.98, 21.93, 21.88, 21.83, 21.78, 21.73, 21.68, 21.63, 21.58, 21.53, 21.48, 21.43, 21.38, 21.33, 21.28, 21.23, 21.18, 21.13, 21.08, 21.03, 20.98, 20.93, 20.88, 20.83, 20.78, 20.73, 20.68, 20.63, 20.58, 20.53, 20.48, 20.43, 20.38, 20.33, 20.28, 20.23, 20.18, 20.13, 20.08, 20.03, 19.98, 19.93, 19.88, 19.83, 19.78, 19.73, 19.68, 19.63, 19.58, 19.53, 19.48, 19.43, 19.38, 19.33, 19.28, 19.23, 19.18, 19.13, 19.08, 19.03, 18.98, 18.93, 18.88, 18.83, 18.78, 18.73, 18.68, 18.63, 18.58, 18.53, 18.48, 18.43, 18.38, 18.33, 18.28, 18.23, 18.18, 18.13, 18.08, 18.03, 17.98, 17.93, 17.88, 17.83, 17.78, 17.73, 17.68, 17.63, 17.58, 17.53, 17.48, 17.43, 17.38, 17.33, 17.28, 17.23, 17.18, 17.13, 17.08, 17.03, 16.98, 16.93, 16.88, 16.83, 16.78, 16.73, 16.68, 16.63, 16.58, 16.53, 16.48, 16.43, 16.38, 16.33, 16.28, 16.23, 16.18, 16.13, 16.08, 16.03, 15.98, 15.93, 15.88, 15.83, 15.78, 15.73, 15.68, 15.63, 15.58, 15.53, 15.48, 15.43, 15.38, 15.33, 15.28, 15.23, 15.18, 15.13, 15.08, 15.03, 14.98, 14.93, 14.88, 14.83, 14.78, 14.73, 14.68, 14.63, 14.58, 14.53, 14.48, 14.43, 14.38, 14.33, 14.28, 14.23, 14.18, 14.13, 14.08, 14.03, 13.98, 13.93, 13.88, 13.83, 13.78, 13.73, 13.68, 13.63, 13.58, 13.53, 13.48, 13.43, 13.38, 13.33, 13.28, 13.23, 13.18, 13.13, 13.08, 13.03, 12.98, 12.93, 12.88, 12.83, 12.78, 12.73, 12.68, 12.63, 12.58, 12.53, 12.48, 12.43, 12.38, 12.33, 12.28, 12.23, 12.18, 12.13, 12.08, 12.03, 11.98, 11.93, 11.88, 11.83, 11.78, 11.73, 11.68, 11.63, 11.58, 11.53, 11.48, 11.43, 11.38, 11.33, 11.28, 11.23, 11.1

103



Rys. E8.3. Widmo EI-MS związku **11**



Rys. E8.4. Widmo FT-IR związku **11**

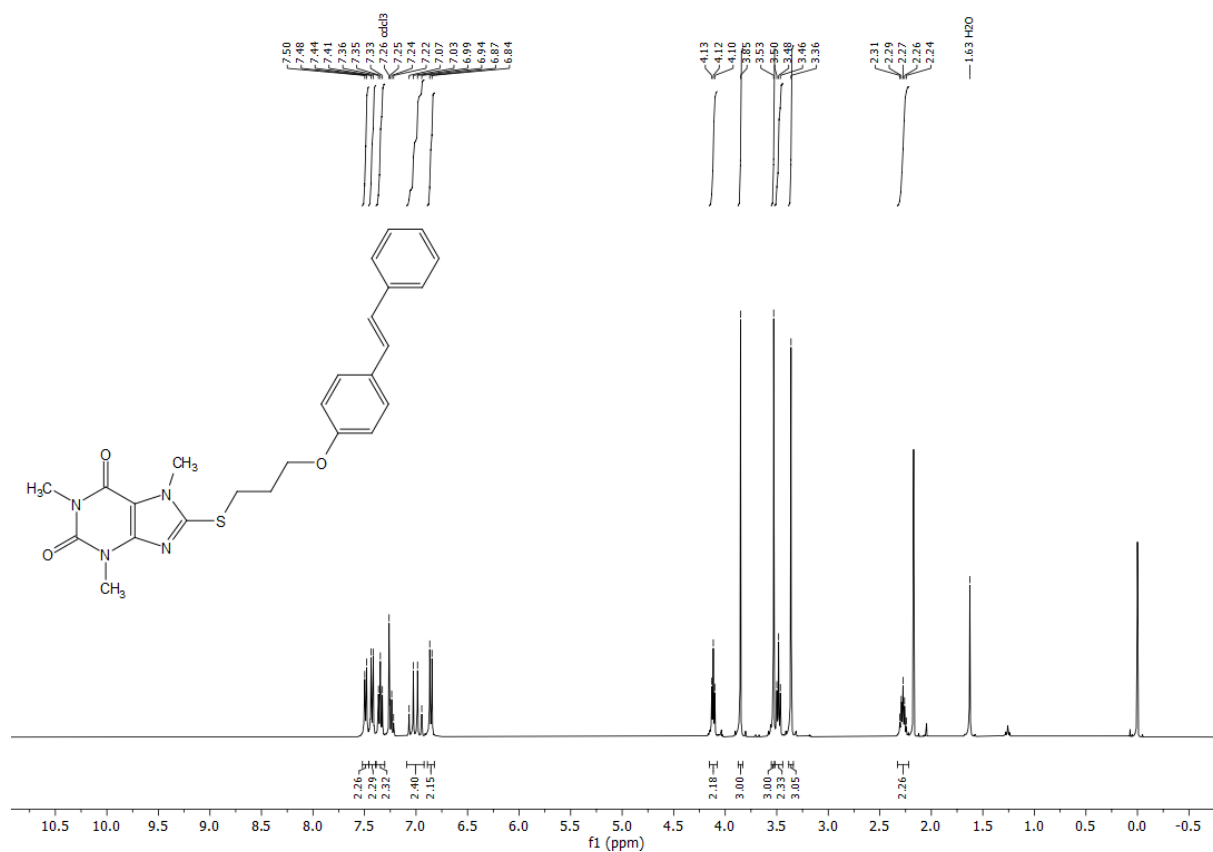
Związek 12

(E)-8-((3-(4-styrylofenoksy)propylo)sulfanylo)kofeina

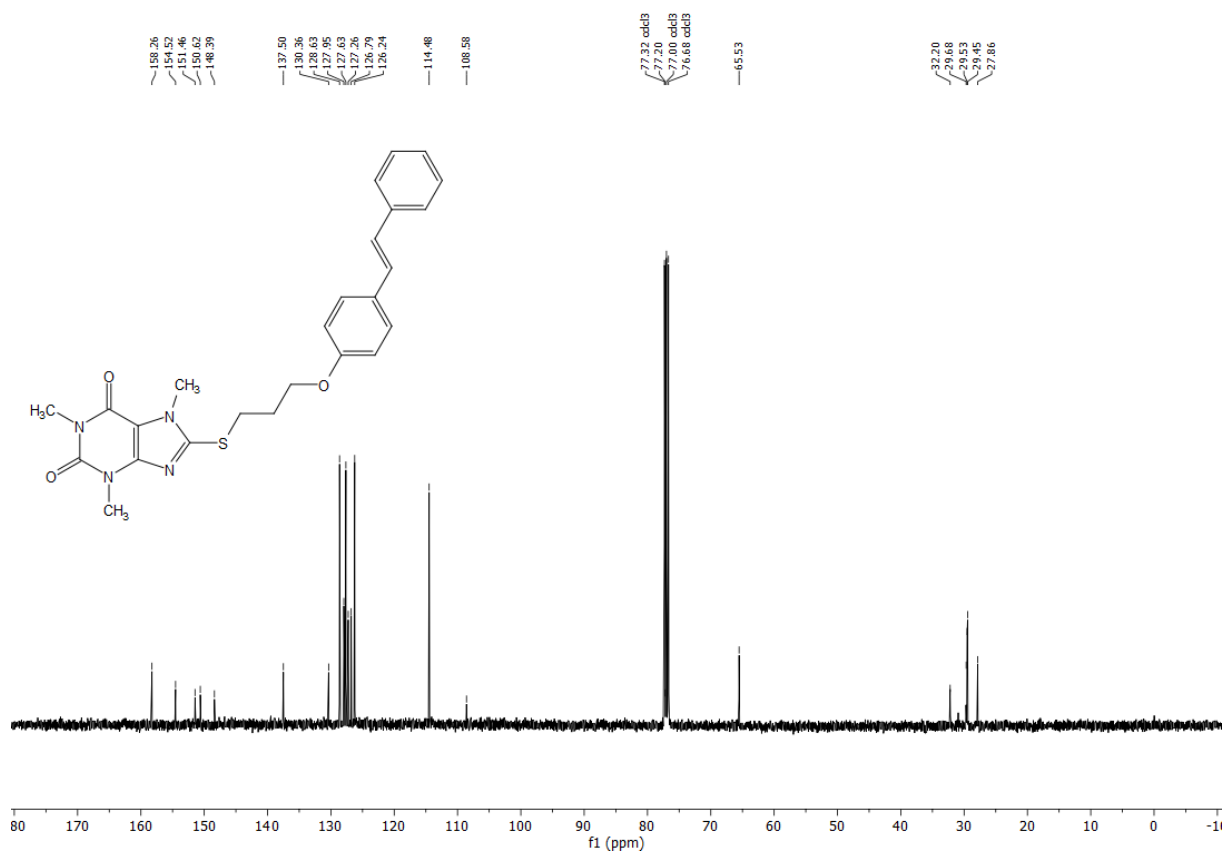
1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4-(3-bromopropoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem $CHCl_3$ (3×40

mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3\text{:AcOEt}$)

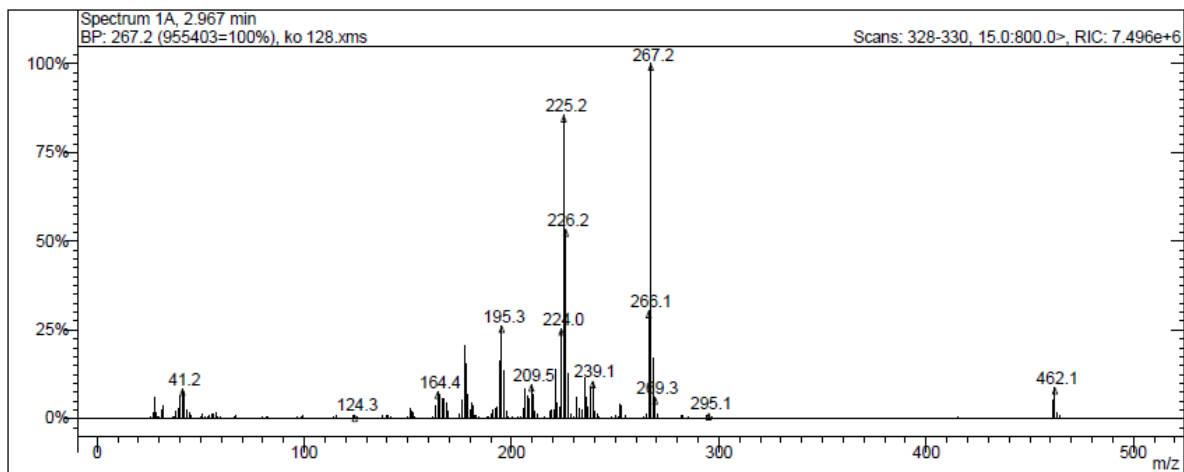
Białe ciało stałe (161 mg, 35%; t.t. 172–173 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,60 – 7,20 (m, 9H), 7,05 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H), 6,97 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 4,12 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 3,48 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,36 (s, 3H), 2,33 – 2,22 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158,3, 154,5, 151,6, 150,6, 148,4, 137,5, 130,4, 128,6 (2x), 128,0, 127,6 (2x), 127,3, 126,8, 126,2 (2x), 114,5, 108,6, 77,2, 65,5, 32,2, 29,7, 29,5, 29,5, 27,9. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3437, 3021, 2940, 2875, 1696, 1657, 1536, 1510, 1451, 1364, 1249, 1178, 1035, 976, 822, 754, 714, 536, 518. EI-MS (m/z , % int.): 462 ($[\text{M}]$, 10%).



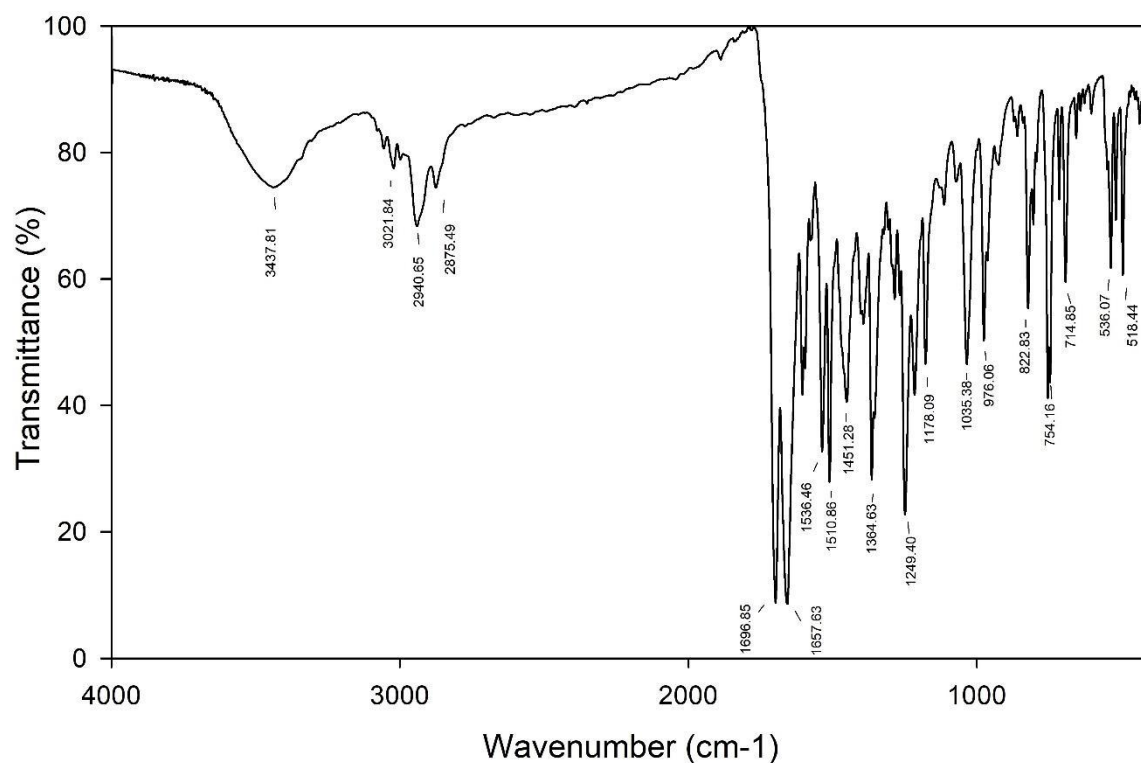
Rys. E9.1. Widmo ^1H NMR związku 12



Rys. E9.2. Widmo ^{13}C NMR związku **12**



Rys. E9.3. Widmo EI-MS związku **12**



Rys. E9.4. Widmo FT-IR związku 12

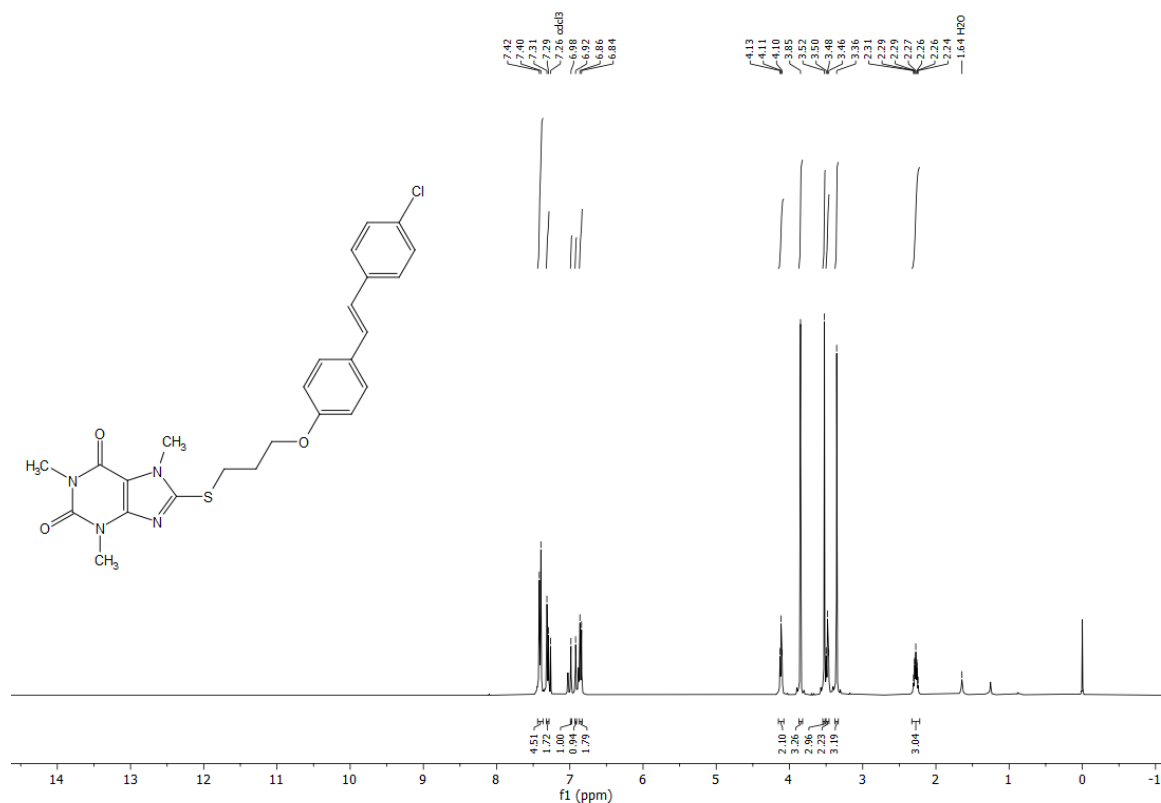
Związek 13

(E)-8-((3-(4-(4-chlorostyrylo)fenoksy)propylo)sulfanylo)kofeina

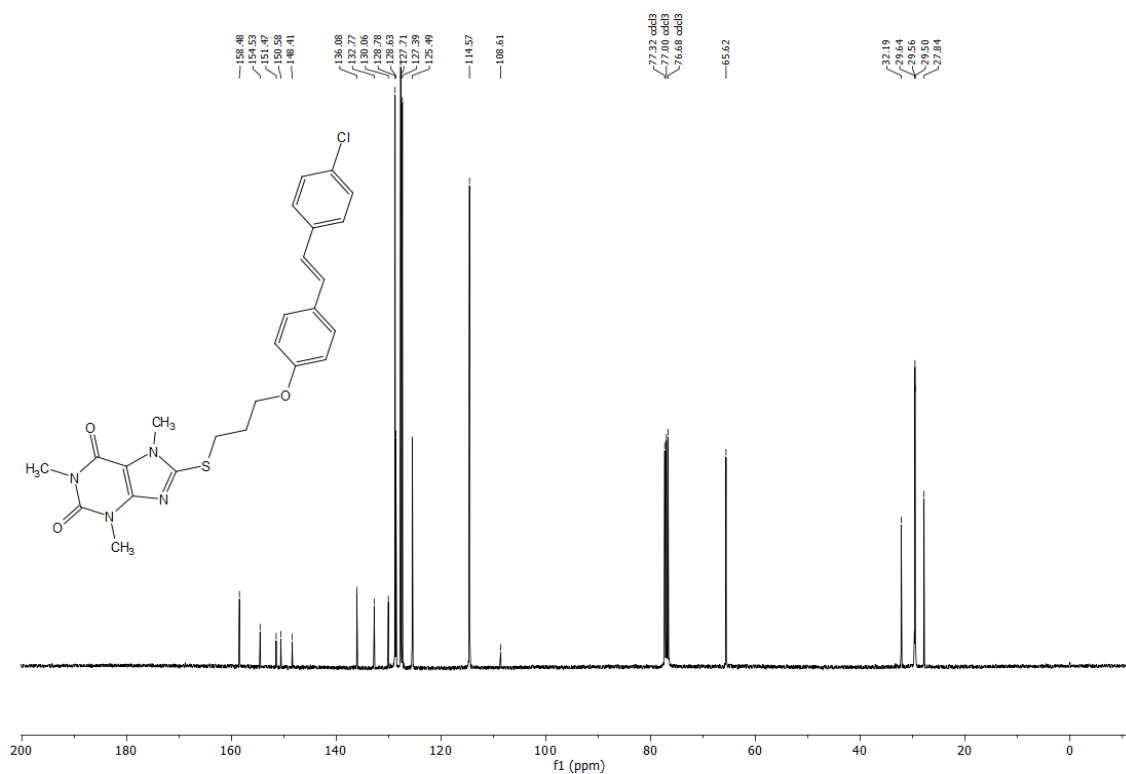
1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4'-chloro-4-(3-bromopropoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem $CHCl_3$ (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3:AcOEt$)

Białe ciało stałe (249 mg, 50%; t.t. 190–191 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,29 – 7,42 (m, 4 H), (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,98 (s, 1H), 6,92 (s, 1H), 6,85 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 4,11 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,52 (s, 3H), 3,48 (t, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,36 (s, 3H), 2,30 – 2,25 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 158,5, 154,5, 151,5, 150,6, 148,4, 136,1, 132,8, 130,1, 128,8 (2x), 128,6, 127,7 (2x), 127,4 (2x), 125,5, 114,6 (2x), 108,6, 65,6, 32,2, 29,6, 29,6, 29,5, 27,8.

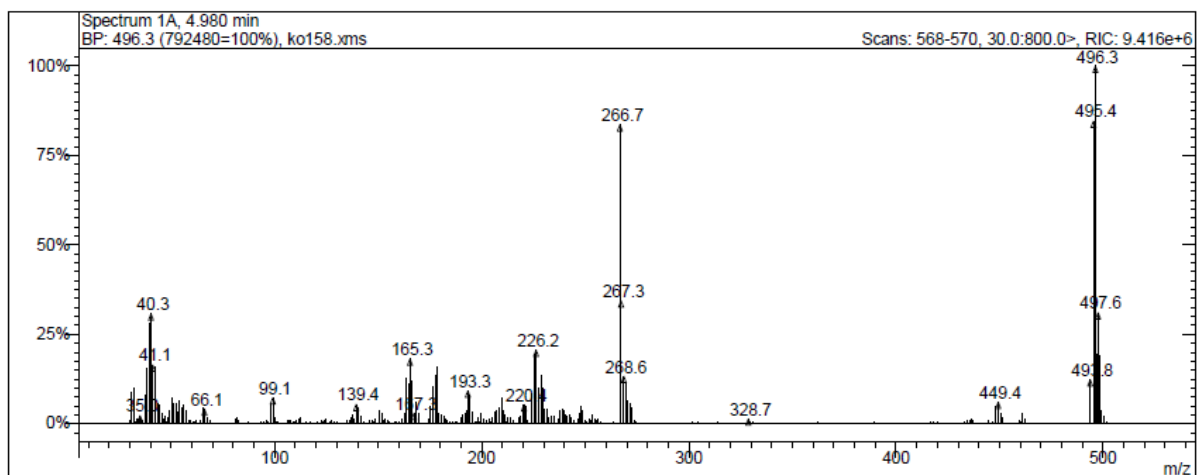
FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3438, 3021, 2944, 2870, 1696, 1671, 1604, 1512, 1367, 1257, 1174, 1096, 1034, 966, 831, 746, 539. EI-MS (m/z , % int.): 496 ([M], 100%).



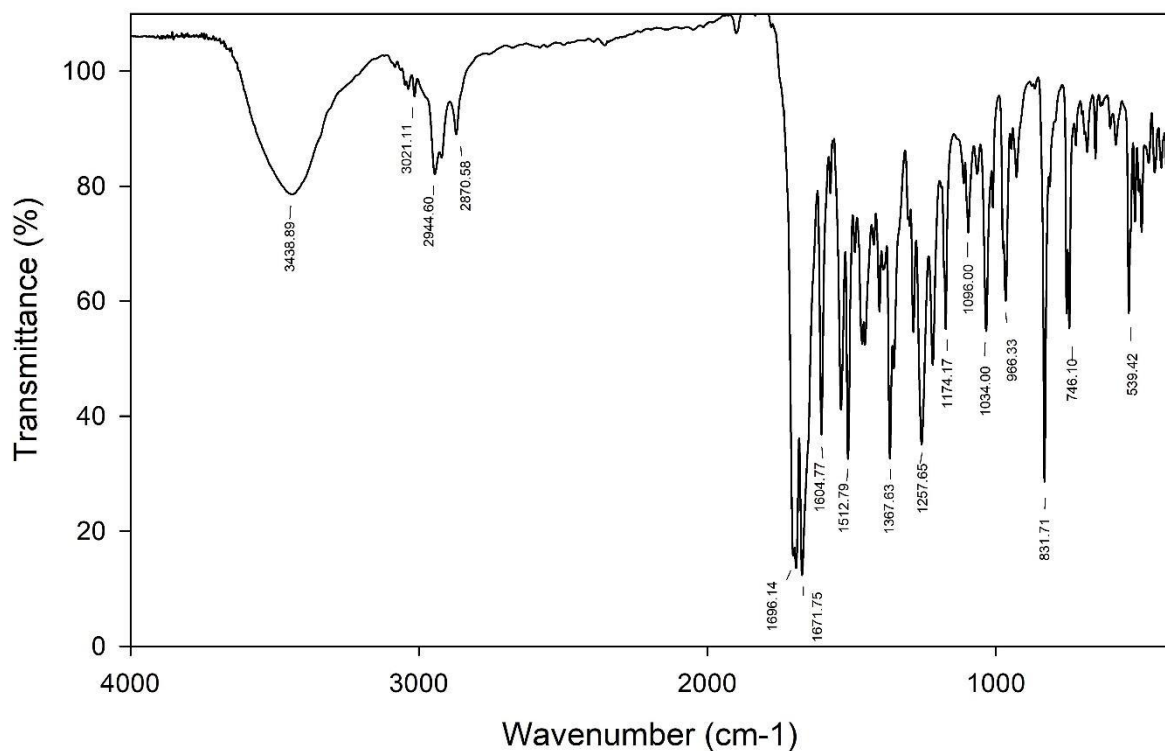
Rys. E10.1. Widmo ¹H NMR związku 13



Rys. E10.2. Widmo ¹³C NMR związku 13



Rys. E10.3. Widmo EI-MS związku 13



Rys. E10.4. Widmo FT-IR związku 13

Związek 14

(E)-8-((3-(4-(4-nitrostyrylo)fenoksy)propylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4'-nitro-4-(3-bromopropoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej

(TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)

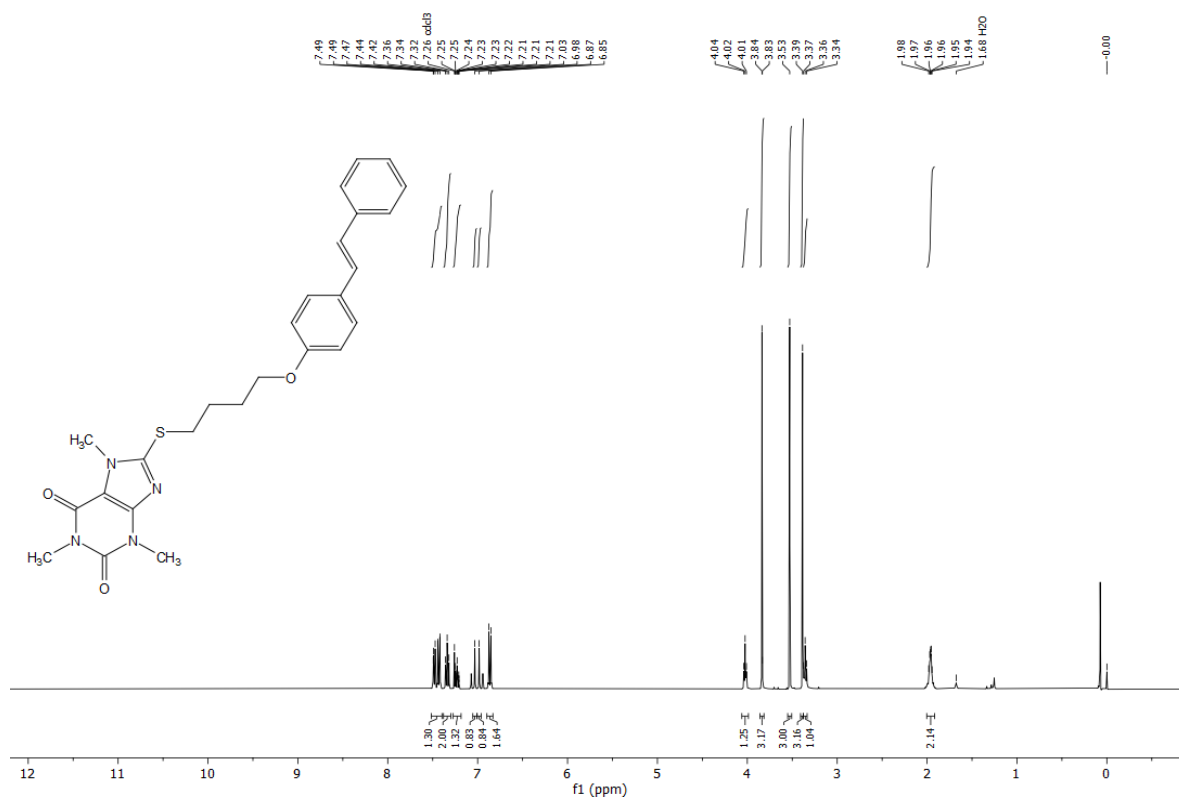
Żółtawe ciało stałe (61 mg, 12%); t.t. 218–219 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,26 – 8,14 (m, 2H), 7,67 – 7,57 (m, 2H), 7,53 – 7,41 (m, 2H), 7,21 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 7,01 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 6,95 – 6,82 (m, 2H), 4,14 (t, $J = 5,8$ Hz, 2H), 3,86 (s, 3H), 3,52 (s, 3H), 3,49 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H), 3,35 (s, 3H), 2,33 – 2,25 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159,2, 154,5, 151,4, 150,8, 148,3, 146,4, 144,2, 132,6, 129,1, 128,3 (2x), 126,5 (2x), 124,2, 124,0 (2x), 114,6 (2x), 108,6, 65,6, 32,1, 29,6, 29,5, 29,4, 27,8. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3471, 3077, 2955, 2887, 1701, 1659, 1598, 1510, 1368, 1339, 1254, 1177, 1032, 836, 748. EI-MS (m/z , % int.): 506 ([M], 20%).

Związek 15

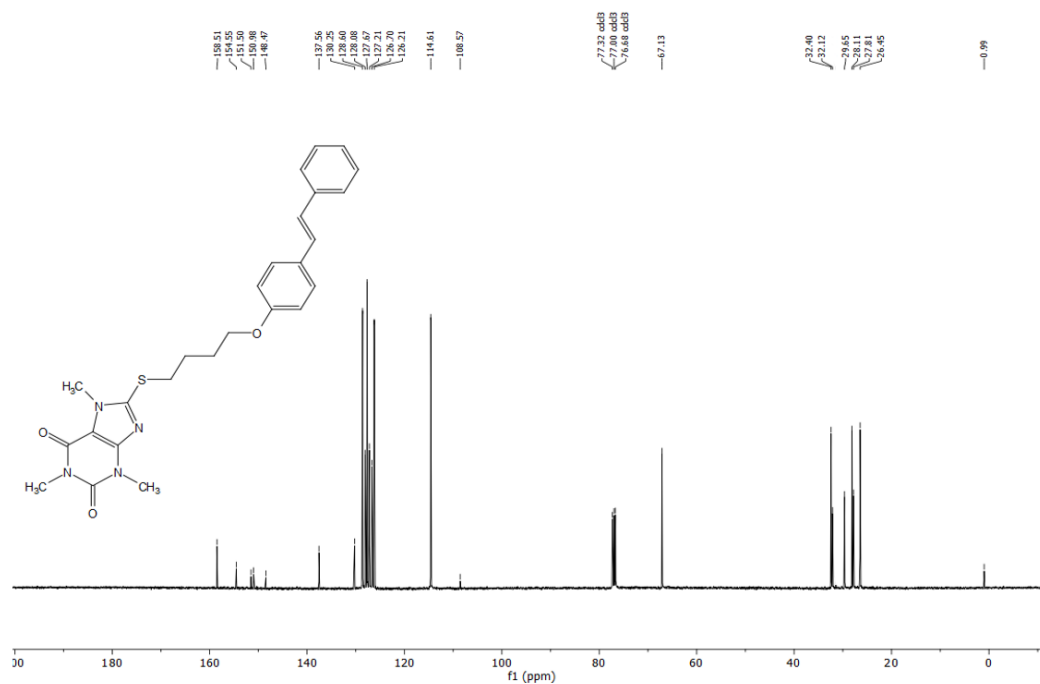
(E)-8-((4-(4-styrylofenoksy)butylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4-(4-bromobutoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)

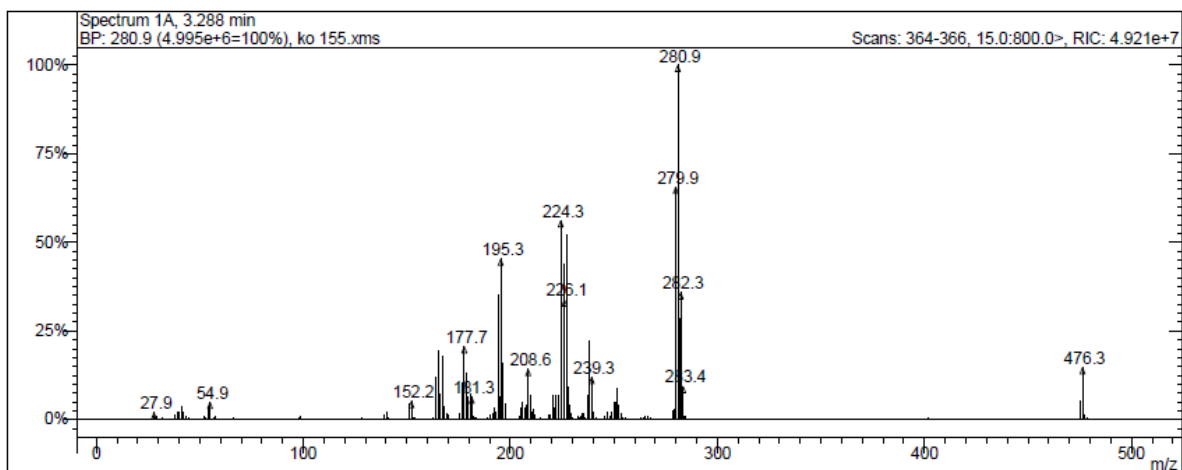
Białe ciało stałe (238 mg, 50%); t.t. 214–215 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,52 – 7,40 (m, 2H), 7,34 (m, 2H), 7,27 – 7,18 (m, 3H), 7,03 (1H), 6,98 (1H), 6,86 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 4,06 – 3,99 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,38 – 3,33 (m, 2H), 2,04 – 1,89 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158,5, 154,6, 151,5, 151,0, 148,5, 137,6, 130,3, 128,6 (2x), 128,1, 127,7 (2x), 127,2, 126,7, 126,2 (2x), 114,6 (2x), 108,6, 67,1, 32,4, 32,1, 29,7, 28,1, 27,8, 26,5. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3435, 3019, 2956, 2869, 1703, 1667, 1604, 1509, 1455, 1359, 1246, 1176, 1030, 803, 746, 534. EI-MS (m/z , % int.): 476 ([M], 20%)



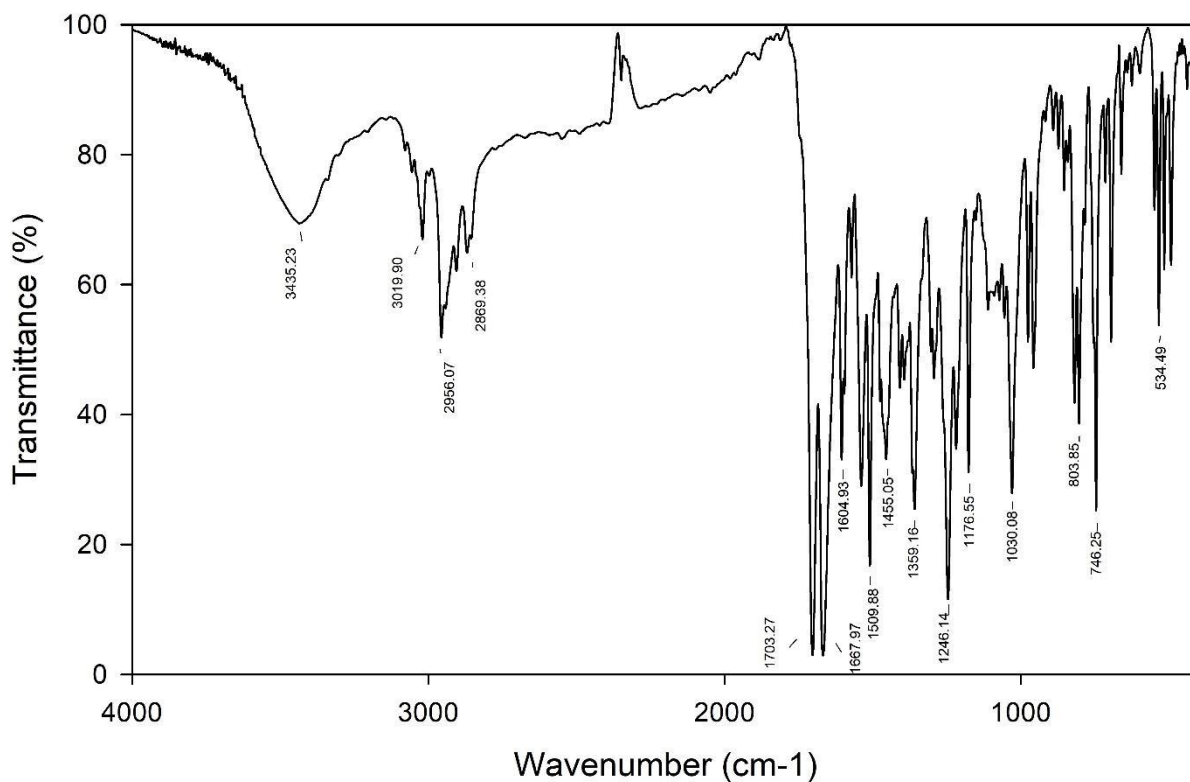
Rys. E11.1. Widmo ¹H NMR związku 15



Rys. E11.2. Widmo ¹³C NMR związku 15



Rys. E11.3. Widmo EI-MS związku 15



Rys. E11.4. Widmo FT-IR związku 15

Związek 16

(E)-8-((4-(4-(4-chlorostyrylo)fenoksy)butylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4'-chloro-4-(4-bromobutoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej

(TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)

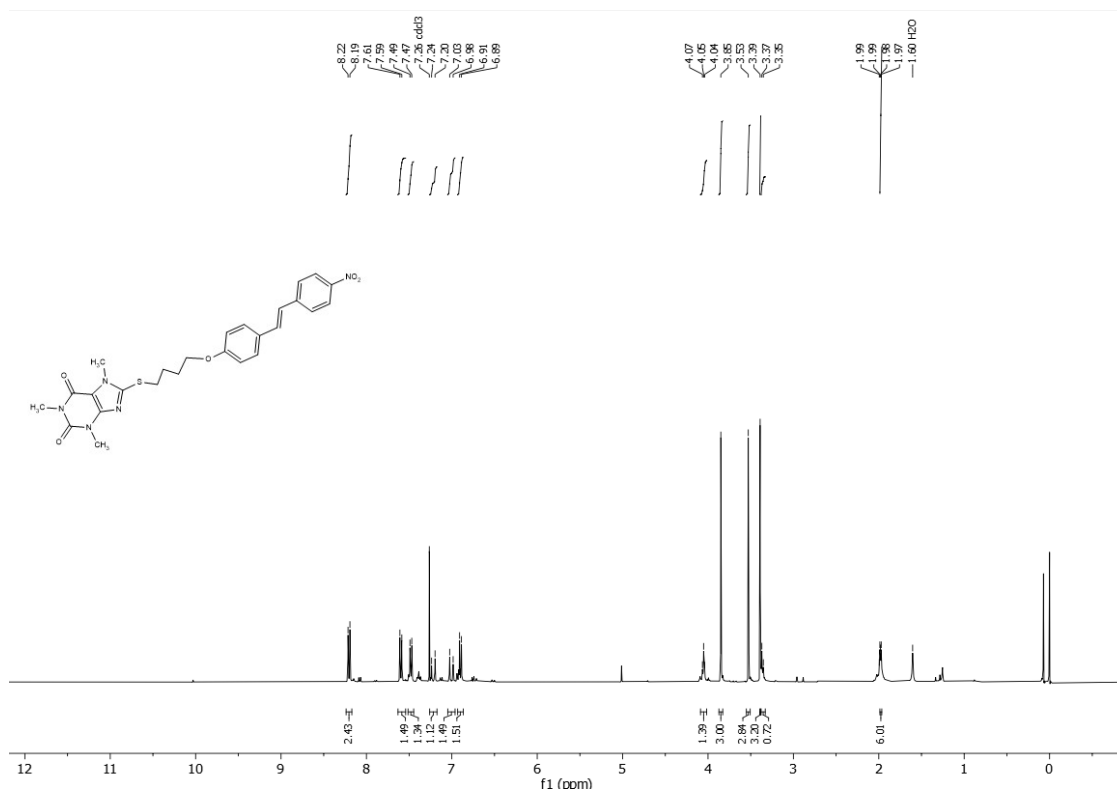
Białe ciało stałe (245 mg, 48%); t.t. 172–173 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (m, 4H), 7,34 – 7,26 (m, 2H), 7,01 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 6,95 – 6,82 (m, 3H), 4,03 – 3,99 (m, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,38 – 3,33 (m, 2H), 2,05 – 1,89 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158,6, 154,5, 151,5, 151,0, 148,4, 136,1, 132,7, 129,8, 128,7, 128,7 (2x), 127,7 (2x), 127,3 (2x), 125,3, 114,6 (2x), 108,5, 67,1, 32,4, 32,1, 29,7, 28,1, 27,8, 26,4. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3429, 3021, 2941, 2870, 1698, 1667, 1604, 1534, 1365, 1252, 1032, 973, 832, 747, 540. EI-MS (m/z , % int.): 510 ($[\text{M}]$, 50%).

