

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Chemii

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Karolina Babiczuk

**Koniugaty indolowe – synteza, analiza strukturalna
i ocena aktywności biologicznej**

**Indole conjugates – synthesis, structural analysis
and evaluation of biological activity**

W formie spójnego tematycznie cyklu artykułów opublikowanych
w czasopismach naukowych

Promotor: prof. UAM dr hab. Beata Jasiewicz

Poznań 2025

*Pragnę wyrazić serdeczne podziękowania
Prof. UAM dr hab. Beacie Jasiewicz
za poświęcony czas i nieocenioną pomoc udzieloną
w trakcie przygotowywania rozprawy doktorskiej*

*Chciałabym podziękować także
Prof. UAM dr hab. Lucynie Mrówczyńskiej
za pomoc w realizacji badań biologicznych*

*Serdecznie dziękuję również
Prof. UAM dr hab. Annie Komasie
za owocną współpracę oraz przyjazną atmosferę*

*Dziękuję także
mojej rodzinie i przyjaciołom
za wsparcie, motywację i wiarę we mnie*

Spis treści

Życiorys naukowy	1
Lista publikacji	2
Wstęp i cel pracy	5
Część literaturowa	7
1. Koniugaty	7
1.1. Biokoniugaty	8
1.2. Związki hybrydowe	8
2. Indol	8
2.1. Właściwości przeciwutleniające indolu	11
2.2. Właściwości przeciwnowotworowe indolu	12
2.3. Właściwości przeciwbakteryjne indolu	13
2.4. Właściwości przeciwgrzybiczne indolu	14
3. Gramina	16
4. Azole	18
4.1. Imidazol i pirazol	19
4.1.1. Właściwości biologiczne imidazoli	21
4.1.2. Właściwości biologiczne pirazoli	23
4.2. Związki kompleksowe imidazolu	24
Wyniki badań	26
5. Synteza	27
5.1. Synteza koniugatów indolowych	27
5.2. Synteza kompleksów koniugatów indolowo-imidazolowych z chlorkiem cynku ...	29
5. Analiza spektroskopowa otrzymanych związków	30
6. Struktura w kryształach	33
7. Badania biologiczne	36
7.1. Aktywność hemolityczna	36
7.2. Aktywność przeciwutleniająca	39
7.3. Aktywność przeciwbakteryjna	42
7.4. Aktywność przeciwgrzybiczna	43
8. Badania in silico	45
8.1. Właściwości fizykochemiczne związków	45
8.2. Dokowanie molekularne	47

Podsumowanie	49
Porównanie numeracji związków w rozprawie doktorskiej i publikacjach	50
Schematy przeprowadzanych syntez.....	51
Bibliografia.....	53
Streszczenie rozprawy doktorskiej.....	69
Summary of doctoral dissertation	70
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej i materiały uzupełniające.....	71

Życiorys naukowy

W 2015 roku ukończyłam I Liceum Ogólnokształcące im. Księcia Bolka I w Jaworze. W tym samym roku rozpoczęłam studia licencjackie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza na kierunku chemia, specjalność chemia sądowa. Pracę licencjacką pod tytułem: “Kości jako materiał biologiczny w badaniach toksykologiczno-sądowych” przygotowałam pod opieką Pani Prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz.

W 2018 roku rozpoczęłam badania nad solami pirydoksyny (witaminy B₆) w Zakładzie Produktów Bioaktywnych w ramach pracowni magisterskiej. Pod kierunkiem Pani Prof. UAM dr hab. Anny Komasy napisałam pracę “Badania spektroskopowe, strukturalne i teoretyczne kompleksów pirydoksyny z kwasami” i w 2020 roku uzyskałam tytuł magistra chemii.

Studia w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych rozpoczęłam w październiku 2021 roku, gdzie zajęłam się tematyką nowych pochodnych alkaloidów indolowych i ich aktywnością biologiczną. Badania wykonywałam w Zakładzie Produktów Bioaktywnych, pod opieką Pani Prof. UAM dr hab. Beaty Jasiewicz. Odebrałam również staż w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biologii UAM, gdzie przy wsparciu Pani Prof. UAM dr hab. Lucyny Mrówczyńskiej wykonywałam badania właściwości hemolitycznych i antyoksydacyjnych otrzymanych związków.

Wyniki swoich badań w formie wystąpienia ustnego lub posteru przedstawiłam na pięciu konferencjach naukowych. Jestem współautorką kilku artykułów naukowych, opublikowanych w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

Lista publikacji

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

P1. Jasiewicz, B.; **Babijczuk, K.**; Warżajtis, B.; Rychlewska, U.; Starzyk, J.; Cofta, G.; Mrówczyńska, L. Indole Derivatives Bearing Imidazole, Benzothiazole-2-Thione or Benzoxazole-2-Thione Moieties—Synthesis, Structure and Evaluation of Their Cytoprotective, Antioxidant, Antibacterial and Fungicidal Activities. *Molecules* **2023**, *28*, 708, doi:10.3390/molecules28020708.

P2. **Babijczuk, K.**; Warżajtis, B.; Starzyk, J.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B.; Rychlewska, U. Synthesis, Structure and Biological Activity of Indole–Imidazole Complexes with ZnCl₂: Can Coordination Enhance the Functionality of Bioactive Ligands? *Molecules* **2023**, *28*, 4132, doi:10.3390/molecules28104132.

P3. **Babijczuk, K.**; Berdzik, N.; Nowak, D.; Warżajtis, B.; Rychlewska, U.; Starzyk, J.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B. Novel C3-Methylene-Bridged Indole Derivatives with and without Substituents at N1: The Influence of Substituents on Their Hemolytic, Cytoprotective, and Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Sciences* **2024**, *25*, 5364, doi:10.3390/ijms25105364.

P4. **Babijczuk, K.**; Wawrzyniak, K.; Rutkowska, K.; Budnik, L.; Warżajtis, B.; Rychlewska, U.; Nowak, D.; Starzyk, J.; Banda, Y.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B. Indole-pyrazole hybrids: synthesis, structure, and assessment of their hemolytic, cytoprotective, and antimicrobial properties. (*Wysłane do czasopisma*)

Pozostałe publikacje

P5. Komasa, A.; **Babijczuk, K.**; Dega-Szafran, Z.; Gołdyn, M.; Bartoszak-Adamska, E.; Szafran, M.; Cofta, G. Interactions of Pyridoxine (Vitamin B6) with Squaric Acid and Water. Experimental and Theoretical Studies. *Journal of Molecular Structure* **2022**, *1251*, 131773, doi:10.1016/j.molstruc.2021.131773.

P6. Nowak, D.; **Babijczuk, K.**; Jaya, L.O.I.; Bachorz, R.A.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B.; Hoffmann, M. Artificial Intelligence in Decrypting Cytoprotective Activity under Oxidative Stress from Molecular Structure. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24*, 11349, doi:10.3390/ijms241411349.

P7. Koenig, H.; **Babijczuk, K.**; Ostrowski, K.; Nowak, D.; Pospieszny, T.; Jasiewicz, B. New Steroid–Alkaloid Bioconjugates as Potential Bioactive Compounds: Synthesis, Spectroscopic and In Silico Study. *Applied Sciences* **2025**, *15*, 591, doi:10.3390/app15020591.

P8. Babijczuk, K.; Komasa, A.; Gołdyn, M.; Bartoszak-Adamska, E.; Larowska-Zarych, D.; Lipińska, P.; Sell-Kubiak, E.; Warzych E.; Structural diversity of salts of pyridoxine with genistic acid and the impact of a dihydrate form on antioxidant activity and boar sperm viability. (*Wysłane do czasopisma*)

Rozdziały w monografiach

- 1. Babijczuk, K.;** Jasiewicz, B.; Mrówczyńska, L.; Starzyk, J.; Cofta, G. Hybrydy indolowo-imidazolowe o właściwościach biologicznych. *BioOrg 2022 - IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Materiały konferencyjne 2022*, 45-47, ISBN: 978-83-955437-2-2
- 2. Babijczuk, K.;** Komasa, A. Spektroskopowe i teoretyczne badania soli pirydoskyny (witaminy b6) z kwasem 2,4-dihydroksybeznosowym. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości 2022*, 240-243, ISBN: 978-83-227-9602-3
- 3. Babijczuk, K.;** Warżajtis, B.; Starzyk, J.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B.; Rychlewska, U. Structure and biological activity of indole-imidazole hybrids complexes with ZnCl₂. *ChemBiotIC Chemistry & Biotechnology International Conference Programme and book of abstracts 2023*, 85, ISBN: 978-83-7493-244-8

Udział w konferencjach

- 1. Babijczuk, K.;** Jasiewicz, B.; Mrówczyńska, L.; Starzyk, J.; Cofta, G. Hybrydy indolowo-imidazolowe o właściwościach biologicznych. *BioOrg 2022 - IV Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów*, Poznań, 3.12.2022
- 2. Babijczuk, K.;** Komasa, A. Spektroskopowe i teoretyczne badania soli pirydoskyny (witaminy b6) z kwasem 2,4-dihydroksybeznosowym. *Nauka i przemysł - metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, Lublin, 28-29.06.2022 (online)
- 3. Nowak, D.;** **Babijczuk, K.;** Jaya, L.O.I.; Bachorz, R.A.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B.; Hoffmann, M. Uczenie maszynowe w odszyfrowywaniu aktywności cytoprotekcyjnej podczas stresu oksydacyjnego ze struktury cząsteczki, *XX Ogólnopolskie Seminarium Studentów i Doktorantów „Na pograniczu Chemii, Biologii i Farmacji”*, Jarnołtówek, 26-29.05.2023
- 4. Babijczuk, K.;** Warżajtis, B.; Starzyk, J.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B.; Rychlewska, U. Structure and biological activity of indole-imidazole hybrids complexes with ZnCl₂. *ChemBiotIC Chemistry & Biotechnology International Conference*, Wrocław, 22-23.06.2023 (online)
- 5. Babijczuk, K.;** Jasiewicz, B.; Warżajtis, B.; Mrówczyńska, L.; Starzyk, J.; Nowak, D. Hybrydy indolowe zawierające grupę tiolową lub tionową – synteza, struktura i aktywność

biologiczna. Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk Ścisłych i Przyrodniczych „Bio Idea 4.0”, Lublin, 3.02.2024 (online)

6. Babiczuk, K.; Komasa, A.; Gołdyn, M.; Bartoszak-Adamska, E.; Larowska-Zarych, D. Lipińska, P.; Sell-Kubiak, E.; Warzych, E. Zróżnicowanie strukturalne soli pirydoksyny z kwasem gentyzynowym i wpływ dihydratu na żywotność plemników knura. 66. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem 2024, Poznań, 15-20.09.2024

7. Nowak, D.; Bachorz, R.A.; **Babiczuk, K.**; Jaya L.O.I.; Jasiewicz, B.; Mrówczyńska, L.; Hoffmann, M.; *Przewidywanie aktywności cytoprotekcyjnej związków indolowych za pomocą algorytmów uczenia maszynowego*, 66. Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, PTChem 2024, Poznań, 15-20.09.2024

Wstęp i cel pracy

Badania zależności aktywności związków od struktury (SAR, ang. *Structure-Activity Relationships*) są istotnym elementem projektowania nowych leków. Wiedząc, które elementy budowy cząsteczki mają wpływ na jej konkretne właściwości, można tak modyfikować nowe pochodne, by uzyskać jak najlepszą aktywność biologiczną.

Powszechną praktyką są zmiany podstawników w znanych już aktywnych cząsteczkach. Zastąpienie atomu wodoru grupą funkcyjną lub podstawnikiem, takim jak alkil lub halogen, może znacząco zmodyfikować działanie biologiczne związków. Inną metodą jest łączenie ze sobą dwóch lub więcej aktywnych cząsteczek i otrzymywanie koniugatów.

W ciągu ostatnich lat zauważyć można wzrost zainteresowania antyoksydantami. Związane jest to z udziałem utleniaczy w wielu chorobach przewlekłych, między innymi chorobach Alzheimera i Parkinsona, cukrzyca, chorobach serca i płuc, schorzeniach psychicznych, takich jak depresja czy schizofrenia, a także w nowotworach oraz procesie starzenia. Z tego powodu poszukiwanie nowych związków o właściwościach przeciwutleniających jest tak istotnym zagadnieniem. Ugrupowaniem chętnie wykorzystywanym w takich syntezach jest pierścień indolu, obecny w wielu związkach pochodzenia naturalnego, między innymi w graminie. Modyfikacje tego alkaloidu mogą prowadzić do otrzymania pochodnych wykazujących szereg właściwości biologicznych.

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza koniugatów indolowych o potencjalnych właściwościach antyoksydacyjnych oraz analiza zależności aktywności biologicznej otrzymanych związków od ich struktury.

Wychodząc z graminy otrzymałam trzy grupy koniugatów indolowych: 1) indolowo-imidazolowe, 2) indolowo-tioketonowe i 3) indolowo-pirazolowe.

Ponadto, aby sprawdzić w jakim stopniu reakcje kompleksowania mogą zmienić właściwości biologiczne ligandów, otrzymałam związki kompleksowe koniugatów indolowo-imidazolowych z chlorkiem cynku.

Strukturę wszystkich nowych związków potwierdziłam za pomocą spektrometrii mas oraz spektroskopii FT-IR i NMR (^1H i ^{13}C). Dla większości koniugatów i kompleksów wykonana została analiza krystalograficzna.

Badania biologiczne skupiły się głównie na określeniu aktywności hemolitycznej i antyoksydacyjnej związków. Zbadałam ich zdolność do ochrony erytrocytów przed hemolizą indukowaną oksydacyjnie oraz do chelatowania jonów żelaza (II). Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na określenie zależności aktywności hemolitycznej i przeciwutleniającej związków od ich struktury.

Badania dokowania molekularnego posłużyły do przeanalizowania powinowactwa wybranych koniugatów do enzymów biorących udział w stresie oksydacyjnym. Ponadto

za pomocą metod *in silico* sprawdziłam parametry fizykochemiczne otrzymanych pochodnych, określające podobieństwo związków do leków.

Dodatkowo badania biologiczne zostały poszerzone o sprawdzenie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej koniugatów i kompleksów. Wybrane w tym celu szczepy mikroorganizmów są szeroko rozpowszechnione w środowisku i mogą przyczyniać się do chorób zarówno wśród ludzi jak i roślin.

Wszystkie opisane w tej pracy wyniki są zawarte w trzech opublikowanych artykułach o międzynarodowym zasięgu oraz jednym wysłanym do redakcji.

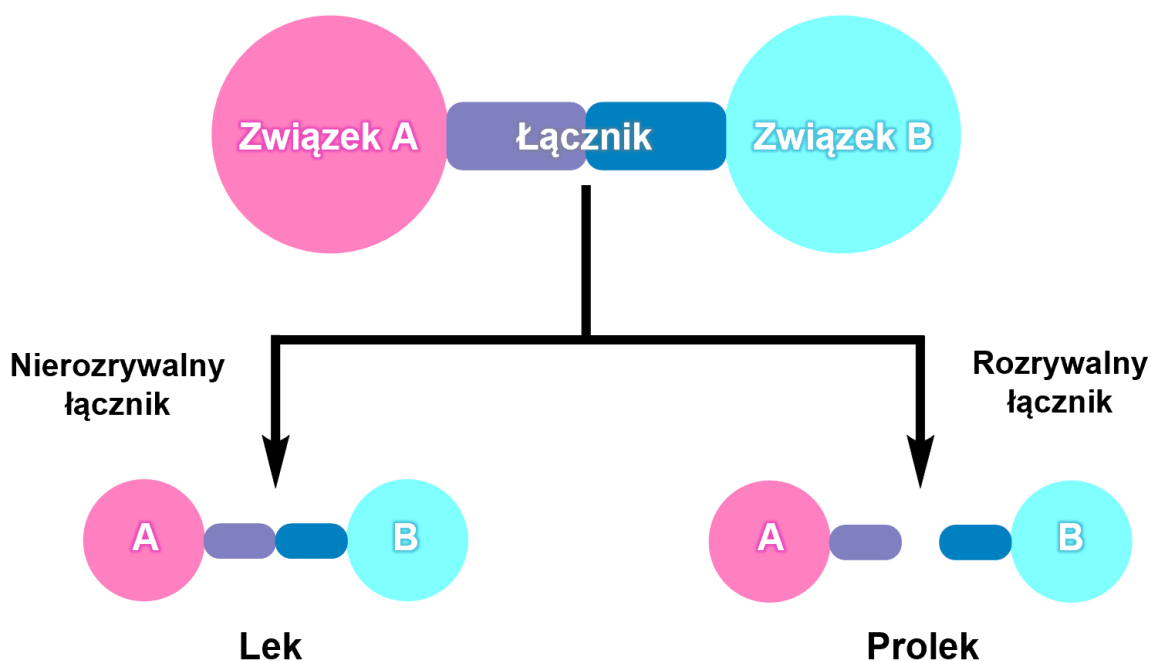
Część literaturowa

1. Koniugaty

Koniugaty to związki powstałe z połączenia ze sobą kowalencyjnym łącznikiem dwóch (lub więcej) aktywnych biologicznie indywidualów chemicznych [1]. Mogą one nie tylko łączyć właściwości związków, z których pochodzą, ale także wykazywać mniejszą toksyczność i poprawić ich biodostępność. Dodatkowo umożliwiają ukierunkowane działanie farmaceutyków, tak ważne w przypadku walki z nowotworami [2–4].

Strategia łączenia ze sobą różnych leków znana jest od dziesięcioleci i nosi nazwę politerapii lub leczenia skojarzonego. Od lat stosowana jest w terapiach przeciwnowotworowych oraz w leczeniu AIDS i malarii [5]. Przyjmowanie dwóch lub więcej farmaceutyków jednocześnie ma na celu między innymi poprawę ich działania, zmniejszenie efektów ubocznych a także walkę z antybiotykoopornością [5,6]. Takie podejście jednak niesie ze sobą większe ryzyko toksyczności. Trudniej jest ustalić bezpieczną dawkę dwóch leków niż jednego, a dodatkowo mogą one wchodzić ze sobą w trudne do przewidzenia interakcje oraz znacznie różnić się swoją farmakokinetyką [7]. Koniugaty stanowią alternatywę dla politerapii.

Kowalencyjny łącznik, stanowiący połączenie między bioaktywnymi składnikami koniugatów, może być zaprojektowany zarówno tak, by zostać zerwanym po przedostaniu się związku do organizmu, jak i pozostać nierozrwanym (Rys. 1) [8,9]. W pierwszym przypadku mowa o prolekach (związkach nie będących lekami, ale stającymi się nimi po przemianach metabolicznych *in vivo* [10]), w drugim natomiast całe koniugaty wykazują działanie farmakologiczne.



Rysunek 1. Schemat budowy koniugatu, będącego lekiem.

1.1. Biokoniugaty

Gdy przynajmniej jednym z elementów tworzących koniugat jest biocząsteczką (np. aminokwas, peptyd, cukier, tłuszcz [11]) całość nosi nazwę biokoniugatu [12]. Często to pojęcie ma jeszcze węższe znaczenie i odnosi się do połączenia środka o działaniu farmakologicznym i makrocząsteczki, takiej jak białko czy polimer [13,14]. Głównym celem takiego podejścia jest synteza leków o ukierunkowanym i lepszym działaniu oraz mniejszej toksyczności [15,16].

Biokoniugaty znalazły zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe [17], przeciwbakteryjne [18], a także jako szczepionki [19]. Przykładem są koniugaty przeciwciało-lek, będące połączeniem przeciwciała monoklonalnego, związku cytotoksycznego i łącznika [9,20,21]. Są one klasą leków przeciwnowotworowych, które w precyzyjny sposób dostarczają silnie cytotoksyczną molekułę bezpośrednio do komórek rakowych [20]. W tym wypadku biocząsteczką jest przeciwciało, które łączy się specyficznym z konkretnym antygenem, zapewniając tym samym ukierunkowane działanie biokoniugatu [21].

1.2. Związki hybrydowe

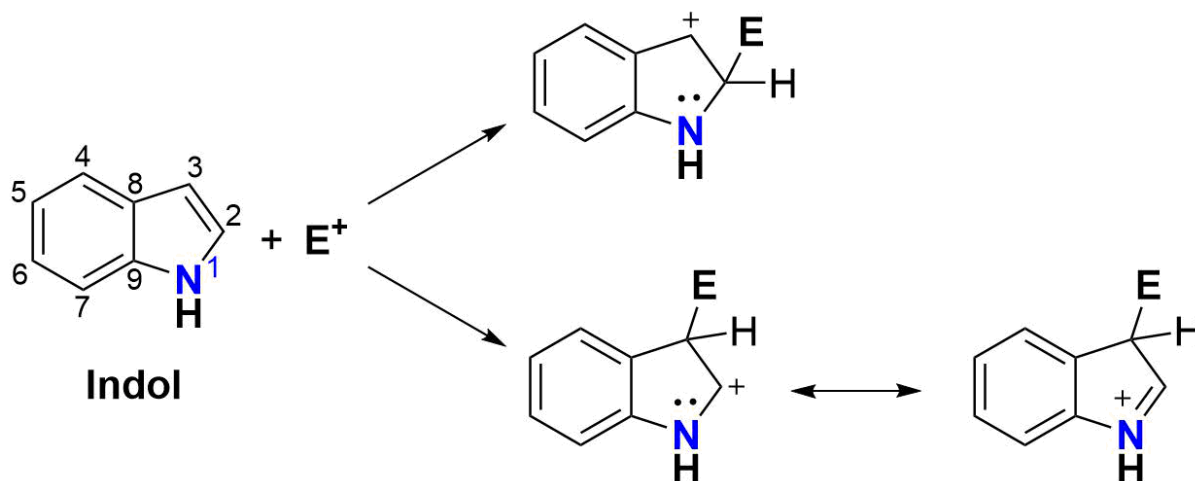
Hybrydami określa się związki składające się z przynajmniej dwóch aktywnych cząsteczek, połączonych kowalencyjnym łącznikiem [22]. Uzyskane w taki sposób pochodne mogą wykazywać lepszą aktywność niż związki wyjściowe i mieć lepszą biodostępność [23,24]. Dzięki działaniu w więcej niż jednym miejscu jednocześnie i dzięki różnym mechanizmom działania komponentów hybrydy, mogą być one odpowiedzią w walce z chorobą Alzheimera [25], antybiotykoopornością bakterii [26] czy lekoodpornością nowotworów [27]. Ich ogromny potencjał sprawia, że od wielu lat cieszą się rosnącym zainteresowaniem [28].

2. Indol

Wśród związków organicznych wykorzystywanych do syntez w chemii medycznej na szczególną uwagę zasługują związki heterocykliczne. Posiadają one przynajmniej jeden heteroatom, tj. inny niż atom węgla, najczęściej jest to atom azotu, tlenu lub siarki, wbudowany w strukturę pierścienia. Układy heterocykliczne można znaleźć w związkach pochodzenia naturalnego, zarówno roślinnego jak i zwierzęcego oraz w wielu lekach. Według danych z lat 2013-2023, związki heterocykliczne zawierające atom azotu stanowią 82% wszystkich nowych małych cząsteczkowych leków zatwierdzonych przez FDA (Agencja Żywności i Leków, ang. *Food and Drug Administration*), podczas gdy w latach 1938-2012 było to 59% [29]. Porównanie to pokazuje jak dużym zainteresowaniem w syntezie farmaceutyków cieszą się związki heterocykliczne.

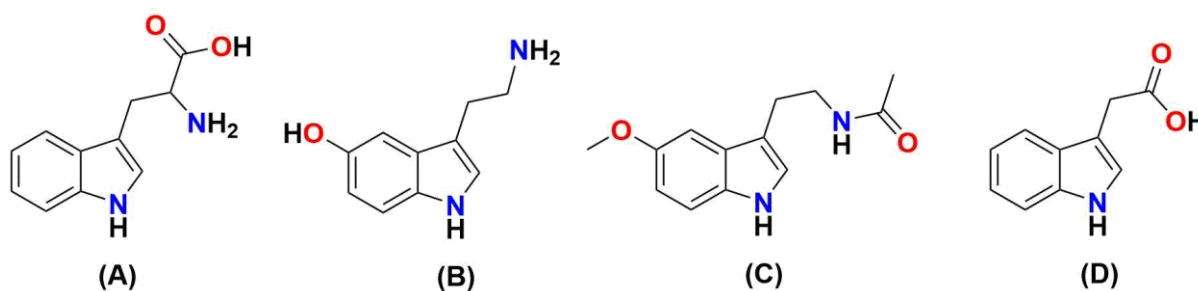
Przedstawicielem związków heterocyklicznych jest indol (2,3-benzopirol, 1*H*-benzo[*b*]pirol), zawierający dwa skondensowane pierścienie: benzen i pirol. Płaska budowa i obecność dziesięciu zdelokalizowanych elektronów π sprawiają, że zaliczany jest on do związków aromatycznych. Jego słabo zasadowy charakter związany jest z udziałem w rezonansie

elektronowym wolnej pary elektronowej atomu azotu, co uniemożliwia wykorzystanie jej w reakcji protonowania [30]. Podobnie jak benzen, indol ulega reakcji substytucji elektrofilowej. Preferowaną pozycją ataku jest pozycja C3 z uwagi na zwiększoną gęstość elektronową i największą stabilność powstałego produktu przejściowego (Rys. 2) [31].



Rysunek 2. Struktura indolu wraz z numeracją atomów węgla oraz schemat substytucji elektrofilowej w pierścieniu indolu.

Układ indolowy obecny jest w strukturze egzogennego aminokwasu tryptofanu (Rys. 3A), będącego prekursorem między innymi serotoniny i melatoniny oraz auksyn, roślinnych hormonów wzrostu [32,33] (Rys. 3B-D). Indol występuje w ludzkich odchodach i razem z para-krezolem (4-metylofenolem) stanowi prekursor wielu toksyn mocznicowych, czyli toksycznych metabolitów wydalanych wraz z moczem [34]. Jest odpowiedzialny za nieprzyjemny, charakterystyczny zapach kału [35], ale w małych stężeniach pachnie jaśminem i jest chętnie wykorzystywany jako środek zapachowy w perfumach czy herbatach [36].

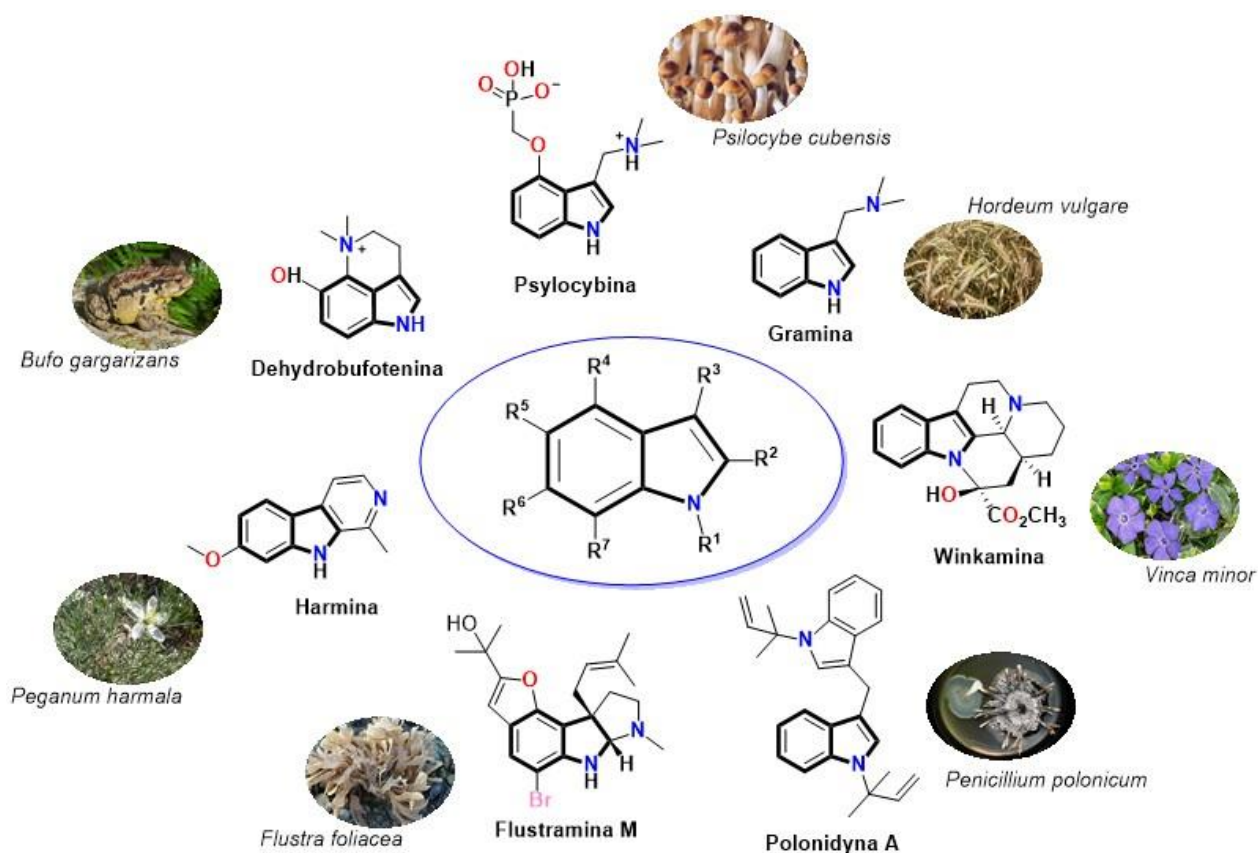


Rysunek 3. Wzory tryptofanu (A), serotoniny (B), melatoniny (C) i kwasu indolilo-3-octowego, przykłady auksyny (D).

Pochodne indolu powszechnie występują w świecie przyrody w postaci alkaloidów indolowych [37]. Alkaloidy są ogromną grupą związków organicznych (kilkanaście tysięcy), a brak dokładnej definicji sprawia, że w niektórych przypadkach trudno je odróżnić od innych

naturalnych produktów [38]. Mianem alkaloidów określa się związki pochodzenia naturalnego (z roślin, grzybów lub bakterii, a także niektórych zwierząt, głównie owadów [39]), zawierające w swojej strukturze atom azotu i zazwyczaj mające charakter zasadowy [40]. Klasyfikuje się je głównie ze względu na budowę chemiczną [41]. Jedną z największych grup alkaloidów są alkaloidy indolowe.

Zidentyfikowano je między innymi w roślinach z rodzin toinowatych (*Apocynaceae*), marzanowatych (*Rubiaceae*), loganiowatych (*Loganiaceae*), błotniowatych (*Nyssaceae*) [37,42] i wiechlinowatych (*Gramineae; Poaceae*) [43], a także w mikroorganizmach morskich [44], psychoaktywnych grzybach [45] i jadzie ropuch z rodzaju *Bufo* [46] (Rys. 4).



Rysunek 4. Przykłady alkaloidów indolowych i źródła ich pochodzenia.

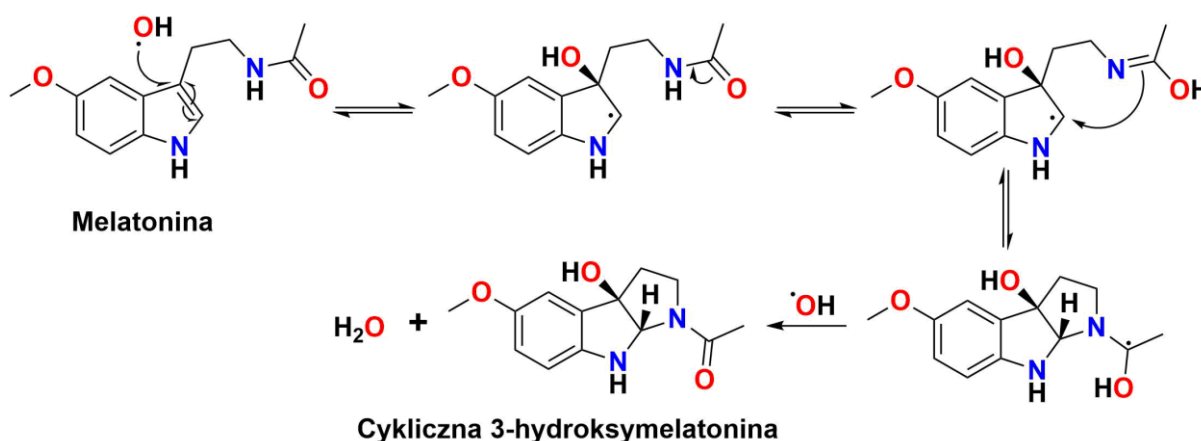
Alkaloidy indolowe oraz ich pochodne wykazują szereg właściwości biologicznych. Wśród nich wymienić można aktywność przeciwutleniającą, przeciwnowotworową, przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczną [37,47,48]. Związki indolowe wykorzystywane są w poszukiwaniu nowych leków przeciwzapalnych [49], przeciw chorobom Alzheimera [50] i Parkinsona [51], przeciwko cukrzycy [52], HIV [53] oraz SARS-CoV-2 [54].

2.1. Właściwości przeciwutleniające indolu

Wolne rodniki są indywidualami chemicznymi posiadającymi w swojej strukturze niesparowany elektron. Taka budowa sprawia, że są niestabilne i wysoko reaktywne [55]. Ich źródła są zarówno egzo- jak i endogenne, a ich nadmiar prowadzi do stresu oksydacyjnego [56]. Ten z kolei ma swój udział w wielu chorobach, między innymi cukrzycy, otyłości czy chorobach neurodegeneracyjnych [57]. Stąd istotne jest poszukiwanie nowych związków przeciwutleniających.

Właściwości antyoksydacyjne indolu powiązane są głównie z obecnością niepodstawionego atomu azotu w pierścieniu pirolu, będącego aktywnym centrum redoks cząsteczki [58]. Dodatkowo, bogaty w elektrony układ aromatyczny indolu, będący donorem elektronów, może stabilizować powstałe wolne rodniki, a w pozycji C3 możliwa jest elektrofilowa addycja rodnikowa [59]. Istotny jest także nie tylko rodzaj, ale i położenie podstawnika, jako że zawada przestrzenna może mieć istotny wpływ na oddziaływanie z dużymi objętościowo utleniaczami [58].

Przykładem pochodnej indolu cechującej się aktywnością antyoksydacyjną jest melatonina (Rys. 5). Jest to hormon odpowiadający za regulację cyklu dobowego, a także procesu dorastania czy formowania pamięci [60]. Melatonina wychwytuje wolne rodniki zarówno tlenowe (rodnik hydroksylowy, nadtlenuk wodoru, tlen singletowy) jak i azotowe (tlenek azotu, anion nadtlenoazotynowy). Swoją aktywność zawdzięcza obecności pierścienia indolowego oraz podstawnikom: grupie amidowej w pozycji C3 i grupie metoksyłowej w pozycji C5 [59]. Fragment karbonyłowy w grupie amidowej wychwytuje wolne rodniki, podczas gdy atom azotu bierze udział w tworzeniu nowego pięcioczłonowego pierścienia po interakcji z reaktywną cząsteczką [61]. Grupa metoksyłowa natomiast zapobiega prooksydacyjnym reakcjom oraz dostarcza elektrony do pierścienia indolu [59].