Związek 17

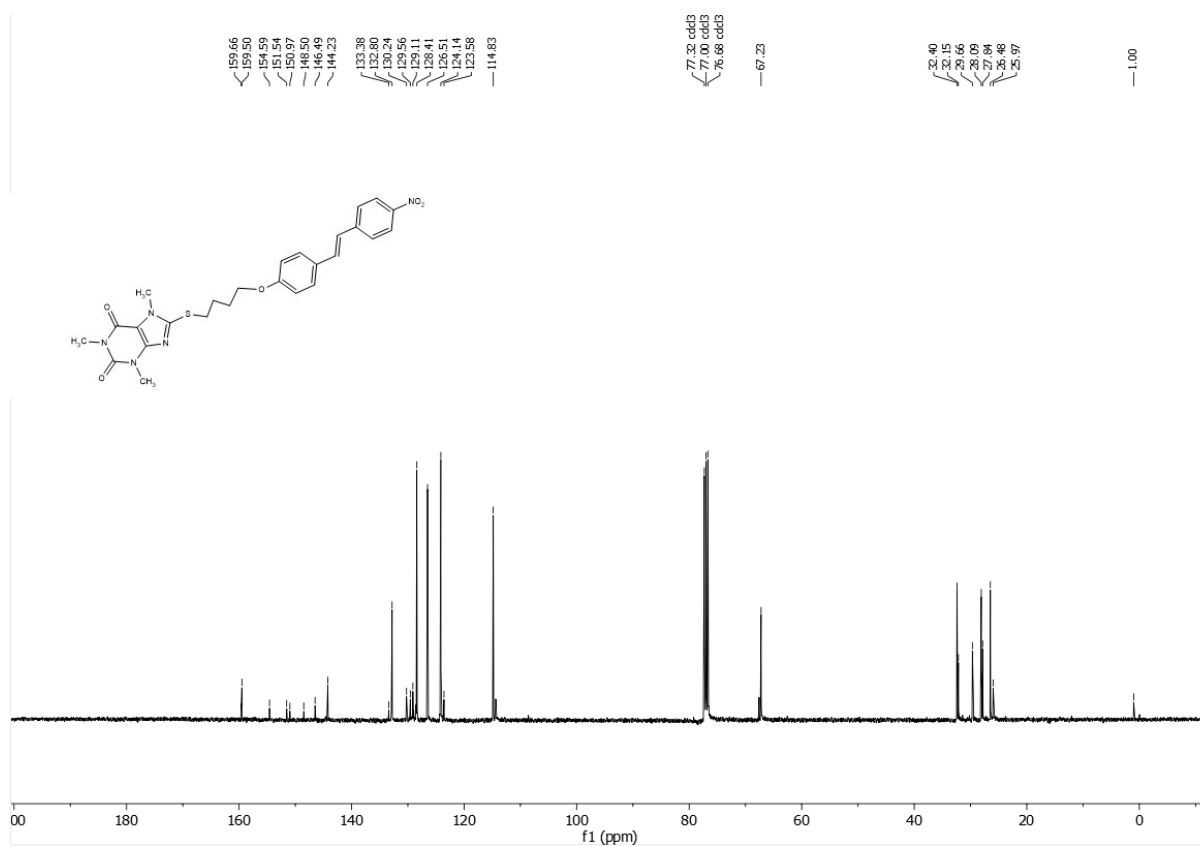
(E)-8-((4-(4-(4-nitrostyrylo)fenoksy)butylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4'-nitro-4-(4-bromobutoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)

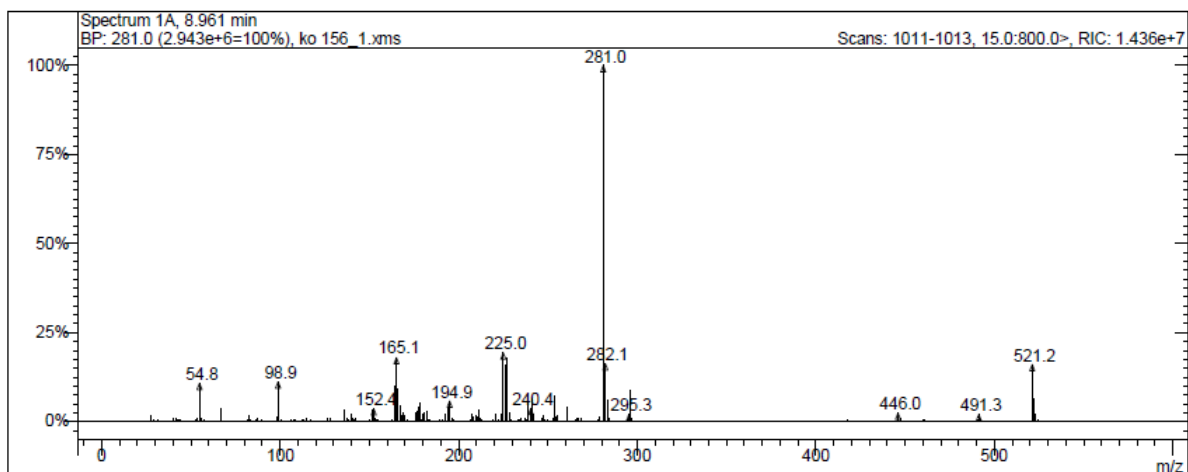
Brązowawe ciało stałe (78 mg, 15%); t.t. 202–203 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,60 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H), 7,48 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H), 7,23 (m, 4H), 7,00 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 4,09 – 4,02 (m, 2H), 3,85 (s, 3H), 3,53 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,36 (t, $J = 7,0$ Hz, 2H), 1,98 (m, $J = 3,6$ Hz, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159,5, 154,6, 151,5, 151,0, 148,5, 146,5, 144,2, 132,8, 130,2, 129,6, 129,1, 128,4 (2x), 126,5 (2x), 124,1 (2x), 114,8 (2x), 67,2, 32,4, 32,2, 29,7, 28,1, 27,8, 26,5. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3439, 3037, 2933, 2862, 1701, 1656, 1604, 1511, 1337, 1285, 1176, 1108, 1034, 974, 841, 746, 494. EI-MS (m/z , % int.): 521 ($[\text{M}]$, 20%).



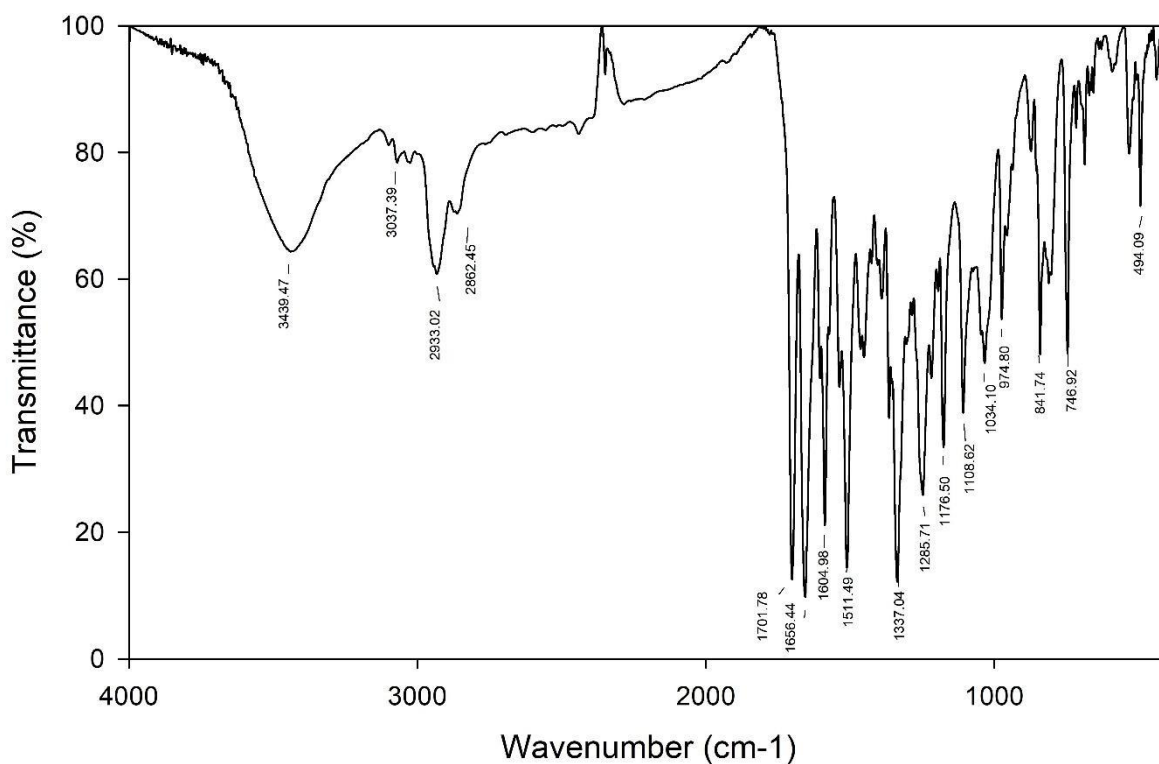
Rys. E12.1. Widmo ¹H NMR związku 17



Rys. E12.2. Widmo ¹³C NMR związku 17



Rys. E12.3. Widmo EI-MS związku 17



Rys. E12.4. Widmo FT-IR związku 17

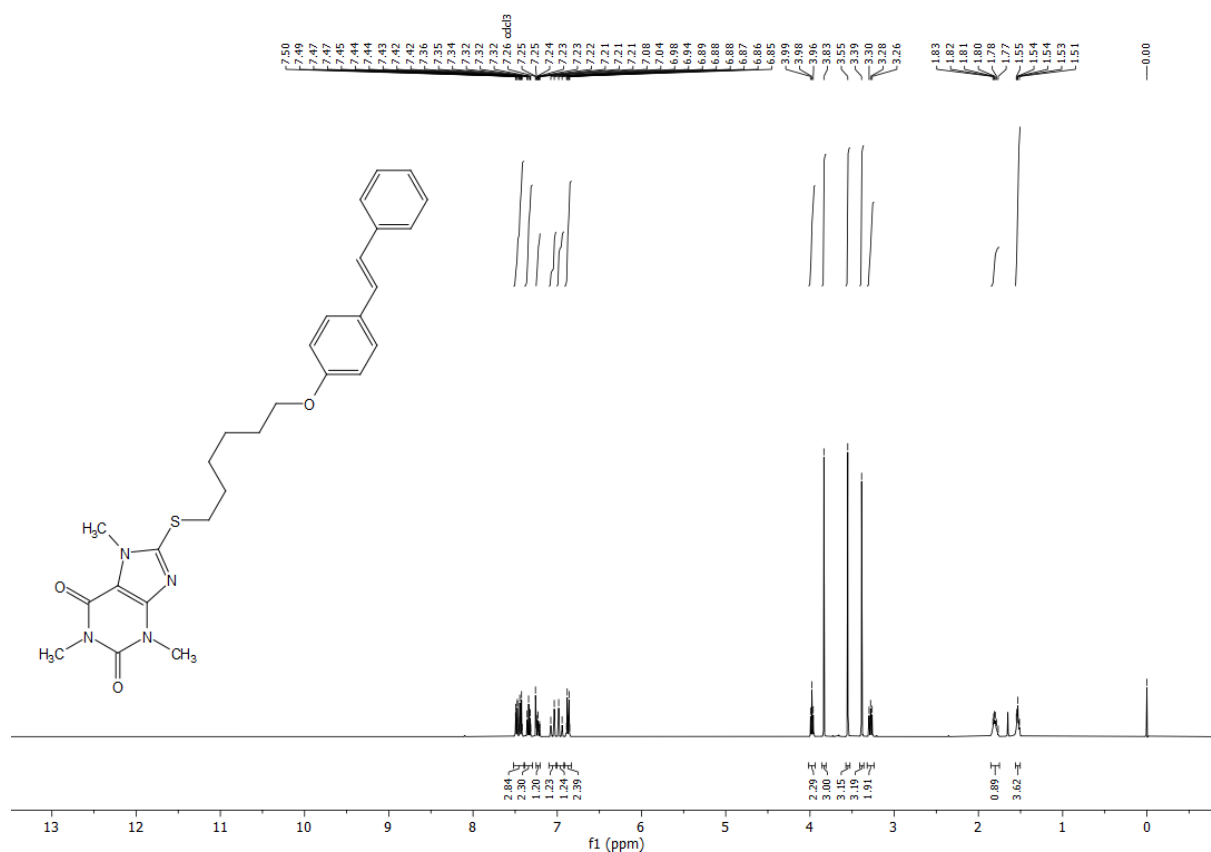
Związek 18

(E)-8-((6-(4-styrylofenoksy)heksylo)sulfanylo)kofeina

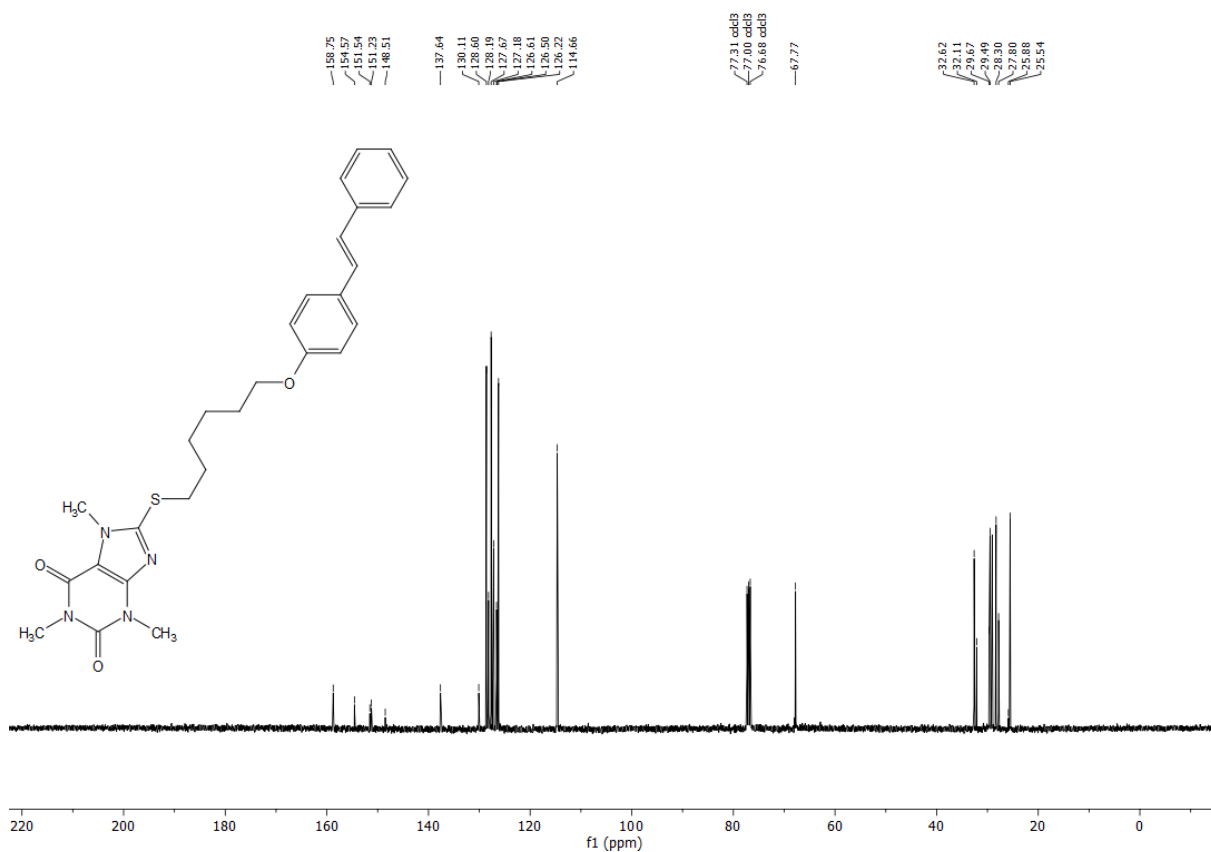
1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4-(6-bromoheksoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na

zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)

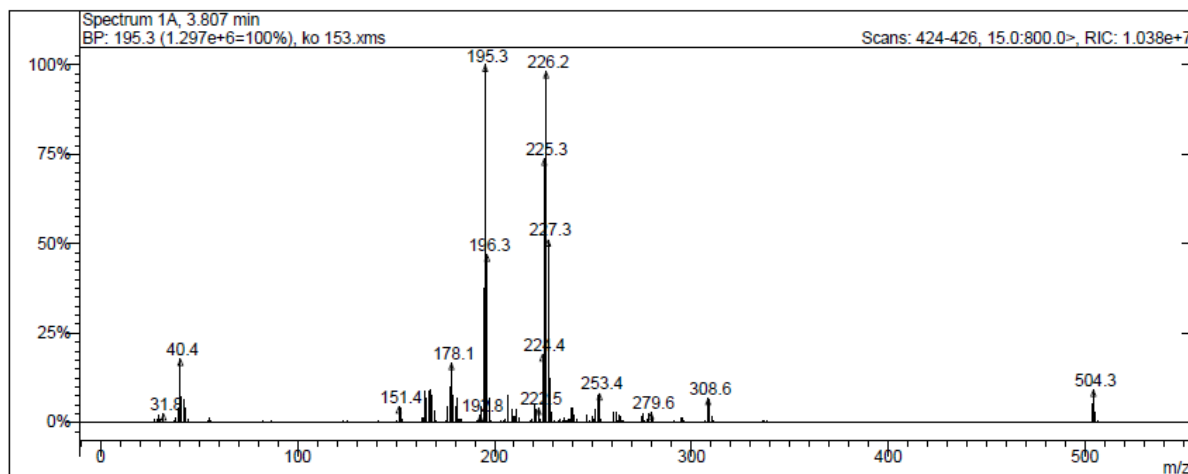
Białe ciało stałe 261 mg, 52%); t.t. 148–149 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,52 – 7,39 (m, 3H), 7,39 – 7,29 (m, 2H), 7,25 – 7,20 (m, 2H), 7,06 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 6,96 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H), 6,91 – 6,83 (m, 2H), 3,98 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,83 (s, 3H), 3,55 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,30 – 3,26 (m, 2H), 1,86 – 1,75 (m, 4H), 1,55 – 1,51 (m, 4H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158,8, 154,6, 151,5, 151,2, 148,5, 137,6, 130,1, 128,6 (2x), 128,2, 127,7 (2x), 127,2, 126,6, 126,5, 126,2 (2x), 114,7 (2x), 67,8, 32,6, 32,1, 29,7, 29,5, 28,3, 27,8, 25,9, 25,5. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3436, 3022, 2935, 2858, 1712, 1665, 1604, 1537, 1511, 1358, 1248, 1176, 1036, 965, 822, 746, 691, 537. EI-MS (m/z , % int.): 504 ($[\text{M}]$, 10%).



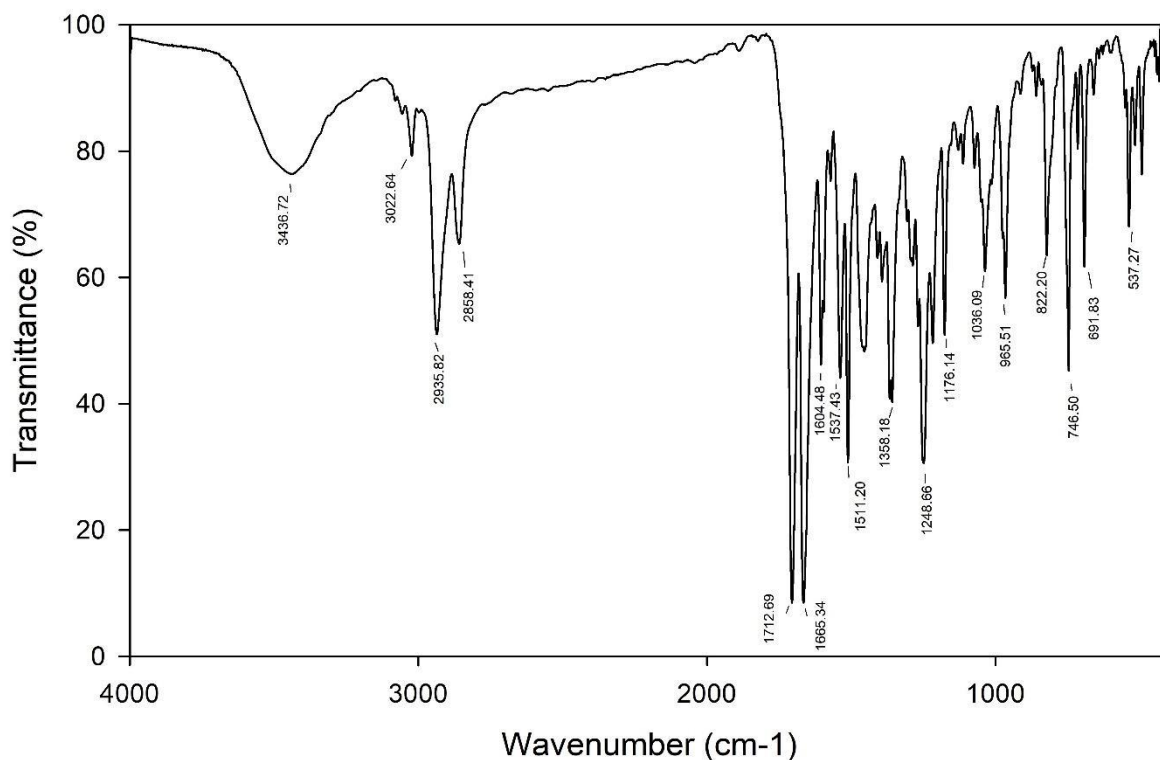
Rys. E13.1. Widmo ^1H NMR związku **18**



Rys. E13.2. Widmo ^{13}C NMR związku 18



Rys. E13.3. Widmo EI-MS związku 18



Rys. E13.4. Widmo FT-IR związku **18**

Związek 19

(E)-8-((6-(4-(4-chlorostyrylo)fenoksy)heksylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4'-chloro-4-(6-bromoheksoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem $CHCl_3$ (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3:AcOEt$)

Białe ciało stałe (260 mg, 48%); t.t. 152–153 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,43 – 7,40 (m, 4H), 7,30 6,93 (m, 4H), 6,87 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 3,98 (t, J = 6,4 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,55 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,33 – 3,24 (m, 2H), 1,82-1,79 (m, 6H), 1,55-1,52 (m, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 159,0, 154,6, 151,6, 151,3, 148,5, 136,2, 132,7, 129,8, 128,8 (3x), 127,8 (2x), 127,4 (2x), 125,3, 114,7 (2x), 108,6, 67,8, 32,6, 32,1, 29,7, 29,5, 29,1, 28,3, 27,8, 25,5. FT-IR:

(KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3438, 3024, 2937, 2867, 1701, 1669, 1604, 1511, 1364, 1252, 1218, 1089, 1032, 973, 831, 746, 539. EI-MS (m/z , % int.): 538 (M, 25%).

Związek 20

(E)-8-((6-(4-(4-nitrostyrylo)fenoksy)heksylo)sulfanylo)kofeina

1 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 5 mL DMF, dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem do mieszaniny 4'-nitro-4-(6-bromoheksoksy)stilben (1 mmol) i mieszałem przez 48 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem wody (20 mL), następnie całość ekstrahowałem CHCl_3 (3×40 mL). Połączone ekstrakty przemyłem wodą (3×40 mL) oraz solanką (120 mL). Całość suszyłem nad bezwodnym Na_2SO_4 , a rozpuszczalnik usunąłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując metodę gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$)

Brązowe ciało stałe (203 mg, 37%); t.t. 157–158 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,20 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,59 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,20 (m, 2H), 7,02 (m, 2H), 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 4,00 (t, $J = 6,4$ Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 3,55 (s, 3H), 3,39 (s, 3H), 3,33 – 3,25 (m, 2H), 1,82 (d, $J = 6,2$ Hz, 6H), 1,55 (q, $J = 3,7$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159,7, 154,6, 151,6, 151,2, 148,5, 146,5, 144,3, 132,9, 128,4 (2x), 126,5 (2x), 124,1 (2x), 124,1 (2x), 114,9, 114,8, 108,6, 67,9, 32,6, 32,1, 29,7, 29,5, 29,0, 28,3, 27,8, 25,5. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3440, 3026, 2940, 2863, 1700, 1656, 1509, 1335, 1259, 1174, 1031, 842, 747, 537. EI-MS (m/z , % int.): 549 ([M], 60%).

4.5 Synteza i dane spektroskopowe biokonjugatów kofeiny i pochodnych pierścienia imidazolowego – Grupa III (związki **21**–**28**)

Związek **21**

8-((1-metylo-1H-benzo(d)imidazol-2-yl)sulfanylo)kofeina

1,5 mmol *2-merkaptio-3-metylo-1H-benzimidazolu* rozpuściłem w 15 mL EtOH, następnie dodałem 2 mmol K₂CO₃ i mieszałem przez godzinę. Po tym czasie dodałem 8-bromokofeinę (1 mmol). Mieszaninę grzałem pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem 20 mL wody. Otrzymaną mieszaninę ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL), przemyłem wodą (3 x 30 mL) oraz solanką (90 mL). Podczas reakcji powstał związek **26** jako produkt uboczny. Surową mieszaninę związków **21** i **26** rozdzieliłem, korzystając z chromatografii kolumnowej gradientowej (CHCl₃:AcOEt). Związek **26** uzyskałem z wydajnością 10%.

Białe ciało stałe (213 mg, 60%); t.t. 208–209 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,71–7,69 (dt, *J* = 7,9, 1,1 Hz, 2H), 7,34 (dd, *J* = 6,4, 1,2 Hz, 2H), 4,12 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,51 (s, 3H), 3,39 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 154,85, 151,29, 147,83, 143,12, 142,97, 141,59, 136,48, 123,67, 122,77, 119,89, 110,17, 109,53, 33,59, 31,11, 29,78, 27,99. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3051, 2945, 1703, 1659, 1603, 1454, 1364, 745. EI-MS (*m/z*, % int.): 356 ([M], 65%). Zawartość obliczona dla: C₁₆H₁₆N₂O₂S (MW = 356,11): C, 53,92; H, 4,53; N, 23,58; O, 8,98; S, 9; otrzymana: C, 53,6; H, 3,99; N, 23,51; S, 8,43 %.

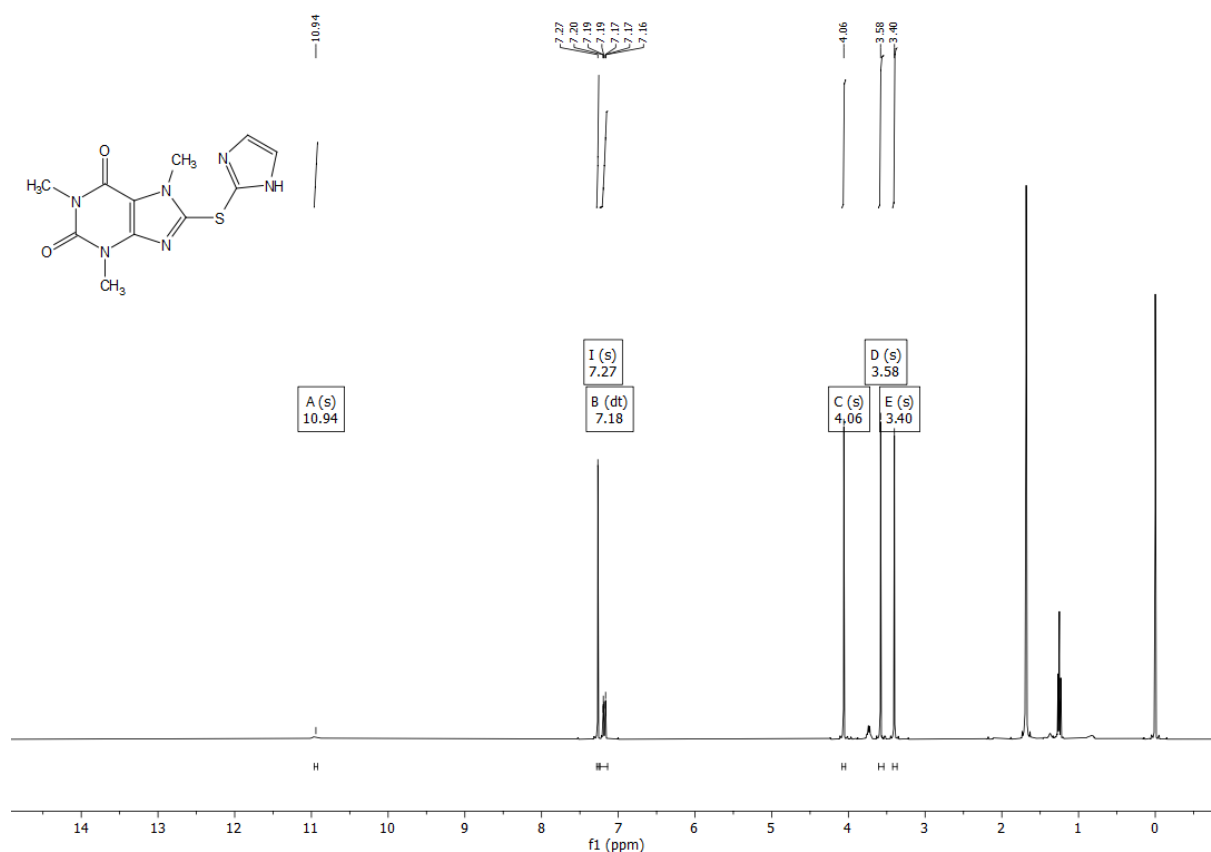
Związek **22**

8-((1H-imidazol-2-yl)sulfanylo)kofeina

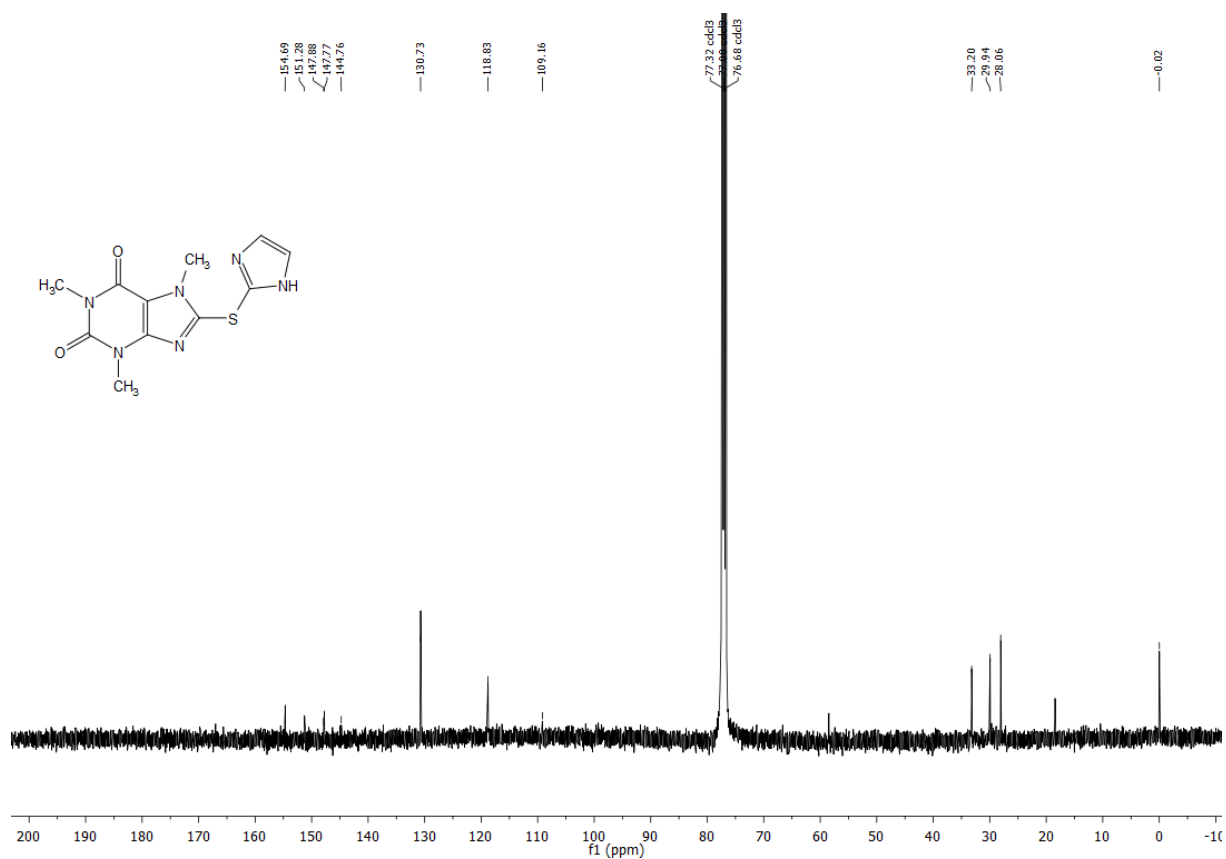
1,5 mmol *2-merkaptioimidazolu* rozpuściłem w 15 mL EtOH, następnie dodałem 2 mmol K₂CO₃ i mieszałem przez godzinę. Po tym czasie dodałem 8-bromokofeinę (1 mmol). Mieszaninę grzałem pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 3 h. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie reakcji dodałem 20 mL wody. Otrzymaną mieszaninę ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL), przemyłem wodą (3 x 30 mL) oraz solanką (90 mL). Podczas reakcji powstał związek **26** jako produkt uboczny. Surową mieszaninę związków **22** i **26** rozdzieliłem, korzystając z

chromatografii kolumnowej gradientowej (CHCl₃:AcOEt). Związek **26** uzyskałem z wydajnością 15%.

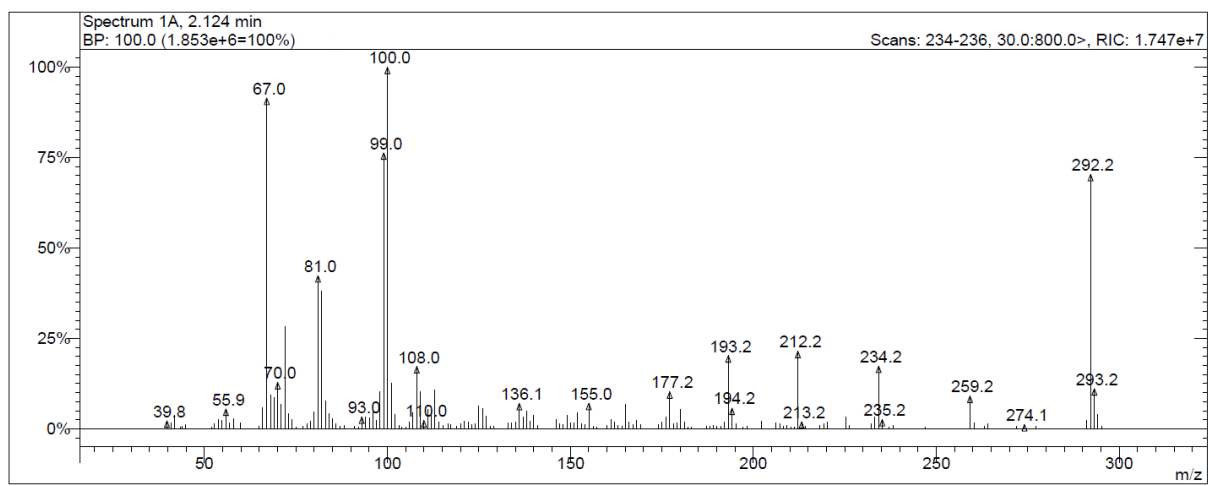
Białe ciało stałe (220 mg; 76%); t.t. 221–222 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 10,94 (s, 1H), 7,18 (dt, *J* = 11,2, 1,4 Hz, 2H), 4,06 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,40 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 154,69, 151,28, 147,88, 147,77, 144,76, 130,73, 118,83, 109,16, 33,20, 29,94, 28,06. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3131, 3000, 2892, 2633, 1704, 1665, 1604, 1449, 1367, 744. EI-MS (*m/z*, % int.): 292,2 ([M], 70%). Zawartość obliczona dla C₁₁H₁₂N₆O₂S (MW = 292,32): C, 45,2; H, 4,14; N, 28,75; O, 10,95; S, 10,97. Otrzymana: C, 43,32; H, 2,87; N, 27,65; S, 10,49 %.