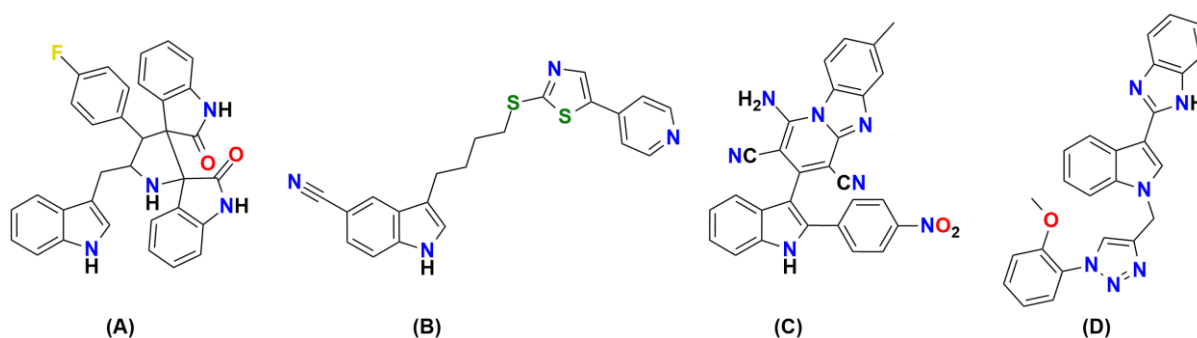
Rysunek 5. Schemat neutralizacji rodnika hydroksylowego przez melatoninę.

Oprócz melatoniny, do związków indolowych naturalnego pochodzenia wykazujących właściwości antyoksydacyjne należą między innymi indolo-3-karbinol [62], kwas indolilo-3-propionowy [63], windolina [64] i gramina [65].

Z uwagi na swoją aktywność biologiczną indole są chętnie wykorzystywane w syntezie nowych koniugatów o właściwościach przeciwutleniających. Przykładem mogą być hybrydy indolu z kwasem kawowym [66], chalkonami [67,68], izoniazydem [69], hydrazonami [70] czy 1,3,4-oksadiazolami [71] oraz koniugaty indolu z izatyną, tryptofanem i benzolidenoindanonem (Rys. 6A) zsyntezowane przez Arumugam i in. Te ostatnie neutralizują cząsteczki H₂O₂ w takim samym stopniu co związek referencyjny, jakim była witamina C, w każdym badanym stężeniu [72].

Wśród grupy hybryd indolu z pochodnymi 3-(4-chlorobutylo)-1*H*-indolo-5-karbonitrilu, otrzymanymi przez Jagadeesan i in., najlepsze właściwości antyoksydacyjne w testach z udziałem DPPH i ABTS wykazał związek z pierścieniami tiazolowym i pirydynowym (Rys. 6B) [73]. Wysoką aktywnością odznaczyły się także pochodne z 4-metylo-1,2,4-triazolem, benzimidazolem i 5-metoksybenzimidazolem.

Kolejna grupa pochodnych to hybrydy indolowo-benzimidazowe (Rys. 6C) zsyntezowane przez Kathrotiya i Patela charakteryzujące się dobrymi właściwościami redukującymi jony żelaza w osoczu (FRAP, ang. *Ferric reducing ability of plasma*) [74]. Badania prowadzone przez Ashok i in., na pochodnych indolowo-benzimidazolowych dodatkowo podstawionych w pozycji *N1* indolu wykazały, że związki te mają zdolności do wychwytywania rodników DPPH i H₂O₂ [75]. Najlepszą aktywnością charakteryzowały się związki mające grupę metoksyową w pierścieniu fenylowym (Rys. 6D).

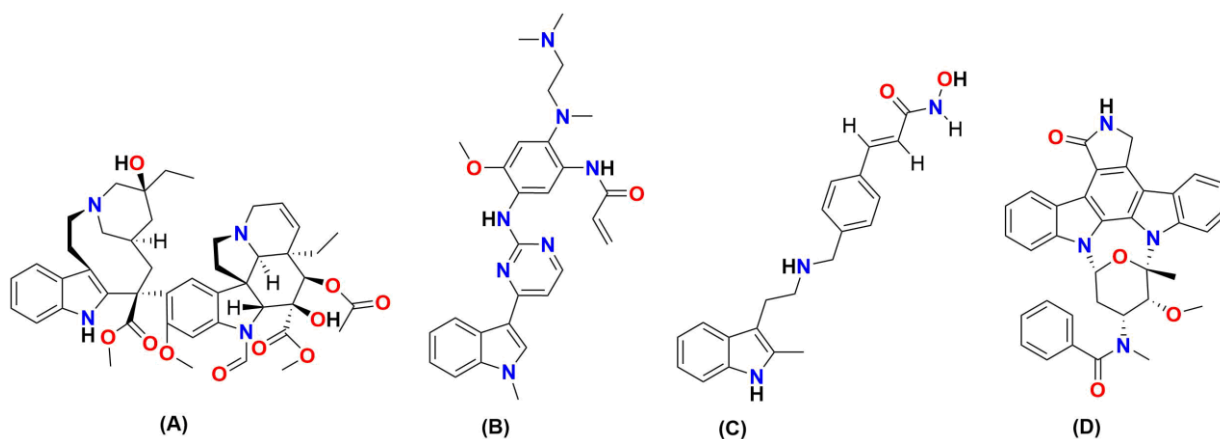


Rysunek 6. Koniugaty indolowe o właściwościach przeciwutleniających.

2.2. Właściwości przeciwnowotworowe indolu

Nowotwory są drugą najczęstszą przyczyną zgonów, zaraz po chorobach serca [76], nie więc dziwnego, że poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych są jednym z priorytetów chemii medycznej. Układem często pojawiającym się w takich syntezach jest pierścień indolowy. Motywowane jest to zdolnością związków heterocyklicznych do tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych z celem farmakologicznym oraz obecnością indolu

w dwóch lekach przeciwnowotworowych pochodzenia naturalnego: winkrystynie (Rys. 7A) i winblastynie [77]. Wśród innych, zatwierdzonych do użytku, terapeutyków zawierających w swojej strukturze indol są osimertinib (Rys. 7B), wykorzystywany w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca [78], panobinostat (Rys. 7C), używany przy szpiczaku mnogim [79] oraz midostaurin (Rys. 7D), pomocny w terapii ostrej białaczki szpikowej [80].



Rysunek 7. Struktury leków przeciwnowotworowych zawierających indol: winkrystyna (A), osimertinib (B), panobinostat (C), midostaurin (D).

Mechanizmy działania związków indolu o właściwościach przeciwnowotworowych obejmują między innymi indukowanie apoptozy [81], inhibitowanie polimeryzacji tubuliny lub topoimerazy [77], a także powstrzymywanie proliferazy i syntezy DNA [78]. Co więcej, pochodne indolu wykazują aktywność przeciwko lekoopornym nowotworom, dzięki zakłóceniu wielu szlaków sygnałowych w komórkach [82,83]. Nowe hybrydy indolowo-pirazolowe i indolowo-tiazolidynowe są skuteczne przeciwko nowotworowi wątroby [84,85], a związki z tiadiazolami oraz oksindolem powstrzymują wzrost komórek raka piersi [86,87].

2.3. Właściwości przeciwbakteryjne indolu

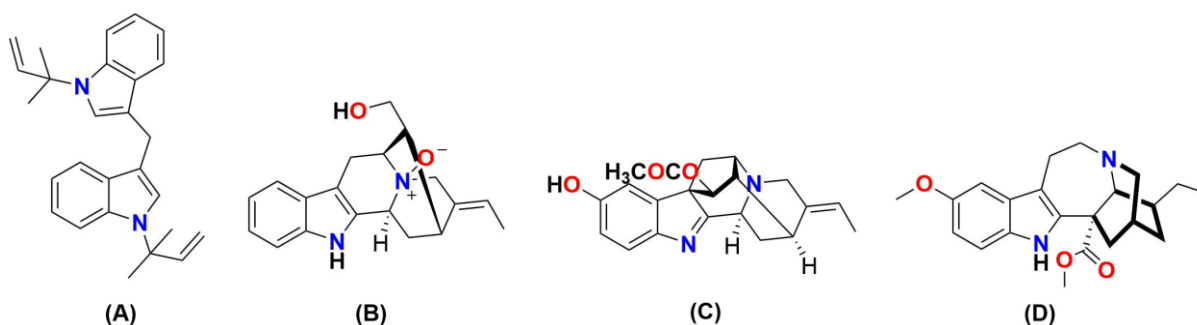
Bakterie występują wszędzie dookoła nas. Większość z nich jest nieszkodliwa, a niektóre szczepy występują w ludzkim organizmie, żyjąc z nami w symbiozie i tworząc naturalną florę bakteryjną [88]. Gdy jednak przedostaną się one ze swoich typowych siedlisk (np. usta, jelita) na obszary, gdzie nie powinny występować (np. krew, płuca) dochodzi do infekcji bakteryjnej [89]. Jest ona jedną z najczęstszych chorób, co sprawia, że synteza związków o działaniu przeciwbakteryjnym nieustannie znajduje się w centrum zainteresowań naukowców. Dodatkowym wyzwaniem jest rosnąca antybiotykoodporność, zmuszająca do poszukiwania nowych leków i nowych mechanizmów ich działania [90].

Alkaloidy indolowe stanowią ważną grupę związków o właściwościach przeciwbakteryjnych. Wykazują działanie przeciwko pałeczce okrężnicy (*Escherichia coli*) [91], laseczce siennej (*Bacillus subtilis*) [92], różnym szczepom gronkowca złocistego (*Staphylococcus*

aureus, MSSA, MRSA) [93,94], a także wielu innym, zarówno Gram-dodatnim jak i Gram-ujemnym bakteriom [95,96].

Wyizolowany z mikroskopijnych grzybów *Penicillium polonicum* alkaloid indolowy, polonidyna A, wykazał umiarkowane działanie przeciwko laseczce siennej (Rys. 8A) [97]. Wzrost tej bakterii inhibują także związki pochodzące z *Voacanga africana* (Rys. 8B) [98] oraz *Rauvolfia yunnanensis* (Rys. 8C) [99].

Pájaro-González i in. wykazali, że spośród alkaloidów indolowych wyizolowanych z *Tabernaemontana cymosa* woakangina (Rys. 8D) wykazuje aktywność przeciwko gronkowcowi złocistemu [100].



Rysunek 8. Alkaloidy indolowe o działaniu przeciwbakteryjnym.

Zarówno dimery indolu jak i jego koniugaty są skuteczne przeciwko lekoopornym bakteriom z grupy ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*) [101,102]. Hybrydy benzotiofenowo-indolowe wykazują działanie przeciw odpornemu na metycylinę gronkowcowi złocistemu (MRSA). Podobnie związki zawierające zarówno indol jak i nitroimidazol, które dodatkowo są aktywne przeciw wankomycyno-odpornej *Enterococcus faecium* [103].

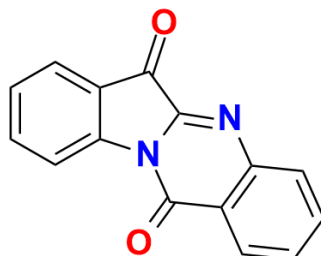
2.4. Właściwości przeciwgrzybiczne indolu

Choroby wywoływane przez grzyby stanowią poważne zagrożenie nie tylko dla ludzi, ale także dla upraw. Mogą prowadzić do utraty nawet 1/5 z nich, a te liczby prawdopodobnie wzrosną przez trwające ocieplenie klimatu [104].

Alkaloidy indolowe wykazujące właściwości antygrzybicze wyizolowano między innymi z roślin *Winchia calophylla* [105], *Alstonia scholaris* [106], *Alstonia venenata* [107], *Kopsia genus* [108] i z organizmów morskich [109].

Tryptantryna jest naturalnym alkaloidem, zaliczanym do grupy alkaloidów indolochinazolinowych. Wykazuje wiele właściwości biologicznych, między innymi aktywność

przeciwgrzybiczną [110]. Inhibituje wzrost *Cryptococcus* [111], drożdżaków odpowiedzialnych za kryptokokozę, infekcję grzybiczną charakteryzującą się znaczną zachorowalnością i wysoką śmiertelnością [112]. Co więcej, tryptantryna wykazuje także działanie przeciwko innemu chorobotwórczemu grzybowi - *Trichophyton benhamiae* [113].



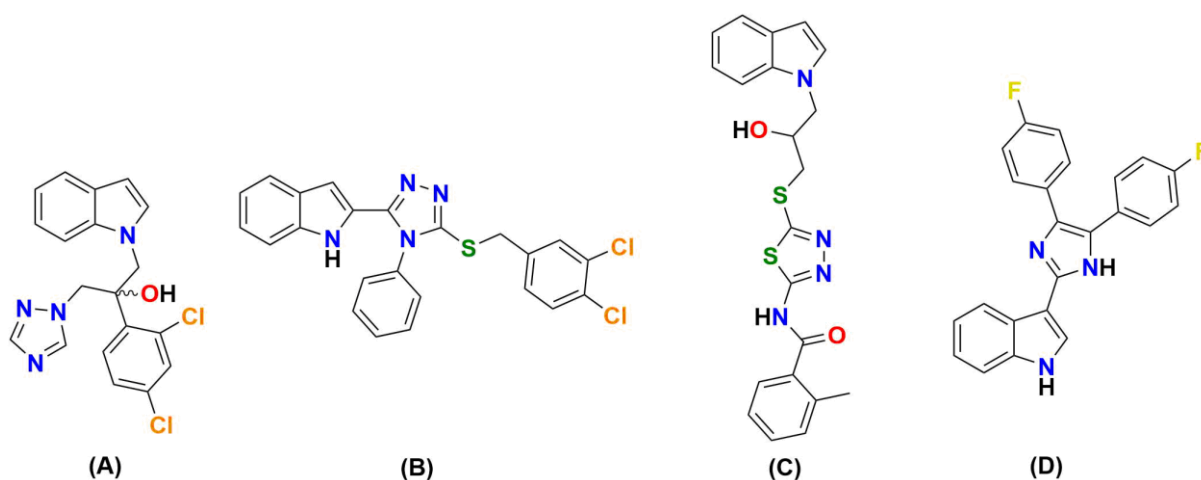
Tryptantryna

Rysunek 9. Wzór tryptantryny.

Zsyntezowana przez Pagniez i in. hybryda indolowo-triazolowa (Rys. 10A) była skuteczna przeciwko drożdżakowi *Candida*, wywołującemu kandydozę [114]. Grupa związków zawierających te same dwa układy (Rys. 10B) została otrzymana przez Al-Wabli i in. i wykazała działanie przeciwko trzem szczepom *Candida* [115].

Wśród serii 24 koniugatów indolowo-tiadiazolowych przebadanych przez He i in. na 14 grzybach będących patogenami roślin, pochodna z podstawnikiem w pozycji N1 indolu i z grupą metylową w pierścieniu benzenu przyłączonym wiązaniem amidowym do tiadiazolu (Rys.10C) była bardziej aktywna przeciwko gronowcowi szaremu (*Botrytis cinerea*) niż związek referencyjny [116].

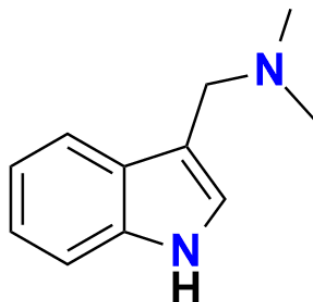
Innym przykładem hybryd indolowych o właściwościach przeciwgrzybiczych są związki otrzymane przez Chauhan i in. (Rys. 10D) [117]. Trzy z nich wykazały aktywność przeciwko *Candida albicans*, porównywalną do aktywności standardowego leku flukonazolu.



Rysunek 10. Koniugaty indolowe o właściwościach przeciwgrzybiczych.

3. Gramina

Jednym z przedstawicieli grupy alkaloidów indolowych jest gramina (donaxin, 3-(dimetyloaminometylo)indol) (Rys. 11). Po raz pierwszy została wyizolowana w 1935 roku z lasecznicy trzcinowatej (*Arundo donax* L.) [118]. Roślina ta wzbudziła zainteresowanie badaczy, gdy zauważono, że jest pomijana przez pasące się wielbłądy, które wybierały gatunek pokrewny – trzcinę pospolitą (*Phragmites australis*). Skłoniło to naukowców do zbadania zawartości alkaloidów w tej roślinie. Udało się im otrzymać kryształy związku o wzorze sumarycznym $C_{11}H_{14}N_2$, zawierającym nienasycone wiązania i wykazującym charakter zasadowy, któremu nadano nazwę „donaxin” [118]. W tym samym roku inna grupa badawcza wyizolowała ten sam związek z jęczmienia, nazywając go „gramina” [119]. Później graminę znaleziono również w innych roślinach z rodziny wiechlinowatych np. w owsie (*Avena sativa* L.) [120] i miodze trzcinowatej (*Phalaris arundinacea* L.) [121], a oprócz tego także w łubinie (*Lupinus luteus* L.) [122] czy *Gymnacranthera paniculata*, drzewie z lasów deszczowych Nowej Gwinei [123].