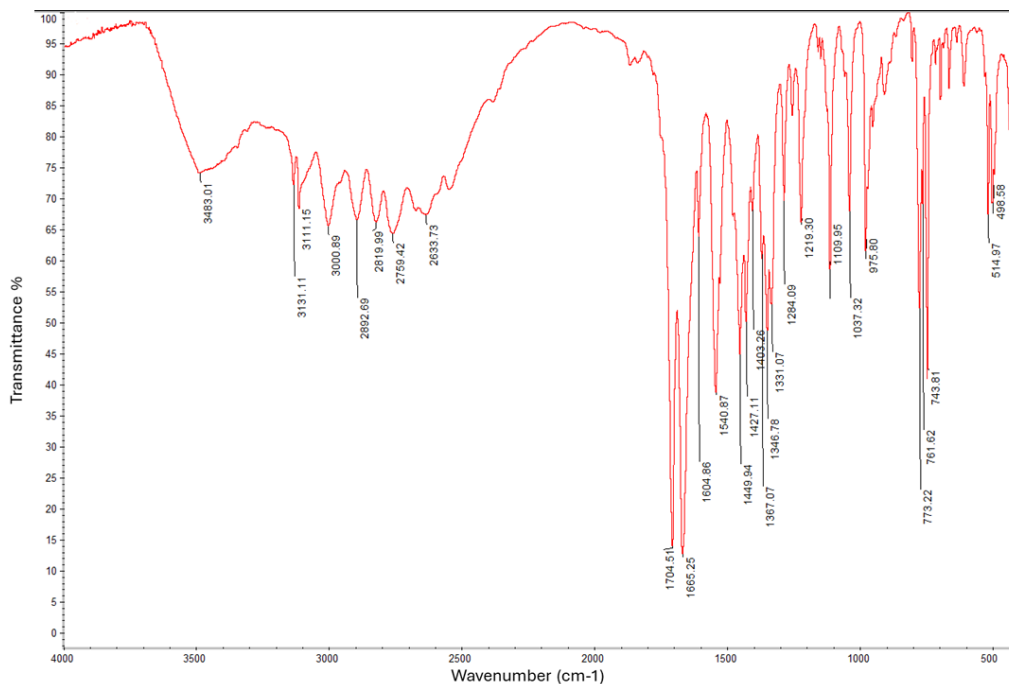
Rys. E14.1. Widmo ¹H NMR związku **22**



Rys. E14.2. Widmo ¹³C NMR związku 22



Rys. E14.3. Widmo EI-MS związku 22



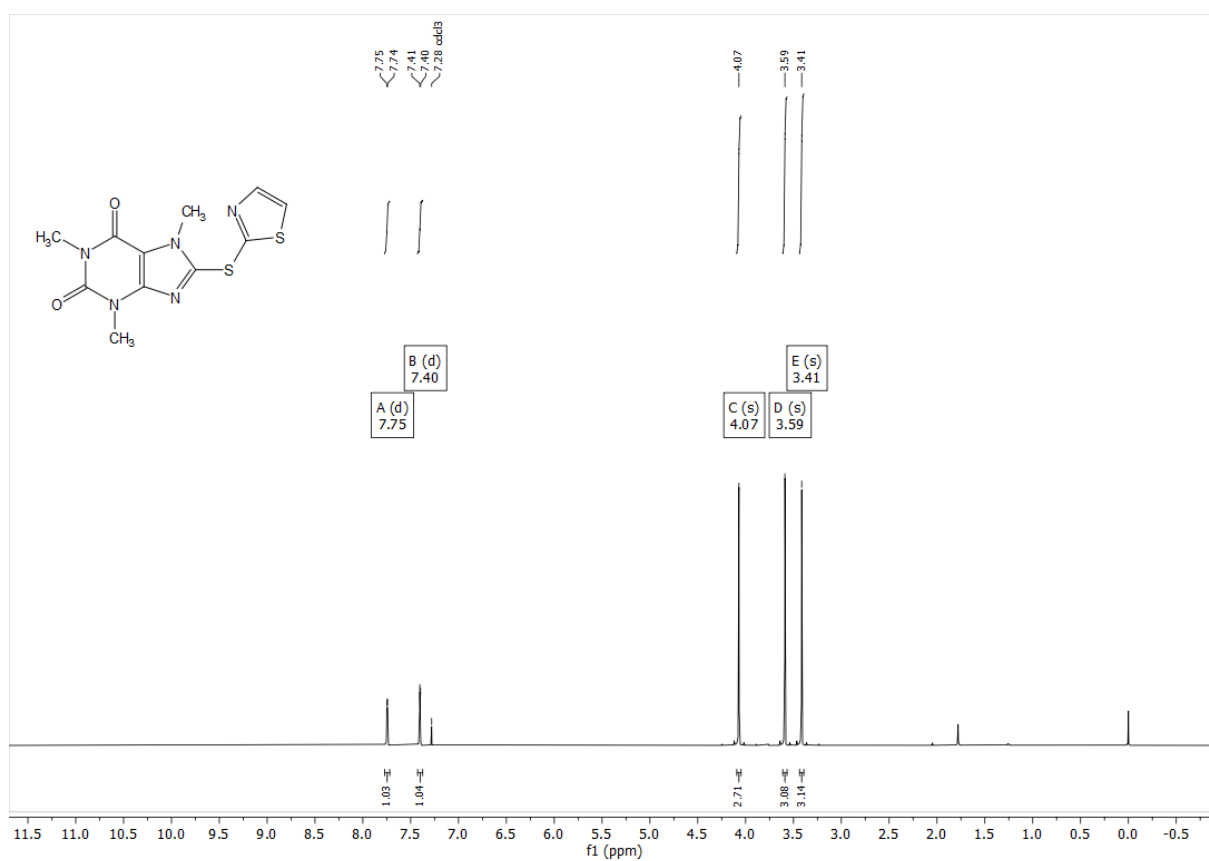
Rys. E14.4. Widmo FT-IR związku 22

Związek 23

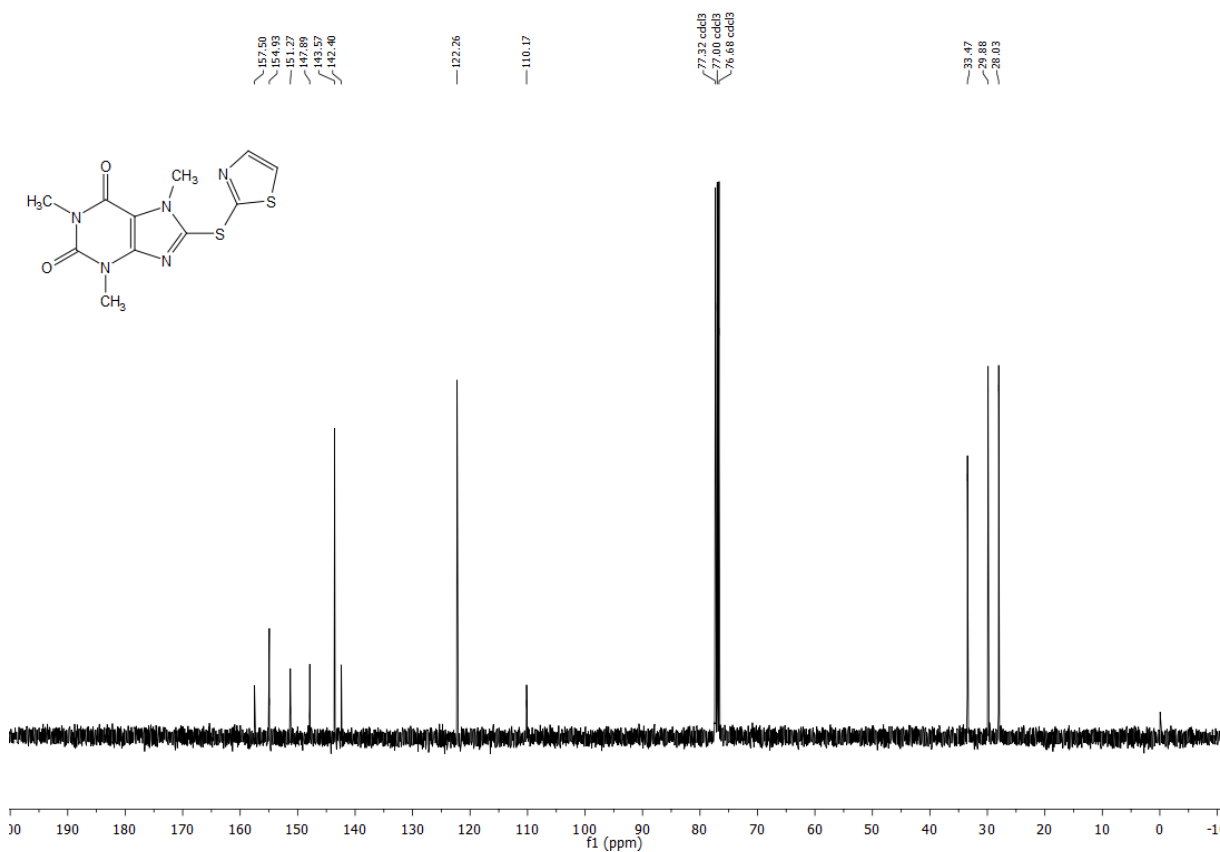
8-((tiazol-2-ylo)sulfanylo)kofeina

1,5 mmol 2-merkapto-3*H*-1,3-tioazolu rozpuściłem w 6 mL DMF, do roztworu dodałem 2 mmol K₂CO₃ i mieszałem przez godzinę. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i całość grzałem w 65 °C przez 3 godziny. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie syntezy do mieszaniny dodałem 18 mL wody i całość ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL). Otrzymane ekstrakty organiczne przemyłem wodą (3 × 30 mL) oraz solanką (90 mL). Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując gradientową chromatografię kolumnową (CHCl₃:AcOEt)

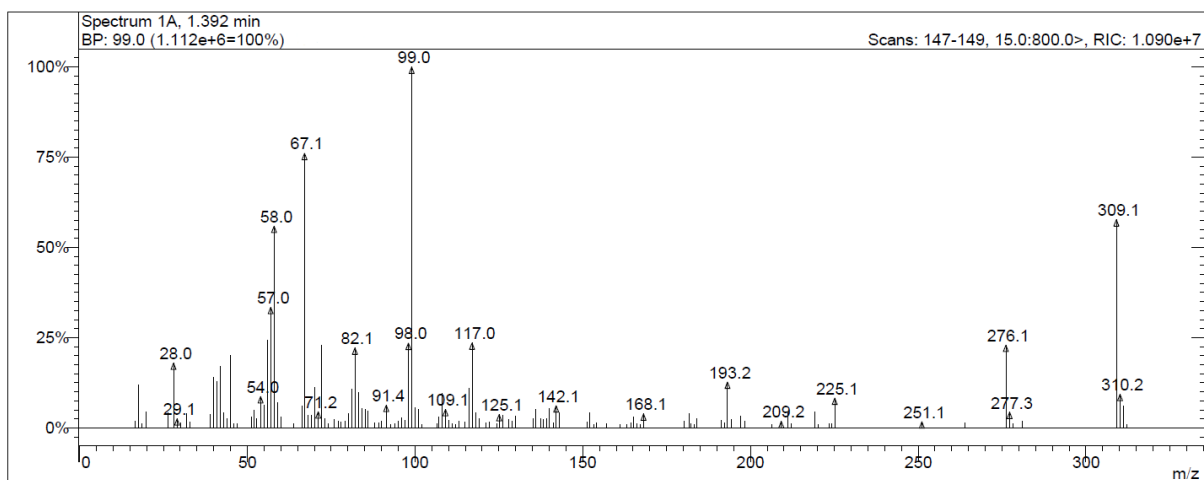
Białe ciało stałe (185 mg, 60%); t.t. 195–196 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,75 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 7,40 (d, *J* = 3,4 Hz, 1H), 4,07 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,41 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃): δ 157,50, 154,93, 151,27, 147,89, 143,57, 142,40, 122,26, 110,17, 33,47, 29,88, 28,03. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3101, 3087, 2952, 1702, 1662, 1600, 1540, 1446, 1340, 762. EI-MS (*m/z*, % int.): 309 ([*M*], 55%). Zawartość obliczona dla C₁₁H₁₁N₅O₂S₂ (MW = 309,04): C, 42,71; H, 3,58; N, 22,64; O, 10,34; S, 20,73. Otrzymana: C, 42,7; H, 3,6; N, 22,6; S, 20,7 %.



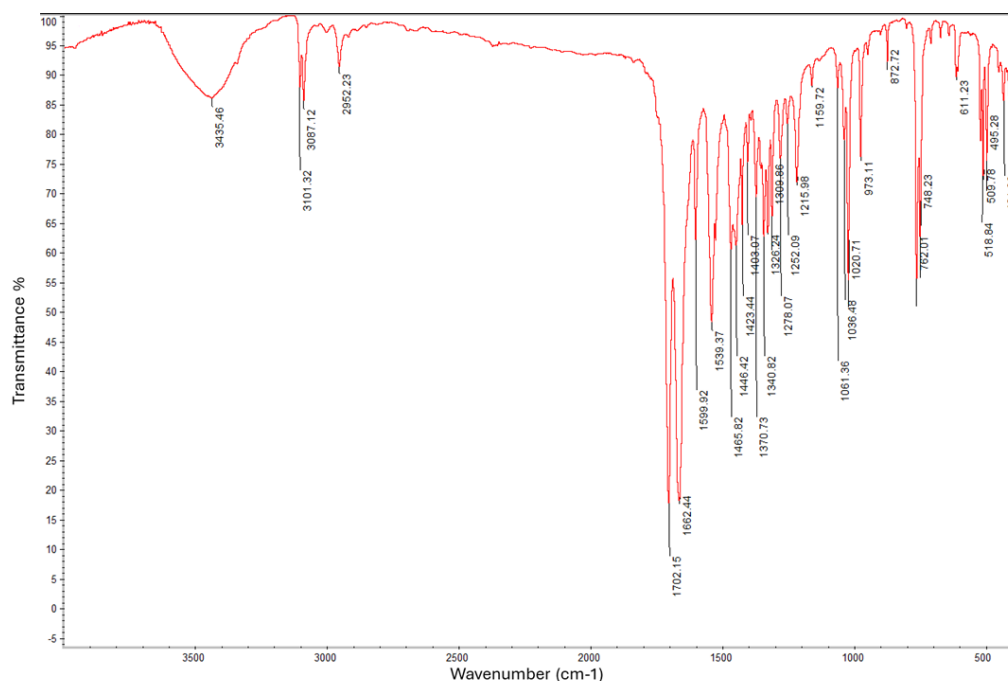
Rys. E15.1. Widmo ¹H NMR związku 23



Rys. E15.2. Widmo ¹³C NMR związku 23



Rys. E15.3. Widmo EI-MS związku 23



Rys. E15.4. Widmo FT-IR związku 23

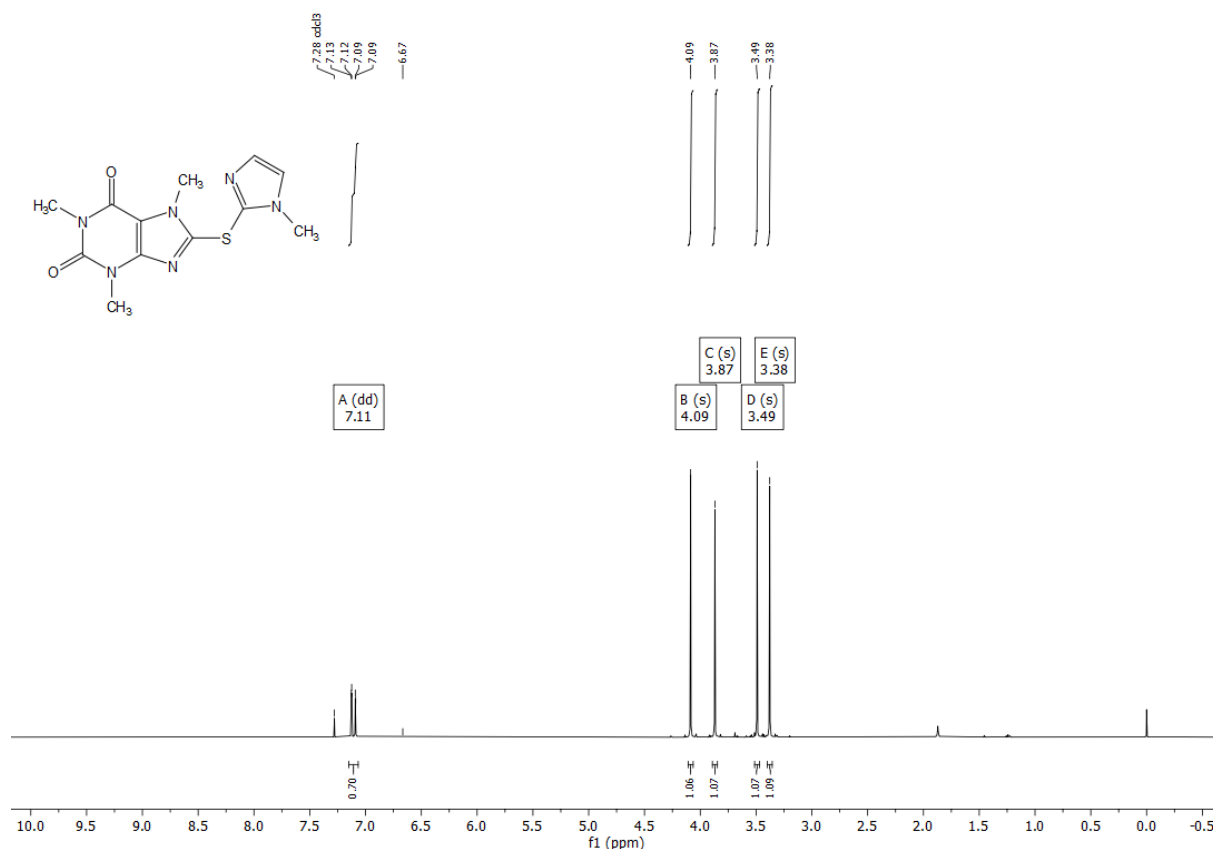
Związek 24

8-((1-metylo-1H-imidazol-2-ylo)sulfanylo)kofeina

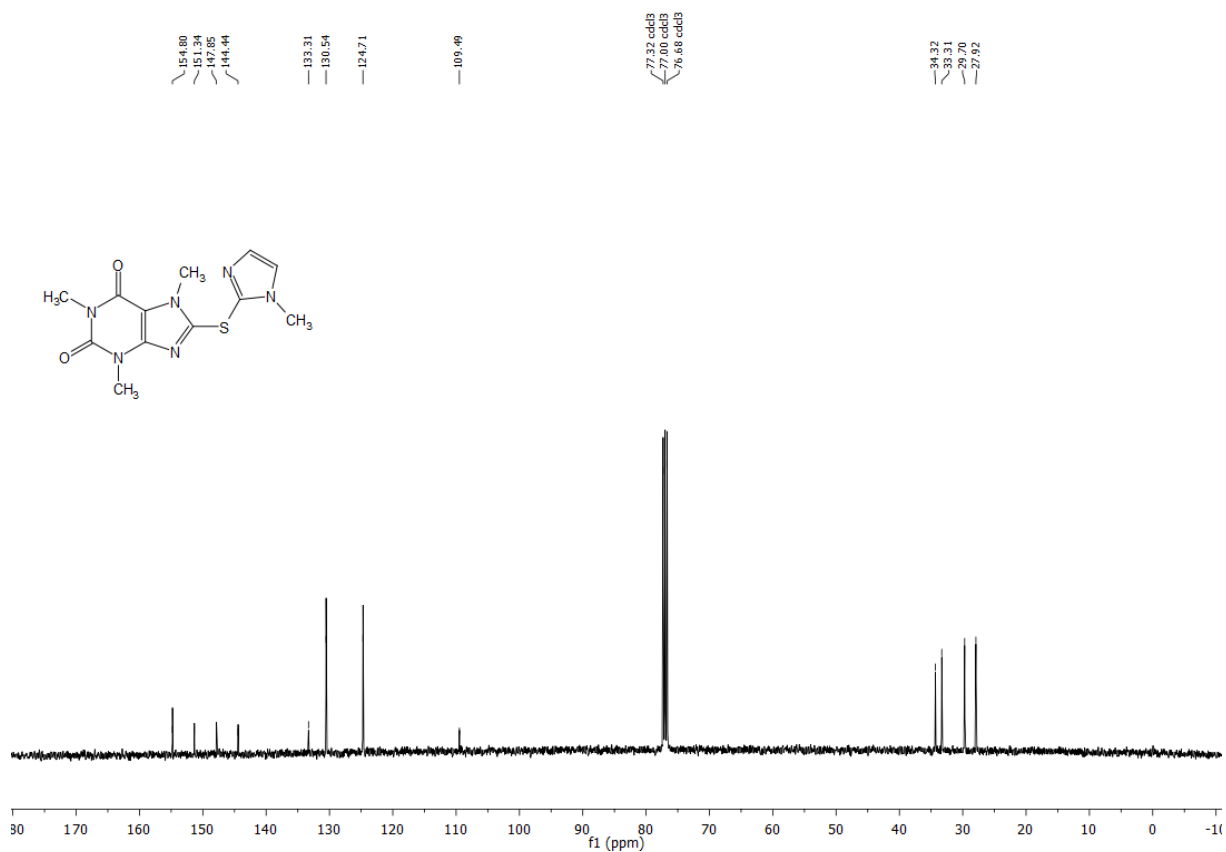
1,5 mmol 2-merkpto-1-metylo-1H-imidazolu rozpuściłem w 6 mL DMF, do roztworu dodałem 2 mmol K₂CO₃ i mieszałem przez godzinę. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i całość grzałem w 65 °C przez 3 godziny. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie syntezy do mieszaniny dodałem 18 mL wody i całość ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL). Otrzymane ekstrakty organiczne przemyłem wodą (3 x 30 mL) oraz solanką (90 mL). Podczas reakcji powstał związek 26 jako produkt uboczny.

Surową mieszaninę związków **24** i **26** rozdzieliłem, korzystając z chromatografii kolumnowej gradientowej (CHCl₃:AcOEt). Związek **26** uzyskałem z wydajnością 12%.

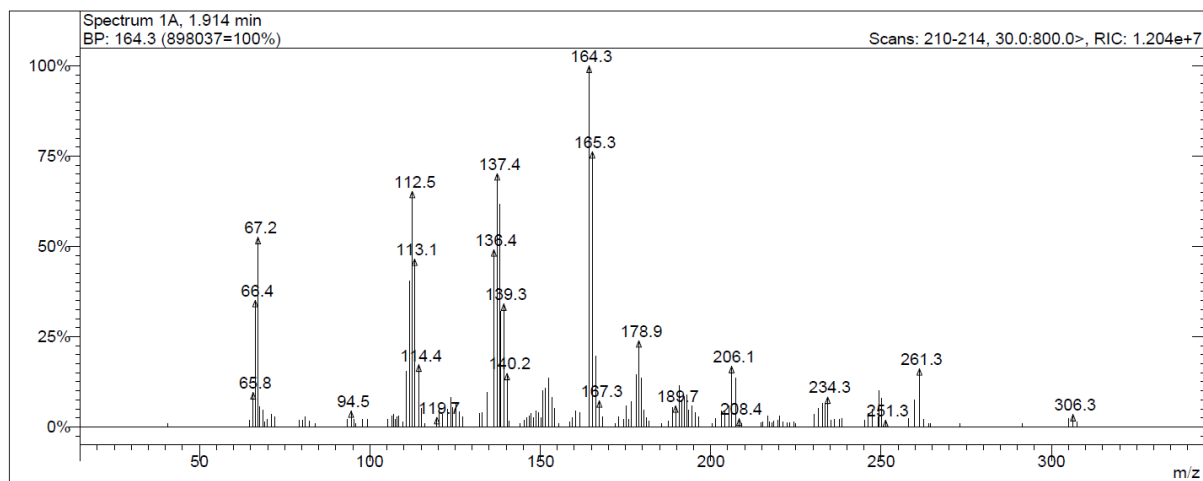
Bezbarwne ciało stałe (203 mg, 67%); t.t. 225–226 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7,11 (dd, *J* = 14,3, 1,3 Hz, 2H), 4,09 (s, 3H), 3,87 (s, 3H), 3,49 (s, 3H), 3,38 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz; CDCl₃): δ 154,80, 151,34, 147,85, 144,44, 133,32, 130,54, 124,71, 109,49, 34,32, 33,31, 29,70, 27,92. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) *v*_{max}: 3131, 3114, 2958, 1702, 1661, 1599, 1456, 1343, 762. EI-MS (*m/z*, % int.): 306 ([M], 5%). Zawartość obliczona dla C₁₂H₁₄N₆O₂S (MW = 306,34): C, 47,05; H, 4,61; N, 27,43; O, 10,45; S, 10,47; Otrzymana: C, 47,8; H, 4,02; N, 26,45; S, 10,1 %.



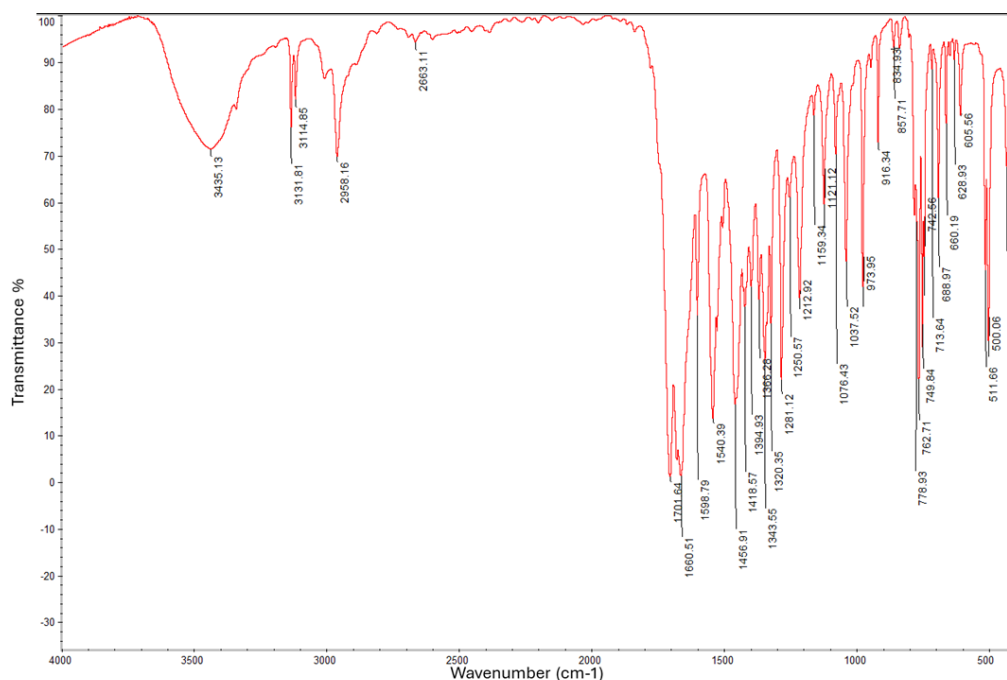
Rys. E16.1. Widmo ¹H NMR związku **24**



Rys. E16.2. Widmo ¹³C NMR związku 24



Rys. E16.3. Widmo EI-MS związku 24



Rys. E16.4. Widmo FT-IR związku 24

Związek 25

8-((4,5-dihydrothiazol-2-ylo)sulfanylo)kofeina

1,5 mmol 2-merkaptioazoliny rozpuściłem w 6 mL DMF, do roztworu dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez godzinę. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i całość grzałem w 65 °C przez 3 godziny. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie syntezy do mieszaniny dodałem 18 mL wody i całość ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL). Otrzymane ekstrakty organiczne przemyłem wodą (3 × 30 mL) oraz solanką (90 mL). Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując gradientową chromatografię kolumnową ($CHCl_3$:AcOEt)

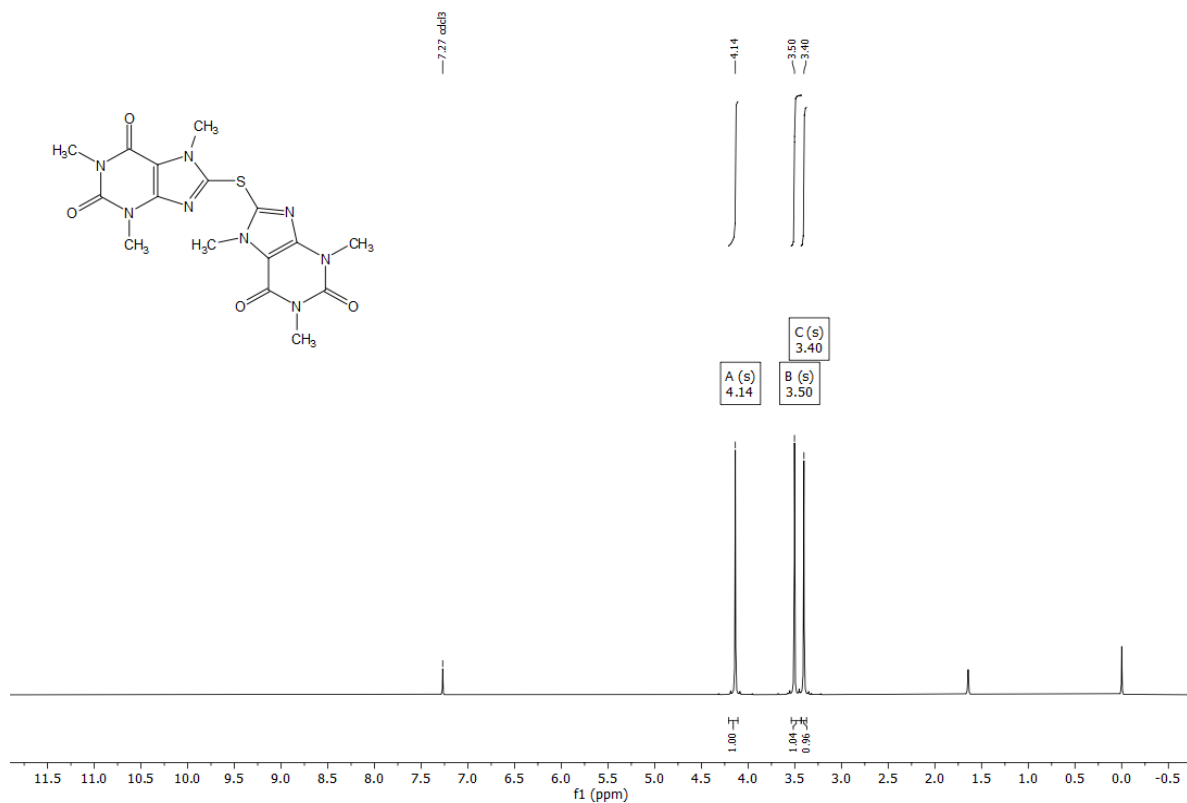
Białe ciało stałe (205 mg, 66%); t.t. 211–212 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4,24 (t, J = 8,1 Hz, 2H), 4,05 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,46 (t, J = 8,1 Hz, 2H), 3,42 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz; $CDCl_3$): δ 162,14, 154,99, 151,25, 147,67, 140,67, 110,50, 64,87, 36,03, 33,53, 29,84, 28,02. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2959, 2844, 1706, 1666, 1599, 1540, 1450, 1343, 744. EI-MS (m/z , % int.): 309,8 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{11}H_{13}N_5O_2S_2$ (MW = 311,05): C, 42,43; H, 4,21; N, 22,49; O, 10,28; S, 20,59; Otrzymana: C, 45,2; H, 4,1; N, 28,8; S, 11,0 %.

Związek 26

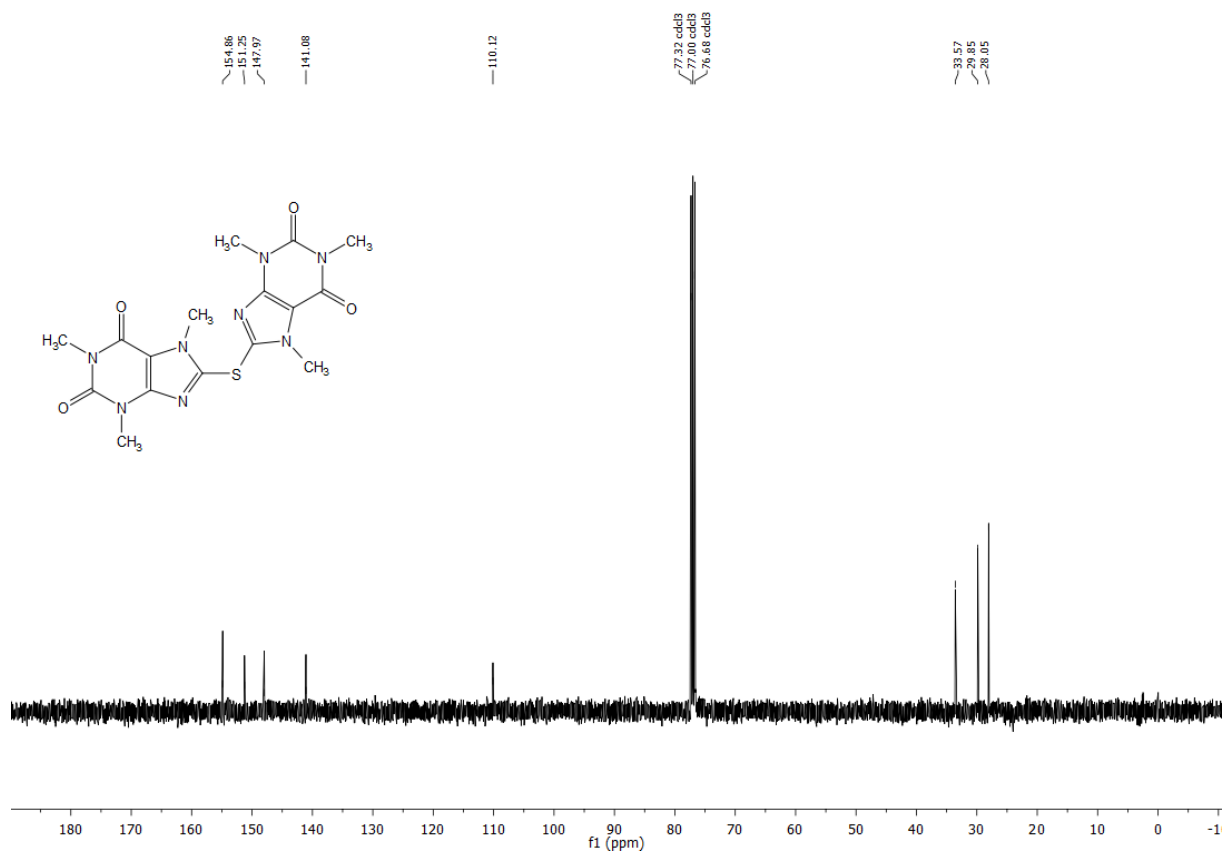
8,8'-tiobis(kofeina)

0,5 mmol 8-tiokofeiny rozpuściłem w 6 mL DMF, do roztworu dodałem 1 mmol K_2CO_3 , mieszaninę mieszałem i ogrzewałem w 65 °C przez 30 min. Następnie do mieszaniny dodałem 8-bromokofeinę (0,5 mmol) i całość grzałem, utrzymując stałą temperaturę przez następne 6 godzin. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem, dodając wody (18 mL). Otrzymany osad oczyściłem na kolumnie chromatograficznej ($CHCl_3$:AcOEt).

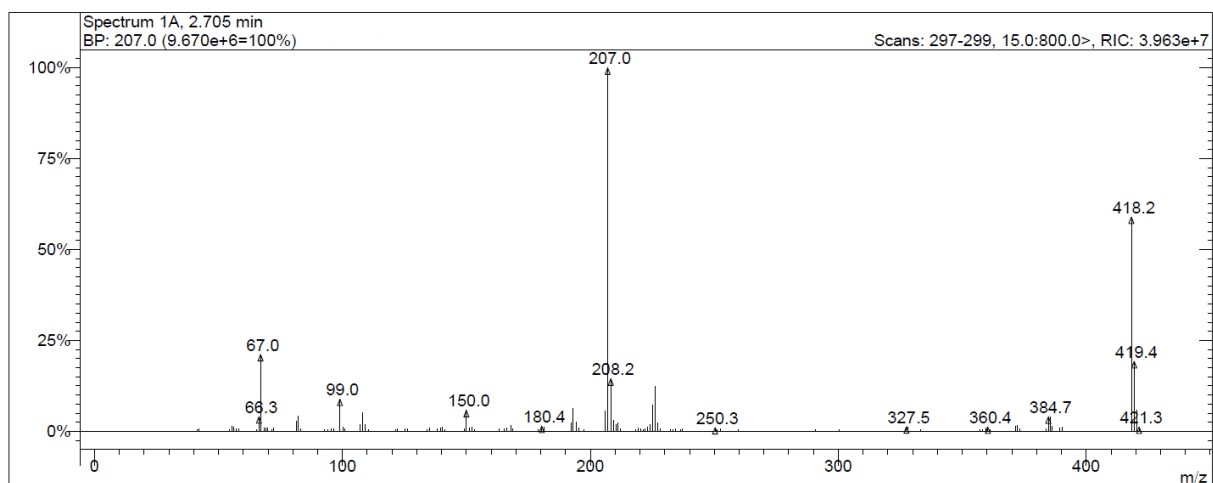
Białe ciało stałe (305 mg, 73%); t.t. 248–249 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 4,14 (s, 6H), 3,50 (s, 6H), 3,40 (s, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz; $CDCl_3$): δ 154,86 (x2), 151,25 (x2), 147,97 (x2), 141,08 (x2), 110,12 (x2), 33,57 (x2), 29,85 (x2), 28,05 (x2). FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 2955, 1705, 1667, 1601, 1454, 1370, 765. EI-MS (m/z , % int.): 418 ([M], 60%). Zawartość obliczona dla $C_{16}H_{18}N_8O_4S$ (MW = 418,43): C, 45,93; H, 4,34; N, 26,78; O, 15,29; S, 7,66; Otrzymana: C, 43,91; H, 5,1; N, 25,33; S, 8,68 %.



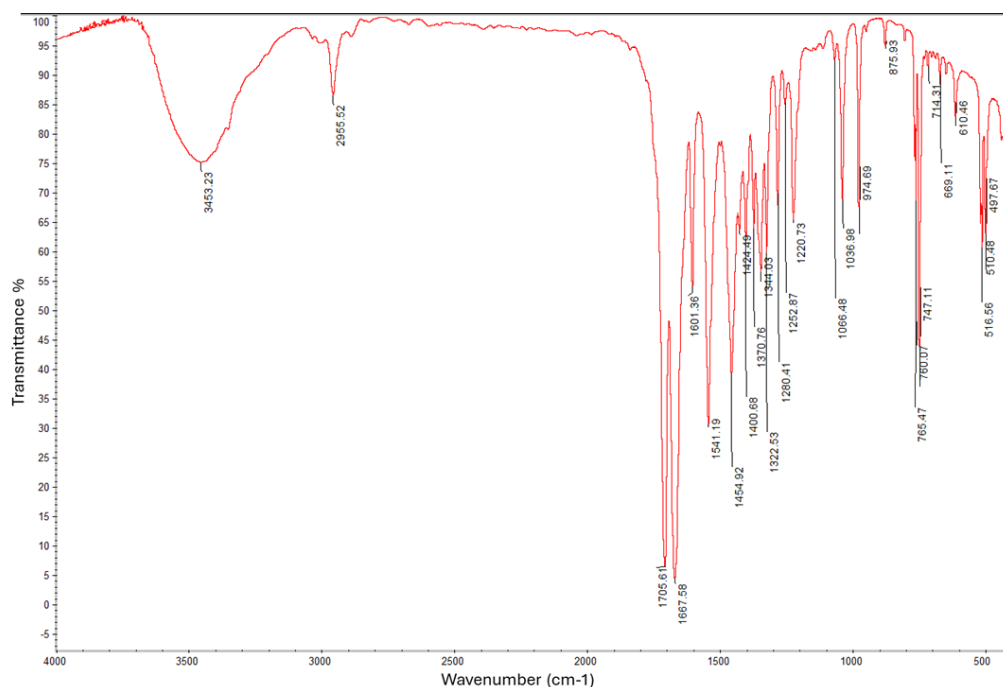
Rys. E17.1. Widmo ^1H NMR związku 26



Rys. E17.2. Widmo ¹³C NMR związku 26



Rys. E17.3. Widmo EI-MS związku 26



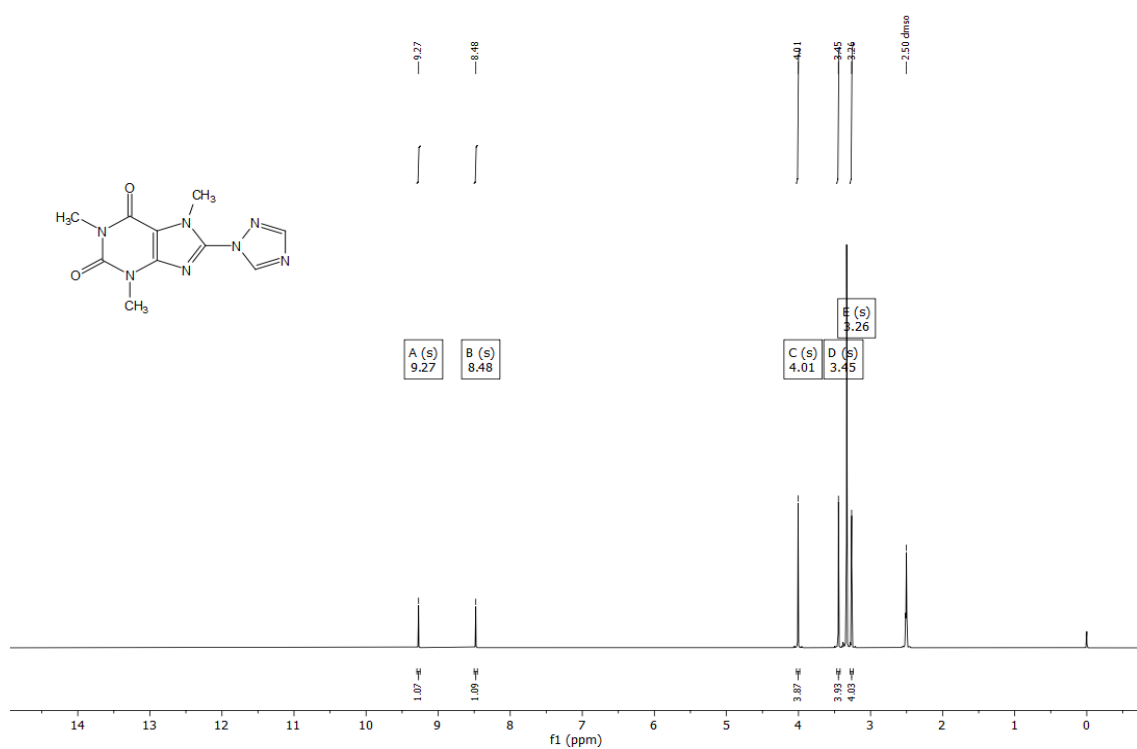
Rys. E17.4. Widmo FT-IR związku 26

Związek 27

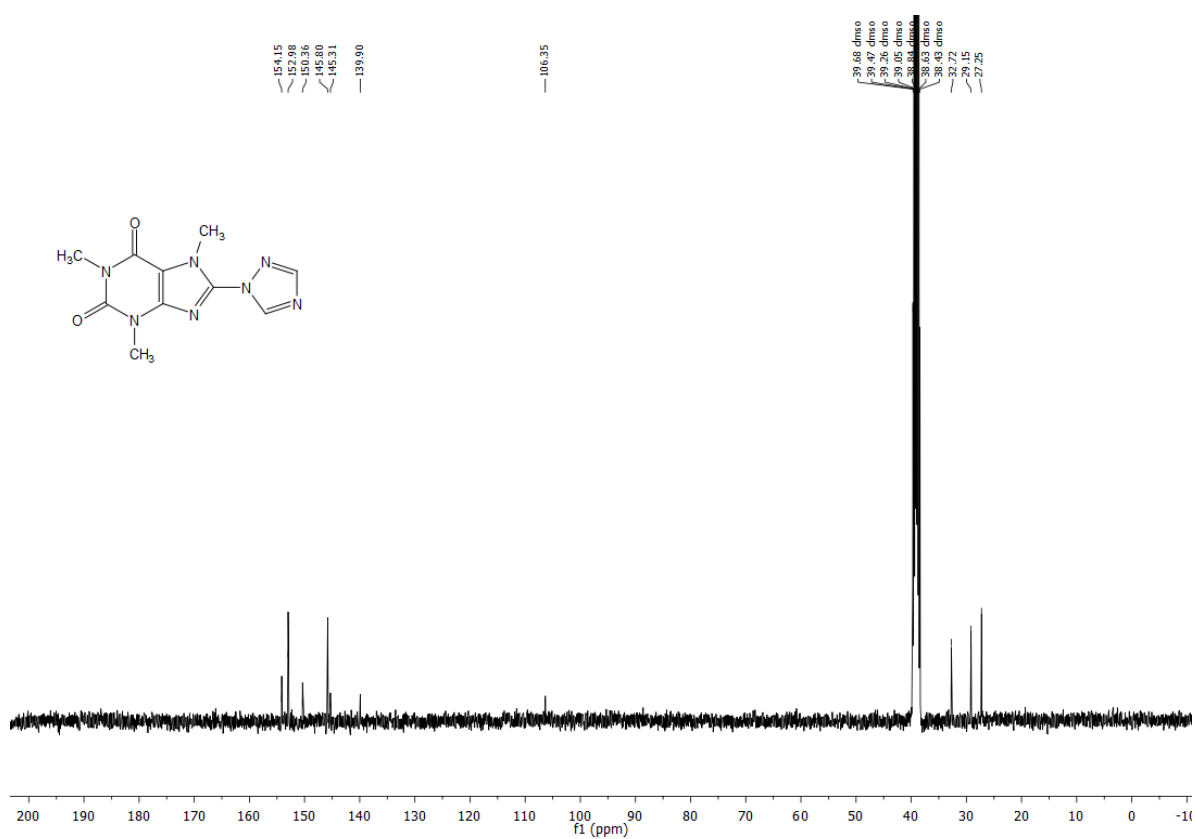
8-(1*H*-1,2,4-triazol-1-ilo)kofeina

1,5 mmol 1,2,4-3*H*-triazolu rozpuściłem w 6 mL DMF, do roztworu dodałem 2 mmol K₂CO₃ i mieszałem przez godzinę. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i całość grzałem w 65 °C przez 3 godziny. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie syntezy do mieszaniny dodałem 18 mL wody i całość ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL). Otrzymane ekstrakty organiczne przemyłem wodą (3 x 30 mL) oraz solanką (90 mL). Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując gradientową chromatografię kolumnową (CHCl₃:AcOEt)

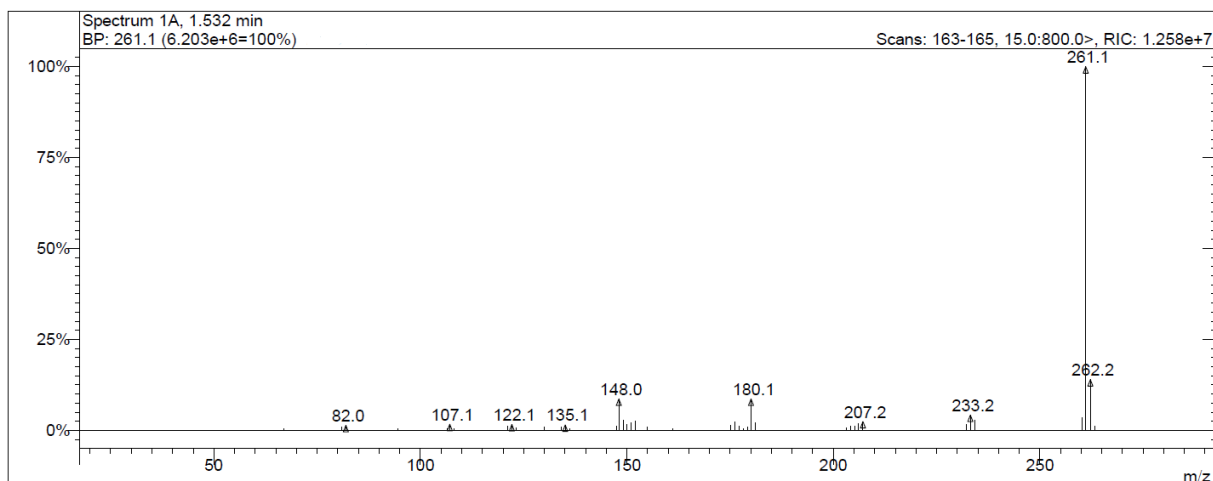
Białe ciało stałe (137 mg, 53%); t.t. 218–219 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,27 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 4,01 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 3,26 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz; DMSO-*d*₆): δ 154,15, 152,98, 150,36, 145,80, 145,31, 139,90, 106,35, 32,72, 29,15, 27,25. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3129, 3002, 2958, 1703, 1671, 1614, 1548, 1513, 1460, 1408, 1378, 1338. EI-MS (*m/z*, % int.): 261 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₀H₁₁N₇O₂ (MW = 261,1): C, 45,98; H, 4,24; N, 37,53; O, 12,25; Otrzymana: C, 45,7; H, 3,16; N, 37,83 %.