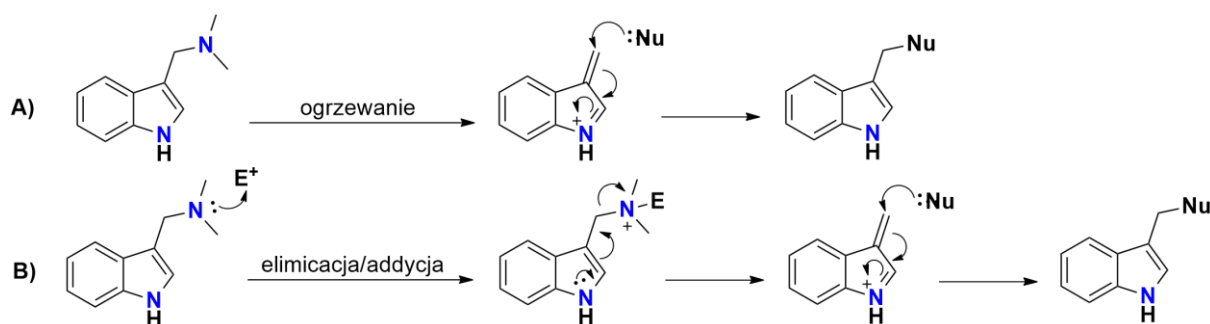


Gramina

Rysunek 11. Wzór graminy.

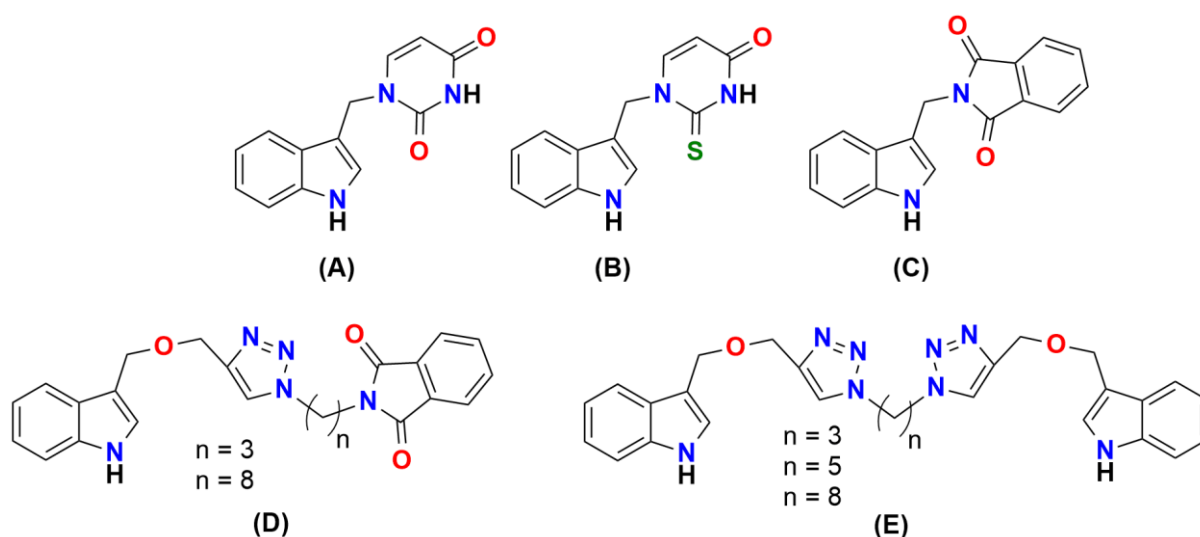
Gramina jest chętnie wykorzystywana jako związek wyjściowy w syntezie pochodnych indolowych z podstawnikiem w pozycji C3 [124–126]. Grupa dimetyloaminowa w łańcuchu bocznym indolu może łatwo odejść pod wpływem wysokiej temperatury (Rys. 12A) lub będąc najpierw przekształconą w trzeciorzędową sól amonową (będącą dobrą grupą odchodzącą) (Rys. 12B), tworząc produkt przejściowy, który następnie może reagować z nukleofilem [124,127,128].

Gramina należy do metabolitów wtórnych i pełni w roślinach rolę ochronną przed owadami, a także przeżuwaczami [129]. Ponadto wykazuje aktywność przeciwutleniającą [65] i przeciwnowotworową [130]. Może być także wykorzystywana do hamowania wzrostu alg [131] oraz wykazuje potencjał w walce z pałeczką zapalenia płuc (*Klebsiella pneumoniae*) [132].



Rysunek 12. Metody otrzymywania pochodnych graminy poprzez A) ogrzewanie graminy i B) przekształcenie graminy w sól amonową.

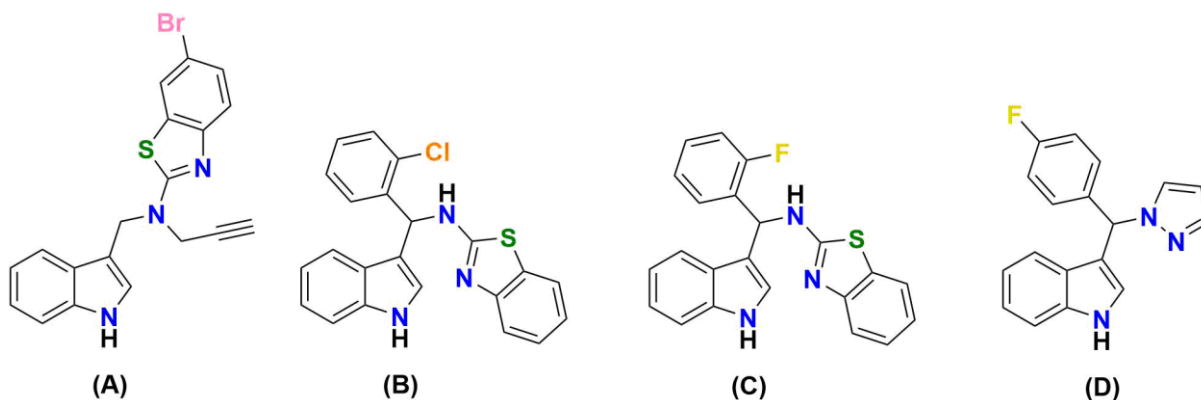
Pochodne graminy wykazują między innymi właściwości antyoksydacyjne. Chronią krwinki czerwone (RBC) przed szkodliwym działaniem wolnych rodników generowanych przez dihydrochlorek 2,2'-azobis(2-amidynopropanu) (AAPH), co wykazały badania prowadzone przez Kozanecką-Okupnik i in., Jasiewicz i in. oraz Berdzik i in. [124–126,133]. Wśród otrzymanych związków największą aktywnością, porównywalną do aktywności Troloxu (rozpuszczalnej w wodzie formy witamy E) charakteryzowały się związki zawierające w swojej strukturze w pozycji C3 indolu połączone łącznikiem metylenowym pierścieniem uracylu i tiouracylu [125] (Rys. 13A, B), a także ftalimidu (Rys. 13C) [124,]. Aktywne były także inne pochodne zawierające ugrupowanie ftalimidowe (Rys. 13D) [133] oraz takie będące dimerami indolowo-triazolowymi połączonymi różnej długości łańcuchami alkilowymi [126] (Rys. 13E).



Rysunek 13. Pochodne graminy o właściwościach antyoksydacyjnych.

Zhang i in. wychodząc z graminy zsyntezowali serię hybryd indolowo-azolowych i zbadali ich działanie przeciwko nowotworowi żołądka [134]. Związek zawierający bromobenzotiazol (Rys. 14A) najlepiej inhibitował proliferację tych komórek rakowych. To samo ugrupowanie, tj. benzotiazol, było także obecne w dwóch pochodnych otrzymanych przez Ke i in.,

które wykazywały aktywność przeciwko nowotworom żołądka i wątroby [135] (Rys. 14B, C). Jednakże związkiem o najlepszych właściwościach przeciwnowotworowych, w tym samym badaniu, była hybryda zawierająca pierścień pirazolu, inhibitując proliferację komórek raka wątroby, żołądka, a także płuc (Rys. 14D).



Rysunek 14. Pochodne graminy o właściwościach przeciwnowotworowych.

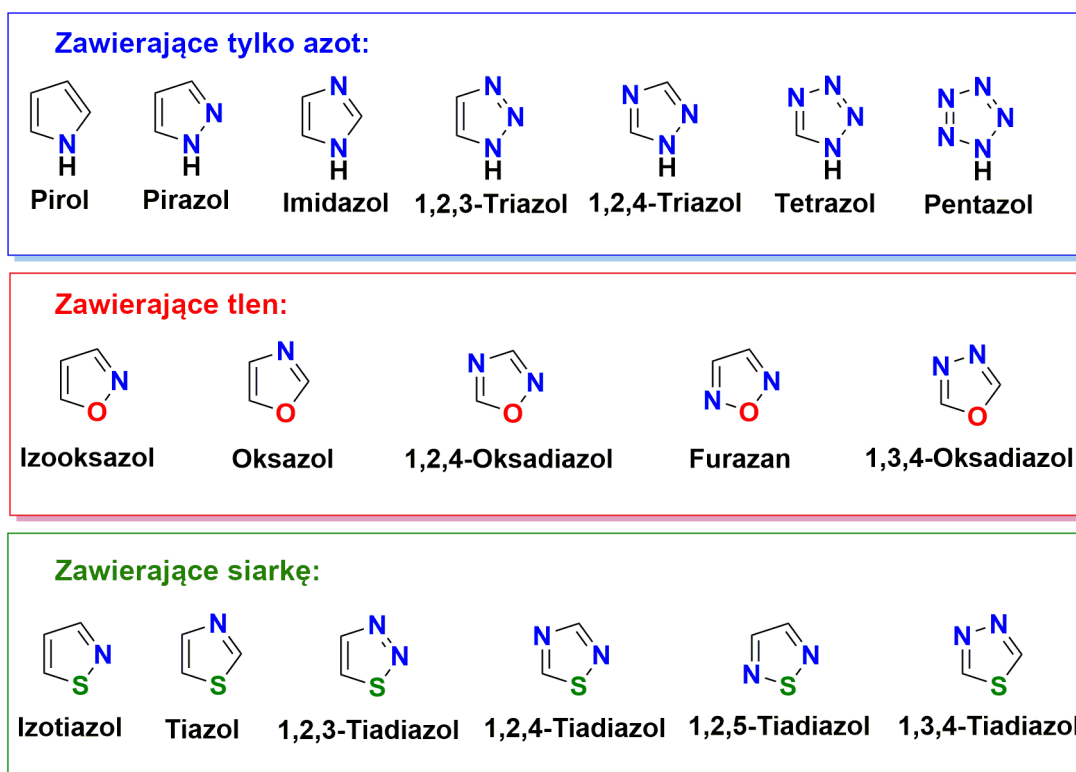
Pochodne graminy wykazują również właściwości przeciwmikrobowe. Inhibują wzrost szczepów bakterii pałeczki okrężnicy i gronkowca złocistego [136] oraz grzybów: gronowca szarego, *Fusarium culmorum* i *Zymoseptoria tritici* [137].

W 2019 roku przebadano graminę oraz grupę ponad trzydziestu jej pochodnych w kierunku działania antywirusowego przeciwko wirusowi mozaiki tytoniu, wywołującemu chorobę w roślinach z rodziny psiankowatych (*Solanaceae* Juss.) [138]. Badania te wskazały kilka związków o wyższej niż ningnanmycyna, związek referencyjny, zdolności do inhibicji tego wirusa.

Pochodne graminy otrzymane przez Wei i in. wykazały selektywne działanie hamujące przeciwko infekcjom enterowirusem 71, powodującym ciężką chorobę neurologiczną, a także choroby dłoni, stopy i jamy ustnej u dzieci [139].

4. Azole

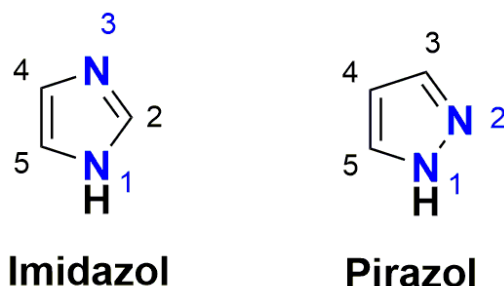
Azole są heterocyklicznymi, pięcioczłonowymi związkami zawierającymi w swojej strukturze przynajmniej jeden atom azotu [140] (Rys. 15). Mają charakter aromatyczny dzięki udziałowi wolnej pary atomu azotu, tlenu lub siarki w tworzeniu zdelokalizowanego sekstetu elektronowego [141]. Aromatyczność azoli zmniejsza się wraz ze wzrostem różnicy elektroujemności heteroatomu i sąsiadującego atomu (tiazol > imidazol > oksazol) [142].



Rysunek 15. Azole i ich podział ze względu na budowę.

Układ azolowy często występuje w środkach o działaniu zarówno przeciwgrzybicznym [143,144] jak i przeciwbakteryjnym [145]. Są one tak powszechne, że zanieczyszczenie wody w środowisku związkami zawierającymi azole jest realnym problemem, skutkującym nie tylko możliwym działaniem toksycznym dla ludzi i zwierząt, ale też podnoszeniem odporności patogenów na środki przeciwdrobnoustrojowe [146].

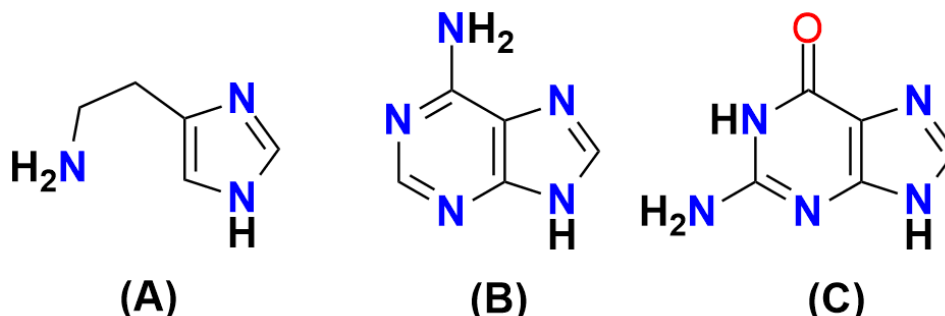
4.1. Imidazol i pirazol



Rysunek 16. Wzory imidazolu i pirazolu wraz z numeracją atomów węgla i azotu.

Jednym z najważniejszych przedstawicieli azoli jest imidazol (Rys. 16), pięciocłonowy pierścień z dwoma atomami azotu w pozycjach 1 i 3. Jego ugrupowanie znajduje się w histydynie, aminokwasie białkowym (Rys. 17A), a także jej pochodnej histaminie, hormonie

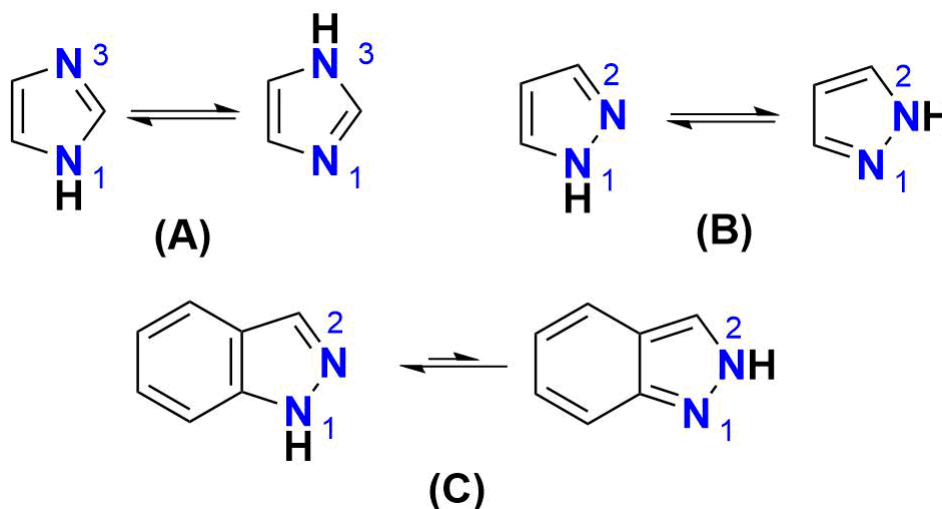
będącym podstawowym mediatorem stanu zapalnego [147]. Połączony z pirymidyną tworzy purynę [148], podstawowy szkielet adeniny i guaniny (Rys. 17B, C), związków wchodzących w skład nukleotydów kwasów nukleinowych [149].



Rysunek 17. Wzory histydyny (A), adeniny (B) i guaniny (C).

Izomerem imidazolu jest pirazol (Rys. 16), którego dwa atomy azotu znajdują się w pozycjach 1 i 2 pierścienia i są ze sobą połączone. Obecność wiązania N-N sprawia, że pirazol jest mniej stabilny niż imidazol [150] i rzadziej występuje przyrodzie [151]. Ma również wpływ na mniejszą zasadowość pirazolu - bliskość drugiego atomu azotu sprawia, że kation pirazolowy jest destabilizowany przez jego elektronoakceptorowy charakter, podczas gdy kation imidazolowy jest stabilizowany przez efekt indukcyjny. [152]

Zarówno pirazol jak i imidazol występują w dwóch nieodróżnialnych formach tautomerycznych (Rys. 18A, B), w których atom wodoru jest przeniesiony z jednego atomu azotu na drugi [153]. Formy pośrednie, niearomatyczne, są niestabilne [154]. Z kolei przykładem związku, który występuje głównie w jednej formie tautomerycznej jest indazol (benzpirazol). Z uwagi na większą aromaticzność pierścienia benzenowego preferowana jest forma z atomem wodoru przyłączonym do atomu azotu N1 (Rys. 18C) [155].