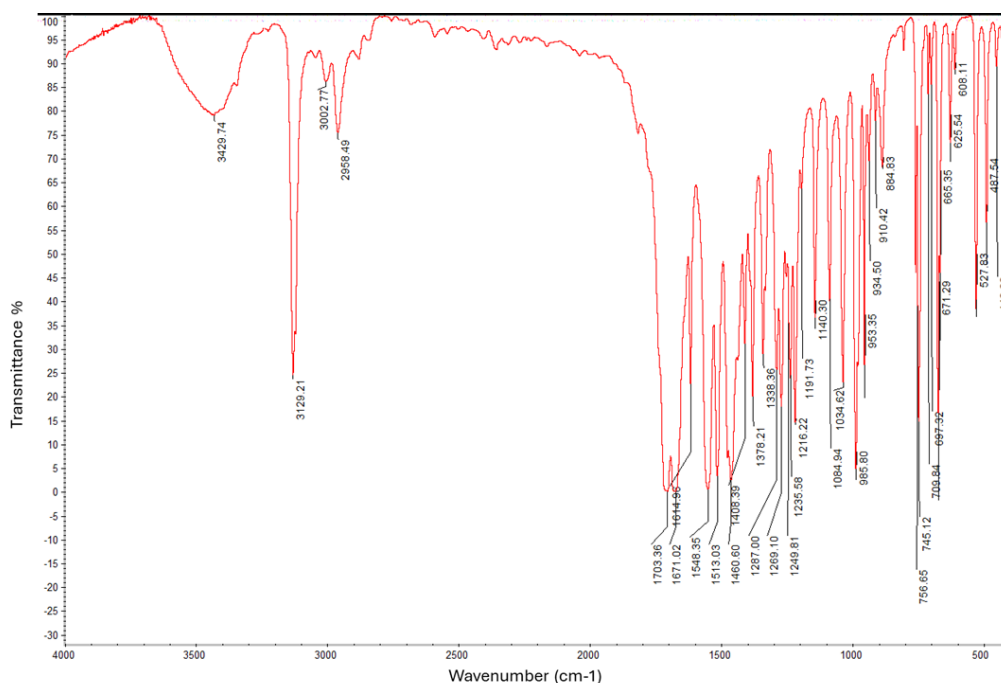
Rys. E18.1. Widmo ^1H NMR związku 27



Rys. E18.2. Widmo ^{13}C NMR związku 27



Rys. E18.3. Widmo EI-MS związku 27



Rys. E18.4. Widmo FT-IR związku 27

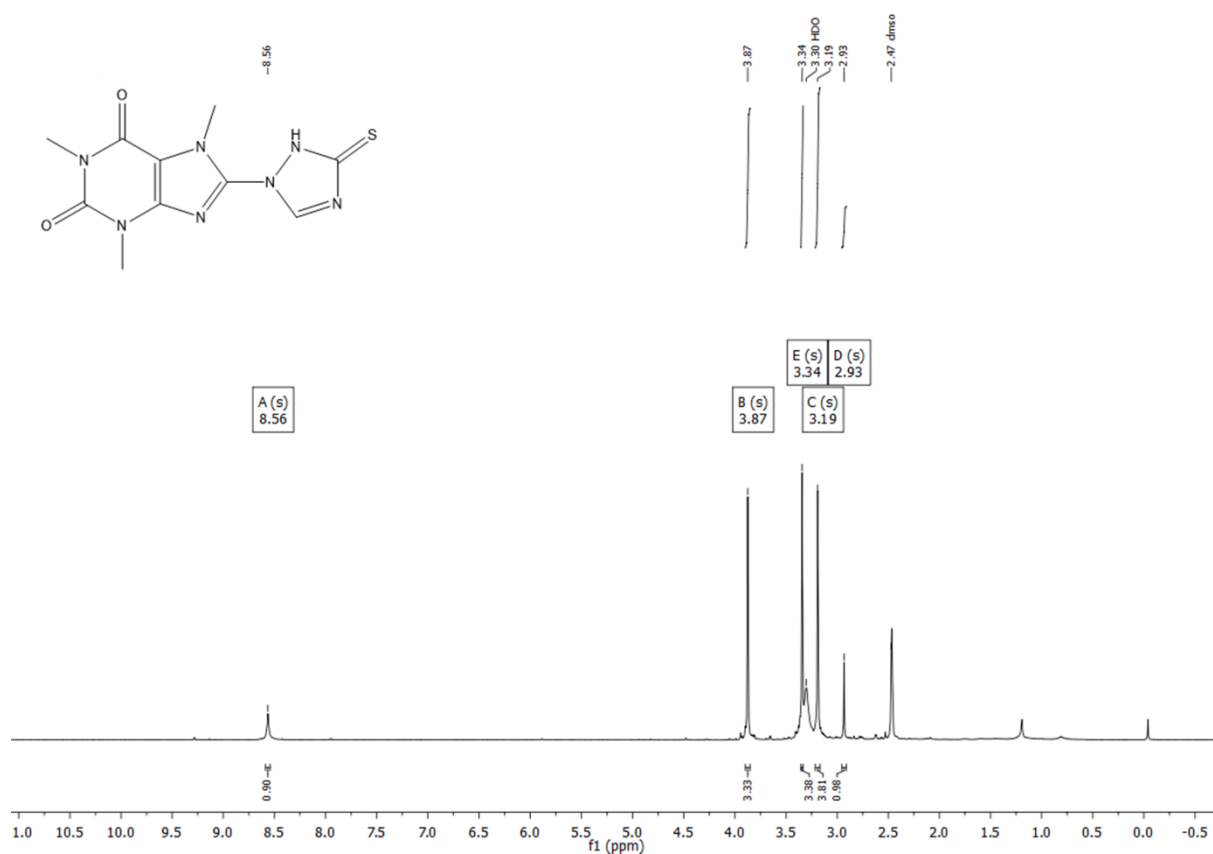
Związek 28

8-(3-sulfanylo-1H-1,2,4-triazol-1-ilo)kofeina

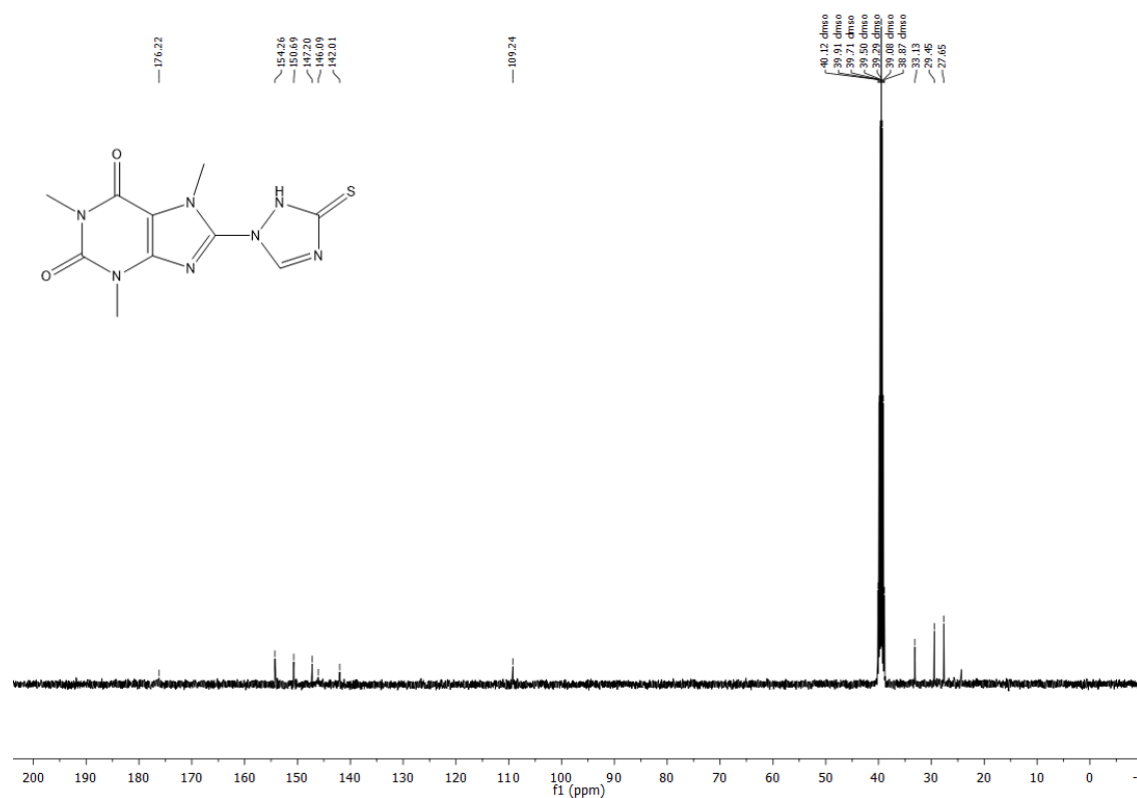
1,5 mmol 3-merkapto-1,2,4-triazolu rozpuściłem w 6 mL DMF, do roztworu dodałem 2 mmol K_2CO_3 i mieszałem przez godzinę. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i całość grzałem w 65 °C przez 3 godziny. Reakcję monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Na zakończenie syntezy do mieszaniny dodałem 18 mL wody i

całość ekstrahowałem AcOEt (3 x 30 mL). Otrzymane ekstrakty organiczne przemylem wodą (3 × 30 mL) oraz solanką (90 mL). Otrzymany surowy produkt oczyściłem stosując gradientową chromatografię kolumnową (CHCl₃:AcOEt)

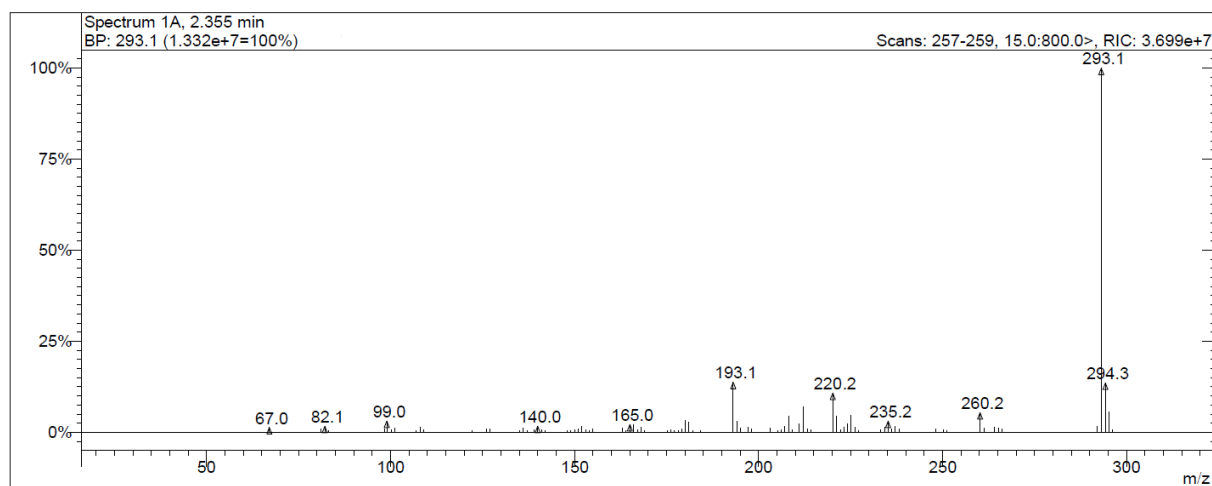
Białe ciało stałe (73 mg, 25%); t.t. 198–199 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,56 (s, 1H), 3,87 (s, 3H), 3,34 (s, 3H), 3,19 (s, 3H), 2,93 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz; DMSO-*d*₆): δ 176,22, 154,26, 150,69, 147,20, 146,09, 142,01, 109,24, 33,13, 29,45, 27,65. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max} : 3110, 2917, 2854, 2736, 2676, 1708, 1666, 1604, 1541, 1449, 1341, 745. EI-MS (m/z, % int.): 293 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₀H₁₁N₇O₂S (MW = 293,31): C, 40,95; H, 3,78; N, 33,43; O, 10,91; S, 10,93; Otrzymana: C, 41,03; H, 3,8; N, 33,41; S, 10,91 %.



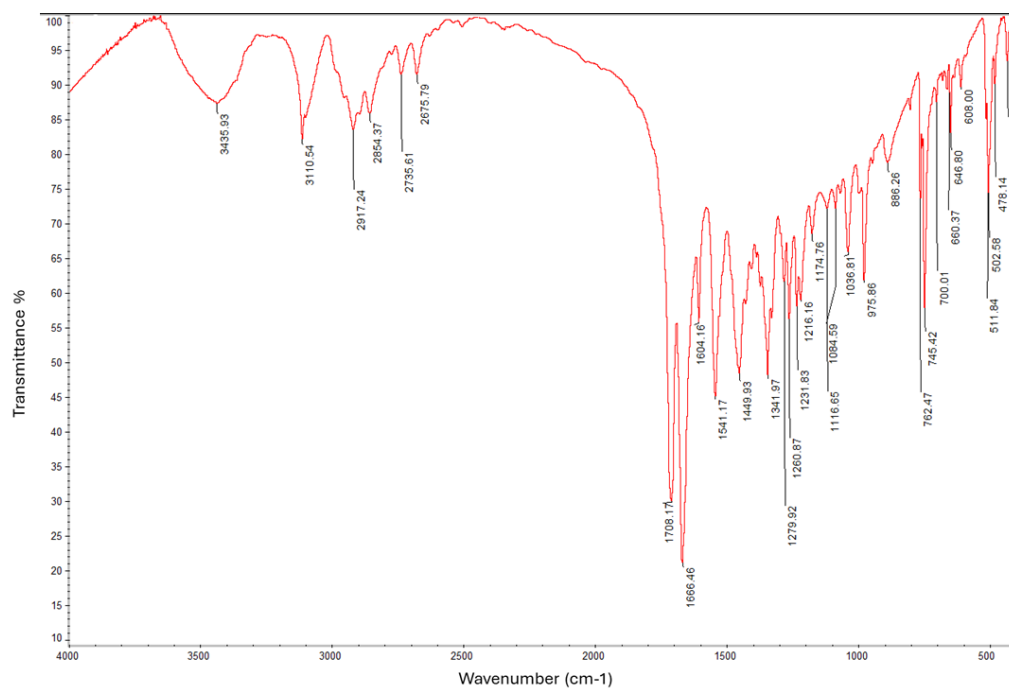
Rys. E19.1. Widmo ¹H NMR związku 28



Rys. E19.2. Widmo ¹³C NMR związku 28



Rys. E19.3. Widmo EI-MS związku 28



Rys. E19.4. Widmo FT-IR związku **28**

4.6 Synteza i dane spektroskopowe pochodnych kofeiny z analogami pierścienia pirazolowego – Grupa IV (związki 29–45)

Związek 29

8-(1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol *1H-pirazolu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

Białe kryształy (104 mg, 40%); t.t. 199–200 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,25 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 1,2 Hz, 1H), 6,52 (dd, J = 2,7, 1,7 Hz, 1H), 4,29 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,43 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155,2, 151,5, 146,5, 143,5, 143,2, 131,1, 108,1, 106,6, 34,3, 29,7, 27,9. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3341, 3143, 2944, 1696, 1653, 1553, 1463, 1243, 1034, 754, 529. EI-MS (m/z, % int.): 280 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₁H₁₂N₂O₂ (MW = 260,26): C, 50,77; H, 4,65; N, 32,29; Otrzymana: C, 49,72; H, 4,38; N, 31,92 %.

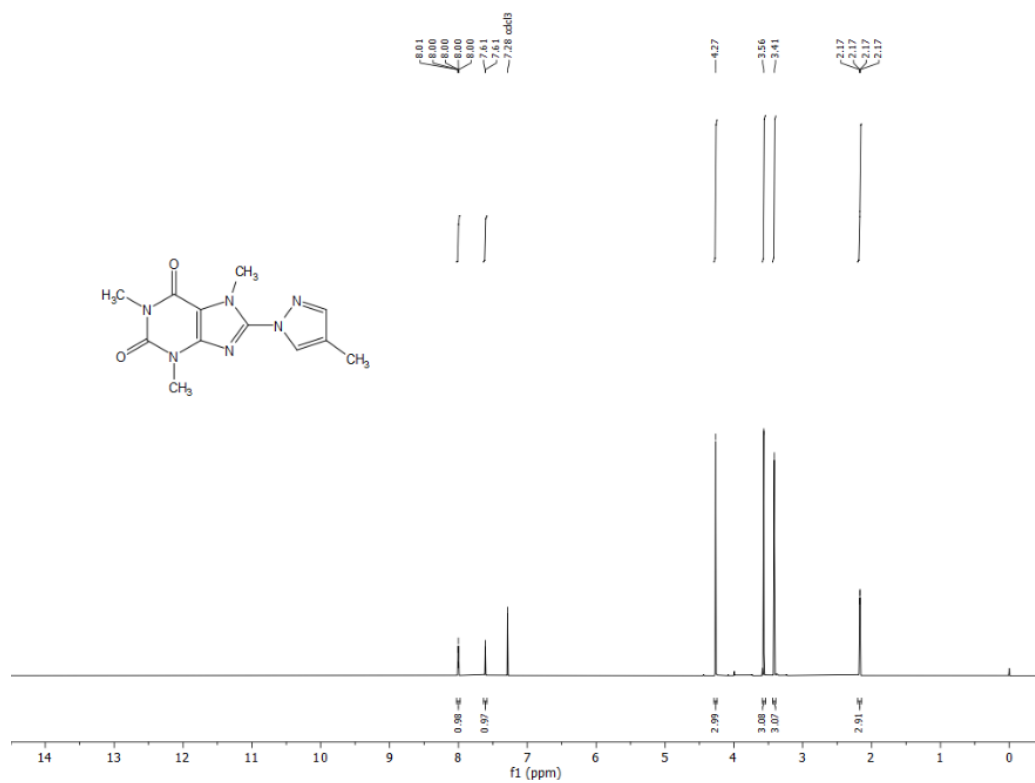
Związek 30

8-(4-metylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

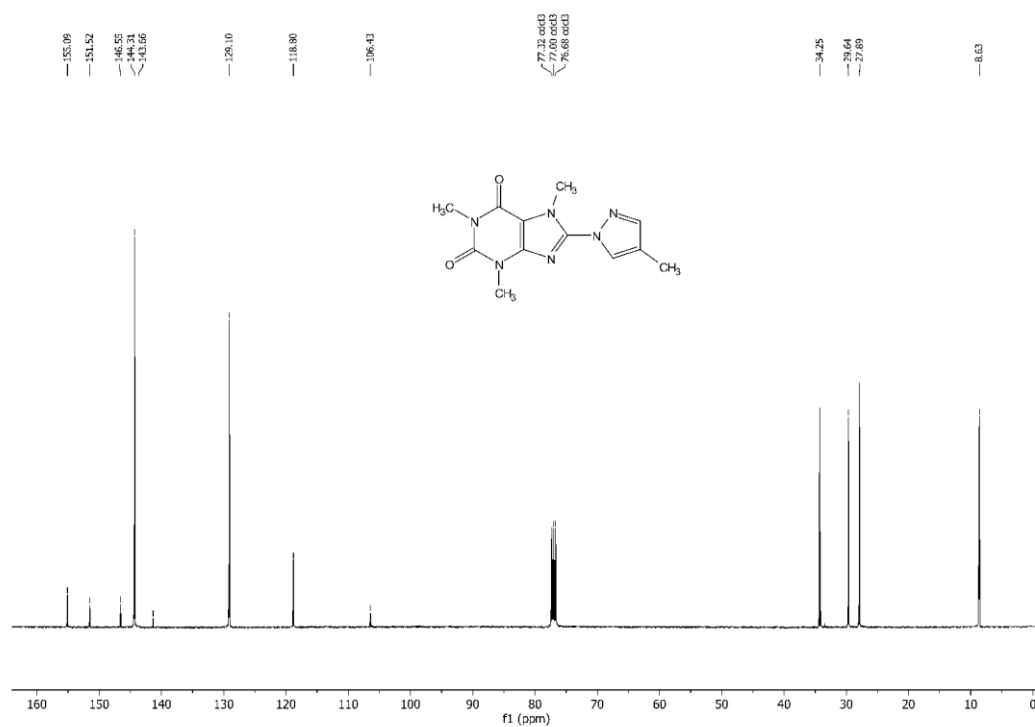
1 mmol *4-metylo-1H-pirazolu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

Białe ciało stałe (227 mg, 83%); t.t. 192–193 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,00 (1H), 7,61 (s, 1H), 4,27 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 3,41 (s, 3H), 2,17 (dd, J = 1,0, 0,5 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155,1, 151,5, 146,6, 144,3, 143,7, 129,1, 118,8, 106,4, 34,3, 29,6, 27,9, 8,6. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3445, 3130, 2966, 1720, 1672, 1551, 1458, 1294, 1222, 1038, 966,

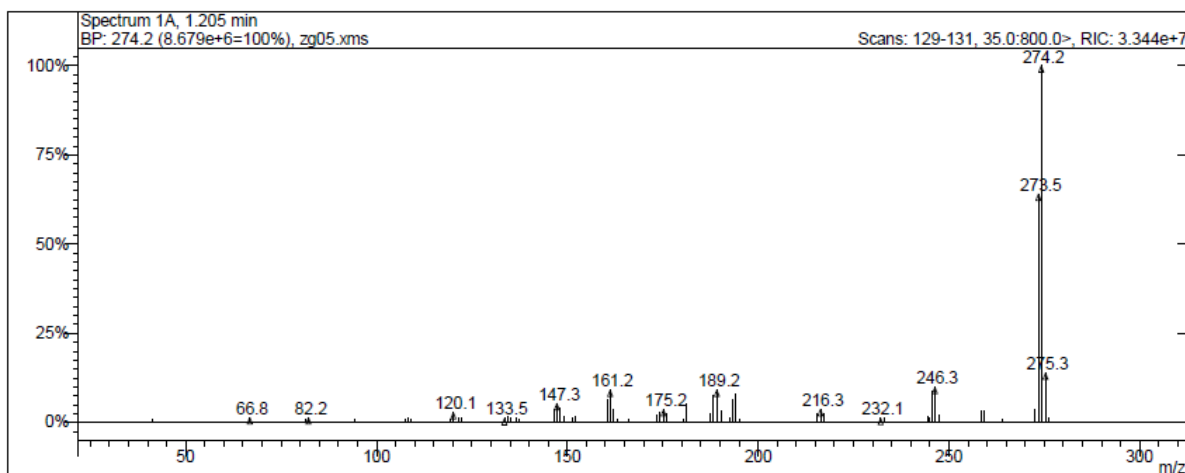
744, 532. EI-MS (m/z, % int.): 274 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₂H₁₄N₆O₂ (MW = 274,28): C, 52,55; H, 5,15; N, 30,64; Otrzymana: C, 53,00; H, 5,11; N, 30,52 %.



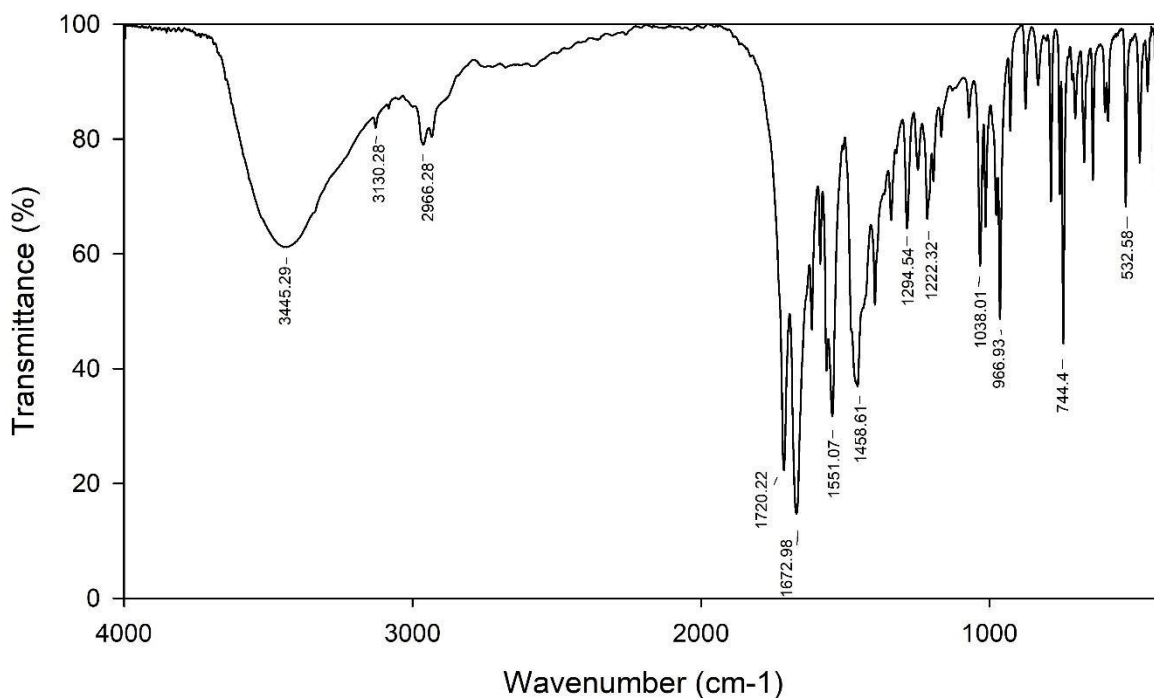
Rys. E20.1. Widmo ¹H NMR związku 30



Rys. E20.2. Widmo ¹³C NMR związku 30



Rys. E20.3. Widmo EI-MS związku **30**



Rys. E20.4. Widmo FT-IR związku **30**

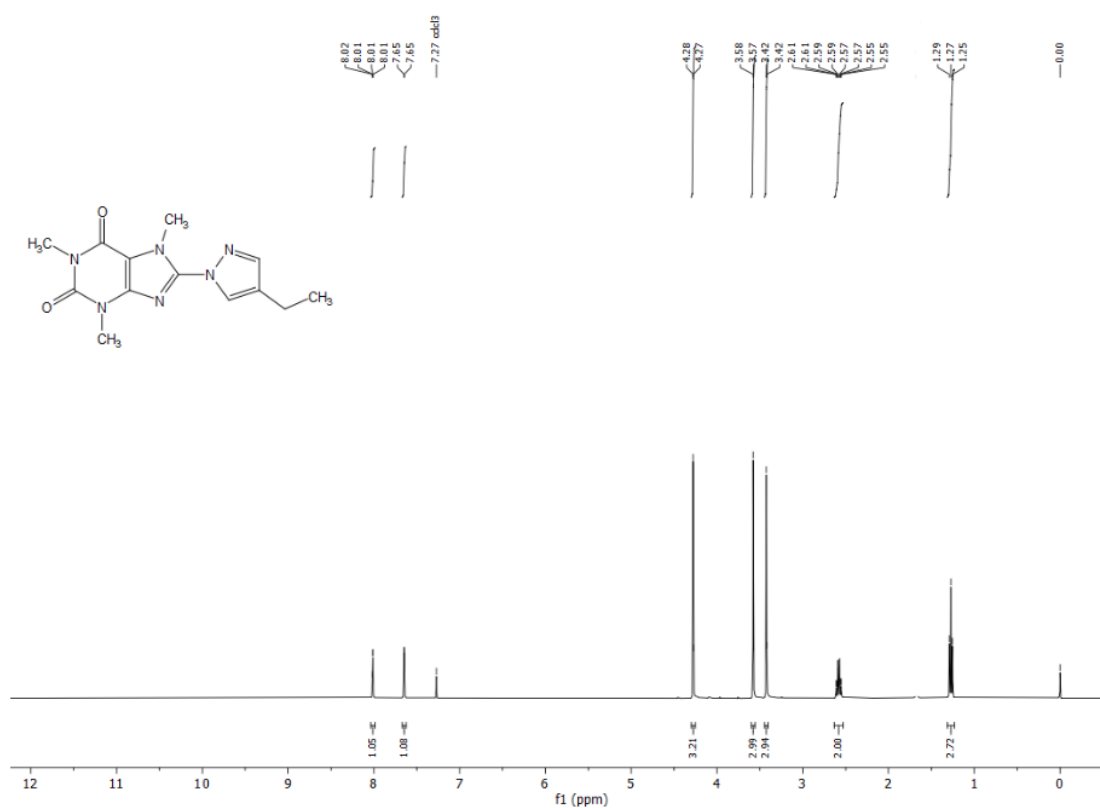
Związek **31**

8-(4-etylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

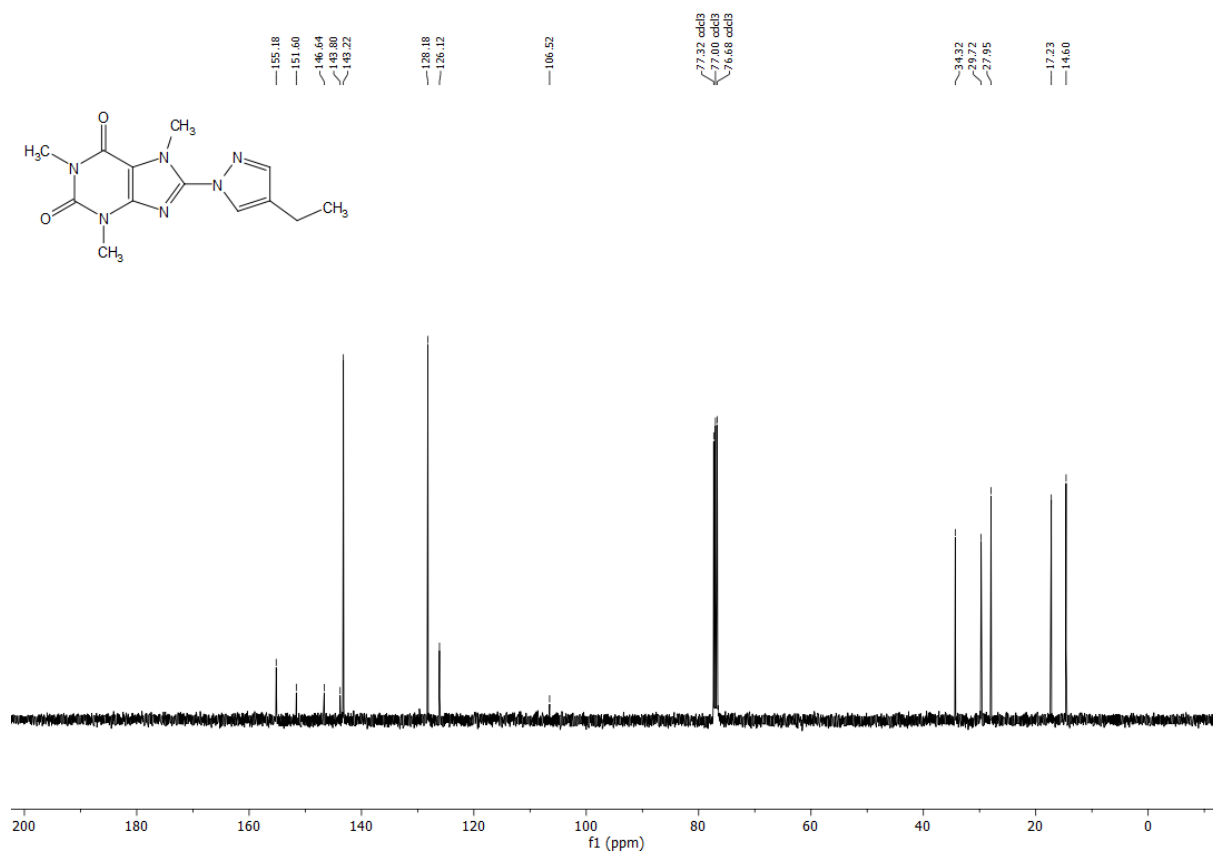
1 mmol *4-etylo-1H-pirazolu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL

wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

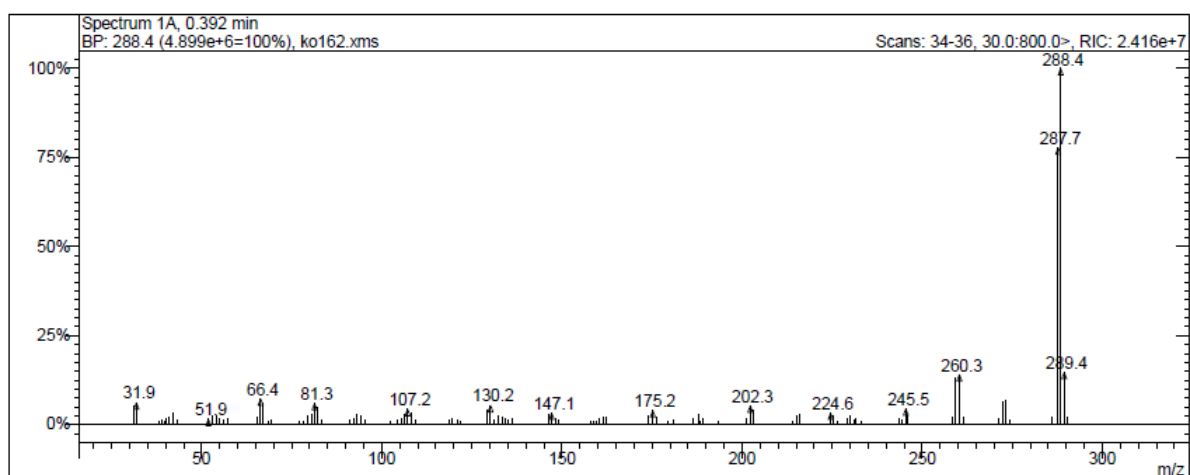
Białe ciało stałe (40 mg, 13%); t.t. 193–194 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,01 (s, 1H), 7,65 (s, 1H), 4,28 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,42 (s, 3H), 2,58 (d, J = 1,0 Hz, 2H), 1,27 (t, J = 7,6 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155,2, 151,6, 146,6, 143,8, 143,2, 128,2, 126,1, 106,5, 34,3, 29,7, 27,9, 17,2, 14,6. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3442, 3138, 2971, 1712, 1685, 1542, 1468, 1283, 1034, 963, 743, 526. EI-MS (m/z, % int.): 288 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₃H₁₆N₆O₂ (MW = 288,31): C, 54,16; H, 5,59; N, 29,15; Otrzymana: C, 54,32; H, 5,61; N, 29,23 %.



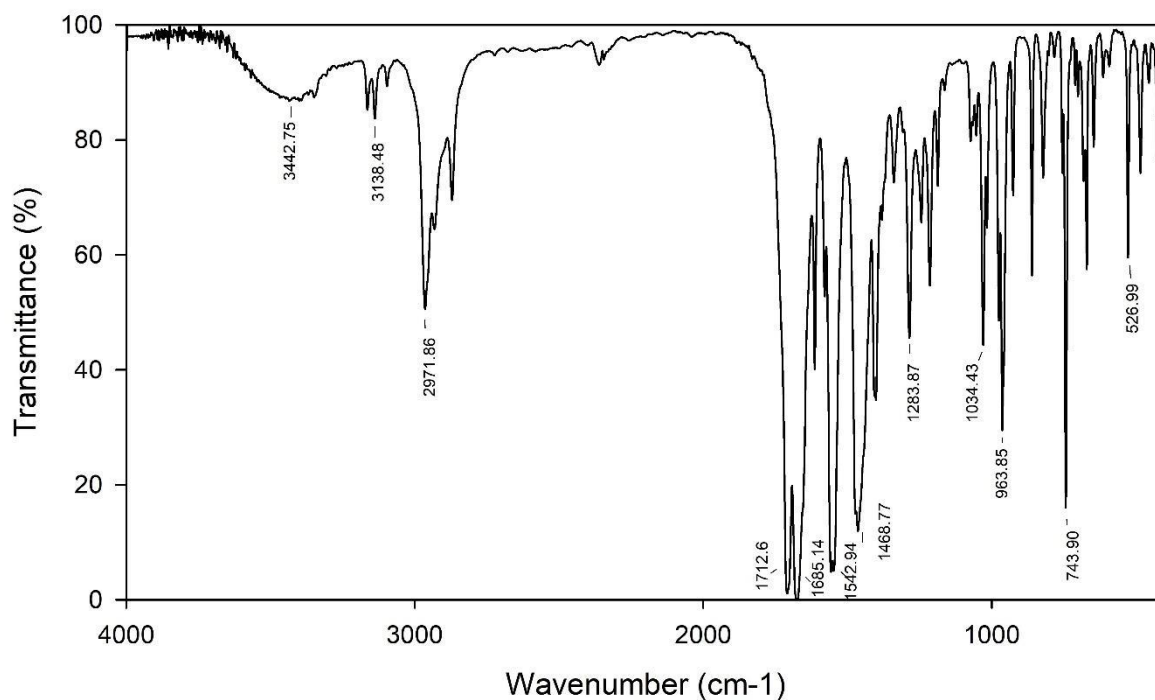
Rys. E21.1. Widmo ¹H NMR związku 31



Rys. E21.2. Widmo ¹³C NMR związku 31



Rys. E21.3. Widmo EI-MS związku 31



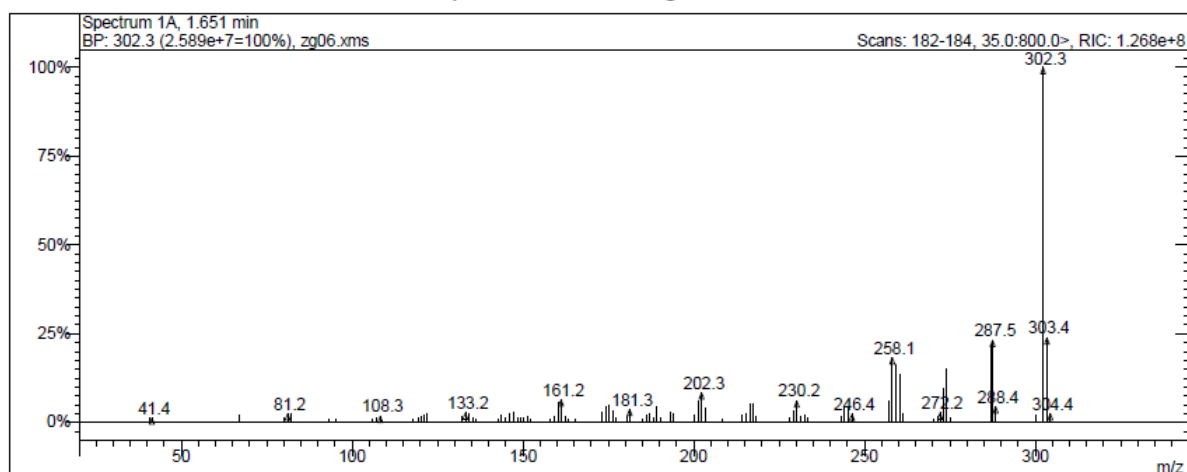
Rys. E21.4. Widmo FT-IR związku **31**

Związek **32**

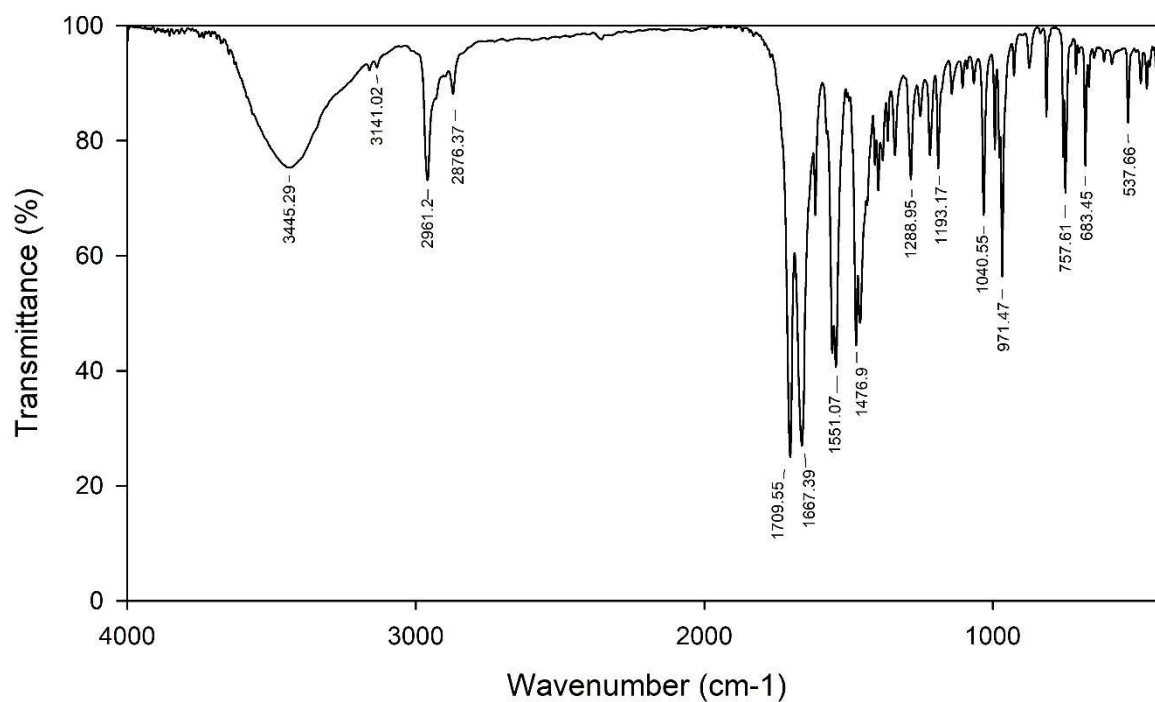
8-(4-(propan-2-ylo)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol 4-izopropylo-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3$:AcOEt)

Białe ciało stałe (163 mg, 54%); t.t. 188–189 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,00 (1H), 7,67 (1H), 4,28 (s, 3H), 3,58 (s, 3H), 3,42 (s, 3H), 2,93 (h, $J = 0,9$ Hz, 1H), 1,29 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 155,1, 151,5, 146,6, 143,8, 142,3, 131,6, 127,2, 106,5, 34,3, 29,7, 27,9, 24,2, 23,5 (2X). FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3445, 3141, 2961, 2876, 1709, 1667, 1551, 1476, 1288, 1193, 1040, 971, 757, 683, 537. EI-MS (m/z , % int.): 302 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{14}H_{18}N_6O_2$ (MW = 302,34): C, 55,62; H, 6,00; N, 27,80; Otrzymana: C, 55,76; H, 6,05; N, 27,91 %.



Rys. E22.3. Widmo EI-MS związku 32



Rys. E22.4. Widmo FT-IR związku 32

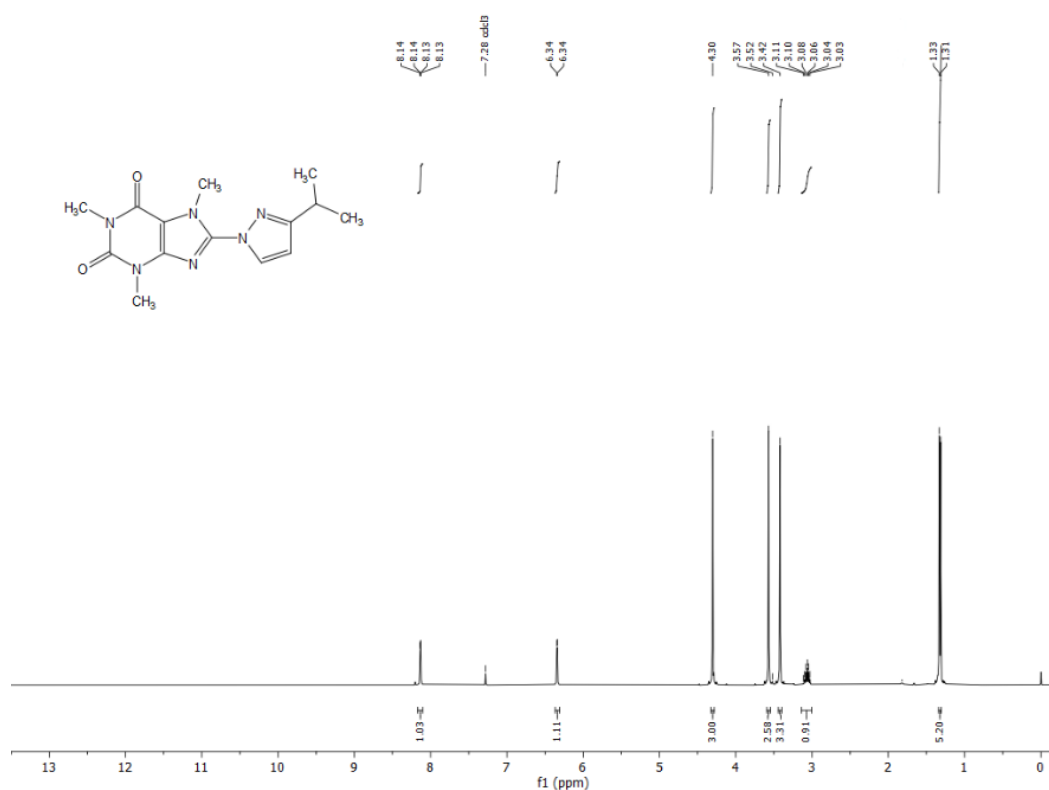
Związek 33

8-(3-(propan-2-ylo)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

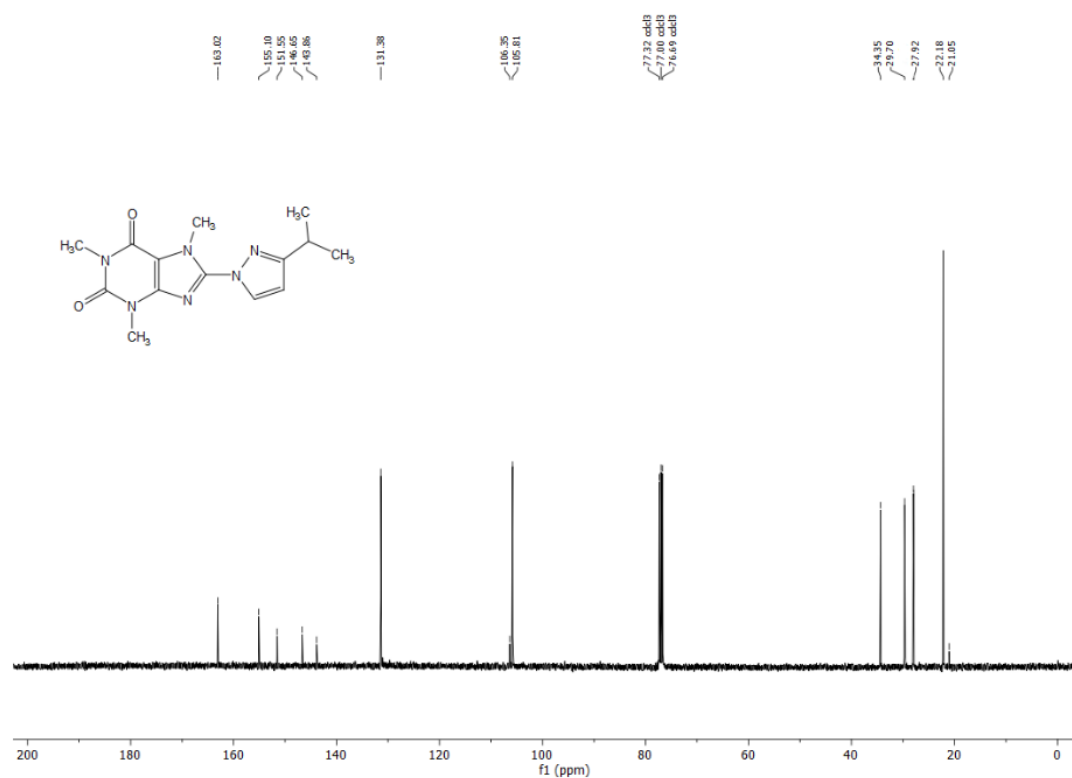
1 mmol 5-izopropylo-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL

wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

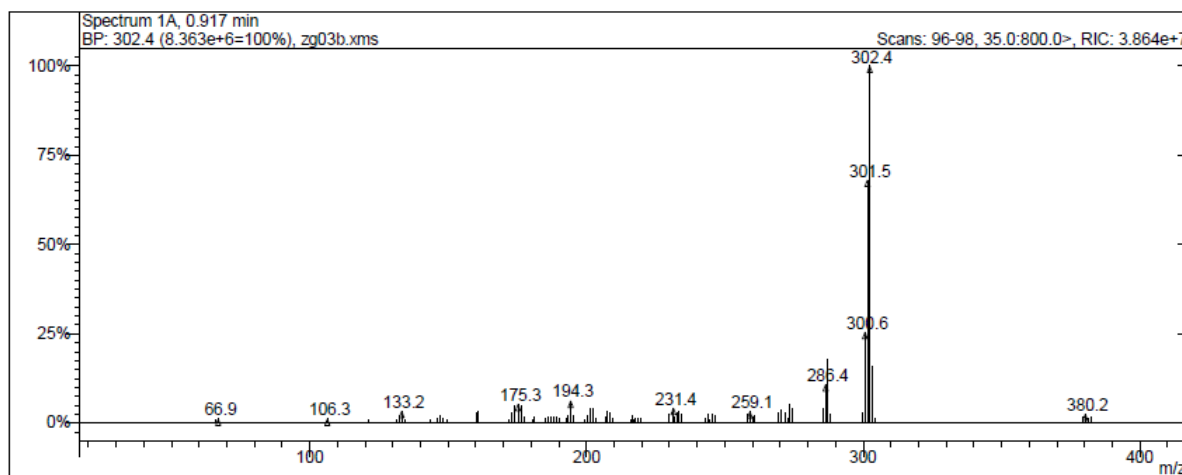
Białe ciało stałe (48 mg, 16%); t.t. 188–189 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,17 (1H), 6,34 (1H), 4,30 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,42 (s, 3H), 3,07 (h, J = 7,1 Hz, 1H), 1,32 (d, J = 7,0 Hz, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 163,0, 155,1, 151,6, 146,7, 143,9, 131,4, 106,4, 105,8, 34,4, 29,7, 27,9, 22,2 (2x), 21,1. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3452, 3116, 2968, 2875, 1712, 1666, 1548, 1463, 1288, 1246, 1037, 968, 777, 540. EI-MS (m/z, % int.): 302 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₄H₁₈N₆O₂ (MW = 302,34): C, 55,62; H, 6,00; N, 27,80; Otrzymana: C, 55,58; H, 5,98; N, 27,73 %.



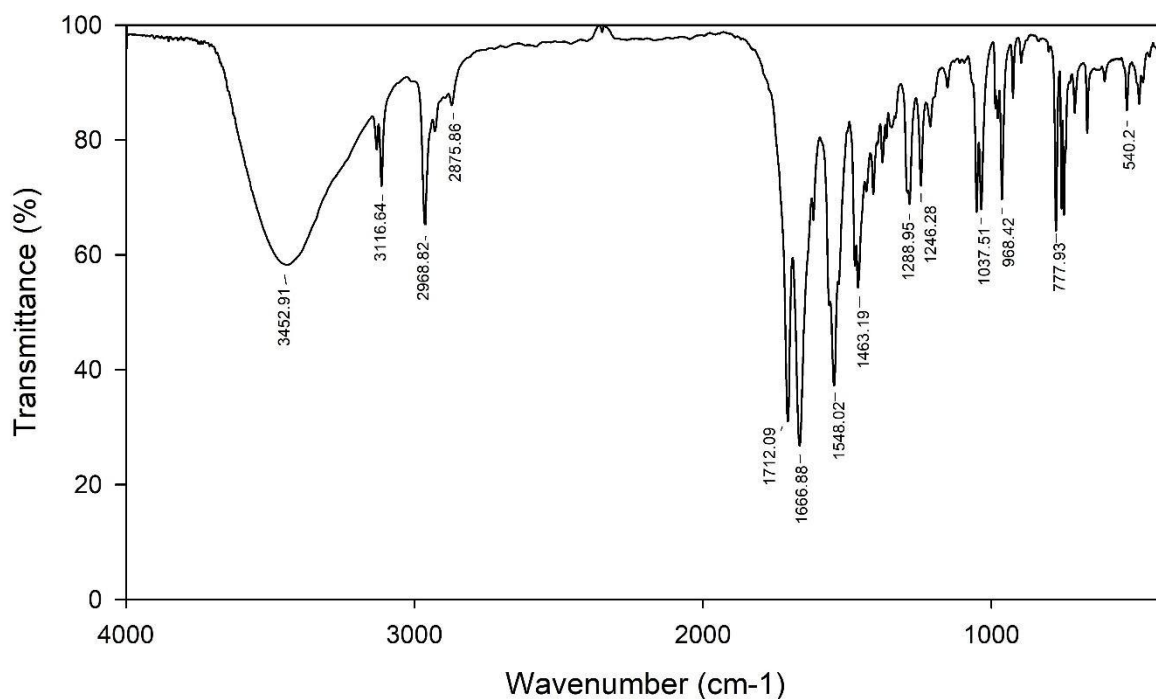
Rys. E23.1. Widmo ¹H NMR związku 33



Rys. 23.2. Widmo ^{13}C NMR związku 33



Rys. E23.3. Widmo EI-MS związku 33



Rys. E23.4. Widmo FT-IR związku 33

Związek 34

8-(3-bromo-5-metylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol *3-bromo-5-metylo-1H-pirazolu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3$:AcOEt)

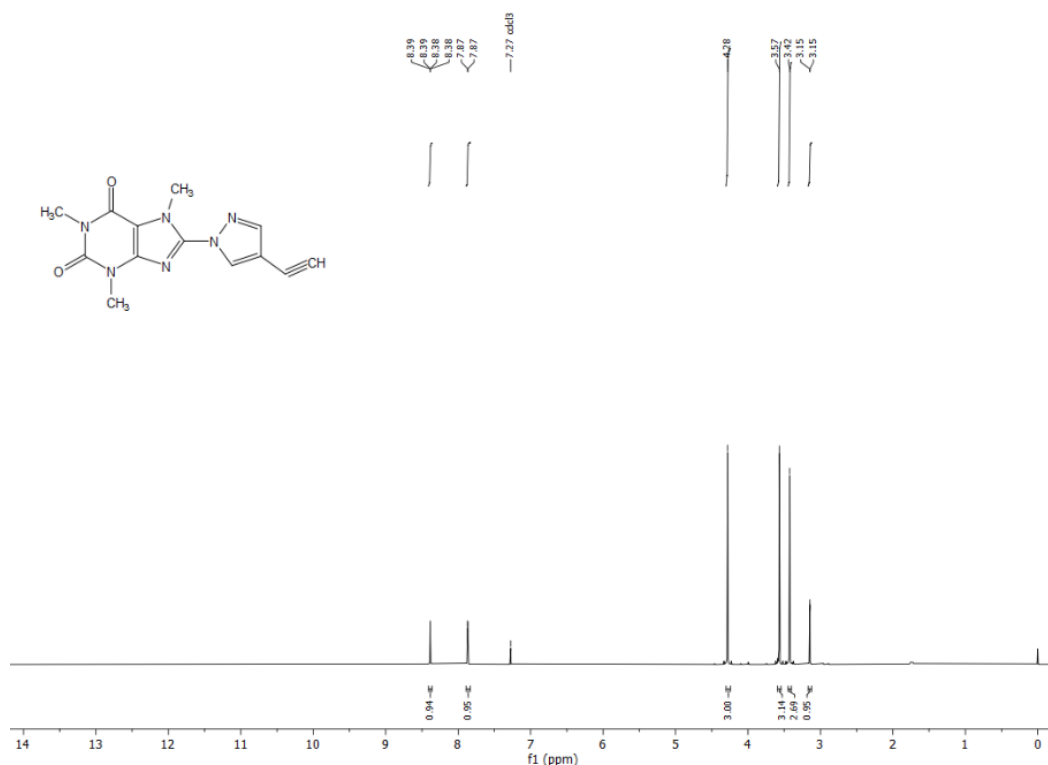
Białe ciało stałe (165 mg, 47%); t.t. 187–188 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6,29 (1H), 4,05 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,43 (s, 3H), 2,47 (d, $J = 0,9$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 155,2, 151,5, 146,1, 144,9, 141,9, 130,3, 110,9, 106,9, 33,5, 29,8, 28,0, 12,2. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3442, 2931, 1717, 1653, 1537, 1460, 1235, 1031, 754, 526. EI-MS (m/z , % int.): 352 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{12}H_{13}BrN_6O_2$ (MW = 353,18): C, 40,81; H, 3,71; N, 23,80; Otrzymana: C, 40,75; H, 3,81; N, 23,32 %.

Związek 35

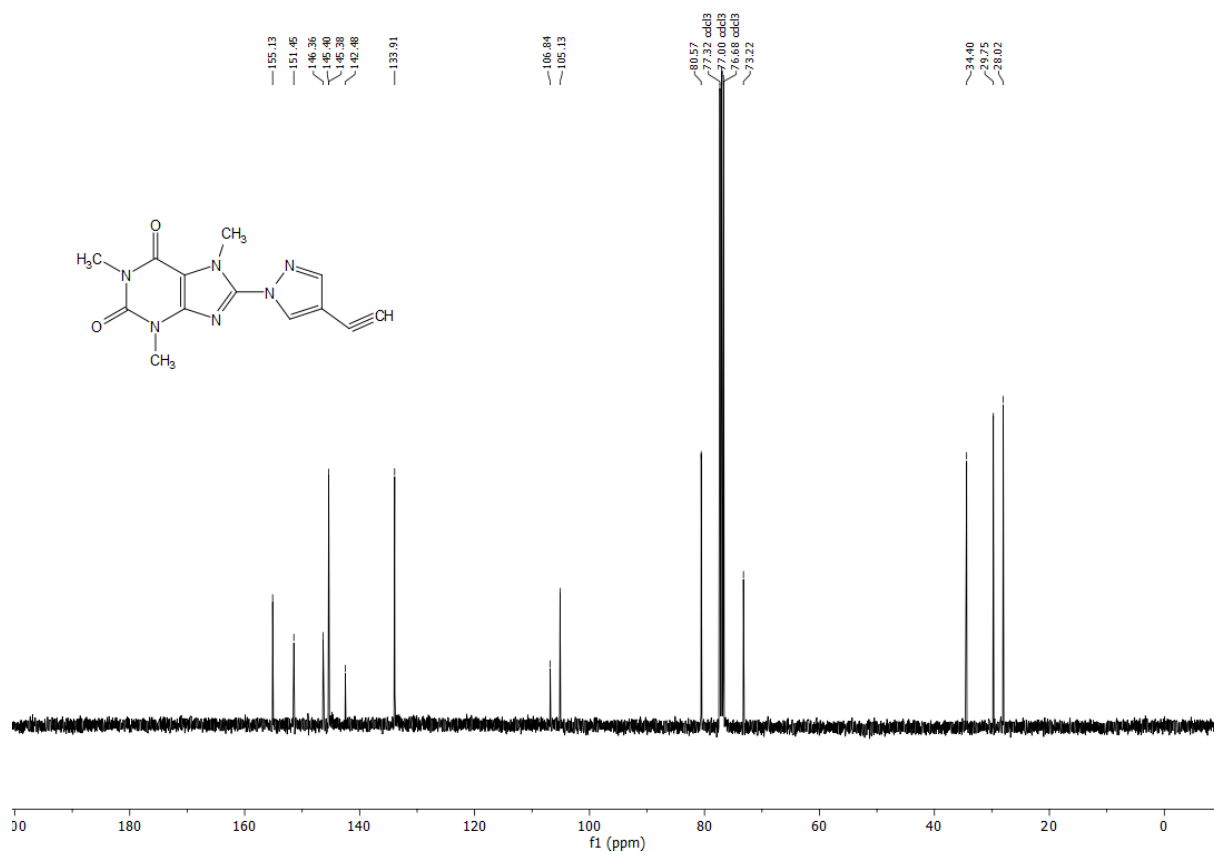
8-(4-etynylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol 4-etynylo-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

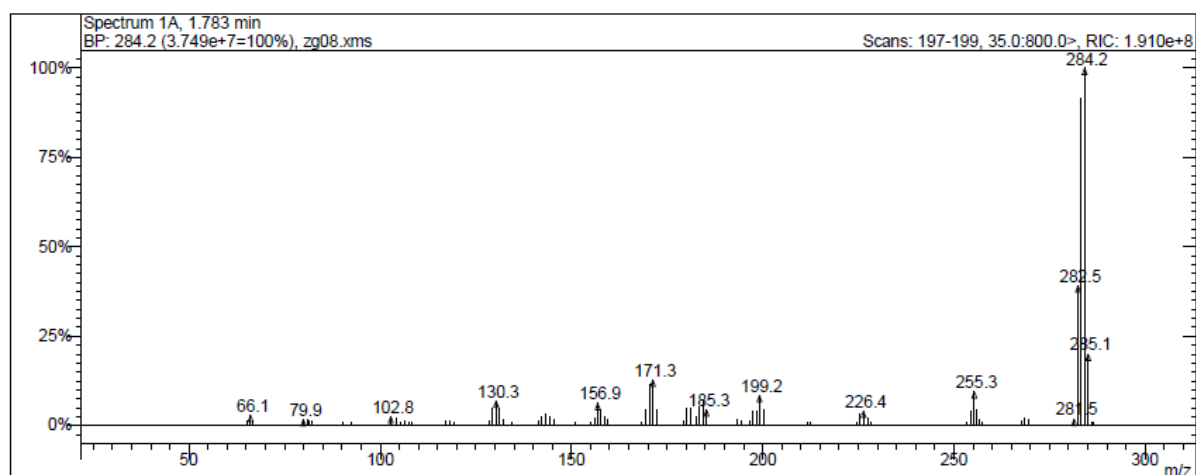
Białe ciało stałe (241 mg, 85%); t.t. 197–198 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,38 (s, 1H), 7,87 (1H), 4,28 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,42 (s, 3H), 3,15 (1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155,1, 151,5, 146,4, 145,4, 142,5, 133,9, 106,8, 105,1, 80,6, 73,2, 34,4, 29,8, 28,0. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3447, 3246, 3124, 2955, 2111, 1709, 1656, 1550, 1478, 1296, 1039, 968, 830, 762, 516. EI-MS (m/z, % int.): 284 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₃H₁₂N₆O₂ (MW = 284,28): C, 54,93; H, 4,25; N, 29,56; Otrzymana: C, 54,87; H, 4,31; N, 29,60 %.



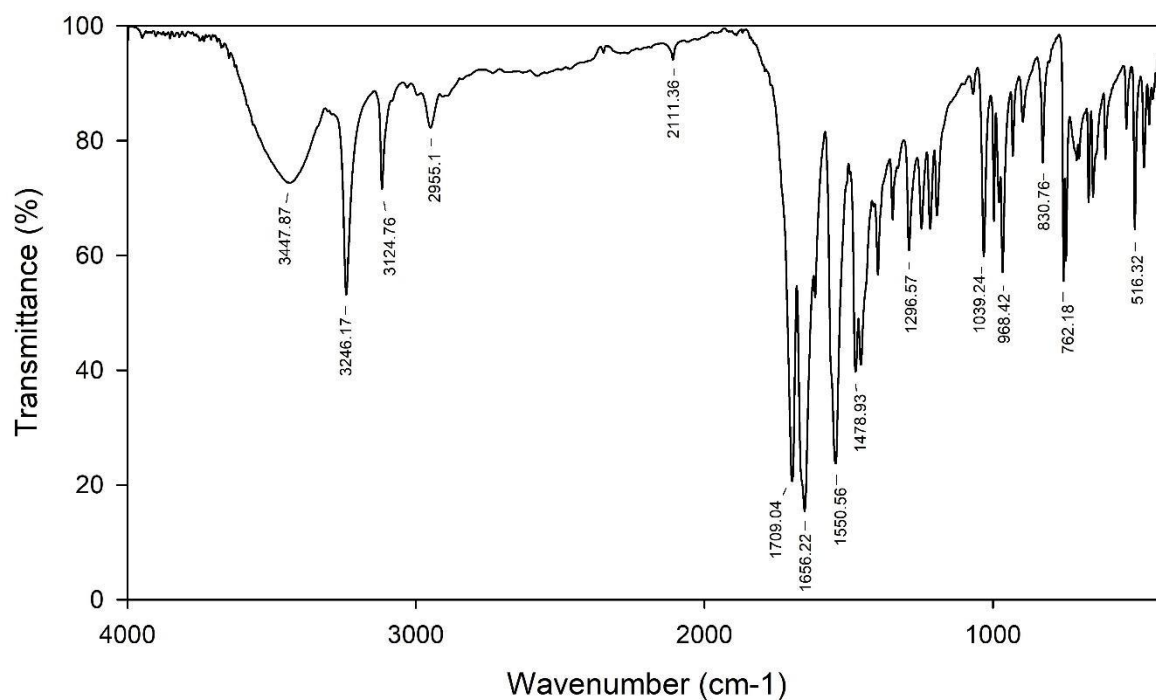
Rys. E24.1. Widmo ¹H NMR związku 35



Rys. E24.2. Widmo ¹³C NMR związku 35



Rys. E24.3. Widmo EI-MS związku 35



Rys. E24.4. Widmo FT-IR związku 35

Związek 36

8-(4-bromo-5-karbonitrylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol 4-bromo-5-karbonitrylo-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3$:AcOEt)

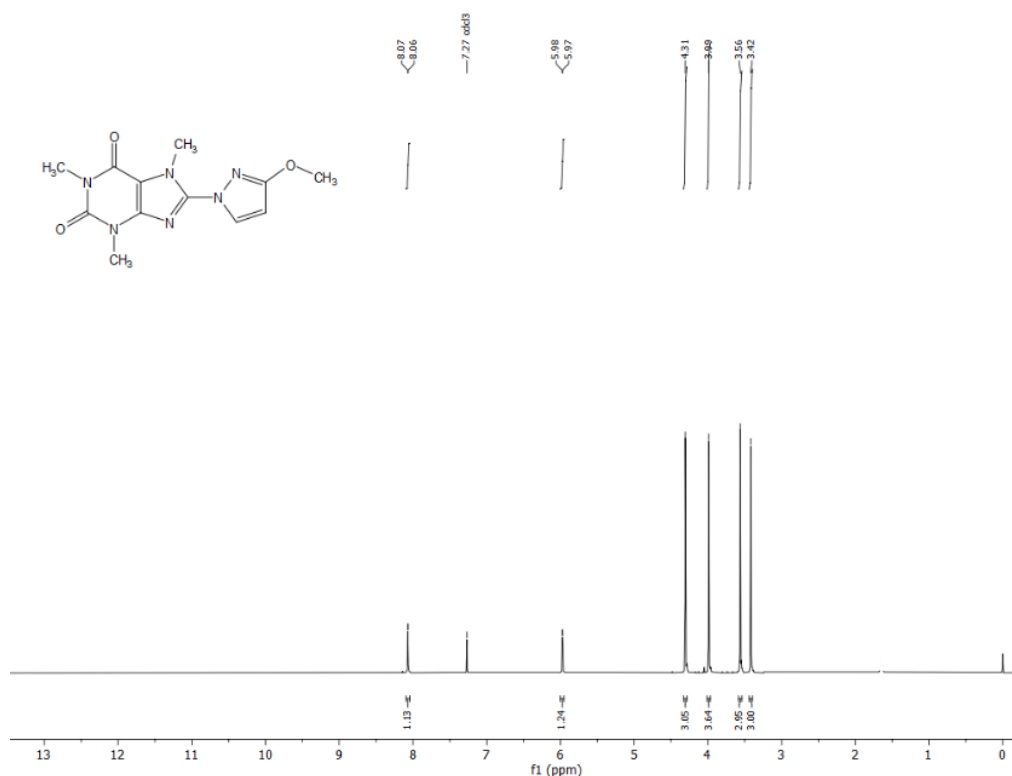
Białe ciało stałe (229 mg, 63%); t.t. 181–182 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,43 (s, 1H), 4,30 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 3,43 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 155,1, 151,3, 146,0, 140,7, 132,3, 130,3, 110,9, 107,5, 101,7, 34,6, 29,8, 28,13. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3455, 3130, 2958, 2257, 1715, 1669, 1551, 1468, 1358, 1251, 977, 752, 521. EI-MS (m/z , % int.): 364 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{12}H_{10}BrN_7O_2$ (MW = 364,16): C, 39,58; H, 2,77; N, 26,92; Otrzymana: C, 39,60; H, 2,82; N, 27,02 %.

Związek 37

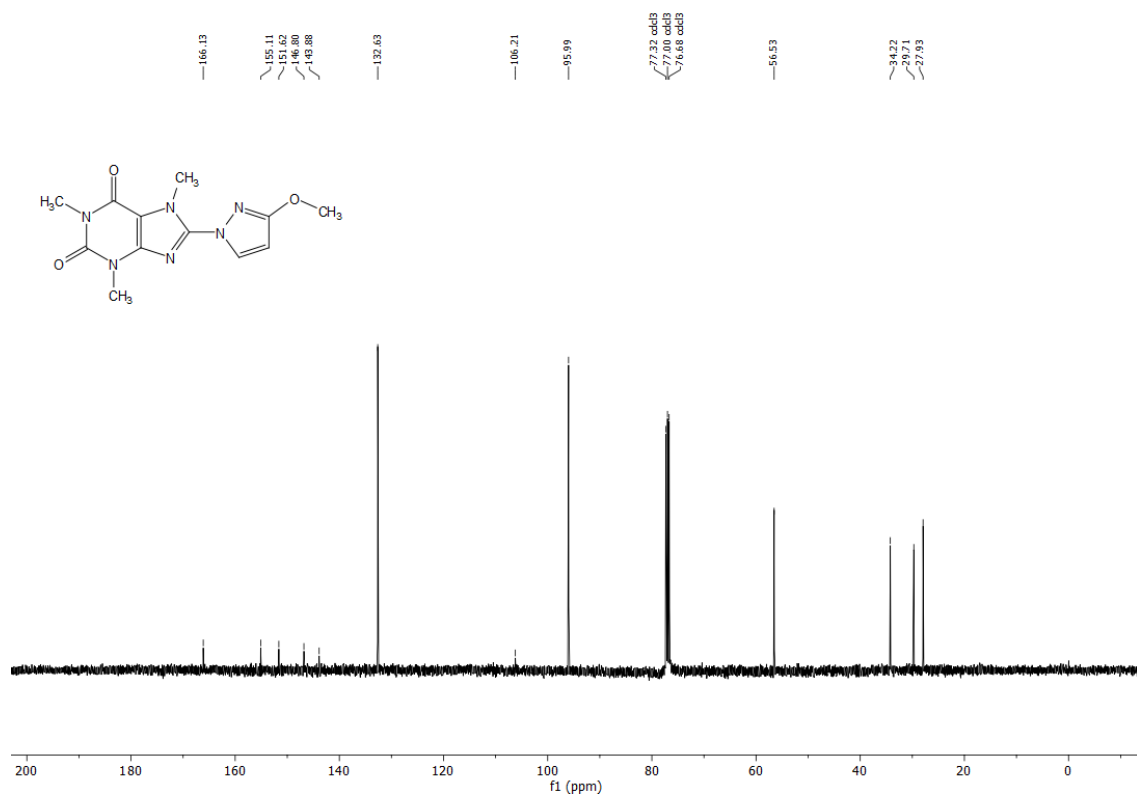
8-(3-metoksy-1*H*-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol 3-metoksy-1*H*-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

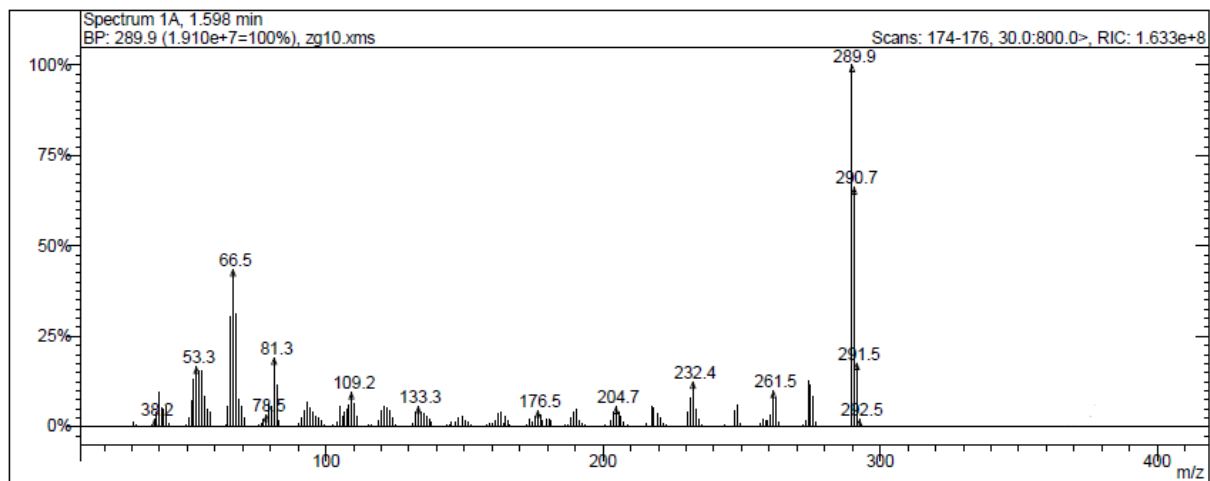
Białe ciało stałe (210 mg, 73%); t.t. 192–193 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,07 (1H), 5,98 (1H), 4,31 (s, 3H), 3,99 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 166,1, 155,1, 151,6, 146,8, 143,9, 132,6, 106,2, 95,9, 56,5, 34,2, 29,7, 27,9. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3119, 2953, 1701, 1656, 1553, 1460, 1296, 1238, 1087, 984, 752, 518. EI-MS (m/z, % int.): 289 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₈H₁₈N₆O₃ (MW = 366,38): C, 59,01; H, 4,95; N, 22,94; Otrzymana: C, 59,13; H, 4,87; N, 22,91 %.



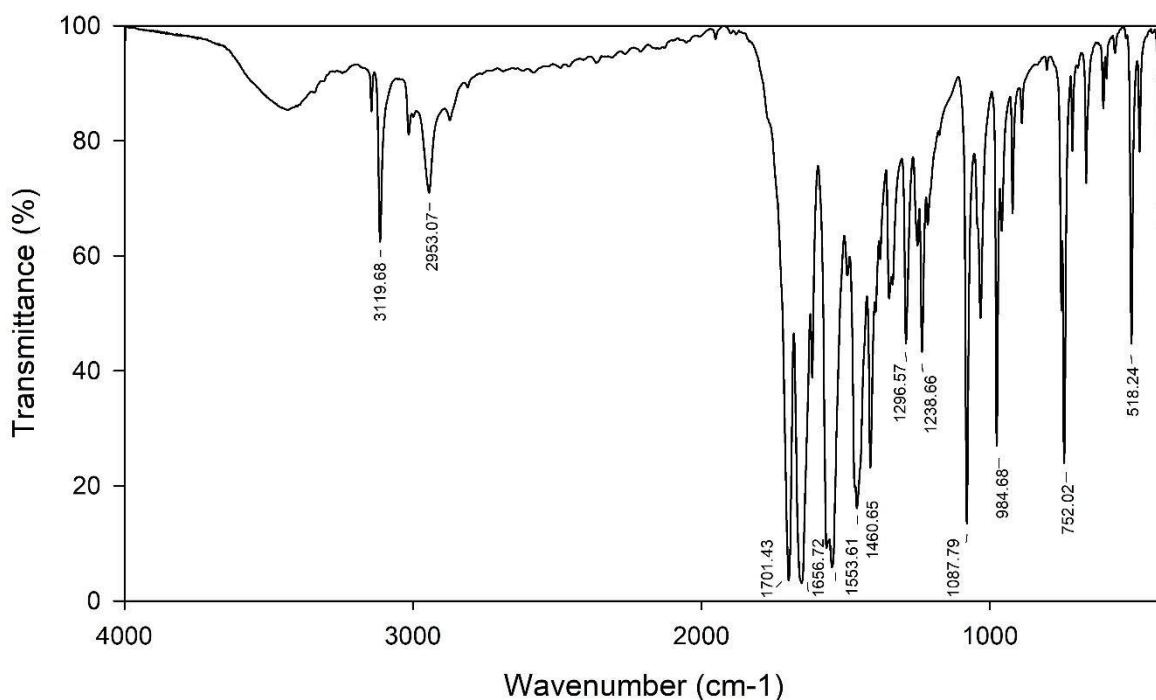
Rys. E25.1. Widmo ¹H NMR związku 37



Rys. E25.2. Widmo ¹³C NMR związku 37



Rys. E25.3. Widmo EI-MS związku 37



Rys. E25.4. Widmo FT-IR związku 37

Związek 38

8-(3-formylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol *1H-pirazolo-3-karbaldehydu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3:AcOEt$)

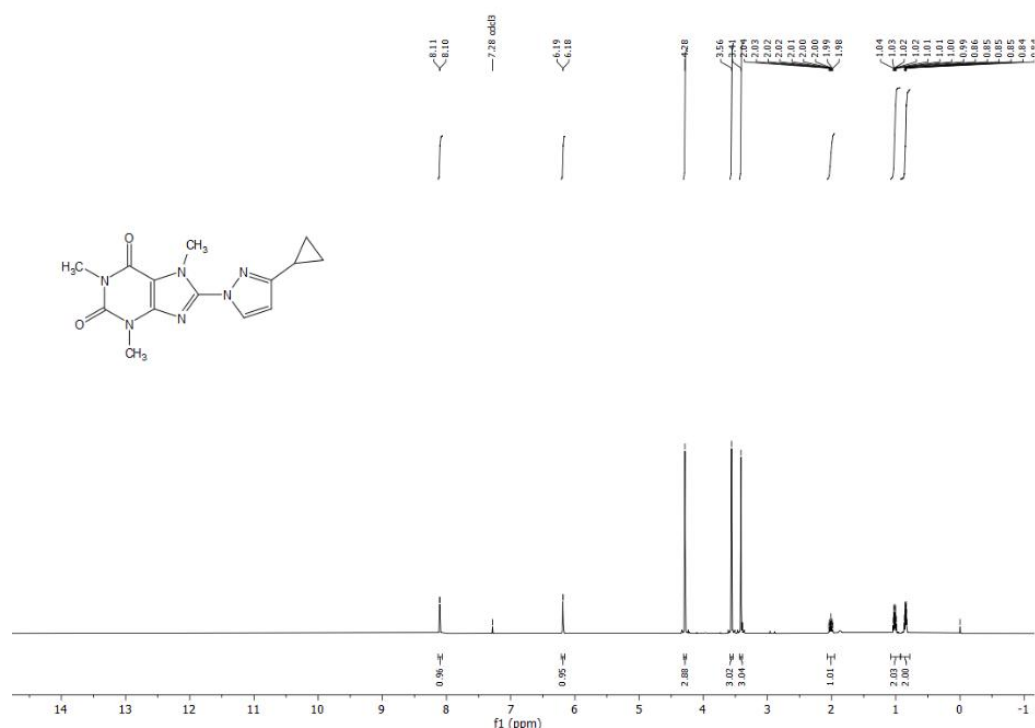
Białe ciało stałe (126 mg, 44%); t.t. 210–211 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10,10 (1H), 8,34 (1H), 7,02 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 4,37 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,44 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 185,7, 155,2, 153,9, 151,4, 146,3, 142,3, 133,1, 107,2, 107,1, 34,5, 29,8, 28,1. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3130, 2926, 2860, 1707, 1675, 1548, 1455, 1291, 1040, 812, 752, 511. EI-MS (m/z , % int.): 288 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{12}H_{12}N_6O_3$ (MW = 288,27): C, 50,00; H, 4,20; N, 29,15; Otrzymana: C, 50,13; H, 4,18; N, 29,21 %.