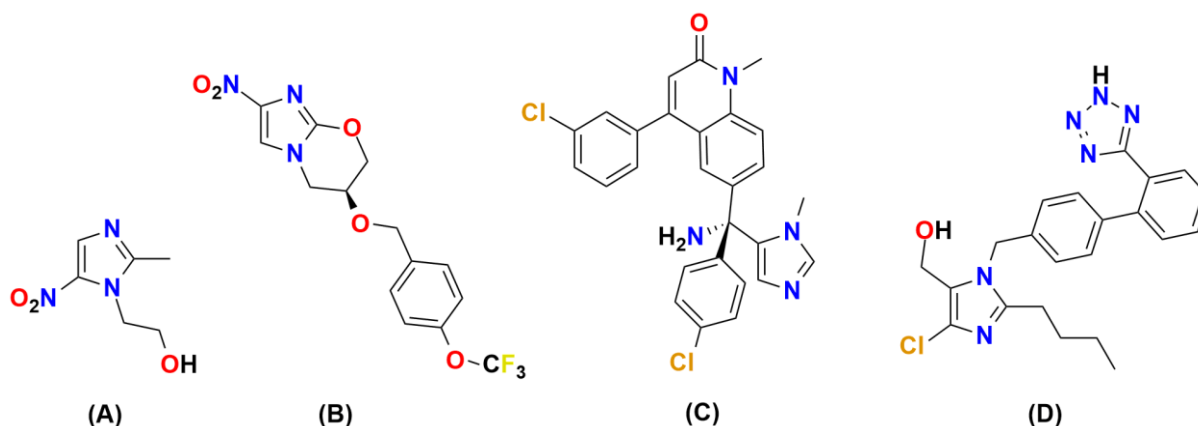


Rysunek 18. Struktury tautomeryczne imidazolu (A), pirazolu (B) i indazolu (C).

W przypadku podstawionych pochodnych pirazolu i imidazolu zazwyczaj dominuje jedna z form tautomerycznych. Przykładowo, w podstawieniu w pozycji C3(5) pirazolu, podstawniki wyciągające elektrony preferują pozycję C3, a te dostarczające elektrony – C5 [153]. W 4(5)-nitro- i 4(5)-fenyloimidazolu natomiast dominują formy podstawione w pozycji C4 [153,156].

4.1.1. Właściwości biologiczne imidazoli

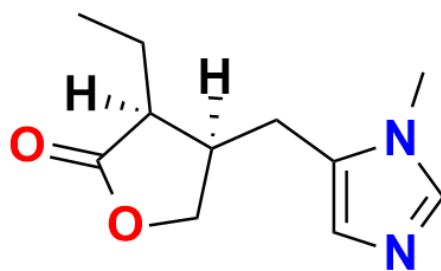
Pochodne imidazolu wykazują wiele właściwości biologicznych i od lat cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców [157–160]. Są wykorzystywane między innymi jako leki. Przykładem mogą być metronidazol (Rys. 19A) [161] i pretomanid (Rys. 19B) [162], będące antybiotykami, tipifarnib (Rys. 19C) [163] o działaniu przeciwnowotworowym czy losartan, stosowany w leczeniu nadciśnienia tętniczego (Rys. 19D) [164].



Rysunek 19. Leki zawierające w strukturze imidazol: metronidazol (A), pretomanid (B), tipifarnib (C), losartan (D).

Związki zawierające pierścień imidazolu powszechnie występują w naturze w postaci alkaloidów imidazolowych [165]. Wyizolowano je między innymi z pieprzycy peruwiańskiej (*Lepidium meyenii*) [166], drzew z rodziny rutowatych (*Rutaceae*) [167] i organizmów morskich, takich jak gąbki [168].

Pilocarpina jest naturalnym alkaloidem imidazolowym, który znalazł zastosowanie w medycynie. Ten pochodzący z potoślinu jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) związek jest agonistą receptorów muskarynowych i wywołuje pobudzenie gruczołów ślinowych, potowych i łzowych [169]. Dlatego też wykorzystywany jest w leczeniu jaskry [170] i starczowzroczności [171] oraz suchości jamy ustnej [172].



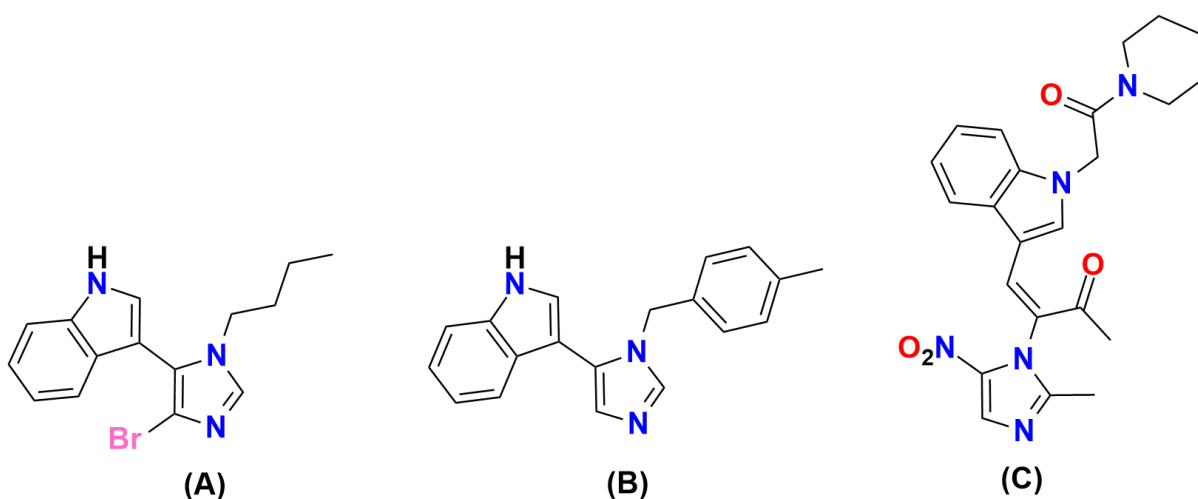
Pilokarpina

Rysunek 20. Wzór pilokarpiny.

Koniugaty zawierające w swojej strukturze pierścień imidazolowy wykazują właściwości przeciwutleniające [173,174], przeciwbakteryjne [174,175], przeciwgrzybiczne [176,177], przeciwnowotworowe [178,179] oraz przeciwwirusowe [180,181].

Gao i in. zsyntezowali serię hybryd indolowo-imidazolowych i zbadali ich aktywność przeciwko sześciu szczepom grzybów [182]. Jeden z otrzymanych związków (Rys. 21A) inhibował wzrost *Gibberella zeae* w 88%, lepiej od wszystkich stosowanych leków. Z kolei inna pochodna (Rys. 21B) wykazała najwyższą aktywność (97%) przeciwko *Alternaria Leaf Spot*. Generalnie związki zawierające w swojej strukturze atom halogenu miały większe właściwości grzybobójcze niż pozostałe hybrydy.

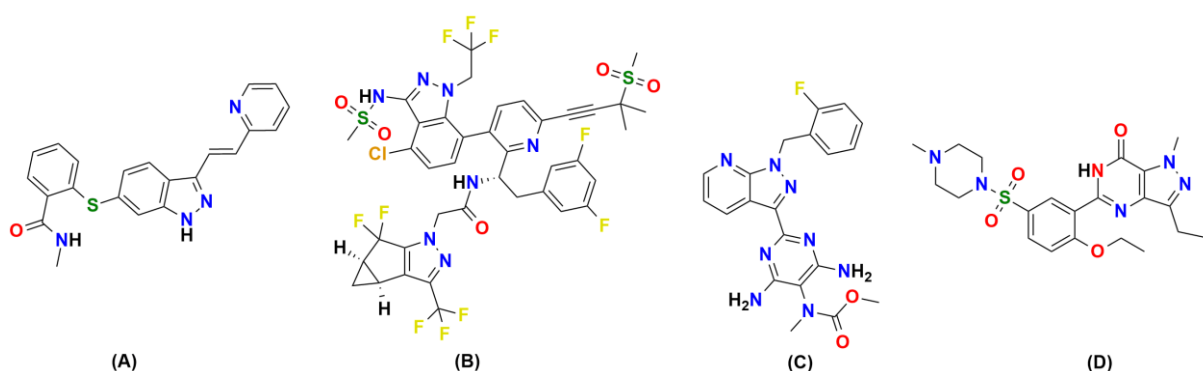
W innych badaniach, Li i in. otrzymali koniugat zawierający pierścienie indolu, imidazolu i piperydyny (Rys. 21C), który w zadowalającym stopniu powstrzymywał wzrost odpornego na metycylinę gronkowca złocistego [183].



Rysunek 21. Koniugaty indolowo-imidazolowe o właściwościach przeciwgrzybiczych.

4.1.2. Właściwości biologiczne pirazoli

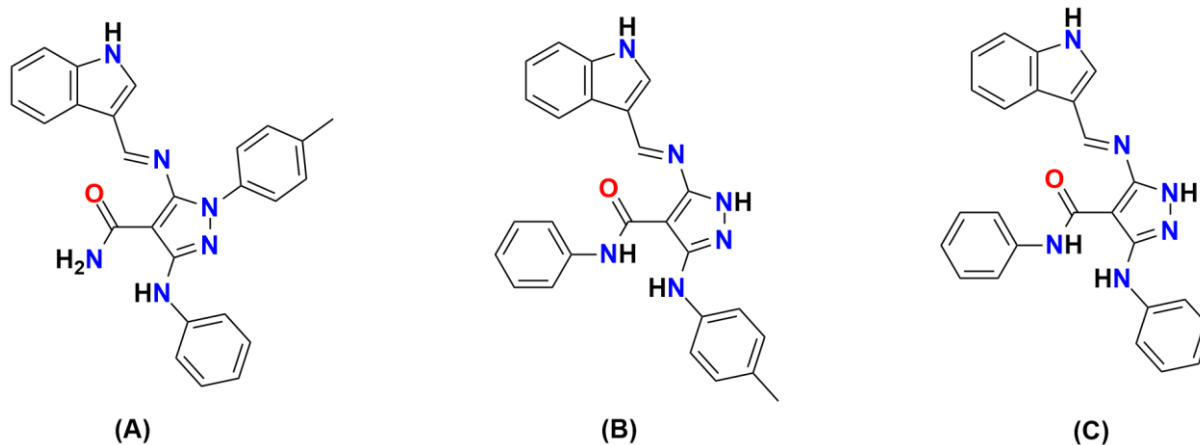
Pirazol jest obecny w wielu lekach o różnym działaniu, między innymi przeciwzapalnym, antybakteryjnym czy przeciwbólowym [184–186]. Wśród zaakceptowanych do użytku farmaceutyków zawierających w swojej strukturze pierścień pirazolu są: aksytynib (Rys. 22A), stosowany w leczeniu raka nerki [187], lenacapawir (Rys. 22B) jako środek przeciwko HIV/AIDS [188], riociguat (Rys. 22C), będący lekiem na nadciśnienie płucne [189] lub sildenafil (Rys. 22D) (znany pod nazwą handlową “Viagra”), używany w przypadku zaburzeń erekcji [190].



Rysunek 22. Wzory leków zawierających pirazol: aksytynib (A), lenacapawir (B), riociguat (C), sildenafil (D).

Jednym z celów syntezy związków hybrydowych pirazoli jest poszukiwanie nowych leków o właściwościach przeciwnowotworowych [191,192], przeciwmikrobowych [193,194] i przeciwcukrzycowych [195]. Hybrydy pirazolowe wykazują także aktywność antyoksydacyjną [196,197] i przeciwzapalną [198].

Jeden z koniugatów indolowo-pirazolowych otrzymanych przez Naglah i in. (Rys. 23A) charakteryzował się dobrym działaniem przeciwcukrzycowym i przeciwzapalnym [199]. Podobny związek (różniący się położeniem grupy fenolowej) oraz jego analog (Rys. 23B, C) inhibitowały wzrost czterech badanych szczepów bakterii (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*) [200] oraz wykazywały właściwości przeciwnowotworowe przeciwko rakowi wątroby [84]. Powyższe przykłady pokazują jak szerokie zastosowanie mogą mieć hybrydy indolowo-pirazolowe.

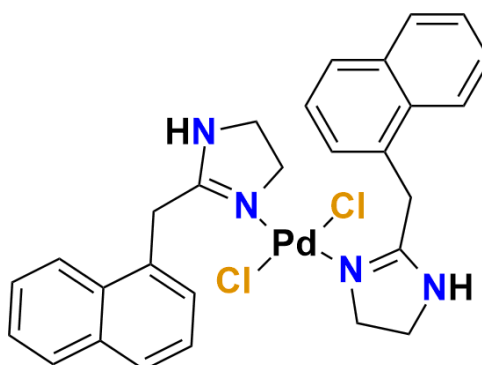


Rysunek 23. Koniugaty indolowo-pirazolowe o działaniu biologicznym.

4.2. Związki kompleksowe imidazolu

Jednym z często występujących oddziaływań w metaloproteinach jest oddziaływanie między jonem metalu a fragmentem histydyny – imidazolem [201]. Atom azotu, którego wolna para elektronowa nie bierze udziału w tworzeniu układu aromatycznego, może tworzyć związki kompleksowe z metalami [202]. Przykładem są anhidrazy węglanowe, enzymy katalizujące odwracalną reakcję powstawania jonu wodorowęglanowego z wody i dwutlenku węgla. W ich centrum aktywnym znajduje się atom cynku, skoordynowany z trzema atomami azotu z imidazolowego fragmentu histydyny oraz z jedną cząsteczką wody [203].

Jedną ze strategii otrzymywania związków biologicznie aktywnych jest synteza związków kompleksowych – układów o lepszych właściwościach biologicznych i fizyko-chemicznych niż związki wyjściowe. Znanych jest wiele kompleksów pochodnych imidazolu z metalami wykazujących aktywność przeciwnowotworową [204,205], przeciwzapalną [206] i przeciwbakteryjną [207].



Rysunek 24. Kompleks nafazoliny z Pd (II).

Nafazolina jest lekiem stosowanym w leczeniu kataru, zapalenia zatok i spojówek, zawierającym w swojej strukturze pierścień imidazoliny, będący częściowo uwodornioną pochodną imidazolu [208]. Ramezanpour i in. otrzymali kompleks nafazoliny z palladem (II) (Rys. 24) i wykazali jego działanie przeciwnowotworowe przeciwko nowotworom szyjki macicy i piersi [204].

Skuteczność przeciwko nowotworowi piersi wykazywały także kompleksy pochodnych imidazolu z cynkiem (II) i miedzią (II), otrzymane przez Mahdy i in. [205]. Te zawierające atom miedzi charakteryzowały się nie tylko silną inhibicją komórek nowotworowych, ale też wysoką selektywnością. Dodatkowo, wszystkie otrzymane kompleksy były bardziej stabilne termicznie niż wyjściowe ligandy.

Wyniki badań

Stres oksydacyjny powstaje w momencie, gdy w organizmie zaburzona jest równowaga między utleniaczami a przeciwutleniaczami, na korzyść tych pierwszych. Do oksydantów zalicza się reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*), zarówno rodnikowe (anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$, hydroksylowy OH^{\cdot} , nadtlenkowy RO_2^{\cdot} , wodoronadtlenkowy HO_2^{\cdot}), jak i nierodnikowe (nadtlenek wodoru H_2O_2 , tlen singletowy 1O_2 , kwas podchlorawy $HOCl$ i ozon O_3). Powstają one w organizmie w procesach enzymatycznych i nieenzymatycznych, ale mogą także pochodzić ze źródeł zewnętrznych, takich jak żywność, promieniowanie UV lub zanieczyszczenie środowiska [209].

W organizmie żywym komórki za pomocą szeregu mechanizmów antyoksydacyjnych są w stanie neutralizować wolne rodniki lub minimalizować ich powstawanie. Za usuwanie ROS z systemów biologicznych są odpowiedzialne między innymi enzymatyczne przeciwutleniacze. Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje konwersję $O_2^{\cdot-}$ do H_2O_2 , podczas gdy H_2O_2 może zostać zredukowany do wody przez katalazę lub peroksydazę glutationową. Z kolei rodniki hydroksylowe, które są generowane w reakcji Fentona z H_2O_2 w obecności $Fe(II)$ lub $Cu(I)$, są neutralizowane przez peroksydazę glutationową [210].

Oprócz wspomnianych wyżej mechanizmów endogennych, antyoksydanty mogą być także dostarczane do organizmu z zewnątrz, w pożywieniu czy kosmetykach. Najpopularniejszymi przeciwutleniaczami obecnymi w diecie są witaminy A, C i E, a także flawonoidy i alkaloidy [211,212].

Jedną z grup alkaloidów wykazujących właściwości antyoksydacyjne są alkaloidy indolowe [213]. Poszukując nowych związków o aktywności przeciwutleniającej, **za cel swojej pracy doktorskiej wybrałam syntezę koniugatów indolowo-azolowych, w których ugrupowanie azolowe połączone jest z pierścieniem indolowym w pozycji C3 łącznikiem metylenowym.**

Określiłam właściwości hemolityczne związków, ich zdolność do chelatowania jonów żelaza Fe^{+2} oraz aktywność cytoprotekcyjną w warunkach indukowanego stresu oksydacyjnego.