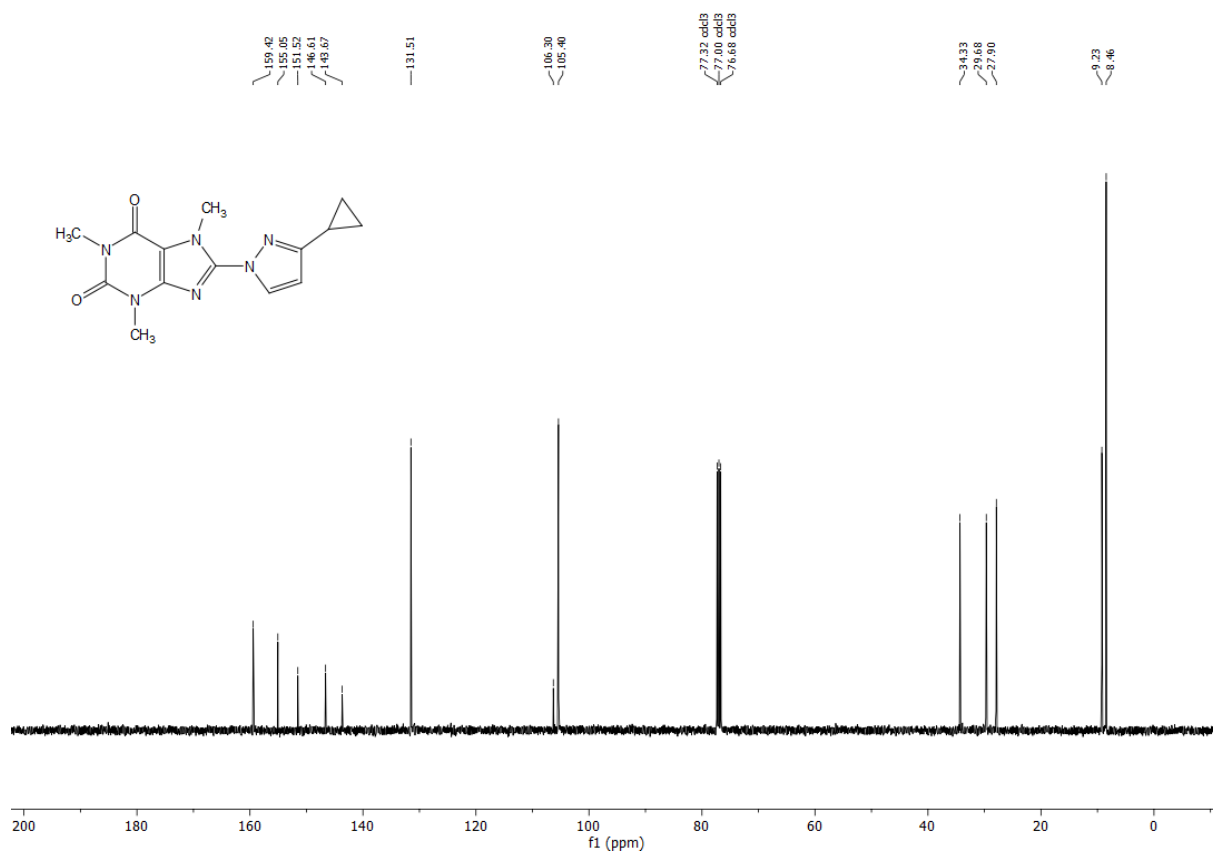
Związek 39

8-(3-cyklopropylo-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

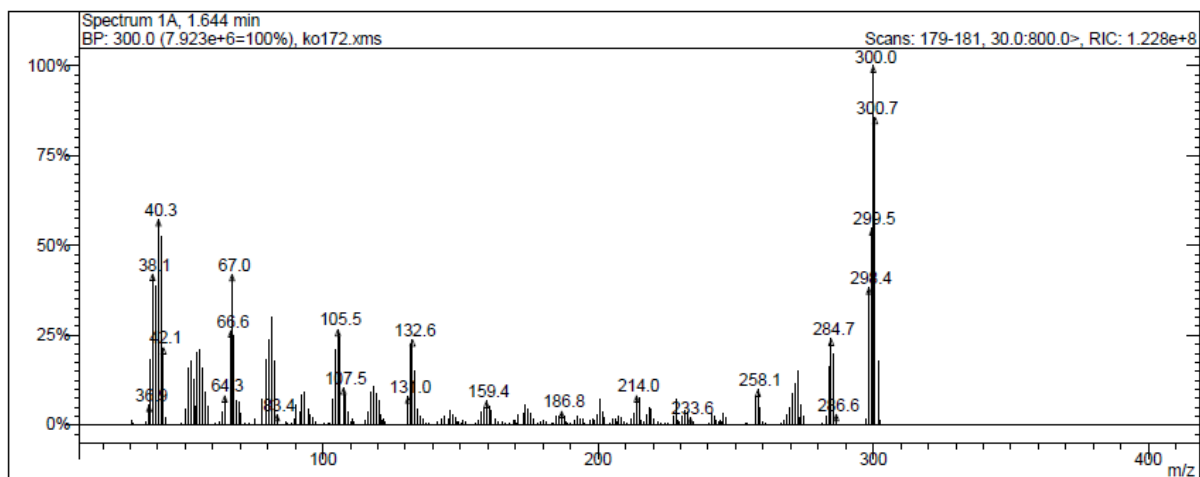
1 mmol 3-cyklopropylo-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

Białe ciało stałe (222 mg, 74%); t.t 188–189 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,10 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 6,18 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 4,28 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 3,41 (s, 3H), 2,01 (dt, J = 8,4, 5,0 Hz, 1H), 1,08 – 0,93 (m, 2H), 0,92 – 0,78 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159,4, 155,1, 151,5, 146,6, 143,7, 131,5, 106,3, 105,4, 34,3, 29,7, 27,9, 9,2, 8,5 (2x). FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3450, 3122, 2950, 1701, 1659, 1551, 1453, 1236, 1037, 968, 746. EI-MS (m/z, % int.): 300 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₄H₁₆N₆O₂ (MW = 300,32): C, 55,99; H, 5,37; N, 27,98; Otrzymana: C, 56,03; H, 5,41; N, 28,02 %.

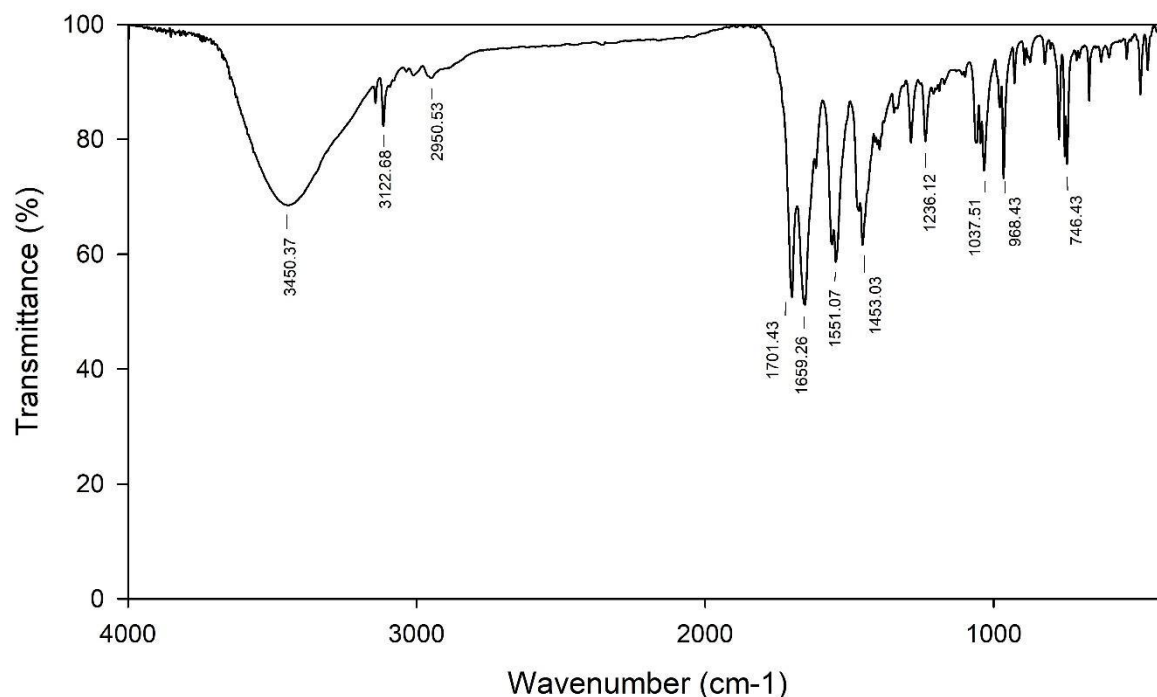




Rys. E26.2. Widmo ^{13}C NMR związku 39



Rys. E26.3. Widmo EI-MS związku 39



Rys. E26.4. Widmo FT-IR związku **39**

Związek 40

*8-(1*H*,1'*H*-4,4'-bipirazol-1-ilo)kofeina*

1 mmol *1H,1'H-4,4'-bipirazolu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

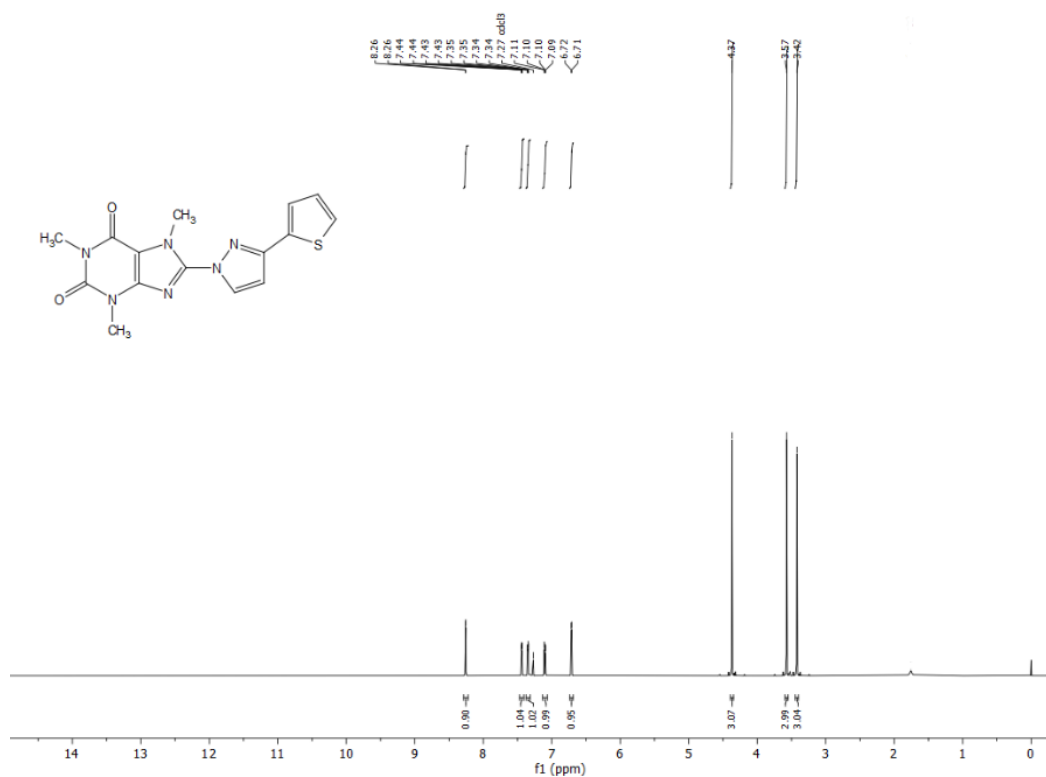
Białe ciało stałe (42 mg, 15%); t.t. 204–205 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12,98 (s, 1H), 8,63 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,90 (s, 1H), 4,13 (s, 3H), 3,45 (s, 3H), 3,25 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 154,4, 150,9, 146,0, 143,1, 141,5, 136,7, 126,6, 125,7, 116,9, 110,8, 106,0, 33,9, 29,5, 27,6. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3412, 3243, 3122, 2963, 1698, 1659, 1550, 1458, 1392, 1294, 1042, 968, 762. EI-MS (m/z, % int.): 326 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₄H₁₄N₈O₂ (MW = 326,32): C, 51,53; H, 4,32; N, 34,34; Otrzymana: C, 51,47; H, 4,34; N, 34,29 %.

Związek 41

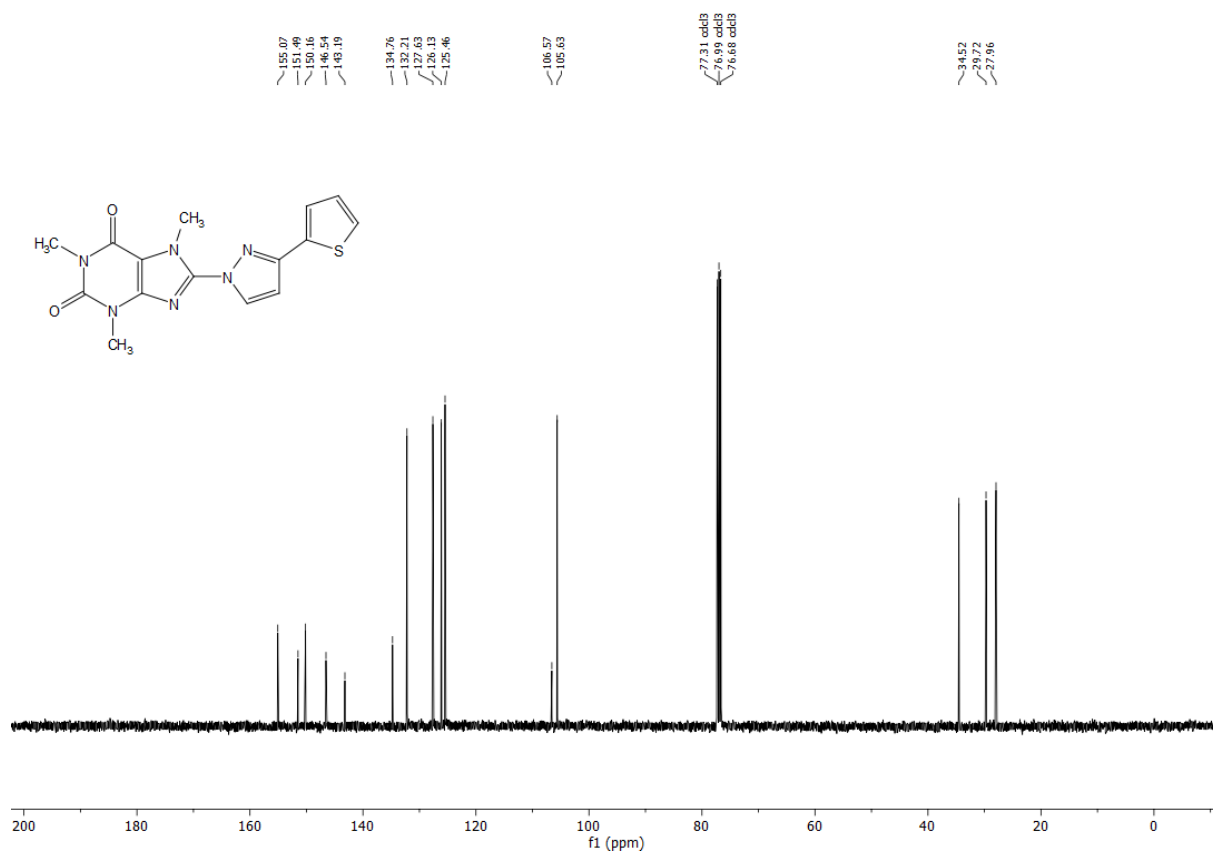
8-(3-(tiofen-2-ylo)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol 3-tiofeno-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3$:AcOEt)

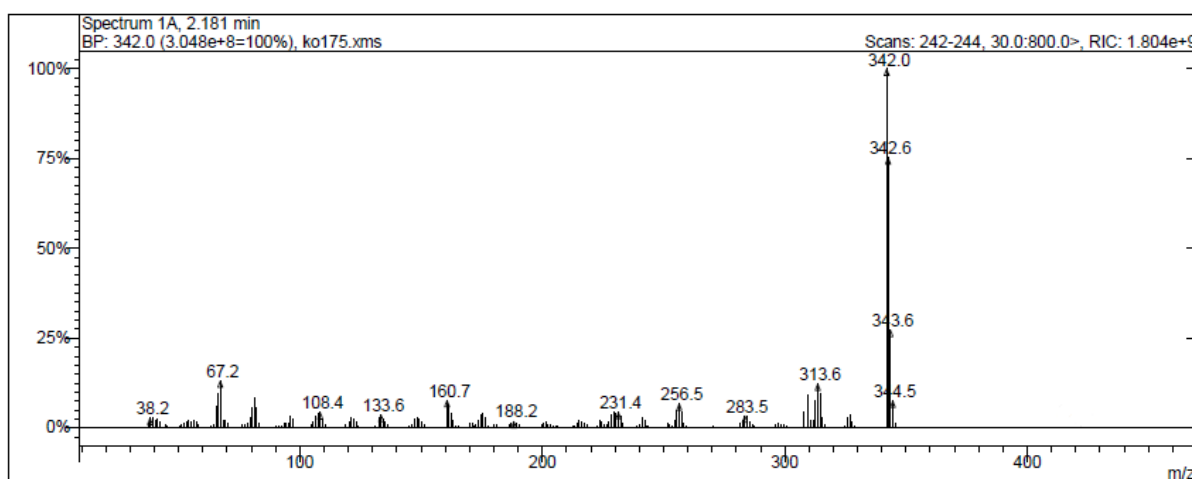
Białe ciało stałe (174 mg, 51%); t.t. 193–194 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,26 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 7,44 (1H), 7,35 (1H), 7,10 (1H), 6,71 (d, J = 2,7 Hz, 1H), 4,37 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 155,1, 151,5, 150,2, 146,5, 143,2, 134,8, 132,2, 127,6, 126,1, 125,5, 106,6, 105,6, 34,5, 29,7, 27,9. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3447, 3074, 2953, 1701, 1664, 1553, 1461, 1294, 1225, 1038, 974, 850, 757, 545, 492. EI-MS (m/z, % int.): 342 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{15}H_{14}N_6O_2S$ (MW = 342,38): C, 52,62; H, 4,12; N, 24,55; S, 9,36; Otrzymana: C, 52,67; H, 4,17; N, 24,67; S, 9,25 %.



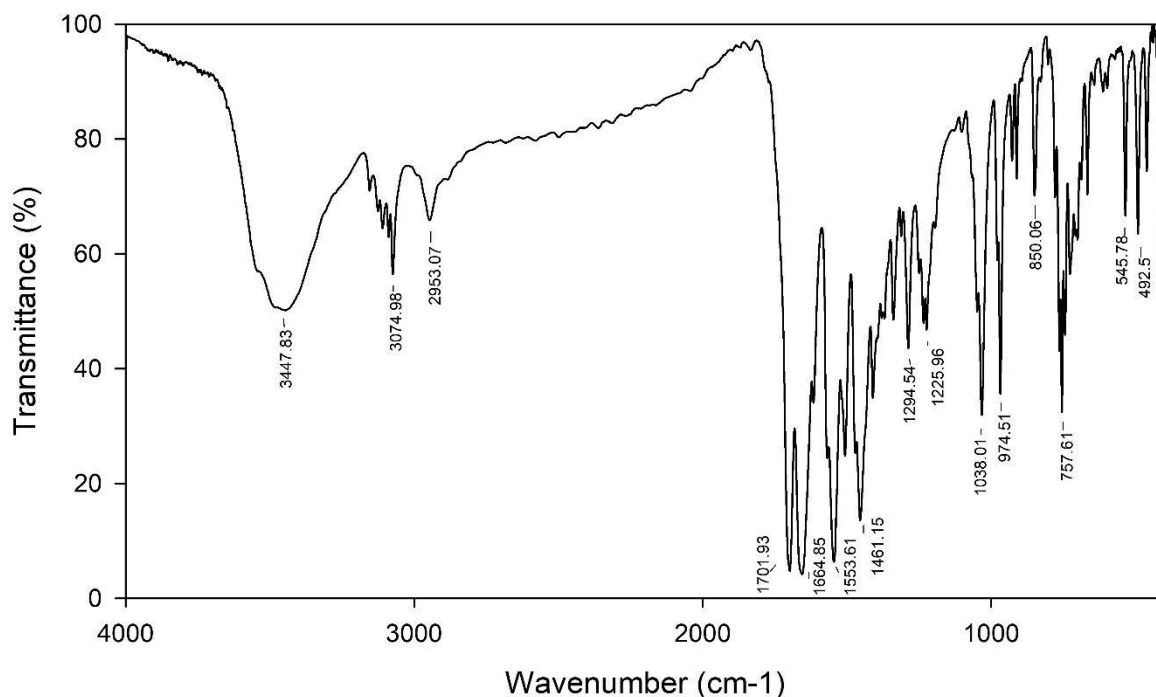
Rys. E27.1. Widmo ^1H NMR związku



Rys. E27.2. Widmo ¹³C NMR związku 41



Rys. E27.3. Widmo EI-MS związku 41



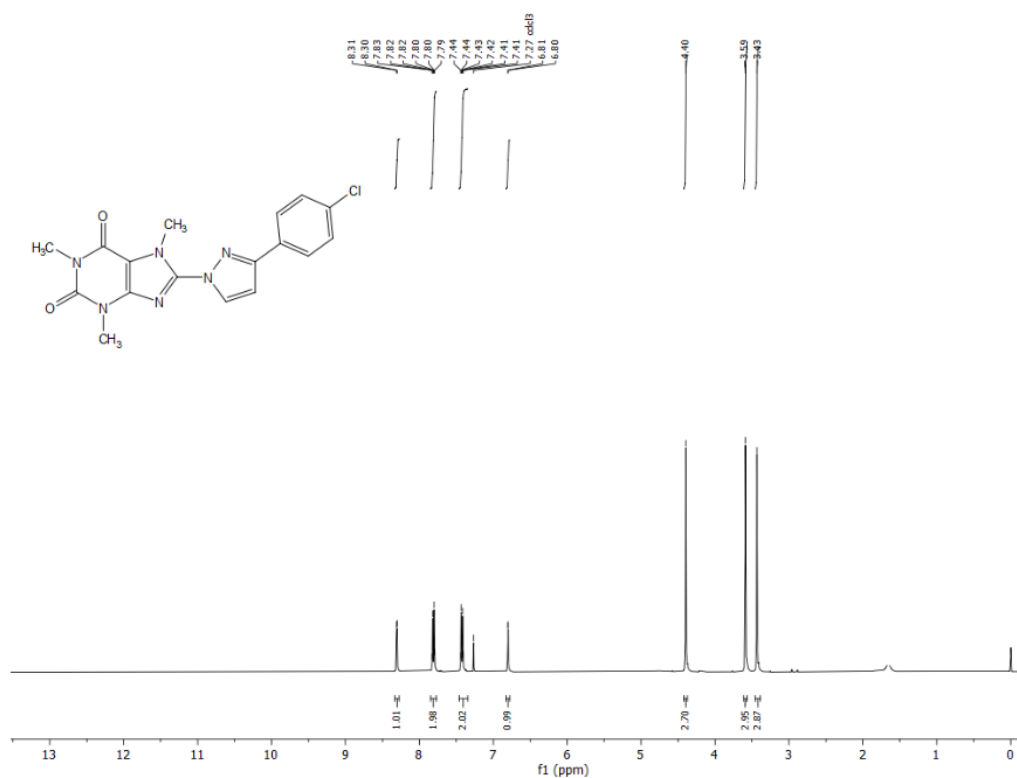
Rys. E27.4. Widmo FT-IR związku **41**

Związek 42

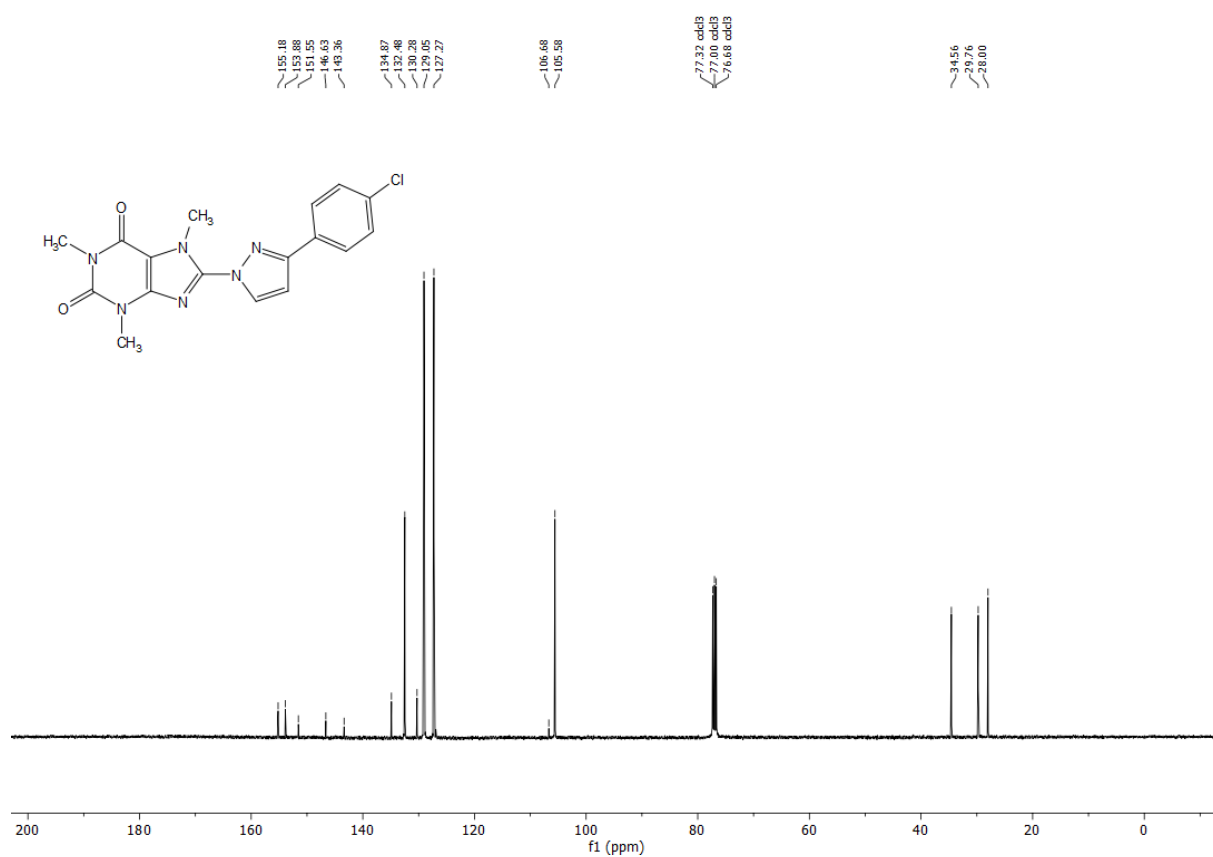
8-(3-(4-chlorofenyl)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol *3-(4-chlorofenyl)-1H-pirazolu* rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K_2CO_3 (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($CHCl_3:AcOEt$)

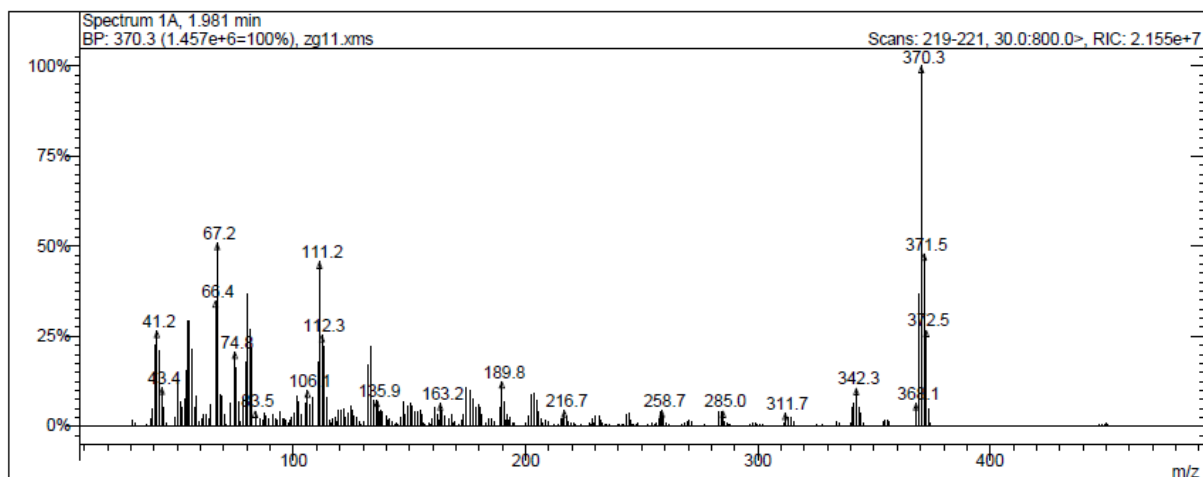
Białe ciało stałe (240 mg, 65%); t.t. 185–186 °C; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8,31 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 7,85 – 7,77 (m, 2H), 7,46 – 7,35 (m, 2H), 6,80 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H), 4,40 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,43 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 155,2, 153,9, 151,6, 146,6, 143,46, 134,9, 132,5, 130,3, 129,1 (2x), 127,3 (2x), 106,7, 105,6, 34,6, 29,8, 28,0. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3447, 3119, 2953, 1910, 1696, 1654, 1553, 1458, 1365, 1043, 976, 841, 748, 516. EI-MS (m/z , % int.): 370 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $C_{17}H_{15}ClN_6O_2$ (MW = 370,80): C, 55,07; H, 4,08; N, 22,67; Otrzymana: C, 55,17; H, 4,11; N, 22,71 %.



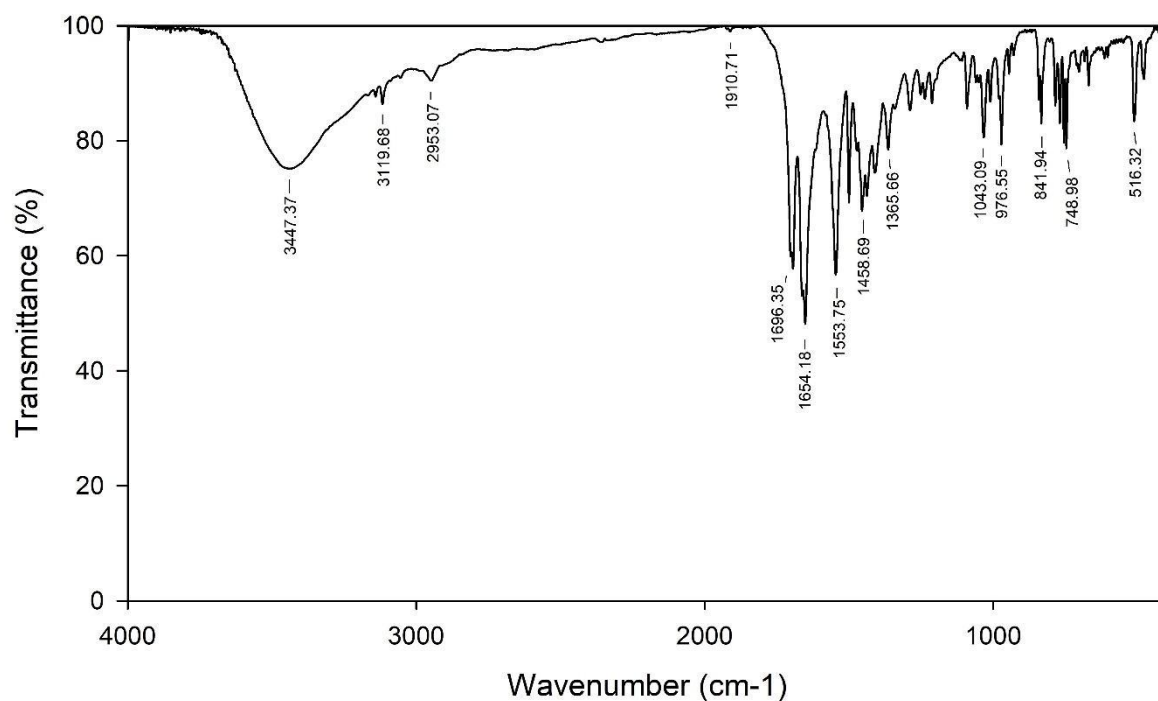
Rys. E28.1. Widmo ¹H NMR związku 42



Rys. E28.2. Widmo ¹³C NMR związku 42



Rys. E28.3. Widmo EI-MS związku 42



Rys. E28.4. Widmo FT-IR związku 42

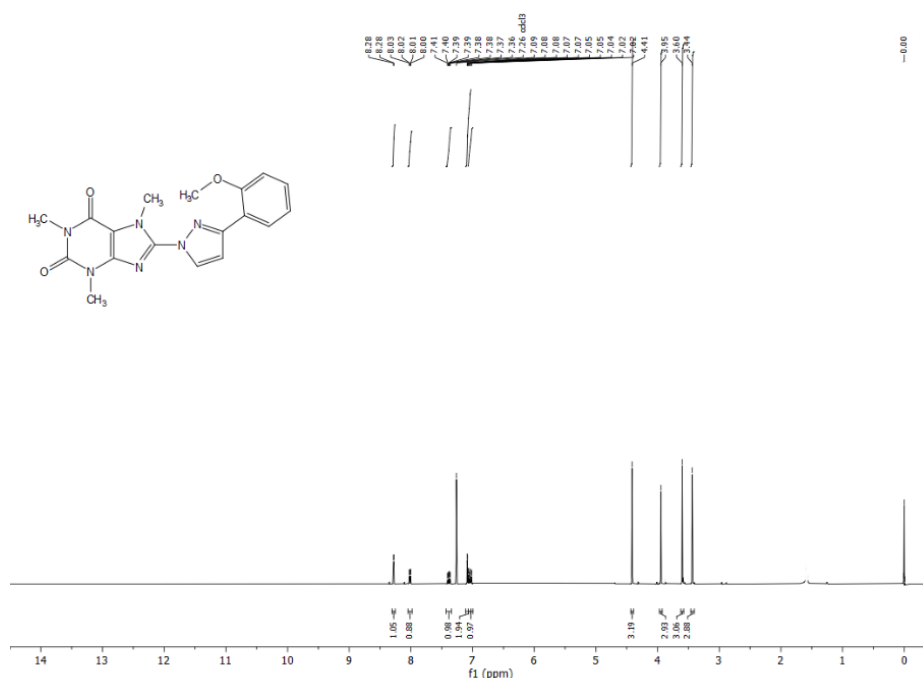
Związek 43

8-(3-(2-metoksyfenylo)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

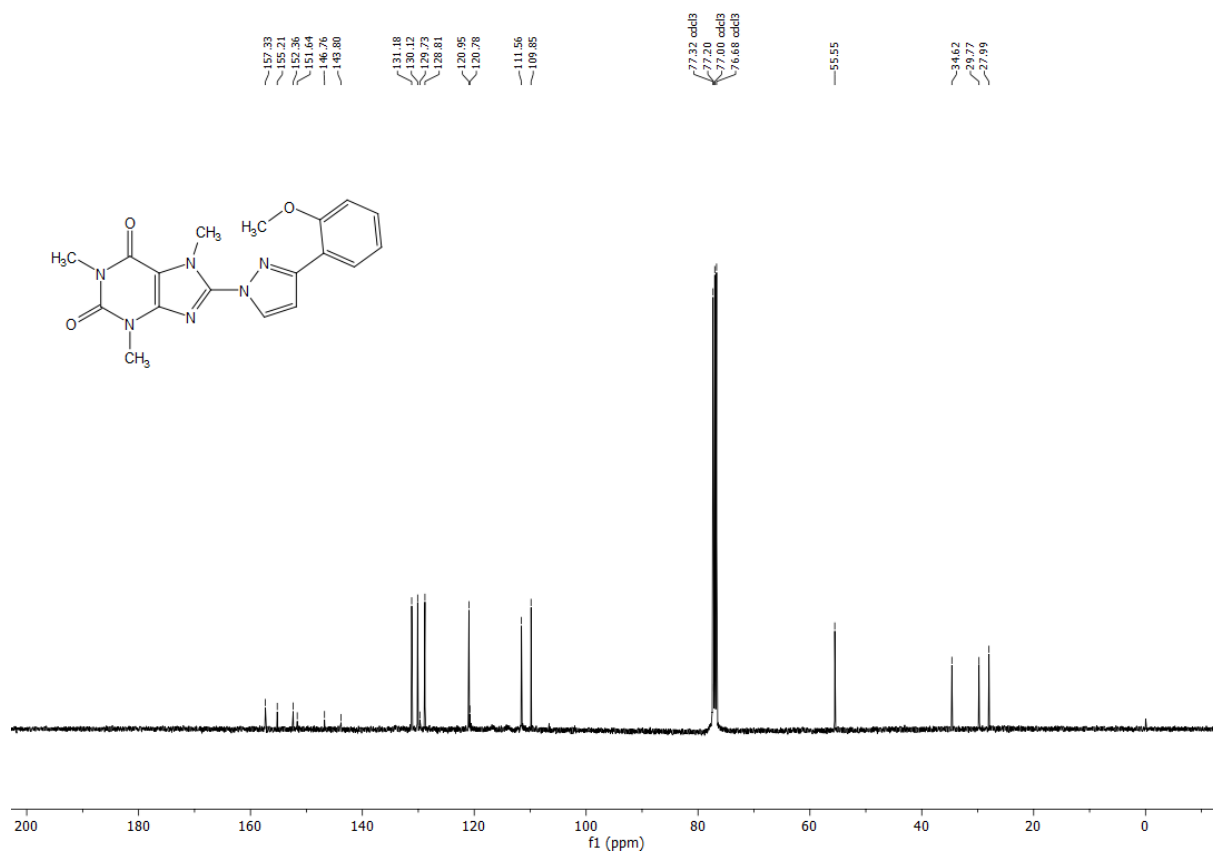
1 mmol 3-(2-metoksyfenylo)-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem

za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej ($\text{CHCl}_3\text{:AcOEt}$)

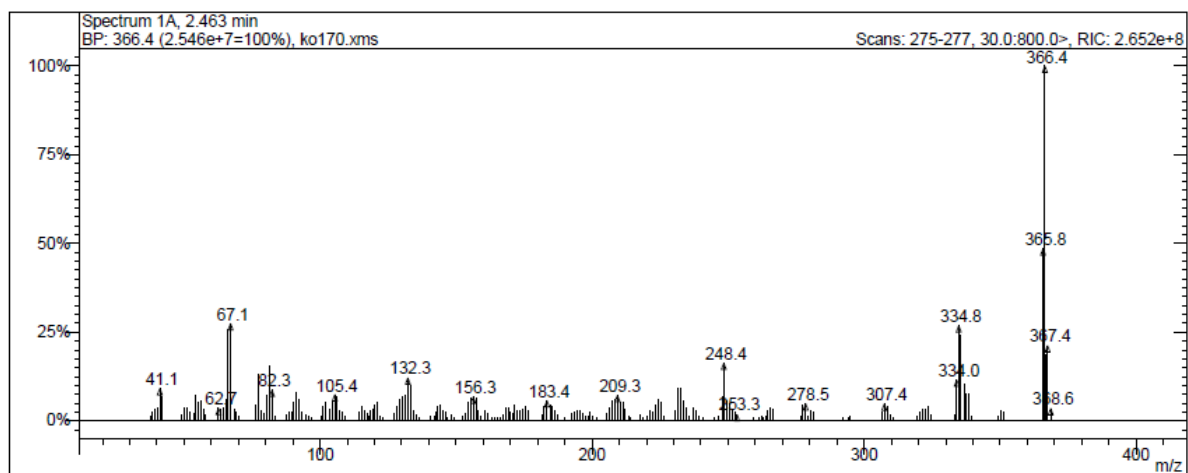
Białe ciało stałe (139 mg, 38%); t.t 219–220 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8,28 (1H), 8,01 (1H), 7,38 (1H), 7,11 – 7,03 (m, 2H), 7,07 – 6,99 (m, 1H), 4,41 (s, 3H), 3,95 (s, 3H), 3,60 (s, 3H), 3,44 (s, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 157,3, 155,2, 152,4, 151,6, 146,8, 143,8, 131,2, 130,1, 129,7, 128,8, 120,9, 120,8, 111,6, 109,9, 55,6, 34,6, 29,8, 27,9. FT-IR: (KBr, cm^{-1}) ν_{max} : 3437, 3135, 2950, 1704, 1659, 1545, 1471, 1278, 1027, 760, 526. EI-MS (m/z , % int.): 366 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_3$ (MW = 366,38): C, 59,01; H, 4,95; N, 22,94; Otrzymana: C, 59,09; H, 4,99; N, 22,93 %.



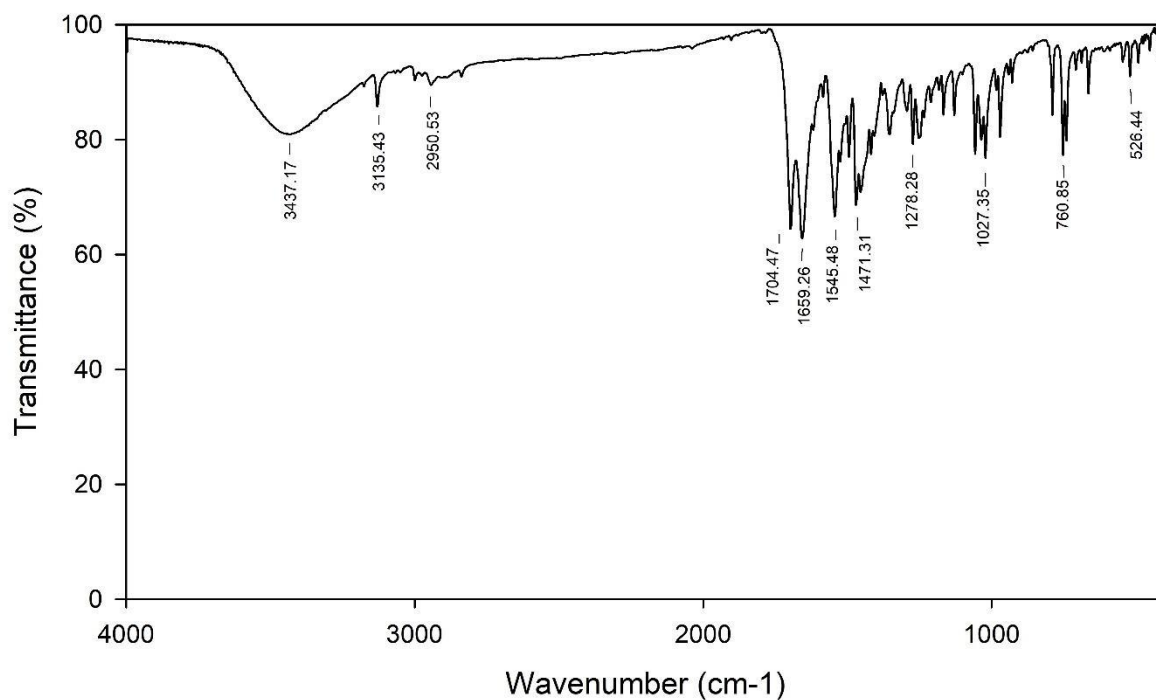
Rys. E29.1. Widmo ^1H NMR związku 43



Rys. E29.2. Widmo ¹³C NMR związku 43



Rys. E29.3. Widmo EI-MS związku 43



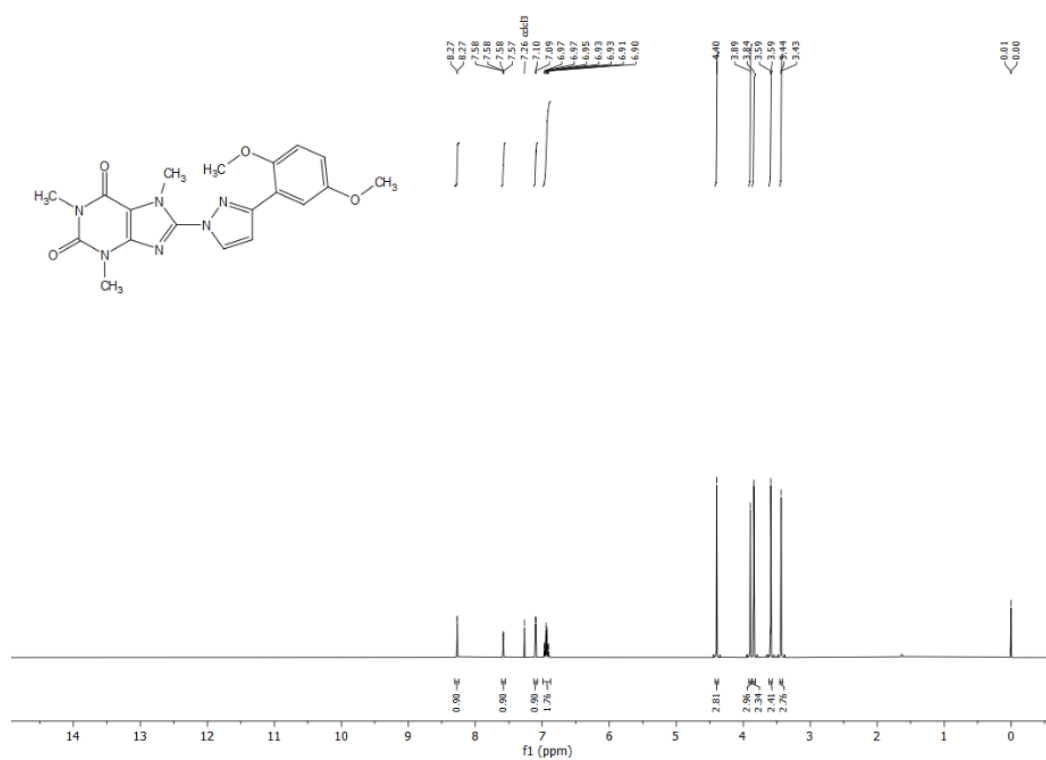
Rys. E29.4. Widmo FT-IR związku **43**

Związek **44**

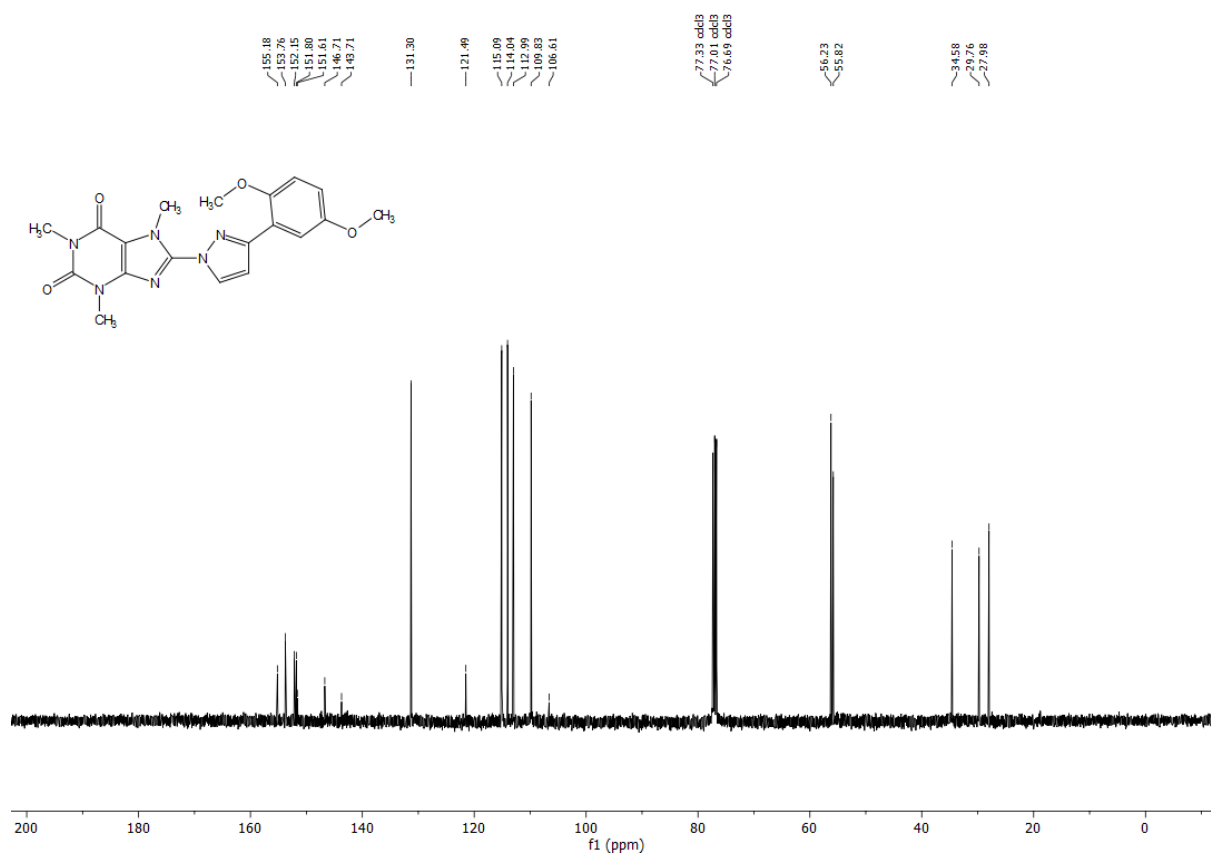
8-(3-(2,5-dimetoksyfenylo)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

1 mmol 3-(2,5-dimetoksyfenylo)-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

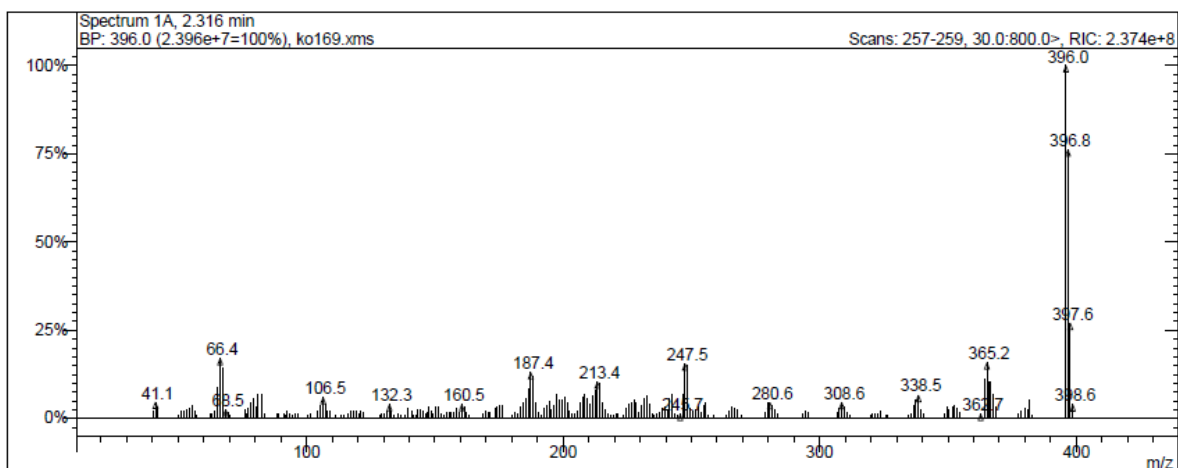
Białe ciało stałe (174 mg, 44 %); t.t 218–219 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8,27 (1H), 7,58 (1H), 7,10 (1H), 6,99 – 6,88 (m, 2H), 4,40 (s, 3H), 3,89 (s, 3H), 3,84 (s, 3H), 3,59 (s, 3H), 3,43 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 155,2, 153,8, 152,2, 151,8, 151,6, 146,7, 143,7, 131,3, 121,5, 115,1, 114,0, 112,9, 109,8, 106,6, 56,2, 55,8, 34,6, 29,8, 27,9. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3444, 3154, 2953, 1704, 1659, 1551, 1460, 1254, 1053, 786, 529. EI-MS (m/z, % int.): 396 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla C₁₉H₂₀N₆O₄ (MW = 396,41): C, 57,57; H, 5,09; N, 21,20; Otrzymana: C, 57,52; H, 5,12; N, 21,31 %.



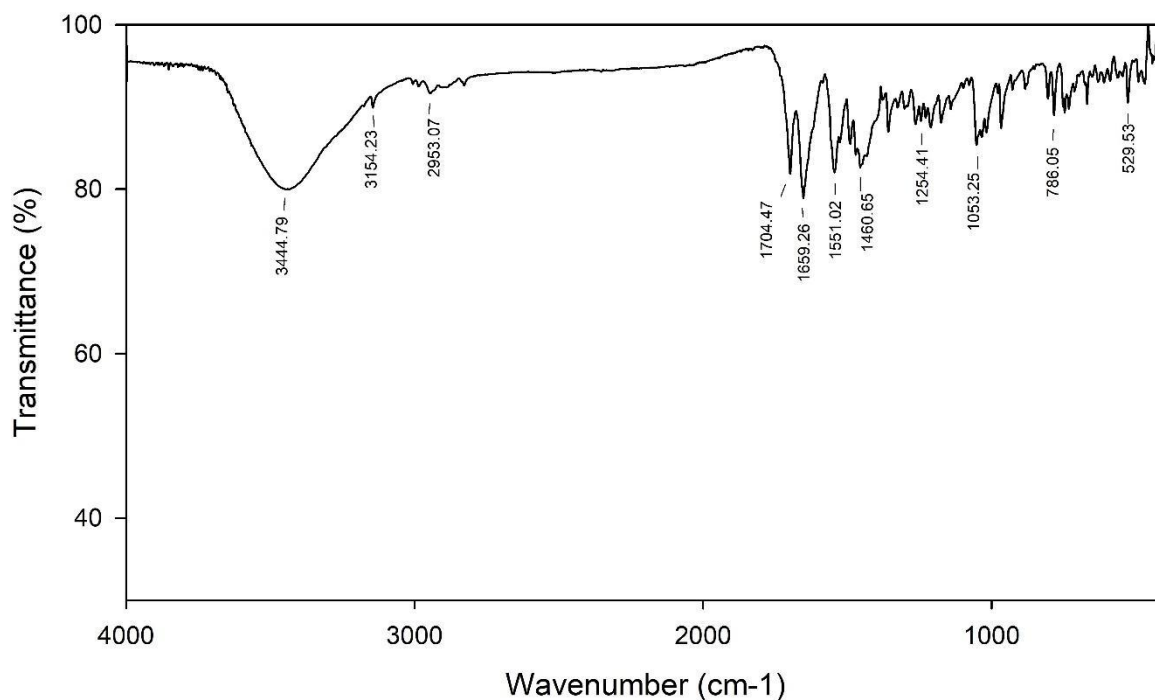
Rys. E30.1. Widmo ¹H NMR związku 44



Rys. E30.2. Widmo ¹³C NMR związku 44



Rys. E30.3. Widmo EI-MS związku **44**



Rys. E30.4. Widmo FT-IR związku **44**

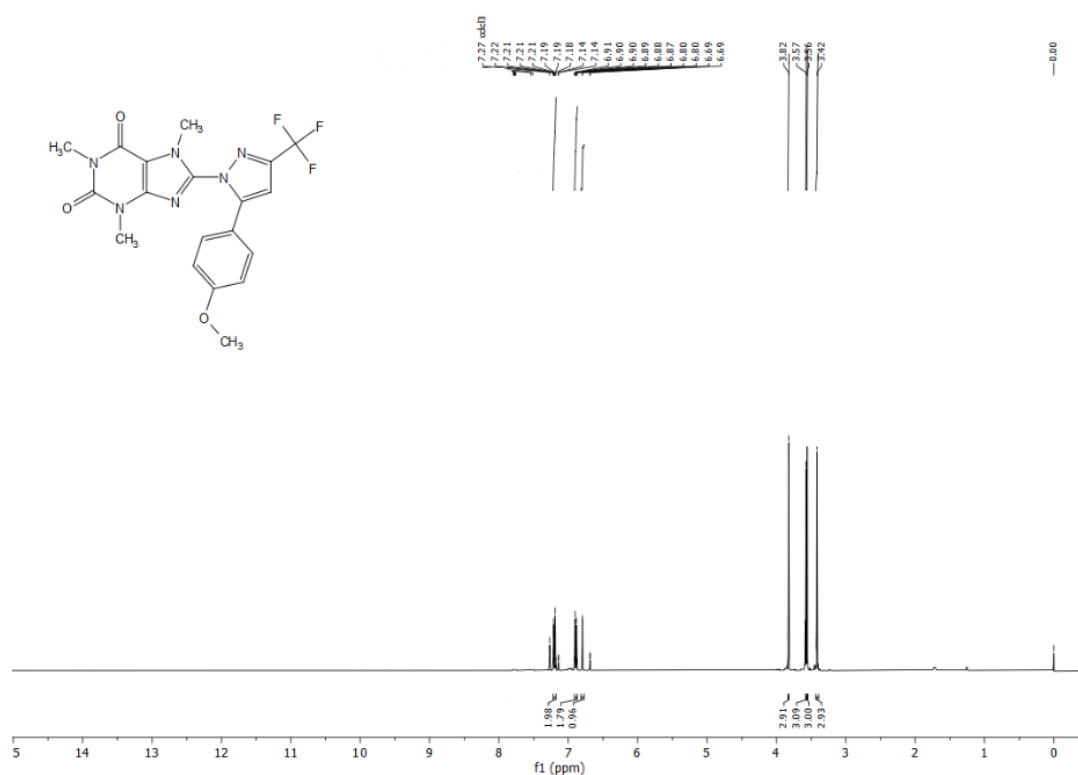
Związek **45**

8-(5-(4-metoksyfenylo)-3-(trifluorometylo)-1H-pirazol-1-ilo)kofeina

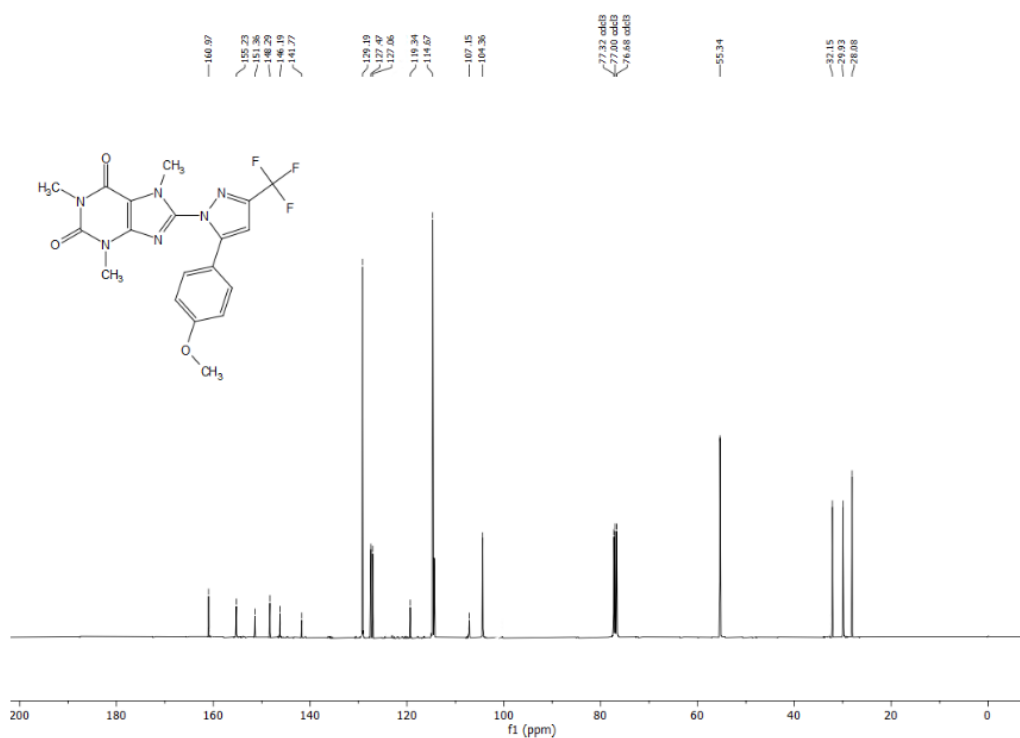
1 mmol 5-(4-metoksyfenylo)-3-(trifluorometylo)-1H-pirazolu rozpuściłem w 5 mL DMF i dodałem do roztworu K₂CO₃ (2 mmol). Całość mieszałem przez 30 min. Następnie dodałem 1 mmol 8-bromokofeiny i grzałem mieszaninę przez następne 24 h w temperaturze 70 °C. Postęp reakcji monitorowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Reakcję

zakończyłem dodaniem 20 mL wody. Otrzymany surowy osad oczyściłem metodą gradientowej chromatografii kolumnowej (CHCl₃:AcOEt)

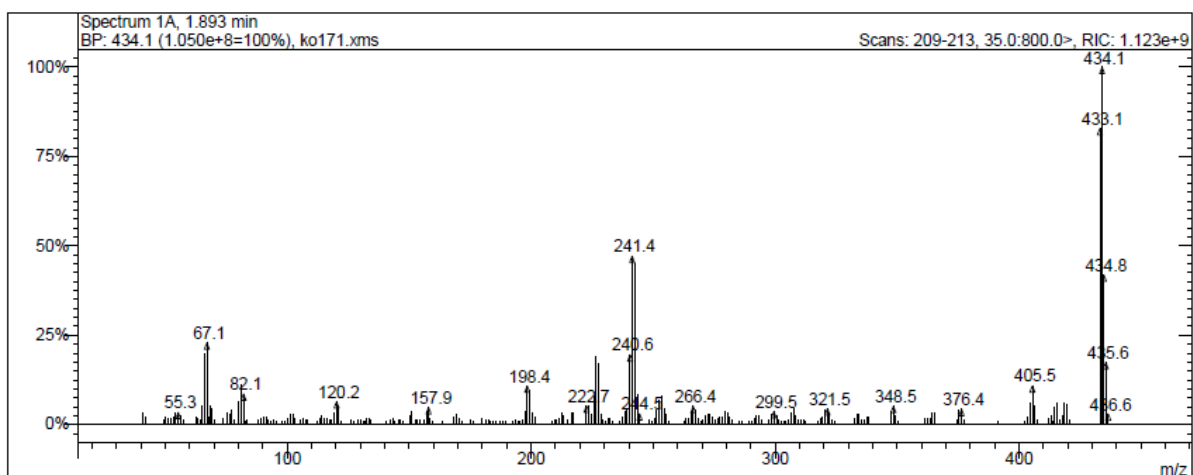
Białe ciało stałe (339 mg, 78%); t.t. 195–196 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,22 – 6,89 (m, 5H), 3,82 (s, 3H), 3,57 (s, 3H), 3,56 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160,9, 155,2, 151,4, 148,3, 146,2, 141,8, 129,2 (2x), 127,5, 127,1, 119,3, 114,7 (2x), 107,2, 104,4, 55,3, 32,2, 29,9, 28,1. FT-IR: (KBr, cm⁻¹) ν_{max}: 3443, 3244, 3144, 2977, 2858, 2053, 1895, 1718, 1662, 1620, 1474, 1260, 1168, 1041, 987, 802, 747. EI-MS (m/z, % int.): 434 ([M], 100%). Zawartość obliczona dla: C₁₉H₁₇F₃N₆O₃ (MW = 434,38): C, 52,54; H, 3,94; N, 19,35; Otrzymana: C, 52,48; H, 3,76; N, 19,32 %,



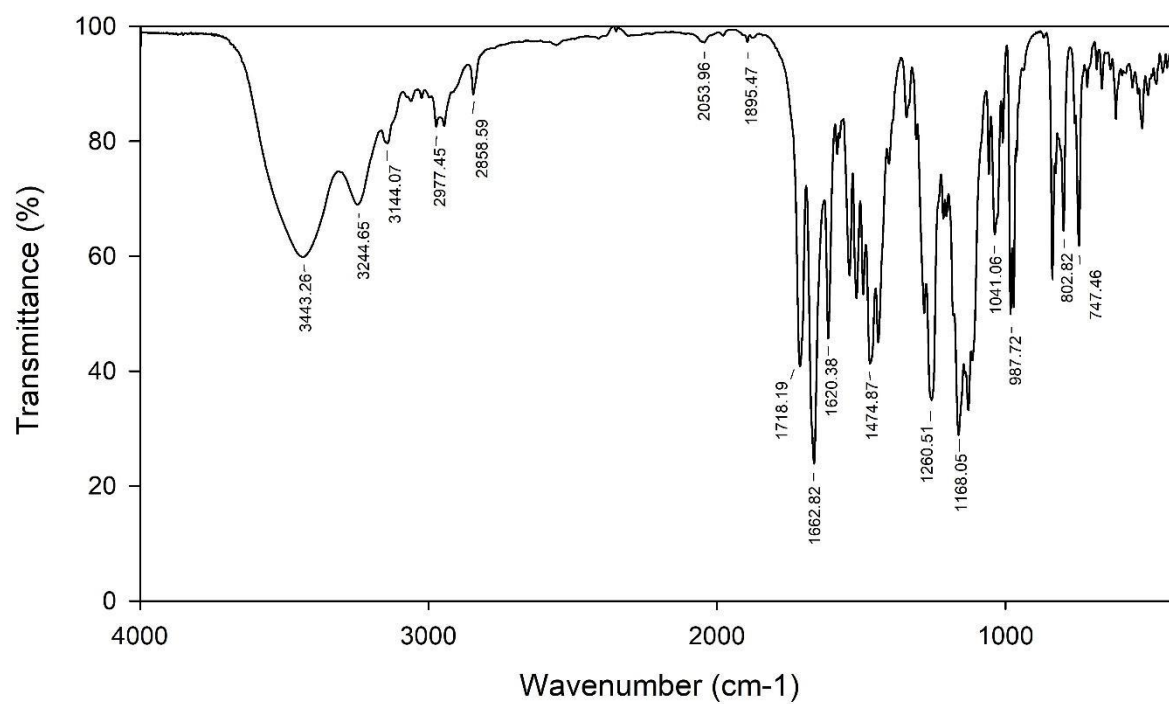
Rys. E31.1. Widmo ¹H NMR związku 45



Rys. E31.2. Widmo ¹³C NMR związku 45



Rys. E31.3. Widmo EI-MS związku 45



Rys. E31.4. Widmo FT-IR związku 45

5. Podsumowanie pracy

Głównym celem mojej pracy była synteza nowych pochodnych kofeiny o szerokim zakresie aktywności biologicznej, które mogą znaleźć zastosowanie w zwalczaniu chorób cywilizacyjnych, takich jak nowotwory i choroby neurodegeneracyjne, a także w ograniczaniu stresu oksydacyjnego oraz infekcji wywoływanych przez patogeny środowiskowe. Przeprowadzone przeze mnie modyfikacje chemiczne polegały na modyfikacji cząsteczki kofeiny w pozycji C-8 poprzez wprowadzanie w tę pozycję innych ugrupowań biologicznie aktywnych, takich jak pochodne uracylu, stilbeny, imidazole oraz pirazole. W wyniku przeprowadzonych syntez uzyskałem **45 nowych związków chemicznych**, które podzieliłem na cztery grupy.

Grupa I (związki **2–8**) obejmuje koniugaty kofeiny z pochodnymi uracylu, tiouracylu oraz 5-fluorouracylu. Do tego połączenia wykorzystałem reakcję cykloaddycji azydkowo-alkinowej (tzw. chemia *click*).

Grupa II (związki **9–20**) to hybrydy kofeiny z pochodnymi stilbenu. Pochodne różnią się długością węglowego łańcucha alifatycznego ($n = 3, 4$ lub 6 atomów węgla) oraz obecnością różnych podstawników elektroakceptorowych ($-Cl$, $-NO_2$) w pierścieniu stilbenowym.

Grupę III (związki **21–28**) stanowią pochodne azolowe i benzazolowe kofeiny (połączone z imidazolami, tiazolami, triazolami). W ramach tej grupy wyizolowałem również produkt uboczny, dimer, w którym cząsteczki kofeiny połączone są atomem siarki.

Grupa IV (związki **29–45**) to grupa koniugatów, w której kofeina została połączona bezpośrednio z pierścieniem pirazolowym posiadającym różnorodne podstawniki elektronodonorowe i elektroakceptorowe.

Wszystkie otrzymane związki scharakteryzowałem spektralnie za pomocą spektroskopii jądrowego rezonansu magnetycznego ^1H NMR i ^{13}C NMR, spektroskopii w podczerwieni FT-IR oraz spektrometrii mas EI/ESI-MS. We współpracy z Zakładem Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu ustalono struktury krystalograficzne dwóch pochodnych **37** i **41A**. Przeprowadzona analiza strukturalna potwierdziła obecność różnic w upakowaniu kryształów obu pochodnych.

Otrzymane związki poddałem również badaniom *in silico* za pomocą oprogramowania SwissADME. Analizy te wykazały korzystny profil farmakokinetyczny dla większości otrzymanych związków. Prawie wszystkie pochodne z grup II, III i IV spełniają regułę Lipińskiego.

We współpracy z ośrodkami krajowymi i zagranicznymi dokonano oceny potencjału biologicznego otrzymanych związków. Związki, które otrzymałem, poddano badaniom w zakresie ich aktywności biologicznej:

- hemolitycznej i cytoprotekcyjnej – (Zakład Biologii Komórki, Wydział Biologii, UAM) – związki grup I, III i IV
- przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej – (Katedra Gleboznawstwa i Mikrobiologii Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii UP) - związki grup I i III
- inhibicji enzymów oraz cytotoksyczności – (Wydział Chemii, Uniwersytet Van Yüzüncü Yıl w Van, Turcja) - związki grup II i IV.

Badania aktywności hemolitycznej i cytoprotekcyjnej zostały przeprowadzone w odniesieniu do erytrocytów ludzkich. Zdecydowana większość koniugatów jest wysoce hemokompatybilna i nie uszkadza błon komórkowych. Największą aktywnością hemolityczną – przekraczającą dopuszczalną granicę hemolizy – charakteryzują się związki z grupy III. Stwierdzono, że obecność atomu siarki w pierścieniu azolowym lub obecność grupy N-metylowej może sprzyjać hydrofobowym interakcjom z błoną erytrocytów. Wyniki testów z AAPH wskazują, że większość z przeanalizowanych związków odznacza się niską aktywnością cytoprotekcyjną. Najwyższą aktywność cytoprotekcyjną wykazała pochodna pirazolowa kofeiny (**35**) (ochrona na poziomie 72,62%), dorównując standardowi Troloxu (72,33%). Wysoką aktywnością charakteryzuje się również związek **41** (63,44%). Analizując zależność aktywności od struktury, zauważamy, że obecność grup elektroakceptorowych lub fragmentów struktury bogatych w elektrony, ułatwiających delokalizację rodnika (wiązanie potrójne w związku **35**, pierścień tiofenu w związku **41**), znacząco zwiększa potencjał antyoksydacyjny.

Związki przebadane pod kątem potencjału przeciwbakteryjnego i przeciwgrzybicznego wykazywały zróżnicowaną aktywność. Choć żaden z nich nie okazał się skuteczny wobec badanych szczepów bakterii, największy odsetek związków wykazał aktywność wobec *Botrytis cinerea*, patogenu powodującego szarą pleśń. Najbardziej aktywna była pochodna **26**, której strefa zahamowania wzrostu grzybni osiągała 20 mm. Związki z grupy I skutecznie hamowały rozwój *Fusarium culmorum*, będącego przyczyną fuzariozy upraw. Natomiast pochodne grupy III wykazały umiarkowany potencjał wobec *Trichodermy atroviride*.

Analiza związków z grup II i IV pod kątem aktywności inhibicyjnej wobec acetylocholinoesterazy (AChE) oraz α -glukozydazy (α -Glu) wykazała, że większość pochodnych z ugrupowaniem stilbenowym charakteryzuje się wyższą skutecznością działania

wobec AChE w porównaniu ze związkiem referencyjnym. Najlepszymi inhibitorami AChE okazały się koniugaty o krótkim łańcuchu węglowym ($n=3$) zawierające grupy elektroakceptorowe. Najbardziej aktywny związek (**16**) osiągnął IC_{50} na poziomie zaledwie $1,665 \mu M$, co czyni go znacznie skuteczniejszym niż lek referencyjny (DNP, $IC_{50} = 2,484 \mu M$). Wśród pochodnych grupy IV najwyższą aktywność zarejestrowano dla związku **36** ($IC_{50} = 2,193 \pm 0,145$).

W odniesieniu do aktywności względem α -glukozydazy, najskuteczniejszym związkiem jest pochodna charakteryzująca się najdłuższym łańcuchem alkilowym (**20**), dla której wartość IC_{50} wynosi $1,582 \pm 0,832$. Wartość ta jest porównywalna z wartością uzyskaną dla leku referencyjnego – akarbozy ($IC_{50} = 1,612 \mu M$).

Otrzymane hybrydy zbadano pod kątem hamowania namnażania komórek nowotworowych glejaka mózgu (linia U87) oraz gruczolakoraka jelita grubego (linia HT29) w przedziałach czasowych 24 i 48 godzin.

Dla nowotworu glejaka najskuteczniejszą okazała się pochodna pirazolowa **36**, charakteryzująca się wartościami IC_{50} wynoszącymi $15,22 \mu M$ po 24 godzinach oraz $17,11 \mu M$ po 48 godzinach, co stanowi wynik wyższy niż uzyskany dla 5-fluorouracylu ($IC_{50} = 40,05 \mu M$).

W przypadku nowotworu jelita grubego największą aktywność wykazał związek **16** (hybryda stilbenowa), dla którego po 48 godzinach ekspozycji wartość IC_{50} spadła do $25,63 \mu M$, osiągając wartość zbliżoną do wartości leku referencyjnego, tj. 5-fluorouracylu.

Powyższe różnice wskazują na możliwość skutecznego profilowania pochodnych pirazolowych w celach terapeutycznych wobec nowotworów glejaka mózgu, natomiast pochodne stilbenowe mogą być ukierunkowane na nowotwory jelita grubego.

6. Streszczenie pracy

6.1 Streszczenie w języku polskim

W wyniku przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej syntez otrzymałem 45 nowych pochodnych kofeiny, które powstały poprzez połączenie jej cząsteczki z innymi układami o udokumentowanej aktywności biologicznej: pochodnymi uracylu, stilbenami, imidazolami oraz pirazolami. W procesie syntezy wykorzystałem głównie reakcje substytucji nukleofilowej oraz 1,3-dipolarną cykloaddycję Huisgena. Zsyntezowane związki podzieliłem na cztery grupy zróżnicowane pod względem strukturalnym. Budowę chemiczną otrzymanych pochodnych potwierdziłem metodami spektroskopowymi, w tym spektroskopią w podczerwieni (FT-IR), spektrometrią mas (EI/ESI-MS) oraz magnetycznym rezonansem jądrowym (^1H NMR i ^{13}C NMR).

Nowe hybrydy poddano szerokim testom biologicznym, oceniając m.in. aktywność hemolityczną, cytoprotekcyjną (w ochronie przed wolnymi rodnikami generowanymi przez związek AAPH) oraz zdolność do chelatowania jonów metali. Przebadano również działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze pochodnych, ich zdolność do inhibicji enzymów (acetylocholinoesterazy i alfa-glukozydazy) oraz cytotoksyczność wobec linii komórkowych nowotworów U87 i HT29. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoce zróżnicowaną i obiecującą aktywność otrzymanych koniugatów. Niektóre związki wykazały zdolność do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Najlepszy rezultat uzyskano dla pochodnej **35** ($72,62\% \pm 1,89$), charakteryzującej się aktywnością porównywalną z aktywnością związku referencyjnego. Wyjątkową skuteczność w hamowaniu rozwoju patogenu środowiskowego *Botrytis cinerea* odnotowano dla związku **26**. Otrzymane związki, zwłaszcza pochodne stilbenowe, a szczególnie związek **16**, wykazują wysoką zdolność inhibicji enzymu AChE ($\text{IC}_{50} = 1,665 \pm 0,495$). Jest to wyższa skuteczność niż w przypadku związku referencyjnego. Pochodna **36** wykazała wyższy potencjał antyproliferacyjny względem komórek nowotworowych linii U87 niż związek wzorcowy (co potwierdzono zarówno po 24-godzinnej, jak i 48-godzinnej ekspozycji).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że kofeina stanowi dobry związek wyjściowy do projektowania i syntezy nowych pochodnych o szerokim spektrum aktywności biologicznej.

6.2 Streszczenie w języku angielskim

As part of my doctoral dissertation, I synthesized 45 new caffeine derivatives by combining the caffeine molecule with other compounds of documented biological activity: uracil derivatives, stilbenes, imidazoles, and pyrazoles. In the synthesis process, I primarily used nucleophilic substitution reactions and the 1,3-dipolar Huisgen cycloaddition. I divided the synthesized compounds into four structurally distinct groups. I confirmed the chemical structures of the obtained derivatives using spectroscopic methods, including Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR).

The new hybrids underwent extensive biological testing, including assessments of hemolytic and cytoprotective activity (protection against free radicals generated by AAPH) and metal-ion chelation. The antibacterial and antifungal activities of the derivatives were also examined, along with their ability to inhibit enzymes (acetylcholinesterase and alpha-glucosidase) and their cytotoxicity against the U87 and HT29 cancer cell lines. The results confirm the highly diverse and promising activity of the obtained conjugates. Some compounds demonstrated the ability to protect cells against oxidative stress. The best result was obtained for compound **35** ($72.62\% \pm 1.89$), which exhibited activity comparable to that of the reference compound. Compound **26** exhibited exceptional efficacy in inhibiting the growth of the environmental pathogen *Botrytis cinerea*. The compounds obtained, especially the stilbene derivatives, and in particular compound **16**, exhibit a high ability to inhibit the AChE enzyme ($\text{IC}_{50} = 1.665 \pm 0.495$). This efficacy is higher than that of the reference compound. Derivative **36** showed greater antiproliferative activity against U87 cancer cells than the reference compound, as confirmed at both 24 and 48 hours.

The results confirm that caffeine is a good starting compound for designing and synthesizing new derivatives with versatile biological activity.

7. Literatura

- [1] Karoli, T., Mamidyala, S. K., Zuegg, J., Fry, S. R., Tee, E. H. L., Bradford, T. A., Madala, P. K., Huang, J. X., Ramu, S., Butler, M. S., & Cooper, M. A. (2012). Structure aided design of chimeric antibiotics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22, 2428–2433. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.02.019>
- [2] Alkhzem, A. H., Woodman, T. J., & Blagbrough, I. S. (2022). Design and synthesis of hybrid compounds as novel drugs and medicines. *RSC Advances*, 12, 19470–19484. <https://doi.org/10.1039/d2ra03281c>
- [3]. Tamaddon-Abibigloo, Y., Dastmalchi, S., Razzaghi-Asl, N., & Shahbazi Mojarrad, J. (2024). Design, synthesis, in vitro and in silico evaluations of new isatin-triazine-aniline hybrids as potent anti- Alzheimer multi-target directed lead compounds. *Bioorganic Chemistry*, 147, 107355. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107355>
- [4] Laamari, Y., Fawzi, M., Oubella, A., Alotaibi, S. H., Alotaibi, F. M., Rohand, T., van Meervelt, L., Morjani, H., Ait Itto, M. Y., & Auhmani, A. (2025). Semisynthesis of novel chalcone hybrid compounds linked by 1,2,3-triazole and evaluation of their cytotoxic effects. *Journal of Molecular Structure*, 1319, 139648. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.139648>
- [5] Ravindar, L., Hasbullah, S. A., Rakesh, K. P., & Hassan, N. I. (2023). Triazole hybrid compounds: A new frontier in malaria treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 259, 115694. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115694>
- [6] Korkmaz, A., & Bursal, E. (2025). Synthesis, characterization, biological evaluation, ADMET, and molecular docking studies of novel chalcone-sulfonate hybrid compounds as potential antioxidant and antiobesity activities. *Journal of Molecular Structure*, 1332, 141638. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2025.141638>
- [7] Cherfi, M., Harit, T., Dib, I., Yahyaoui, M. I., Asehraou, A., Yahyi, A., Ziyyat, A., & Malek, F. (2023). Pyrazole-tetrazole hybrid compounds: Synthesis, characterization and their biological activities. *Chemical Data Collections*, 45, 101026. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2023.101026>
- [8] Stefanello, N., Spanevello, R. M., Passamonti, S., Porciúncula, L., Bonan, C. D., Olabiyi, A. A., Teixeira da Rocha, J. B., Assmann, C. E., Morsch, V. M., & Schetinger, M. R. C. (2019). Coffee, caffeine, chlorogenic acid, and the purinergic system. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 298–313. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005>
- [9] BA Weinberg, BK Bealer: The world of caffeine. New York & London: Routledge, 2001. [ISBN 0-415-92722-6](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.005).