Dodatkowo przeanalizowałam właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze związków, a także ich parametry fizykochemiczne, pozwalające określić podobieństwo otrzymanych pochodnych do leków. Wykorzystanie dokowania molekularnego pozwoliło na poznanie powinowactwa koniugatów do enzymów uczestniczących w stresie oksydacyjnym.

Dzięki przeprowadzonej kompleksowej analizie aktywności biologicznej i właściwości fizykochemicznych otrzymanych pochodnych została określona zależność między strukturą chemiczną związku a jego właściwościami biologicznymi.

5. Synteza

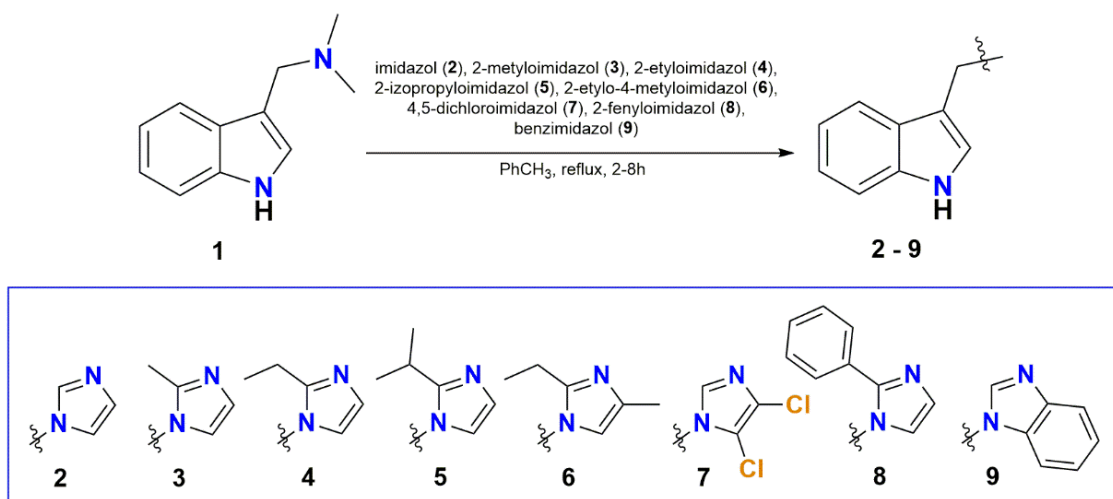
5.1. Synteza koniugatów indolowych

Związkiem wyjściowym w moich syntezach była gramina (**1**), alkaloid indolowy szerzej omówiony w części literaturowej pracy. Grupa dimetyloaminowa w pozycji C3 pierścienia indolowego w graminie pod wpływem temperatury ($>80^{\circ}\text{C}$) łatwo odchodzi, a powstały produkt pośredni chętnie reaguje z nukleofilem [128]. Dlatego funkcjonalizacja tej pozycji jest bardzo dobrym sposobem syntezy bardziej złożonych struktur lub związków wyjściowych do dalszej modyfikacji. Mechanizm przeprowadzonych przeze mnie reakcji został przedstawiony na Rysunku 12A.

Otrzymane koniugaty ze względu na strukturę można podzielić na trzy grupy:

- 1) indolowo-imidazolowe (**2 – 9**),
- 2) indolowo-azolowe z grupą tionową w pozycji C2/C3 azolu (tioketony) (**10 – 23**),
- 3) indolowo-pirazolowe (**24 – 40**).

Związki **2**, **9**, **24** i **29** były już wcześniej opisane w literaturze w publikacjach autorstwa Jasiewicz i in. (**2**) [124], Pillaiyar i in. (**9**) [214] oraz Cravotto i in. (**24**, **29**) [215]. Jednak ze względu na przeprowadzenie dodatkowych badań biologicznych (**2**, **9**, **24**, **29**), określenie struktury krystalograficznej (**24**, **29**) oraz dokładniejszy opis syntezy (**24**, **29**) zostały uwzględnione w tym opracowaniu.

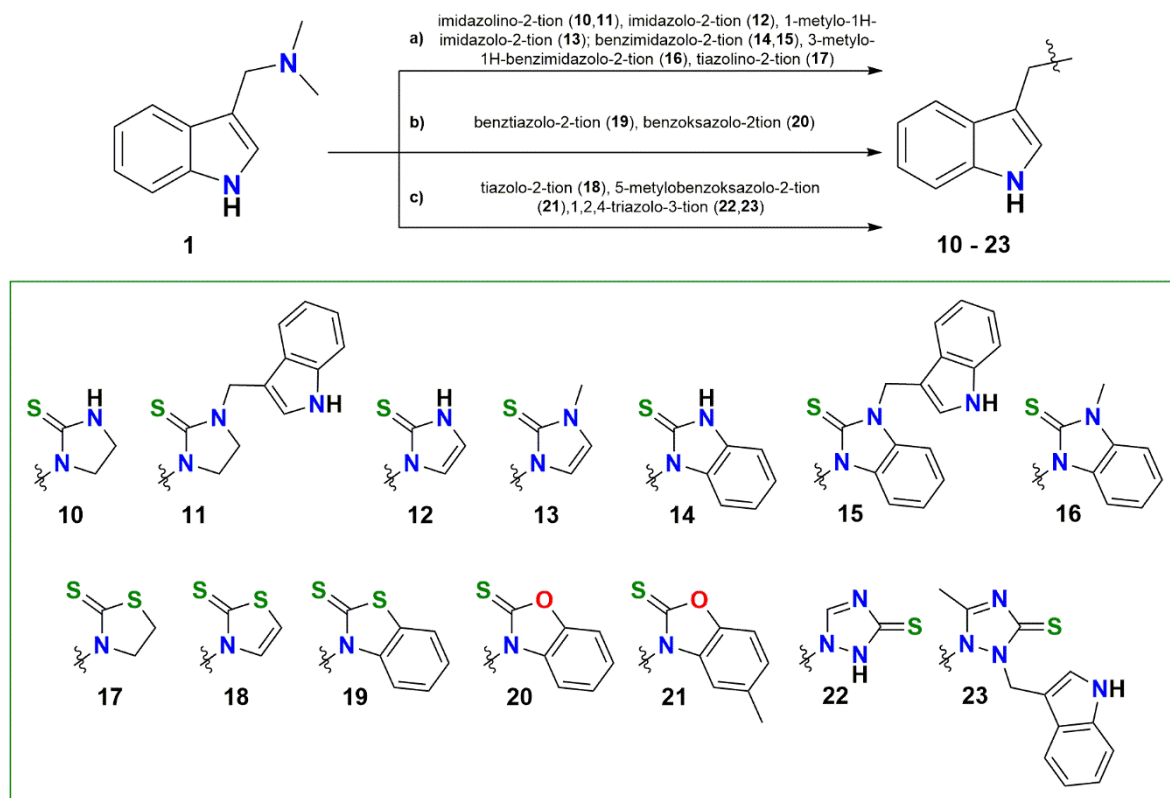


Schemat 1. Schemat syntezy koniugatów indolowo-imidazolowych **2 – 9**.

Pierwszą grupę otrzymanych przeze mnie związków stanowią koniugaty indolowo-imidazolowe (**2 – 9**). Otrzymałam je w wyniku reakcji graminu z odpowiednim substratem imidazolowym. Reakcja prowadzona była w temperaturze wrzenia toluenu przez 2-8 godzin (Schemat 1). Większość otrzymanych pochodnych to ciała stałe. Wyjątkiem był koniugat graminu z 4,5-dichloroimidazolem (**7**), który miał postać ciemnoróżowego oleju. Dla czterech

z otrzymanych ośmiu pochodnych, po krystalizacji z toluenu, możliwe było wykonanie badań krystalograficznych.

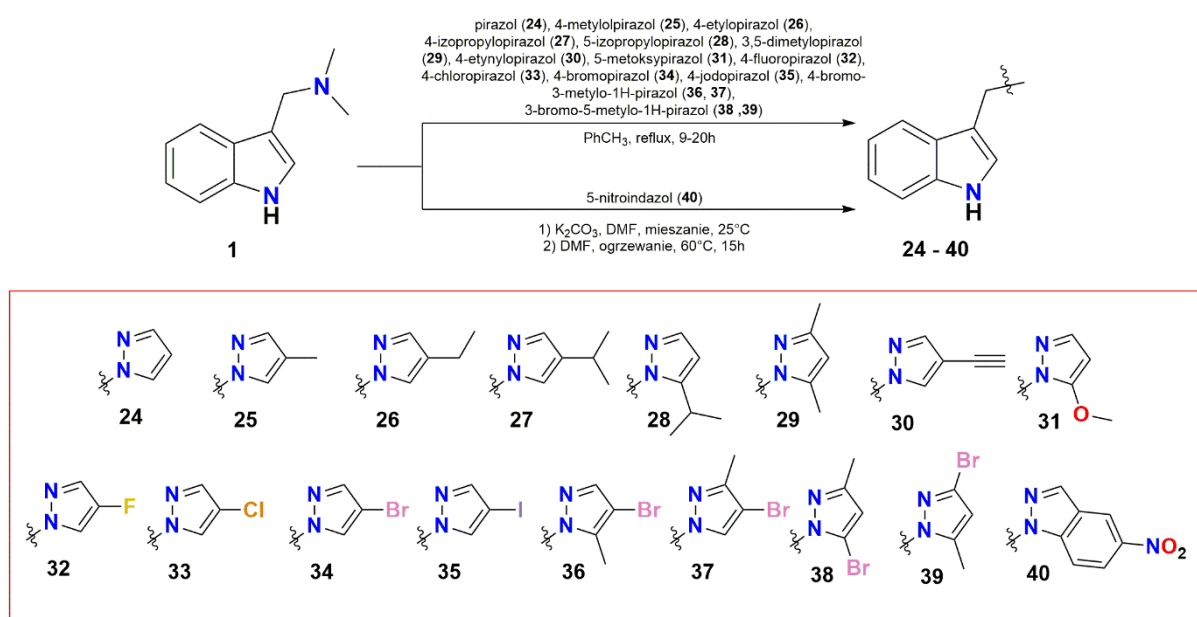
Stosując takie same warunki reakcji otrzymałam związki **19** i **20**, należące do drugiej grupy pochodnych. Syntezy pozostałych koniugatów indolowo-tioketonowych prowadzone były w etanolu, przy czym związki **10** – **17** wymagały warunków zasadowych i nadmiaru substratu azolowego (Schemat 2). Co ciekawe, w syntezach z imidazolino-2-tionem, 2-merkaptobenzimidazolem i 3-merkapto-1,2,4-triazolem oprócz przewidywanych produktów (**10**, **14**, **22**) otrzymałam także pochodne dimeryczne z dwoma ugrupowaniami indolowymi przyłączonymi do dwóch atomów azotu pierścienia azolowego (**11**, **15**, **23**). Związki **22** i **23** rozdzieliłam za pomocą chromatografii kolumnowej. W przypadku koniugatów **10**, **11**, **14** i **15** najpierw podczas krystalizacji tworzył się dimer (**11**, **15**), a po odsączeniu go, z pozostawionego przesączu wypadał monomer (**10**, **14**).



Schemat 2. Schemat syntezy koniugatów indolowo-tioketonowych **10** – **23**. Warunki reakcji: a) pierwszy etap: EtOH, NaOH, drugi etap: EtOH, reflux, 3 – 14 h (gramina:azol 1:2); b) PhCH₃, reflux, 2 – 8 h; c) EtOH, reflux, 5 – 10 h.

Syntezy pochodnych trzeciej grupy (reakcje graminy z pochodnymi pirazolu) prowadzone były w takich samych warunkach w jakich prowadziłam syntezę pochodnych pierwszej grupy. Czas reakcji, w porównaniu do syntez z imidazolami, był jednak znacznie dłuższy. Stosowałam także dwukrotny nadmiar pochodnej azolowej (Schemat 3). Niektóre z wykorzystanych substratów były niesymetryczne, co sugerowało możliwość otrzymania dwóch produktów

reakcji. Jednak w reakcjach graminy z 5-izopropylpirazolem i 5-metoksypirazolem powstawał jeden produkt, z podstawnikiem w pozycji C5 (28, 31). Jest to zgodne z tendencją pirazolu do występowania w formie tautomerycznej podstawionej elektronodonorowym podstawnikiem w tej pozycji [153]. W przypadku reakcji graminy z 4-bromo-3-metylopirazolem otrzymałam dwa produkty reakcji, związki 36 i 37, w stosunku 0,36:0,64. Związki te rozdzieliłam chromatograficznie. Natomiast reakcja graminy z 4-bromo-5-metylopirazolem zdawała się dawać tylko jeden produkt, z grupą metylową w pozycji C5 pirazolu, co sugerowały widma NMR, na których brak było sygnałów innych niż pochodzących od związku 38. Koniugat 39 został zidentyfikowany dopiero dzięki badaniom krystalograficznym. Okazało się, że kryształy związku 38 są mieszaniną dwóch tautomerów: związków 38 i 39, w stosunku 0,92:0,08.



Schemat 3. Schemat syntezy koniugatów indolowo-pirazolowych 24 – 40.

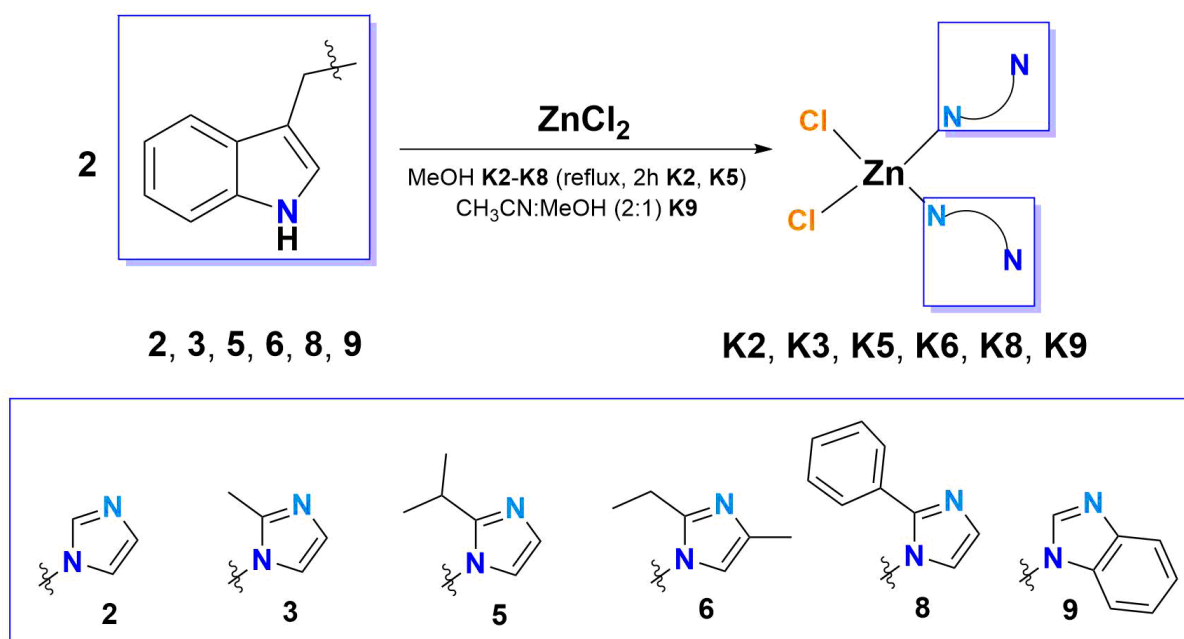
5.2. Synteza kompleksów koniugatów indolowo-imidazolowych z chlorkiem cynku

Cynk należy do grupy biometali, a jego jony są obecne w centrach aktywnych wielu enzymów, pełniąc rolę kofaktora i stabilizując ich strukturę [216]. Jest wykorzystywany w procesach komórkowych, występuje w strukturze tkanki kostnej, a także jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego [217]. Działanie antyoksydacyjne cynku związane jest z jego zdolnością do inhibicji oksydazy NADPH (proutleniającego enzymu), stabilizacji struktury molekularnej błony komórkowej oraz indukcji syntezy metalotionein (białek uczestniczących w detoksykacji organizmów) [218].

Kompleksy związków organicznych z cynkiem wykazują właściwości przeciwutleniające, przeciwnowotworowe i przeciwmikrobowe [206,219–222]. Ich aktywność często jest porównywalna lub wyższa od aktywności ligandów wyjściowych. Bardzo często są też bardziej

biodostępne, selektywne i wykazują mniej skutków ubocznych. Tak jest w przypadku kompleksu indometacyny (niesteroidowego leku przeciwzapalnego) z cynkiem, który zachowuje jej właściwości, jednocześnie zmniejszając toksyczność względem układu pokarmowego [223].

Koniugaty indolowo-imidazolowe, dzięki obecności wolnej pary elektronowej na atomie azotu w pierścieniu imidazolu mogą tworzyć związki kompleksowe z solami metali. Do swoich syntez wybrałam chlorek cynku, ze względu na wspomniane wyżej właściwości cynku, a także obecność przeciwjonu chlorkowego w środowisku zarówno zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowym.



Schemat 4. Schemat syntezy kompleksów koniugatów indolowo-imidazolowych z chlorkiem cynku.