- [10] Kaplánek, R., Jakubek, M., Rak, J., Kejík, Z., Havlík, M., Dolenský, B., Frydrych, I., Hajdúch, M., Kolář, M., Bogdanová, K., Králová, J., Džubák, P., & Král, V. (2015). Caffeine-hydrazones as anticancer agents with pronounced selectivity toward T-lymphoblastic leukaemia cells. *Bioorganic Chemistry*, 60, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.03.003>
- [11] Strydom, B., Malan, S. F., Castagnoli, N., Bergh, J. J., & Petzer, J. P. (2010). Inhibition of monoamine oxidase by 8-benzoyloxycaffeine analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18, 1018–1028. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.12.064>
- [12] Do, H. Q., & Daugulis, O. (2010). Copper-catalyzed cyanation of heterocycle carbon-hydrogen bonds. *Organic Letters*, 12, 2517–2519. <https://doi.org/10.1021/ol100772u>
- [13] Soltani Rad, M. N., Behrouz, S., & Nekoei, A. R. (2012). 8-Bromocaffeine (8-BC): A new versatile reagent for conversion of aldoximes into nitriles. *Synlett*, 23, 1191–1198. <https://doi.org/10.1055/s-0031-129036>
- [14] Arsenyan, P., Vasiljeva, J., Domracheva, I., & Kanepe-Lapsa, I. (2020). 8-Ethynylxanthines as promising antiproliferative agents, angiogenesis inhibitors, and calcium channel activity modulators. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 56, 776–785. <https://doi.org/10.1007/s10593-020-02730-4>
- [15] Constantin, T., Zanini, M., Regni, A., Sheikh, N. S., Juliá, F., & Leonori, D. (2020). Aminoalkyl radicals as halogen-atom transfer agents for activation of alkyl and aryl halides. *Science*, 367, 1021–1026. <https://doi.org/10.1126/science.aba2419>
- [16] Mosrin, M., & Knochel, P. (2009). TMPZnCl.LiCl: A new active selective base for the directed zincation of sensitive aromatics and heteroaromatics. *Organic Letters*, 11, 1837–1840. <https://doi.org/10.1021/ol900342a>
- [17] Do, H. Q., Khan, R. M. K., & Daugulis, O. (2008). A general method for copper-catalyzed arylation of arene C-H bonds. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 15185–15192. <https://doi.org/10.1021/ja805688p>
- [18] Shi, Y., Wang, Z., Cheng, Y., Lan, J., She, Z., & You, J. (2015). Oxygen as an oxidant in palladium/copper-cocatalyzed oxidative C-H/C-H cross-coupling between two heteroarenes. *Science China Chemistry*, 58, 1292–1296. <https://doi.org/10.1007/s11426-015-5386-x>
- [19] Malakar, C. C., Schmidt, D., Conrad, J., & Beifuss, U. (2011). Double C-H activation: The palladium-catalyzed direct C-arylation of xanthines with arenes. *Organic Letters*, 13, 1378–1381. <https://doi.org/10.1021/ol200065s>
- [20] Xi, P., Yang, F., Qin, S., Zhao, D., Lan, J., Gao, G., Hu, C., & You, J. (2010). Palladium(II)-catalyzed oxidative C-H/C-H cross-coupling of heteroarenes. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 1822–1824. <https://doi.org/10.1021/ja909807f>
- [21] Zhao, D., Wang, W., Lian, S., Yang, F., Lan, J., & You, J. (2009). Phosphine-free, palladium-catalyzed arylation of heterocycles through C-H bond activation with pivalic acid as

- a cocatalyst. *Chemistry - A European Journal*, 15, 1337–1340. <https://doi.org/10.1002/chem.200802001>
- [22] Do, H. Q., & Daugulis, O. (2007). Copper-catalyzed arylation of heterocycle C-H bonds. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 12404–12405. <https://doi.org/10.1021/ja075802+>
- [23] Nakao, Y., Kanyiva, K. S., Oda, S., & Hiyama, T. (2006). Hydroheteroarylation of alkynes under mild nickel catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 8146–8147. <https://doi.org/10.1021/ja0623459>
- [24] Ryu, J., Cho, S. H., & Chang, S. (2012). A versatile rhodium(I) catalyst system for the addition of heteroarenes to both alkenes and alkynes by a C-H bond activation. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51, 3677–3681. <https://doi.org/10.1002/anie.201200120>
- [25] Huang, Y., Song, F., Wang, Z., Xi, P., Wu, N., Wang, Z., Lan, J., & You, J. (2012). Dehydrogenative Heck coupling of biologically relevant N-heteroarenes with alkenes: Discovery of fluorescent core frameworks. *Chemical Communications*, 48, 2864–2866. <https://doi.org/10.1039/c2cc17557f>
- [26] Shyamlal, B. R. K., Mathur, M., Yadav, D. K., & Chaudhary, S. (2020). Microwave-assisted modified synthesis of C8-analogues of naturally occurring methylxanthines: Synthesis, biological evaluation and their practical applications. *Fitoterapia*, 143. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104533>
- [27] Kumar, K., Kumar Shyamlal, B. R., Verma, R., Kondaiah, P., & Chaudhary, S. (2020). Reduction-Triggered Doxorubicin Delivery by Self-Assembled Nanospheres of Lipoylated Caffeine. *ChemMedChem*, 15, 733–737. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000070>
- [28] Fennewald, J. C., & Lipshutz, B. H. (2014). Trifluoromethylation of heterocycles in water at room temperature. *Green Chemistry*, 16, 1097–1100. <https://doi.org/10.1039/c3gc42119h>
- [29] Ghosh, I., Khamrai, J., Savateev, A., Shlapakov, N., Antonietti, M., & König, B. (2019). Organic semiconductor photocatalyst can bifunctionalize arenes and heteroarenes. *Science*, 365, 360–366. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3254>
- [30] Kumar, K., Kumar Shyamlal, B. R., Verma, R., Kondaiah, P., & Chaudhary, S. (2020). Reduction-Triggered Doxorubicin Delivery by Self-Assembled Nanospheres of Lipoylated Caffeine. *ChemMedChem*, 15, 733–737. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000070>
- [31] Jasiewicz, B., Sierakowska, A., Wandyszewska, N., Warżajtis, B., Rychlewska, U., Wawrzyniak, R., & Mrówczyńska, L. (2016). Antioxidant properties of thio-caffeine derivatives: Identification of the newly synthesized 8-[(pyrrolidin-1-ylcarbonothioyl)sulfanyl]caffeine as antioxidant and highly potent cytoprotective agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3994–3998. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.091>

- [32] Rico-Gómez, R., Nájera, F., Manuel López-Romero, J., & Cañada-Rudner, P. (2000). Solvent-free synthesis of thio-alkylxanthines from alkylxanthines using microwave irradiation. *Heterocycles*, 53. <https://doi.org/10.3987/com-00-9003>
- [33] Martins, I. L., Miranda, J. P., Oliveira, N. G., Fernandes, A. S., Gonçalves, S., & Antunes, A. M. M. (2013). Synthesis and biological activity of 6-selenocaffeine: Potential modulator of chemotherapeutic drugs in breast cancer cells. *Molecules*, 18, 5251–5264. <https://doi.org/10.3390/molecules18055251>
- [34] Luo, F. T., & Lo, H. K. (2011). Short synthesis of bis-NHC-Pd catalyst derived from caffeine and its applications to Suzuki, Heck, and Sonogashira reactions in aqueous solution. *Journal of Organometallic Chemistry*, 696, 1262–1265. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.11.002>
- [35] Yambulatov, D. S., Nikolaevskii, S. A., Lutsenko, I. A., Kiskin, M. A., Shmelev, M. A., Bekker, O. B., Efimov, N. N., Ugolkova, E. A., Minin, V. v., Sidorov, A. A., & Eremenko, I. L. (2020). Copper(II) Trimethylacetate Complex with Caffeine: Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Russian Journal of Coordination Chemistry/Koordinatsionnaya Khimiya*, 46, 772–778. <https://doi.org/10.1134/S1070328420110093>
- [36] Zhang, J., Rahman, M. M., Zhao, Q., Feliciano, J., Bisz, E., Dziuk, B., Lalancette, R., Szostak, R., & Szostak, M. (2022). N-Heterocyclic Carbene Complexes of Nickel(II) from Caffeine and Theophylline: Sustainable Alternative to Imidazol-2-ylidenes. *Organometallics*, 41, 1806–1815. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.2c00019>
- [37] Fisone, G., Borgkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61, 857–872. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3269-3>
- [38] Kwaśniewska-Sip, P., Cofta, G., & Nowak, P. B. (2018). Resistance of fungal growth on Scots pine treated with caffeine. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 132, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.03.007>
- [39] Kadi, A., El-Tahir A, K.E.H.; Jahng, Y.; Motiur Rahman, A.F.M.S. Synthesis, Biological Evaluation and Structure Activity Relationships (SARs) Study of 8-(Substituted)Aryloxycaffeine. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, 12, 2356–2364
- [40] Turati, F., Galeone, C., Edefonti, V., Ferraroni, M., Lagiou, P., La Vecchia, C., Tavani, A. (2012) A Meta-Analysis of Coffee Consumption and Pancreatic Cancer. *Annals of Oncology*. 23, 311–318. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr331>
- [41] Vieira, A. J. S. C., Gaspar, E. M., & Santos, P. M. P. (2020). Mechanisms of potential antioxidant activity of caffeine. *Radiation Physics and Chemistry*, 170, 108968. [10.1016/j.radphyschem.2020.108968](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.108968)

- [42] Woźniak, M., Gromadzka, K., Kwaśniewska-Sip, P., Cofta, G., & Ratajczak, I. (2022). Chitosan–caffeine formulation as an ecological preservative in wood protection. *Wood Science and Technology*, 56, 1851–1867. <https://doi.org/10.1007/s00226-022-01426-6>
- [43] Wang, Y. C., Qian, W. J., Li, N. N., Hao, X. Y., Wang, L., Xiao, B., Wang, X. C., & Yang, Y. J. (2016). Metabolic Changes of Caffeine in Tea Plant (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) as Defense Response to *Colletotrichum fructicola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 6685–6693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02044>
- [44] Mirón-Mérida, V. A., Yáñez-Fernández, J., Montañez-Barragán, B., & Barragán Huerta, B. E. (2019). Valorization of coffee parchment waste (*Coffea arabica*) as a source of caffeine and phenolic compounds in antifungal gellan gum films. *LWT*, 101, 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.013>
- [45] Andrs, M., Muthna, D., Rezacova, M., Seifrtova, M., Siman, P., Korabecny, J., Benek, O., Dolezal, R., Soukup, O., Jun, D., & Kuca, K. (2016). Novel caffeine derivatives with antiproliferative activity. *RSC Advances*, 6, 32534–32539. <https://doi.org/10.1039/c5ra22889a>
- [46] Jasiewicz, B., Sierakowska, A., Jankowski, W., Hoffmann, M., Piorońska, W., Górnicka, A., Bielawska, A., Bielawski, K., & Mrówczyńska, L. (2018). Antioxidant and cytotoxic activity of new di- and polyamine caffeine analogues. *Free Radical Research*, 52, 724–736. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1467561>
- [47] David Osarieme, E., Modupe, D. T., & Oluchukwu, O. P. (2019). The Anticancer Activity of Caffeine - A Review. *Archives of Clinical and Biomedical Research*, 3, 326–342. <https://doi.org/10.26502/acbr.50170077>
- [48] da Silva Costa, J., da Silva Lopes Costa, K., Cruz, J. V., da Silva Ramos, R., Silva, L. B., do Socorro Barros Brasil, D., de Paula da Silva, C. H. T., dos Santos, C. B. R., & da Cruz Macedo, W. J. (2018). Virtual Screening and Statistical Analysis in the Design of New Caffeine Analogues Molecules with Potential Epithelial Anticancer Activity. *Current Pharmaceutical Design*, 24, 576–594. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170711112510>
- [49] Hu, G. L., Wang, X., Zhang, L., & Qiu, M. H. (2019). The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. *Food and Function*, 10, 3113–3126. <https://doi.org/10.1039/c9fo00288j>
- [50] Chakraborty, P., Dastidar, D. G., Paul, P., Dutta, S., Basu, D., Sharma, S. R., Basu, S., Sarker, R. K., Sen, A., Sarkar, A., & Tribedi, P. (2020). Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by caffeine: a potential approach for sustainable management of biofilm. *Archives of Microbiology*, 202, 623–635. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01775-0>

- [51] Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-derivatives small molecules with antibacterial activity. *Antibiotics*, 10, 1–19. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030231>
- [52] Almeida, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A., & Glória, M. B. A. (2006). Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8738–8743. <https://doi.org/10.1021/jf0617317>
- [53] Fata F., Chittivelu S., Tessler S., Kupfer Y. (1996) Gas gangrene of the arm due to *Enterobacter cloacae* in a neutropenic patient. *Southern Medical Journal*, 89, 1095-6. <https://doi.org/10.1097/00007611-199611000-00014>
- [54] Kascatan-Nebioglu, A., Melaiye, A., Hindi, K., Durmus, S., Panzner, M. J., Hogue, L. A., Mallett, R. J., Hovis, C. E., Coughenour, M., Crosby, S. D., Milsted, A., Ely, D. L., Tessier, C. A., Cannon, C. L., & Youngs, W. J. (2006). Synthesis from caffeine of a mixed N-heterocyclic carbene-silver acetate complex active against resistant respiratory pathogens. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6811–6818. <https://doi.org/10.1021/jm060711t>
- [55] Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry*, 104, 1258–1268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.074>
- [56] León-Carmona, J. R., & Galano, A. (2011). Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *Journal of Physical Chemistry B*, 115, 4538–4546. <https://doi.org/10.1021/jp201383y>
- [57] Devasagayam TP., Kamat JP., Mohan H., Kesavan PC. (1996) Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1282, 63-70. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(96\)00040-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(96)00040-5)
- [58] Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, 124, 863–868. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008>
- [59] Nakagawa, T., Yokozawa, T., Terasawa, K., Shu, S., & Juneja, L. R. (2002). Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2418–2422. <https://doi.org/10.1021/jf011339n>
- [60] Sierakowska, A., Jasiewicz, B., Piosik, Ł., & Mrówczyńska, L. (2023). New C8-substituted caffeine derivatives as promising antioxidants and cytoprotective agents in human erythrocytes. *Scientific Reports*, 13, 1785. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27205-8>

- [61] Petzer, A., Pienaar, A., & Petzer, J. P. (2013). The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life Sciences*, 93, 283–287. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.06.020>
- [62] Yacoubian, T. A., & Standaert, D. G. (2009). Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1792, 676–687. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.09.009>
- [63] Erukainure, O. L., Oyebode, O. A., Sokhela, M. K., Koorbanally, N. A., & Islam, M. S. (2017). Caffeine-rich infusion from *Cola nitida* (kola nut) inhibits major carbohydrate catabolic enzymes; abates redox imbalance; and modulates oxidative dysregulated metabolic pathways and metabolites in Fe²⁺-induced hepatic toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 96, 1065–1074. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.120>
- [64] Liu, S., Ai, Z., Qu, F., Chen, Y., & Ni, D. (2017). Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake. *Food Chemistry*, 234, 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.151>
- [65] Muriel, P., & Arauz, J. (2010). Coffee and liver diseases. *Fitoterapia*, 81, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.10.003>
- [66] Pohanka, M., & Dobes, P. (2013). Caffeine inhibits acetylcholinesterase, but not butyrylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 9873–9882. <https://doi.org/10.3390/ijms14059873>
- [67] Pałasz, A., & Ciez, D. (2015). In search of uracil derivatives as bioactive agents. Uracils and fused uracils: Synthesis, biological activity and applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 582–611. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.008>
- [68] DeVita, V. T., Jr., Lawrence, T. S., & Rosenberg, S. A. (2019). DeVita, hellman, and Rosenberg's cancer: principles and practice of oncology, 11e. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business.
<https://oncology.lwwhealthlibrary.com/book.aspx?bookid=2549&sectionid=0>
- [69] Diasio RB., Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. (1989) *Clinical Pharmacokinetics*, 16, 215-37. <https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002>
- [70] De Clercq, E., Sakuma, T., Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Rosenberg, I., & Holý, A. (1987). Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines. *Antiviral Research*, 8, 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(87\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(87)80004-9)
- [71] Sułkowska, A. (2002). Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 614, 227-232. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00256-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00256-9)

- [72] El-Naggar, A. M., Abou-El-Regal, M. M., El-Metwally, S. A., Sherbiny, F. F., & Eissa, I. H. (2017). Synthesis, characterization and molecular docking studies of thiouracil derivatives as potent thymidylate synthase inhibitors and potential anticancer agents. *Molecular Diversity*, 21, 967–983. <https://doi.org/10.1007/s11030-017-9776-1>
- [73] Abu-Hashem, A. A., & Youssef, M. M. (2011). Synthesis of new visnagen and khellin furochromone pyrimidine derivatives and their anti-inflammatory and analgesic activity. *Molecules*, 16, 1956–1972. <https://doi.org/10.3390/molecules16031956>
- [74] Abu-Hashem, A. A., Youssef, M. M., & Hussein, H. A. R. (2011). Synthesis, antioxidant, antitumor activities of some new thiazolopyrimidines, pyrrolothiazolopyrimidines and triazolopyrrolothiazolopyrimidines derivatives. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58, 41–48. <https://doi.org/10.1002/jccs.201190056>
- [75] Fukushima, M., Suzuki, N., Emura, T., Yano, S., Kazuno, H., Tada, Y., Yamada, Y., & Asao, T. (2000). Structure and Activity of Specific Inhibitors of Thymidine Phosphorylase to Potentiate the Function of Antitumor 2-Deoxyribonucleosides. *Biochemical Pharmacology*, 59, 1227–36. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00253-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00253-7)
- [76] Lewandowska, M., Ruszkowski, P., Baraniak, D., Czarnecka, A., Kleczewska, N., & Celewicz, L. (2013). Synthesis of 3'-azido-2',3'-dideoxy-5-fluorouridine phosphoramidates and evaluation of their anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 67, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.06.047>
- [77] Wigerinck, P., Pannecouque, C., Snoeck, R., Claes, P., De Clercq, E., & Herdewijn, P. (1991). 5-(5-Bromothien-2-yl)-2'-deoxyuridine and 5-(5-chlorothien-2-yl)-2'-deoxyuridine are equipotent to (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in the inhibition of herpes simplex virus type I replication. *Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 2383–2389. <https://doi.org/10.1021/jm00112a011>
- [78] Kumar, K., Sagar, S., Esau, L., Kaur, M., & Kumar, V. (2012). Synthesis of novel 1H-1,2,3-triazole tethered C-5 substituted uracil-isatin conjugates and their cytotoxic evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.10.008>
- [79] Cabrera, C., Artacho, R., & Giménez, R. (2006). Beneficial Effects of Green Tea—A Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 25, 79–99. <https://doi.org/10.1080/07315724.2006.10719518>
- [80] Akinwumi, B. C., Bordun, K. A. M., & Anderson, H. D. (2018). Biological activities of stilbenoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 792. <https://doi.org/10.3390/ijms19030792>

- [81] Gülçin, I. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure-activity insight. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 210–218. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.07.002>
- [82] Neves, A. R., Lúcio, M., Lima, J. L. C., & Reis, S. (2012). Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 1663–81. <https://doi.org/10.2174/092986712799945085>
- [83] Rimando, A. M., Kalt, W., Magee, J. B., Dewey, J., & Ballington, J. R. (2004). Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in Vaccinium berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4713–4719. <https://doi.org/10.1021/jf040095e>
- [84] Srivastava, V., & Lee, H. (2015). Synthesis and bio-evaluation of novel quinolino-stilbene derivatives as potential anticancer agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23, 7629–7640. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.11.007>
- [85] Piekus-Słomka, N., Mikstacka, R., Ronowicz, J., & Sobiak, S. (2019). Hybrid cis-stilbene molecules: Novel anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1300. <https://doi.org/10.3390/ijms20061300>
- [86] de Luca, L. (2006). Naturally Occurring and Synthetic Imidazoles: Their Chemistry and Their Biological Activities. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 1–23. <https://doi.org/10.2174/092986706775197971>
- [87] Ardiansah, B. (2017). Recent reports on pyrazole-based bioactive compounds as candidate for anticancer agents. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10, 45–51. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i12.22065>
- [88] Faria, J. V., Vegi, P. F., Miguita, A. G. C., dos Santos, M. S., Boechat, N., & Bernardino, A. M. R. (2017). Recently reported biological activities of pyrazole compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 25, 5891–5903. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.035>
- [89] Kuthyala, S., Sheikh, S., Prabhu, A., Rekha, P. D., Karikannar, N. G., & Shankar, M. K. (2020). Synthesis, Characterization, and Anticancer Studies of Some Pyrazole-Based Hybrid Heteroatomics. *ChemistrySelect*, 5, 10827–10834. <https://doi.org/10.1002/slct.202002483>
- [90] Antolini, M., Bozzoli, A., Ghiron, C., Kennedy, G., Rossi, T., & Ursini, A. (1999). Analogues of 4,5-bis(3,5-Dichlorophenyl)-2-Trifluoromethyl-1H-Imidazole as Potential Antibacterial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 1023–28. [https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(99\)00112-2](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(99)00112-2)

- [91] Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition*, 40, 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5)
- [92] Moses, J. E., & Moorhouse, A. D. (2007). The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36, 1249–1262. <https://doi.org/10.1039/b613014n>
- [93] Hartmuth, C., Kolb, K., Sharpless, B. (2003). The growing impact of click chemistry on drug discovery, *Drug Discovery Today*, 8, 1128-1137. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02933-7](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02933-7).
- [94] Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwhe, S. (2012). The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20, 5678–5698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>
- [95] Aher, N. G., Pore, V. S., Mishra, N. N., Kumar, A., Shukla, P. K., Sharma, A., & Bhat, M. K. (2009). Synthesis and antifungal activity of 1,2,3-triazole containing fluconazole analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 759–763. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.12.026>
- [96] Zonios, D. I., & Bennett, J. E. (2008). Update on azole antifungals. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 29, 198–210. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1063858>
- [97] Patil, S.A., Patil, R., Miller, D.D. (2012). Indole molecules as inhibitors of tubulin polymerization: potential new anticancer agents, *Future Medicinal Chemistry* 4, 2085-115. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.141>
- [98] Hussaini, S. M. A., Yedla, P., Babu, K. S., Shaik, T. B., Chityal, G. K., & Kamal, A. (2016). Synthesis and biological evaluation of 1,2,3-triazole tethered pyrazoline and chalcone derivatives. *Chemical Biology & Drug Design*, 88, 97–109. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12738>
- [99] Wang, Y., Chen, S., Hu, G., Wang, J., Gou, W., Zuo, D., Gu, Y., Gong, P., & Zhai, X. (2018). Discovery of novel 2,4-diarylaminopyrimidine analogues as ALK and ROS1 dual inhibitors to overcome crizotinib-resistant mutants including G1202R. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.008>
- [100] Mernyak, E., Kovacs, I., Minorics, R., Sere, P., Czegany, D., Sinka, I., Wolfling, J., Schneider, G., Ujfaludi, Z., Doros, I., Ocsovszki, I., Varga, M., & Zupko, I. (2015). Synthesis of trans-16-triazolyl-13a-methyl-17-estradiol diastereomers and the effects of structural modifications on their in vitro antiproliferative activities. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 150, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.04.001>

- [101] Xu, Z., Zhao, S. J., & Liu, Y. (2019). 1,2,3-Triazole-containing hybrids as potential anticancer agents: Current developments, action mechanisms and structure-activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 183, 111700. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111700>
- [102] Zhang, S., Xu, Z., Gao, C., Ren, Q. C., Chang, L., Lv, Z. S., & Feng, L. S. (2017). Triazole derivatives and their anti-tubercular activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 138, 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.051>
- [103] Shaikh, M. H., Subhedar, D. D., Nawale, L., Sarkar, D., Khan, F. A. K., Sangshetti, J. A., & Shingate, B. B. (2015). 1,2,3-Triazole derivatives as antitubercular agents: Synthesis, biological evaluation and molecular docking study. *Medicinal Chemistry Communications*, 6, <https://doi.org/1104-1116>. [10.1039/c5md00057b](https://doi.org/10.1039/c5md00057b)
- [104] Kim, T. W., Yong, Y., Shin, S. Y., Jung, H., Park, K. H., Lee, Y. H., Lim, Y., & Jung, K.-Y. (2015). Synthesis and biological evaluation of phenyl-1H-1,2,3-triazole derivatives as anti-inflammatory agents. *Bioorganic Chemistry*, 59, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2015.01.003>
- [105] de Lourdes, M., Ferreira, G., Pinheiro, L. C. S., Santos-Filho, O. A., Pecanha, M. D. S., Sacramento, C. Q., Machado, V., Ferreira, V. F., Souza, T. M. L., & Boechat, N. (2014). Design, synthesis, and antiviral activity of new 1H-1,2,3-triazole nucleoside ribavirin analogs. *Medicinal Chemistry Research*, 23, 1501–1511. <https://doi.org/10.1007/s00044-013-0762-6>
- [106] Dubey, N., Sharma, M. C., Kumar, A., & Sharma, P. (2015). A click chemistry strategy to synthesize geraniol coupled 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles and exploration of their microbicidal and antioxidant potential with molecular docking profile. *Medicinal Chemistry Research*, 24, 2717–2731. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1329-5>
- [107] Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 205–214. <https://doi.org/10.1038/nrd1330>
- [108] de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, 5, 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- [109] Sies, H. (1997). Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82, 291–295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- [110] Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- [111] Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)

- [112] Finkel, T., Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 9, 239–47. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- [113] Galano, A. (2011). On the direct scavenging activity of melatonin towards hydroxyl and a series of peroxy radicals. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13, 7178–7188. <https://doi.org/10.1039/c0cp02801k>
- [114] Woudenberg, J. H. C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., de Vries, M., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J., & Crous, P. W. (2015). *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology*, 82, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>
- [115] Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- [116] Knutsen, A. P., Bush, R. K., Demain, J. G., Denning, D. W., Dixit, A., Fairs, A., Greenberger, P. A., Kariuki, B., Kita, H., Kurup, V. P., Moss, R. B., Niven, R. M., Pashley, C. H., Slavin, R. G., Vijay, H. M., & Wardlaw, A. J. (2012). Fungi and allergic lower respiratory tract diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.970>
- [117] van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & van Kan, J. A. L. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: An important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, 8, 41–54. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00367.x>
- [118] Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- [119] Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13, 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- [120] Parry, D. W., Jenkinson, P., & McLeod, L. (1995). Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals—a review. *Plant Pathology*, 44, 207–238. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02773.x>
- [121] Bottalico, A. (1998). Fusarium diseases of cereals: Species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80, 85–103.
- [122] Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611–24. <https://doi.org/10.1023/A:1020635214971>
- [123] Sharma, M.; Sharma, A.; Nuthakki, V. K.; Bhatt, S.; Nandi, U.; Bharate, S. B. (2022), Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship of Caffeine-based Triazoles as Dual

AChE and BACE-1 Inhibitors. *Drug Development Research*, 83, 1803–1821. <https://doi.org/10.1002/ddr.21998>.

[124] Yan, B.; Liu, L.; Huang, S.; Ren, Y.; Wang, H.; Yao, Z.; Li, L.; Chen, S.; Wang, X.; Zhang, Z. (2017). Discovery of a new class of highly potent necroptosis inhibitors targeting the mixed lineage kinase domain-like protein. *Chemical Communications* 53, 3637–3640. <https://doi.org/10.1039/c7cc00667e>

[125] Jorgensen, W.L. (2009). Efficient Drug Lead Discovery and Optimization. *Accounts of Chemical Research* 42, 724–733. <https://doi.org/10.1021/ar800236t>

[126] Zhang, M.; Wilkinson, B. (2007). Drug discovery beyond the ‘rule-of-five’, *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 478–488. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.005>

[127] Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. (2003). In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24, 121–131. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00445-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00445-3)

[128] Sæbø IP, Bjørås M, Franzyk H, Helgesen E, Booth JA. (2023). Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 24, 2914. <https://doi.org/10.3390/ijms24032914>

[129] Kostova, I.; Atanasov, P.Y. (2017), Antioxidant Properties of Pyrimidine and Uracil Derivatives. *Current Organic Chemistry* 21, 2020–2032. <https://doi.org/10.2174/1385272820666161025152154>

[130] Jasiewicz, B., Kozanecka-Okupnik, W., Przygodzki, M., Warzajtis, B., Rychlewska, U., Pospieszny, T., & Mrowczyńska, L. (2021). Synthesis, antioxidant and cytoprotective activity evaluation of C-3 substituted indole derivatives. *Scientific Reports*, 11, 15425. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94904-z>

[131] Rivara, S., Piersanti, G., Bartoccini, F., Diamantini, G., Pala, D., Riccioni, T., Stasi, M. A., Cabri, W., Borsini, F., Mor, M., Tarzia, G., & Minetti, P. (2013). Synthesis of (E)-8-(3-chlorostyryl)caffeine analogues leading to 9-deazaxanthine derivatives as dual A2A antagonists/MAO-B inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 1247–1261. <https://doi.org/10.1021/jm301686>

[132] Soltani Rad, M. N., Behrouz, S., Aghajani, S., Behrouz, M., Zarenezhad, E., & Ghanbariasad, A. (2023). Design, synthesis, anticancer and in silico assessment of 8-caffeinyltriazolylmethoxy hybrid conjugates. *RSC Advances*, 13, 3056–3070. <https://doi.org/10.1039/d2ra07683g>

[133] Soltani Rad, M. N., Behrouz, S., Charbaghi, M., Behrouz, M., Zarenezhad, E., & Ghanbariasad, A. (2024). Design, synthesis, anticancer and in silico assessment of 8-caffeinyltriazolylmethoxy hybrid conjugates. *RSC Advances*, 14, 26674. <https://doi.org/10.1039/d4ra04787g>

[134] Wyrzykiewicz, E.; Wendzonka, M. (2004), Synthesis and physicochemical characterization of fluorescent (E)-2-stilbenyloxyalkylthiouracils and isomer differentiation

using EIMS. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 41, 177-186. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570410207>

[135] Rosales Hernández, M., Olvera-Valdez, M., Velazquez Toledano, J., Mendieta Wejebe, J., Fragoso Morales, L., & Cruz, A. (2024). Exploring the benzazole derivatives as pharmacophores for AChE, BACE1, and as anti-A β aggregation to find multitarget compounds against Alzheimer's disease. *Molecules*, 29, 4780. <https://doi.org/10.3390/molecules29194780>

[136] Mavrova, A., Yancheva, D., Anastassova, N., Anichina, K., Zvezdanovic, J., Djordjevic, A., Markovic, D., & Smelcerovic, A. (2015). Synthesis, electronic properties, antioxidant and antibacterial activity of some new benzimidazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23, 6317–6326. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.029>

[137] Palabindela, R., Guda, R., Ramesh, G., Bodapati, R., Nukala, S. K., Myadaraveni, P., Ravi, G., & Kasula, M. (2023). Curcumin based pyrazole-thiazole hybrids as antiproliferative agents: Synthesis, pharmacokinetic, photophysical properties, and docking studies. *Journal of Molecular Structure*, 1275, 134633. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134633>

[138] Khan, S., Iqbal, S., Taha, M., Rahim, F., Shah, M., Ullah, H., Bahadur, A., Alrbyawi, H., Dera, A. A., Alahmdi, M. I., & Pashameah, R. A. (2022). Synthesis, in vitro biological evaluation and in silico molecular docking studies of indole based thiadiazole derivatives as dual inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Molecules*, 27, 7368. <https://doi.org/10.3390/molecules27217368>

[139] Bekhit, A. A., Nasralla, S. N., El-Agroudy, E. J., Hamouda, N., El-Fattah, A. A., Bekhit, S. A., Amagase, K., & Ibrahim, T. M. (2022). Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of promising pyrazole derivative. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168, 106080. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106080>

[140] Rocha, S., Silva, J., Silva, V. L. M., Silva, A. M. S., Corvo, M. L., Freitas, M., & Fernandes, E. (2024). Pyrazoles have a multifaceted anti-inflammatory effect targeting prostaglandin E2, cyclooxygenases and leukocytes' oxidative burst. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 172, 106599. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2024.106599>

[141] Barghady, N., Chalkha, M., Yamari, I., Aflak, N., Abchir, O., Chebbac, K., Nakkabi, A., Chtita, S., Chkirate, K., Mague, J. T., & Mabrouk, E. H. (2024). Synthesis, characterization, mechanistic study, in-vitro and in-silico evaluation of antibacterial and antioxidant activities of novel pyrazole-pyrazoline hybrid systems. *Journal of Molecular Structure*, 1309, 138087. <https://doi.org/10.1186/s13065-025-01386-5>

[142] Mortada, S., Karrouchi, K., Hamza, E. H., Oulmidi, A., Bhat, M. A., Mamad, H., Aalilou, Y., Radi, S., Ansar, M. H., Masrar, A., & Faouzi, M. E. (2024). Synthesis, structural characterizations, in vitro biological evaluation and computational investigations of pyrazole derivatives as potential antidiabetic and antioxidant agents. *Scientific Reports*, 14, 1312. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51290-6>

[143] Bennani, F.E., Doudach, L., Cherrah, Y., Ramli, Y., Karrouchi, K., Ansar, M.H., Faouzi, M.E.A. (2020). Overview of recent developments of pyrazole derivatives as an anticancer agent

in different cell line. *Bioorganic Chemistry*, 97, 103470. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103470>

[144] Alam, M.A. (2023). Pyrazole: An emerging privileged scaffold in drug discovery. *Future medicinal chemistry*, 15, 2011-2023. <https://doi.org/10.4155/fmc-2023-0207>

[145] Ebenezer, O., Shapi, M., Tuszyński, J.A. (2022). A Review of the Recent Development in the Synthesis and Biological Evaluations of Pyrazole Derivatives. *Biomedicines*, 10, 1124. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10051124>

[146] Ameziane El Hassani, I., Rouzi, K., Assila, H., Karrouchi, K., Ansar, M. (2023). Recent Advances in the Synthesis of Pyrazole Derivatives: A Review. *Reactions*, 4, 478–504. <https://doi.org/10.3390/reactions4030029>

[147] Ríos, M.C., Portilla, J. (2022). Recent advances in synthesis and properties of pyrazoles. *Chemistry*, 4, 940-968. <https://doi.org/10.3390/chemistry4030065>

[148] Secieru, A., O'Neill, P.M., Cristiano, M.L.S. (2020). Revisiting the Structure and Chemistry of 3(5)-Substituted Pyrazoles. *Molecules*, 25, 42. <https://doi.org/10.3390/molecules25010042>

[149] Wieczorkiewicz, P.A., Krygowski, T.M., Szatyłowicz, H. (2024). Substituent effects and electron delocalization in five-membered N-heterocycles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 26, 19398, <https://doi.org/10.1039/d4cp01709a>

[150] Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.-Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>

[151] Savjani, K.T., Gajjar, A.K., Savjani, J.K. (2012). Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmacology*, 2012, 195727. <https://doi.org/10.5402/2012/195727>

[152] Cetin, A., Oguz, E., Türkan, F., Babijczuk, K., Berdzik, N., Kurgan, C., & Jasiewicz, B. (2026). Multitarget Enzyme Inhibition and Anticancer Potential of 3-Substituted Indole Derivatives Supported by Molecular Docking Studies. *Biotechnology and Applied Biochemistry* <https://doi.org/10.1002/bab.70166>

[153] Bruno, I. J., Cole, J. C., Edgington, P. R., Kessler, M., Macrae, C. F., McCabe, P., Pearson, J., & Taylor, R. (2002). New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science*, 58, 389–397. <https://doi.org/10.1107/S0108768102003324>

[154] Bruker, SAINT, V8.41, Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA

[155] Sheldrick, G.M. (2015). SHELXT—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A: Foundations and Advances* 71, 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>

- [156] Sheldrick, G.M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. C Structural Chemistry* 71, 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>
- [157] Akyıldırım, O., Oguz, E., Aras, A., Cetin, A., Türkan, F., Bursal, E., Beytur, M., Medetalibeyoğlu, H., Yüksek, H. (2026). Novel 1, 2, 4-Triazole Derivatives: Synthesis, Structural Characterization, Antidiabetic, Anticholinergic and Phase II Detoxification Activities, Cytotoxic Evaluation, and Molecular Docking Studies. *Journal of Molecular Structure*, 1363, 145749. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2026.145749>
- [158] Beytur, M., Tarmaşır, E., Oguz, E., Bayrakdar, A., Sabancılar, İ., Akyıldırım, O., ... & Yüksek, H. (2026). 3-Substituted Triazolone–Benzoate Hybrids: Synthesis, Enzyme Inhibition, Anticancer Activity and ADMET Evaluation by Molecular Docking and Dynamics Studies. *Drug Development Research*, 87, e70222. <https://doi.org/10.1002/ddr.70222>
- [159] Cetin, A., Türkan, F., Oğuz, E., Rozbicki, P., Wolińska, E., & Branowska, D. (2026). Substituted bipyridine-based compounds: Synthesis, enzyme inhibition, anticancer activities and molecular docking studies. *Letters in Drug Design & Discovery*, 100269. <https://doi.org/10.1016/j.lidd.2025.100269>
- [160] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7, 88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- [161] Oguz, E., Tulek, G. S., Asadove, E., Cetin, A., & Türkan, F. (2025). Dual Inhibition of AChE and GST by 1, 2, 4-Triazine-3-Amine: Integrated Biochemical, Computational, and Hepatotoxicity Insights. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 73, 1342-48 <https://doi.org/10.1002/bab.70098>
- [162] Oguz, E., Cetin, A., Kazancioglu, M. Z., Kazancioglu, E. A., & Türkan, F. (2025). Design, Synthesis, and AChE Inhibition of 4-Amino-tetrahydroquinoline Derivatives: Molecular Docking and Biological Evaluation. *Russian Journal of General Chemistry*, 95, 3435-3445. <http://link.springer.com/article/10.1134/S1070363225605162#citeas>
- [163] Bachhawat, J. A., Shihabudeen, M. S., & Thirumurugan, K. (2011). Screening of fifteen Indian ayurvedic plants for alpha-glucosidase inhibitory activity and enzyme kinetics. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3, 267-274.
- [164] Çelik, F., Ünver, Y., Güler, H. İ., Oğuz, E., & Türkan, F. (2025). New methyl/benzyl-1, 2, 4-triazole-3-one Derivatives: Synthesis, Characterization (IR, NMR), Antidiabetic, Anti-Alzheimer, and Molecular Docking Study. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 39, e70510. <https://doi.org/10.1002/jbt.70510>

8. Życiorys naukowy

Publikacje

1. Berdzik, N., Jasiewicz, B., **Ostrowski, K.**, Sierakowska, A., Szlaużys, M., Nowak, D., & Mrówczyńska, L. (2024). Novel gramine-based bioconjugates obtained by click chemistry as cytoprotective compounds and potent antibacterial and antifungal agents. *Natural Product Research*, 38, 3721–3727. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2261139>
2. Koenig, H., Babijczuk, K., **Ostrowski, K.**, Nowak, D., Pospieszny, T., & Jasiewicz, B. (2025). New steroid–alkaloid bioconjugates as potential bioactive compounds: Synthesis, spectroscopic and in silico study. *Applied Sciences*, 15, 591. <https://doi.org/10.3390/app15020591>
3. Szlaużys, M., **Ostrowski, K.**, Nowak, D., Pukała, W., Starzyk, J., Jasiewicz, B., & Mrówczyńska, L. (2025). Hybrid uracil derivatives with caffeine and gramine obtained via click chemistry as potential antioxidants and inhibitors of plant pathogens. *Molecules*, 30, 2714. <https://doi.org/10.3390/molecules30132714>
4. **Ostrowski, K.**, Sierakowska, A., Grzonka, D., Gołdyn, M., Nowak, D., Starzyk, J., Jasiewicz, B., & Mrówczyńska, L. (2026). Synthesis, structure and evaluation of antifungal and cytoprotective activities of caffeine–azole hybrids. *Journal of Molecular Structure*, 147221. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2026.147221>

Rozdziały w monografiach

1. **K. Ostrowski**, A. Sierakowska, B. Jasiewicz. Synthesis of new caffeine derivatives of biological activity, *V edycja Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej pt. Science and Young Researchers*” (on-line, kwiecień 2021 - publikacja w The Book of Articles)
2. **K. Ostrowski**, A. Sierakowska, N. Berdzik, B. Jasiewicz. Click chemistry as a tool for the synthesis of new caffeine derivatives, *VI edycja Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Knowledge – Key to Science”* (on-line, styczeń 2022 – publikacja w The Book of Articles)
3. **K. Ostrowski**, A. Sierakowska, B. Jasiewicz, J. Starzyk. Synteza, analiza spektroskopowa i ocena aktywności biologicznej nowych związków hybrydowych kofeiny i pochodnych imidazolu, *XVI Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie* 29.06.2023 r. Toruń

Udział w konferencjach naukowych

1. N. Berdzik, A. Sierakowska, **K. Ostrowski**, B. Jasiewicz. Synthesis of new indole dimers with triazole ring, *National Scientific Conference “Knowledge – Key to Success” VI edition*, 22.01.2022, online
2. I. Kapuścińska, **K. Ostrowski**, K. Sosnowska, A. Sierakowska, B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska. Ocena potencjału przeciwutleniającego oraz aktywności

cytoprotekcyjnej nowych pochodnych kofeiny otrzymanych metodą chemii „click”, *V Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Wyzwania i problemy nauk biomedycznych”* online, luty 2022

3. A. Sierakowska, **K. Ostrowski**, B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska. Synteza nowych pochodnych kofeiny metodą “chemii klik”, *X Seminarium “Postępy w Syntezie Związków Nieracemicznych”*, Wrocław, 19-21 październik 2022
4. **K. Ostrowski**, A. Sierakowska, B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska. Hybrydowe pochodne kofeiny o potencjalnej aktywności biologicznej, *IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów*, Poznań, 3 grudnia 2022
5. M. Szlaużys, N. Berdzik, **K. Ostrowski**, B. Jasiewicz. Synthesis of new indole-uracil bioconjugates with potential biological activity, *Ogólnopolska Konferencja Naukowa „e-Factory of Science”* 15.04.2023
6. M. Szlaużys, **K. Ostrowski**, B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska. Optymalizacja aktywności antyoksydacyjnej i cytoprotekcyjnej naturalnych związków bioaktywnych: badania strukturalne i molekularne mechanizmy działania. *VII Warsztaty Naukowe Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu Wydział Biologii*, Poznań 14 czerwca 2024

Opis rozprawy doktorskiej:

Imię i nazwisko autora pracy	Kamil Ostrowski
Adres e-mail, telefon autora pracy	Kamost3@amu.edu.pl ; 737 493 000
Imię i nazwisko promotora lub promotorów pracy	Prof. UAM dr hab. Beata Jasiewicz
Wydział	Wydział Chemii
Instytut/Zakład	Zakład Produktów Bioaktywnych
Tytuł pracy w jęz. polskim	Związki hybrydowe pochodnych kofeiny o potencjalnej aktywności biologicznej
Tytuł pracy w jęz. angielskim	Hybrid compounds of caffeine derivatives with potential biological activity
Język pracy	Polski
Słowa kluczowe w jęz. polskim (max 5)	związki naturalne, kofeina, związki hybrydowe, pochodne kofeiny,
Słowa kluczowe w jęz. angielskim (max 5)	natural compounds, caffeine, hybrid compounds, caffeine derivatives
Streszczenie pracy w jęz. polskim (max 1400 znaków)	<p>W wyniku przeprowadzonych syntez otrzymałem 45 nowych pochodnych kofeiny. W procesie syntezy wykorzystałem głównie reakcje substytucji nukleofilowej oraz chemię click. Zsyntezowane związki podzieliłem na cztery grupy zróżnicowane pod względem strukturalnym. Budowę otrzymanych pochodnych potwierdziłem metodami spektroskopowymi, w tym spektroskopią w podczerwieni, spektrometrią mas oraz magnetycznym rezonansem jądrowym.</p> <p>Nowe hybrydy poddano szerokim testom biologicznym, oceniając m.in. aktywność hemolityczną, cytoprotekcyjną oraz zdolność do chelatowania jonów metali. Przebadano również działanie przeciwdrobnoustrojowe pochodnych, ich zdolność do inhibicji wybranych enzymów oraz cytotoksyczność wobec nowotworów U87 i HT29. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoce zróżnicowaną i obiecującą aktywność otrzymanych koniugatów. Niektóre związki wykazały zdolność do ochrony komórek przed stresem oksydacyjnym. Najlepszy rezultat uzyskano dla pochodnej 35 ($72,62\% \pm 1,89$). Wyjątkową skuteczność w hamowaniu rozwoju patogenu środowiskowego <i>Botrytis cinerea</i> odnotowano dla związku 26. Otrzymane związki, zwłaszcza pochodne stilbenowe, a szczególnie związek 16, wykazują wysoką zdolność inhibicji enzymu AChE ($IC_{50} = 1,665 \pm 0,495$). Pochodna 36 wykazała wyższy potencjał</p>

	<p>antyproliferacyjny względem komórek nowotworowych linii U87 niż związek wzorcowy.</p> <p>Uzyskane wyniki potwierdzają, że kofeina stanowi dobry związek wyjściowy do projektowania i syntezy nowych pochodnych o szerokim spektrum aktywności biologicznej.</p>
<p>Streszczenie pracy w jęz. angielskim (max 1400 znaków)</p>	<p>As a result of the conducted syntheses, I obtained 45 new caffeine derivatives. The synthetic procedures were based mainly on nucleophilic substitution reactions and click chemistry. The synthesized compounds were divided into four structurally diverse groups. The structures of the obtained derivatives were confirmed using spectroscopic methods, including infrared spectroscopy, mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance spectroscopy.</p> <p>The new hybrids were subjected to extensive biological testing, including the evaluation of hemolytic and cytoprotective activity, as well as their ability to chelate metal ions. The antimicrobial activity of the derivatives, their ability to inhibit selected enzymes, and their cytotoxicity against U87 and HT29 cancer cell lines were also investigated. The obtained results confirmed the highly diverse and promising biological activity of the synthesized conjugates. Some compounds were able to protect cells against oxidative stress. The best result was obtained for derivative 35 ($72.62\% \pm 1.89$). Compound 26 showed particularly high efficacy in inhibiting the growth of the environmental pathogen <i>Botrytis cinerea</i>. The synthesized compounds, especially the stilbene derivatives, with compound 16 in particular, exhibited strong AChE inhibitory activity ($IC_{50} = 1.665 \pm 0.495$). Derivative 36 showed a higher antiproliferative potential against U87 cancer cells than the reference compound.</p> <p>The obtained results confirm that caffeine is a suitable starting compound for the design and synthesis of new derivatives exhibiting a broad spectrum of biological activities.</p>
<p>liczba stron</p>	<p>192</p>

Streszczenie w języku angielskim

As part of my doctoral dissertation, I synthesized 45 new caffeine derivatives by combining the caffeine molecule with other compounds of documented biological activity: uracil derivatives, stilbenes, imidazoles, and pyrazoles. In the synthesis process, I primarily used nucleophilic substitution reactions and the 1,3-dipolar Huisgen cycloaddition. I divided the synthesized compounds into four structurally distinct groups. I confirmed the chemical structures of the obtained derivatives using spectroscopic methods, including Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR).

The new hybrids underwent extensive biological testing, including assessments of hemolytic and cytoprotective activity (protection against free radicals generated by AAPH) and metal-ion chelation. The antibacterial and antifungal activities of the derivatives were also examined, along with their ability to inhibit enzymes (acetylcholinesterase and alpha-glucosidase) and their cytotoxicity against the U87 and HT29 cancer cell lines. The results confirm the highly diverse and promising activity of the obtained conjugates. Some compounds demonstrated the ability to protect cells against oxidative stress. The best result was obtained for compound 35 ($72.62\% \pm 1.89$), which exhibited activity comparable to that of the reference compound. Compound 26 exhibited exceptional efficacy in inhibiting the growth of the environmental pathogen *Botrytis cinerea*. The compounds obtained, especially the stilbene derivatives, and in particular compound 16, exhibit a high ability to inhibit the AChE enzyme ($\text{IC}_{50} = 1.665 \pm 0.495$). This efficacy is higher than that of the reference compound. Derivative 36 showed greater antiproliferative activity against U87 cancer cells than the reference compound, as confirmed at both 24 and 48 hours.

The results confirm that caffeine is a good starting compound for designing and synthesizing new derivatives with versatile biological activity.