Synteza kompleksów **K2** – **K9** przedstawiona została na Schemacie 4. Wszystkie reakcje prowadzone były poprzez mieszanie substratów w stosunku 2:1 (koniugat: $ZnCl_2$) w metanolu (**K2** – **K8**) lub w mieszaninie $CH_3CN:MeOH$ (2:1) (**K9**). W przypadku syntezy dwóch związków kompleksowych (**K2** i **K5**) konieczne było ogrzewanie mieszaniny. Po kilku dniach krystalizacji otrzymałam kompleksy **K2** – **K9**, przy czym związki **K2** i **K9** wymagały dodatkowej krystalizacji z MeOH.

5. Analiza spektroskopowa otrzymanych związków

Struktury wszystkich otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą analizy spektroskopowej (spektroskopia FT-IR i 1H NMR, ^{13}C NMR) oraz spektrometrii mas.

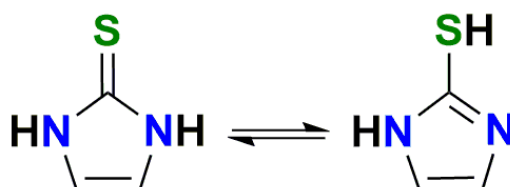
W widmach ^1H NMR wszystkich nowo zsyntetyzowanych związków (**2** – **40**) obecne są sygnały diagnostyczne dla protonów układu indolowego w zakresie 6.20 – 7.85 ppm. Ponadto, w obszarze aromatycznym obserwuje się sygnały pochodzące od protonów pierścieni: imidazolowego (6,69 – 8,19 ppm; **2** – **8**, **K2** – **K8**), benzimidazolowego (7,17 – 8,78 ppm; **9**, **K9**), pirazolowego (5,61 – 8,02 ppm; **24** – **38**), indazolowego (8,03 – 8,80 ppm; **40**), imidazolino-2-tionowego (3,22 – 3,39 ppm; **11**, **12**), imidazolo-2-tionowego (6,86 – 7,04 ppm **13**, **14**), benzimidazolo-2-tionowego (7,10 – 7,98 ppm; **14** – **16**), tiazolino-2-tionowego (3,20 – 3,93; **17**), tiazolo-2-tionowego (6,94 – 7,56, **18**), benzotiazolo-2-tionowego (7,30 – 7,84; **19**), benzok-sazolo-2-tionowego (7,07 – 7,84; **20**, **21**) oraz 1,2,4-triazolo-3-tionowego (8,36 – 8,37 ppm; **22**, **23**).

Charakterystyczny singlet pochodzący od protonu grupy NH układu indolowego znajduje się przy ok. 11 ppm, natomiast w związkach zawierających pierścień imidazolino-2-tionowy (**11**), imidazolo-2-tionowy (**13**) i 1,2,4-triazolo-3-tionowy (**22**) sygnał od protonu grupy NH azolu obecny jest w przedziale 12 – 14 ppm. We wszystkich widmach obecny jest także singlet przy ok. 5 ppm, pochodzący od dwóch protonów mostka metylenowego. Przy niższych wartościach przesunięcia chemicznego (1 – 4 ppm) obserwujemy sygnały pochodzące od protonów podstawników alkilowych (**3** – **6**, **13**, **16**, **21**, **25** – **31**, **36** – **38**).

W widmach ^{13}C NMR wszystkich analizowanych pochodnych sygnały pochodzące od atomów węgla pierścienia indolowego obserwowane są w zakresie 108 – 138 ppm. Sygnały przy około 118 – 152 ppm zostały przypisane do atomów węgla pierścienia imidazolowego (**2** – **8**, **K2** – **K8**), przy 108-146 ppm do atomów węgla pierścienia benzimidazolowego (**9**, **K9**), a przy 101 – 154 i 109 – 142 ppm do atomów węgla odpowiednio pierścienia pirazolowego (**24** – **38**) i indazolowego (**40**).

W przypadku koniugatów drugiej grupy, sygnały od atomów węgla pierścieni azolowych znajdują się w zakresie 110 – 142 ppm (**12**, **13**, **18**, **22**, **23**), a od atomów węgla pierścieni benzazolowych przy 109 – 147 pmm (**14** – **16**, **19** – **21**).

Charakterystyczne sygnały dla atomów węgla grup tiokarbonylowych (**11** - **23**) znajdują się w zakresie 150 – 194 ppm. Związki, które mogłyby występować w dwóch formach tautomerycznych, tiolowej i tionowej (**10**, **12**, **14**, **22**, **23**), przybierają postać tioketonową, co jest zgodne z danymi literaturowymi (Rys. 25). Forma ta jest bowiem dominująca w rozpuszczalnikach polarnych i w stanie stałym [224,225].



Rysunek 25. Struktury tautomeryczne 2-merkaptimidazolu. W rozpuszczalnikach polarnych i ciałach stałych dominuje forma tionowa związku (po lewej).

Sygnały od atomu węgla mostka metylenowego obecne są przy ok. 40 ppm. Ponadto w widmach ^{13}C NMR pochodnych **3 – 6**, **25 – 29**, **36 – 38** widoczne są sygnały pochodzące od atomów węgla podstawników alkilowych odpowiednio przy: 8,69 – 20,92 dla grup $-\text{CH}_3$, przy 58,81 ppm dla grupy metoksylowej oraz w zakresie 31,16 – 34,38 ppm dla grup *N*-metylowych. Wartości przesunięć chemicznych atomów węgla grupy $-\text{C}\equiv\text{CH}$ (**30**) wynoszą odpowiednio 75,75 i 80,77 ppm.

W widmach ^{13}C NMR pochodnych zawierających atom halogenu w pierścieniu pirazolowym sygnał pochodzący od atomu węgla związanego z atomem Cl znajduje się przy 107,82 ppm (**33**), a z atomem Br przy 91,49 – 118,67 ppm (**34**, **36 – 38**). W przypadku pochodnych z atomem fluoru (**32**) i jodu (**35**) obserwujemy rozszczenie sygnałów atomów węgla. Sygnały te znajdują się odpowiednio przy 147,71, 150,12 oraz 56,52, 56,46 ppm.

Wartości przesunięć chemicznych w widmach NMR (zarówno ^1H jak i ^{13}C) otrzymanych związków kompleksowych minimalnie różniły się od wartości przesunięć chemicznych odpowiednich ligandów, co jest dowodem na to, że reakcja kompleksowania nie powoduje zmiany konformacji koniugatów indolowo-azolowych.

W widmach FT-IR otrzymanych koniugatów obecne jest charakterystyczne pasmo absorpcji przy $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ pochodzące od drgań rozciągających grupy NH niepodstawionego pierścienia indolu. W przypadku kompleksów (**K2 – K9**) pasmo to jest szersze i przesunięte w stronę niższych wartości liczby falowej, co ma związek z obecnością wiązań wodorowych stabilizujących strukturę cząsteczki.

Aromatyczny charakter związków został potwierdzony przez obecność pasm absorpcji przy $2800\text{ – }3050\text{ cm}^{-1}$, odpowiadającym drganiom rozciągającym grupy C-H oraz przy ok. 1600 cm^{-1} i 1500 cm^{-1} , pochodzącym od drgań rozciągających wiązania C-C pierścienia aromatycznego.

W widmie FT-IR związku **30** obserwowane jest pasmo absorpcji przy 2117 cm^{-1} , odpowiadające drganiom rozciągającym grupy $\text{C}\equiv\text{C}$. Pasma absorpcji pochodzące od drgań rozciągających $\text{C}=\text{C}$ są obserwowane w tym samym regionie co pasma absorpcji grupy $\text{C}=\text{N}$ ($1500\text{ – }1660\text{ cm}^{-1}$).

W widmach koniugatów drugiej grupy, w zakresie $1000\text{ – }1300\text{ cm}^{-1}$, obecne są także pasma absorpcji przypisywane drganiom rozciągającym wiązania $\text{C}=\text{S}$. Ponadto w widmach wszystkich związków obserwujemy dwa pasma absorpcji charakterystyczne dla pierścienia indolowego, przy ok. 620 cm^{-1} i 575 cm^{-1} .

W widmach EI-MS wszystkich nowo zsyntetyzowanych koniugatów obecne są sygnały odpowiadające jonom molekularnym oraz sygnał przy $m/z = 130$ ($\text{C}_9\text{H}_8\text{N}^+$) pochodzący od fragmentu indolowego.

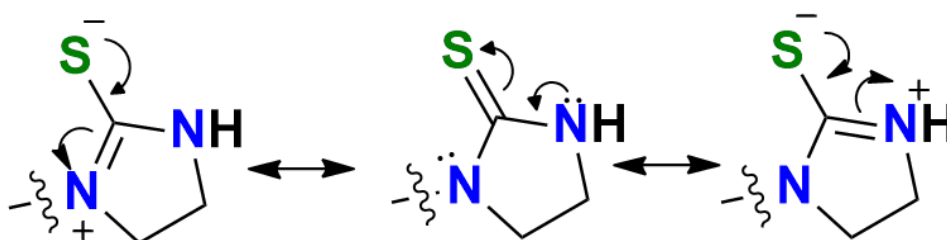
6. Struktura w kryształach

Dla większości otrzymanych przez mnie koniugatów indolowych (**4**, **5**, **8**, **10**, **12**, **13**, **15** – **20**, **24** – **29**, **32** – **35** i **38**, **39**) oraz dla pięciu kompleksów (**K2**, **K3**, **K5**, **K6**, **K8**) możliwe było wykonanie analizy krystalograficznej.

Analiza RTG otrzymanych pochodnych wykazała, że główny szkielet wszystkich analizowanych koniugatów składa się z dwóch podjednostek połączonych mostkiem metylenowym, z których każda zawiera pierścienie aromatyczne. Związki **4**, **24**, **26** i **32** krystalizują jako dwie niezależne cząsteczki, natomiast **38** i **39** krystalizują razem w stosunku 0,92 : 0,08.

W związkach pierwszej grupy (**4**, **5** i **8**) pierścien imidazolowy leży prawie w płaszczyźnie łącznika metylenowego, a fragment indolowy jest znacznie poza tą płaszczyzną. Związki te są zaangażowane głównie w wiązania wodorowe N-H...N, łączące cząsteczki w długie łańcuchy.

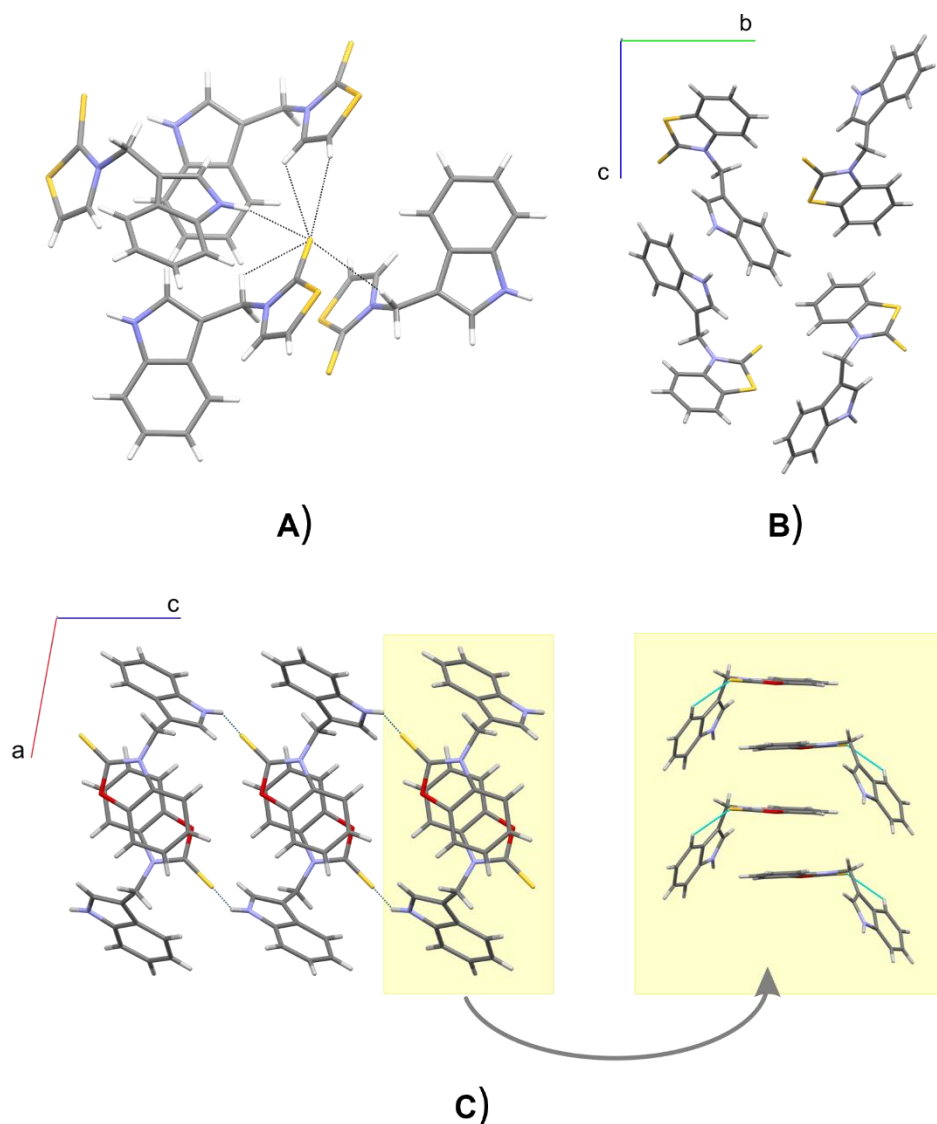
Wszystkie pochodne drugiej grupy występują w ciele stałym, podobnie jak w roztworze, w formie tionej. Średnia wartość długości wiązania C=S w koniugatach **10**, **12**, **13**, **15** i **16** wynosi 1,685(7) Å (wartość leżąca pomiędzy wartościami typowymi dla wiązań pojedynczych i podwójnych). Jest to prawdopodobnie efekt obecności struktur zwitterjonowych w cząsteczce (Rys. 26).



Rysunek 26. Struktury rezonansowe w imidazolino-2-tionie.

Na szczególną uwagę zasługuje konformacja związku **18**, zawierającego pierścien imidazolo-2-tionowy. Jak pokazano na Rys. 27A, grupa tiokarbonylowa tej pochodnej może pełnić rolę akceptora pięciu wiązań wodorowych. W przeciwieństwie do związku **18**, w pochodnej **19** z ugrupowaniem benzimidazolo-2-tionowym grupa C=S nie bierze udziału w oddziaływaniach międzycząsteczkowych. W związku tym pierścien indolowy leży blisko płaszczyzny metylenowej a grupa benzotiazolo-2-tionowa jest poza tą płaszczyzną. Taka konformacja sprzyja tworzeniu wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego między grupą metylenową C-H będącą donorem a grupą S=C pełniącą rolę akceptora (Rys. 27B). W przypadku koniugatu **20** oba pierścienie, indolowy i benzoksazolo-2-tionowy, są prawie prostopadłe do płaszczyzny metylenowej, co jest mniej korzystne dla tworzenia wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego C-H...S. Grupa S=C w związku **20** tworzy wiązania wodorowe z ugrupowaniem N-H kolejnych cząsteczek (Rys. 27C), podczas gdy donorowa grupa N-H w kryształach **19** zaangażowana jest

w międzycząsteczkowe oddziaływania $N-H \cdots \pi$ z częścią benzenową pierścienia indolowego innej cząsteczki.

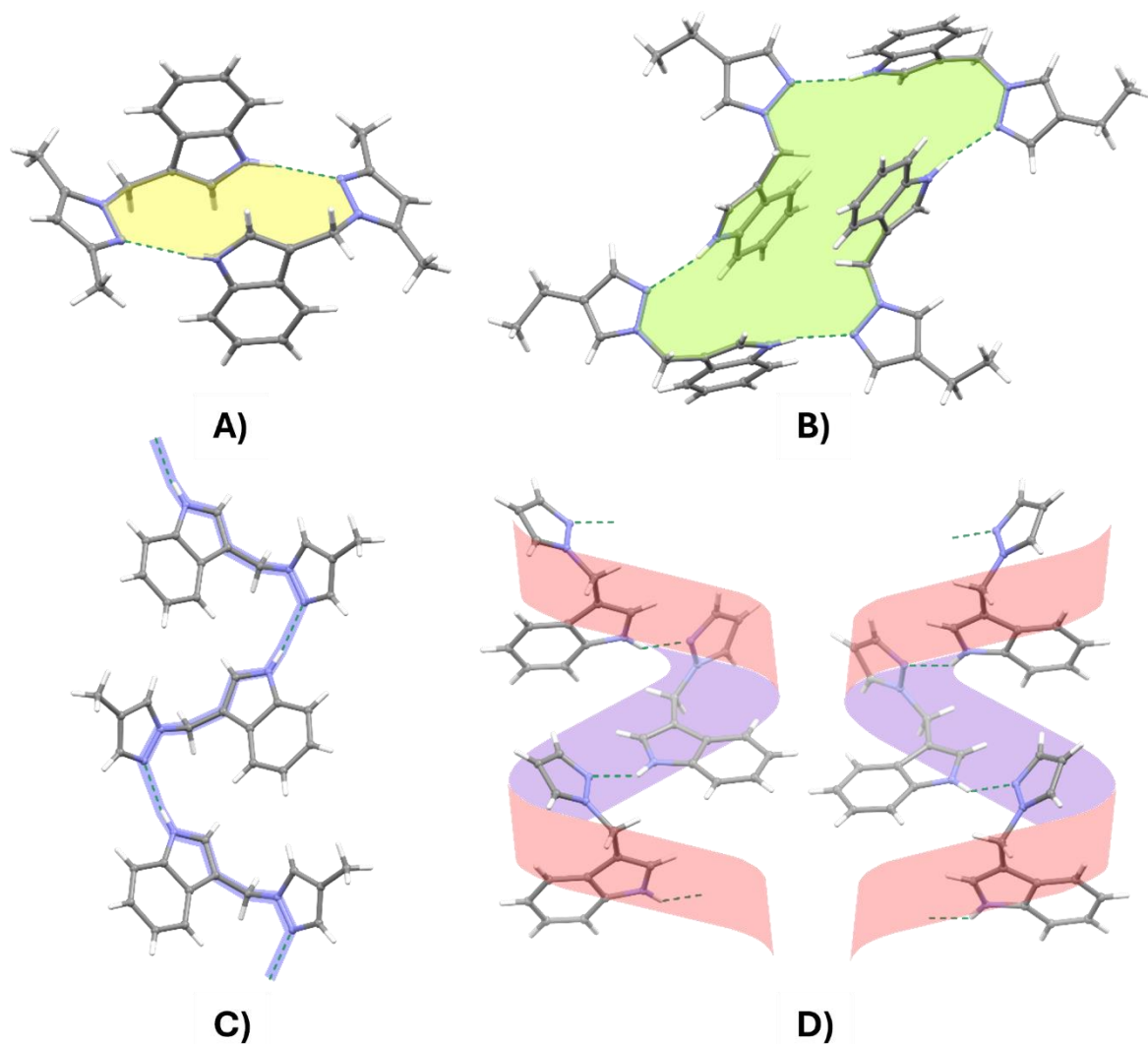


Rysunek 27. Struktura koniugatów **18**, **19** i **20**. Grupa tionowa w związku **18** jest akceptorem pięciu wiązań wodorowych (A). Grupa $N-H$ pochodnej **19** bierze udział w międzycząsteczkowych oddziaływaniach $N-H \cdots \pi$ z pierścieniem indolowym kolejnej cząsteczki (B). W związku **20** powstają wiązania $N-H \cdots S=C$ oraz oddziaływania stackingowe między ugrupowaniami benzoksazolo-2-tionowymi (C).

Interesujące są także supramolekularne struktury pochodnych trzeciej grupy. Związki te łączą się głównie w łańcuchy utworzone przez cząsteczki powiązane płaszczyzną ślizgową (**25**, **27**, **28**, **33** – **35**) lub, w przypadku związku **32**, zbudowane z dwóch niezależnych cząsteczek o przeciwnej helikalności. Pozostałe koniugaty albo tworzą helisy (**24**, **28**), albo łączą się w dimery (**29**) lub tetramery (**26**) (Rys. 28.).

Warto również zwrócić uwagę na izostrukturalność związków **25** i **33**, które zawierają odpowiednio podstawniki metylowe i chlorowe w pozycji C4 pirazolu. Izomorfizm wynikający

z podstawienia Me/Cl nie jest rzadkością i jest skutkiem podobnej wielkości tych podstawników [226].



Rysunek 28. Supramolekularne struktury koniugatów indolowo-pirazolowych. Dimery w kryształach **29** (A), tetramery w kryształach **26** (B), łańcuchy w kryształach **25** (C), dwie przeciwległe helisy w kryształach **24** (D).

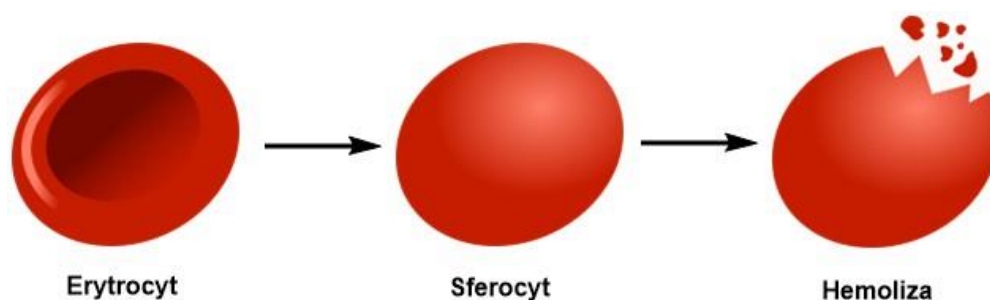
W kryształach kompleksów jon Zn^{2+} jest otoczony przez dwa atomy azotu pochodzące od pierścienia imidazolowego oraz dwa jony chlorkowe. Porównując ze sobą struktury ligandów (**4**, **8**) i kompleksów (**K4**, **K8**) widać dużą zmianę w kątach torsyjnych w przypadku koniugatu z podstawnikiem izopropylowym (**4**, **K4**), podczas gdy struktura pochodnej z grupą fenylową (**8**) pozostaje niemal niezmienną.

7. Badania biologiczne

7.1. Aktywność hemolityczna

Czerwone krwinki (RBC – ang. *red blood cells*) stanowią modele komórkowe wykorzystywane między innymi do badań właściwości cytotoksycznych związków. Są łatwo dostępne i nie posiadają jądra oraz organelli komórkowych.

W zetknięciu z czynnikami zewnętrznymi, takimi jak wolne rodniki czy toksyny, może dojść do przerwania błony komórkowej erytrocytów i hemolizy – uwolnienia hemoglobiny do osocza krwi (Rysunek 29).



Rysunek 29. Schemat procesu hemolizy.

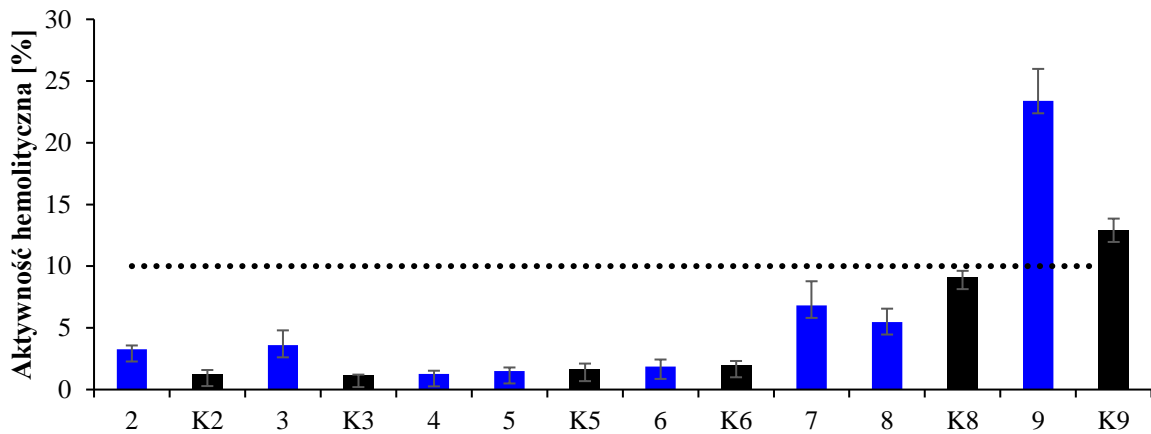
Związki, które powodują hemolizę w stopniu mniejszym niż 10% są uznawane za hemokompatybilne i mogą mieć zastosowanie w medycynie i produktach biomedycznych [227]. W publikacjach [P1 - P3] zostało przyjęte bardziej rygorystyczne kryterium (< 5%), ale dla ujednolicenia wyników, w tej pracy przyjęłam granicę hemokompatybilności równą 10%.

Wszystkie otrzymane przeze mnie koniugaty oraz kompleksy zostały zbadane we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii UAM pod kątem aktywności hemolitycznej. Jedynie dziesięć z nich (9, K9, 16, 26, 27, 33, 34, 35, 38, 40) nie jest hemokompatybilnych.

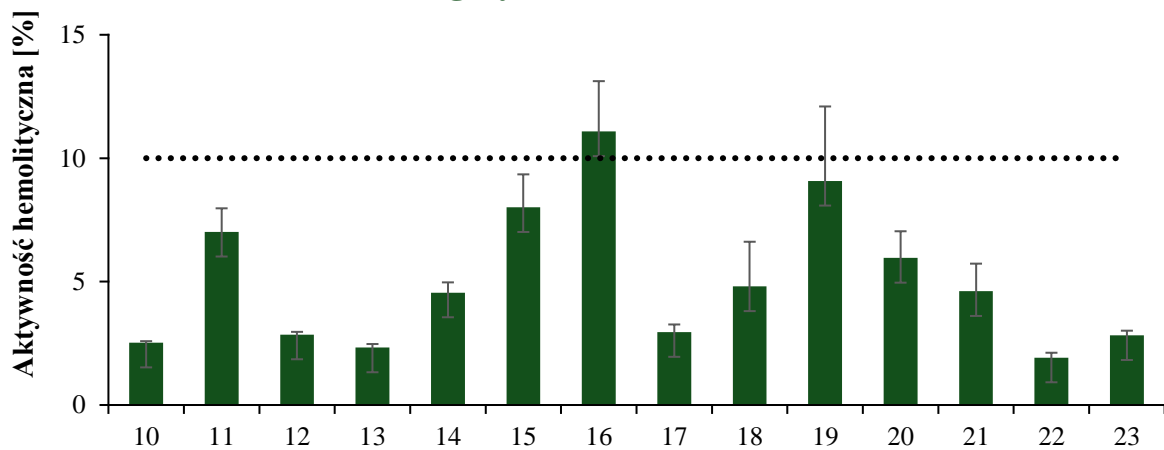
Wśród koniugatów indolowo-imidazolowych widać zależność między rodzajem podstawnika obecnego w pierścieniu imidazolowym a aktywnością hemolityczną związku (Rys. 30A). Aktywność hemolityczna pochodnych indolu z podstawnikami elektronodonorowymi przy pierścieniu imidazolowym wynosiła poniżej 5%. Związki z grupami elektronoakceptorowymi wykazywały wyższą aktywność hemolityczną, przy czym najbardziej hemolityczna była pochodna z benzimidazolem, dla której wartość aktywności hemolitycznej wynosiła $23,38 \pm 2,60\%$.

Kompleksowanie z chlorkiem cynku obniżyło tę wartość do $12,96 \pm 0,89\%$. Spadek wartości aktywności hemolitycznej powstałych kompleksów w stosunku do wartości aktywności hemolitycznej ligandów był obserwowany także w przypadku kompleksów K2 i K3, odpowiednio z $3,27 \pm 0,30\%$ na $1,28 \pm 0,30\%$ i z $3,609 \pm 1,19\%$ na $1,20 \pm 0,01\%$.

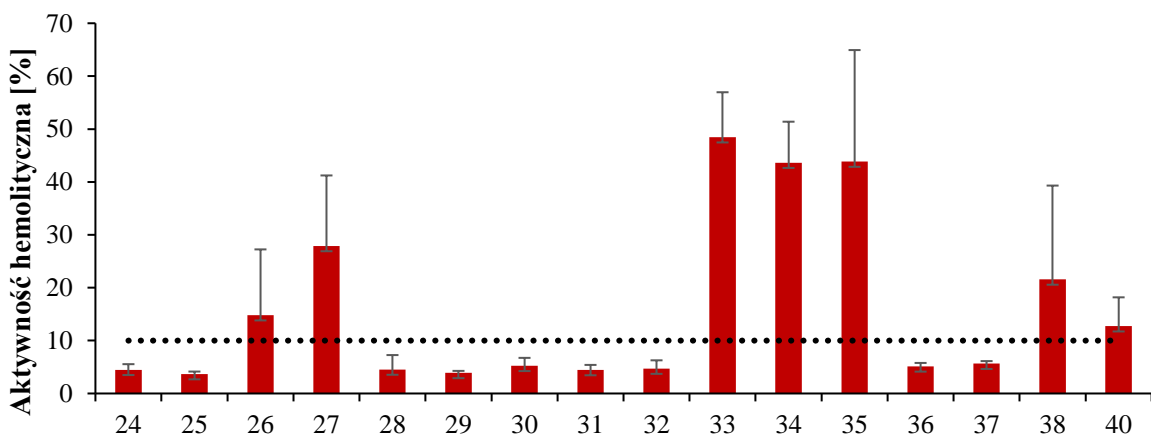
A) Koniugaty indolowo-imidazolowe i kompleksy



B) Koniugaty indolowo-tioketonowe



C) Koniugaty indolowo-pirazolowe



Rysunek 30. Wykresy aktywności hemolitycznej związków 2 – 9 i K2 – K9 (A), 10 – 23 (B) oraz 24 – 40 (C), badania wykonywano w stężeniu 0,1 mg/ml. Przerywana linia na poziomie 10% to granica, poniżej której związki są uznawane za hemokompatybilne.

Większość pochodnych drugiej grupy to związki hemokompatybilne (Rys. 30B). Wyższe wartości aktywności hemolitycznej zaobserwowano dla koniugatów zawierających w swojej strukturze dwie grupy indolowe. Wpływ względów sterycznych na wzrost aktywności hemolitycznej jest oczywisty, gdy porównamy wartości aktywności hemolitycznej par monomer-dimer: **10** ($2,5\% \pm 0,1$) i **11** ($7,0\% \pm 0,9$); **14** ($4,6\% \pm 0,4$) i **15** ($8,0\% \pm 1,3$) oraz **22** ($2,8\% \pm 0,1$) i **23** ($21,8\% \pm 1,0$).

Najwyższą aktywność hemolityczną ($11,08 \pm 2,04\%$) wykazywał koniugat graminy z 1-metylobenzimidazolo-2-tionem (**16**), będący jedynym niehemokompatybilnym związkiem z drugiej grupy. Pochodna **14**, bez grupy metylowej przy atomie azotu w pierścieniu benzimidazolowym, wykazała aktywność hemolityczną na poziomie $4,55 \pm 0,41\%$. Ten ponad dwukrotny spadek wartości aktywności hemolitycznej może być skutkiem różnicy w interakcji tych dwóch związków z dwuwarstwą lipidową RBC. Powodem jest zmiana w konformacji cząsteczkowej, związana z obecnością grupy metylowej. Podobnego efektu nie zaobserwowano porównując wartości aktywności hemolitycznej pochodnej **21** z aktywnością cząsteczki bez grupy metylowej przy atomie węgla C5 (**20**), jak również niemetylowanego związku **12** z *N*-metylowanym związkiem **13**. W obu przypadkach wartości aktywności hemolitycznej były podobne i znajdowały się poniżej granicy hemokompatybilności.

Większość hybryd indolowo-pirazolowych była hemokompatybilna (Rys. 30C) i wykazywała niskie wartości aktywności hemolitycznej. Otrzymane wyniki wskazały na korelację pomiędzy położeniem podstawników w pierścieniu pirazolowym analizowanych pochodnych a ich aktywnością hemolityczną. Przykładem tego jest porównanie wartości aktywności hemolitycznej związków **27** i **28**, zawierających podstawnik izopropylowy odpowiednio w pozycji C4 lub C5. Pochodna **27** wykazała ponad pięciokrotnie wyższą wartość aktywności hemolitycznej ($27,90 \pm 13,33\%$) niż wartość zaobserwowana dla związku **28** ($4,54 \pm 2,72\%$).

Innym przykładem są pochodne **36** – **38**, które mają pierścień pirazolowy podstawiony grupą metylową i atomem bromu. Wśród nich najwyższą aktywność hemolityczną ($21,57 \pm 17,74\%$) wykazał związek **38**, w którym grupa metylowa znajdowała się w pozycji C3, a atom bromu w pozycji C5. Natomiast koniugaty **36** i **37**, zawierające atom bromu w pozycji C4, a grupę metylową w C3 (**37**) lub C5 (**36**) były hemokompatybilne, a wartości aktywności hemolitycznej tych związków były zbliżone i wynosiły ok. 5%.

Najwyższe wartości aktywności hemolitycznej w całej serii wykazały hybrydy z podstawnikami elektronoakceptorowymi w pozycji C4: Cl (**33**; $48,46 \pm 8,49\%$), Br (**34**; $43,64 \pm 7,74\%$) oraz I (**35**; $43,85 \pm 21,08\%$).

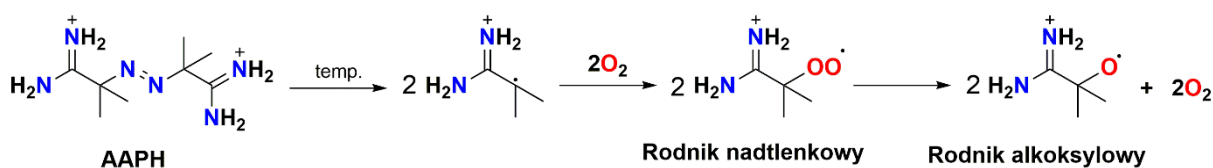
Wpływ podstawników na aktywność hemolityczną koniugatów indolowo-pirazolowych różnił się od tego obserwowanego dla pochodnych indolowo-imidazolowych. Związki pierwszej grupy z podstawnikami alkilowymi w pierścieniu imidazolowym (**3** – **6**) wykazywały aktywność hemolityczną poniżej 5%. Natomiast wśród pochodnych indolowo-pirazolowych z podstawnikami alkilowymi jedynie związek **25** z grupą metylową w pozycji C4 pierścienia pirazolowego wykazał tak niską aktywność hemolityczną, wynoszącą $3,67 \pm 0,87\%$. Wartości aktywności hemolitycznej koniugatów z podstawnikiem etylowym lub izopropylowym w pozycji C4 (związki **26** i **27**) były znacząco wyższe: $14,82 \pm 12,43\%$ i $27,90 \pm 13,33\%$.

7.2. Aktywność przeciwutleniająca

Badania właściwości antyoksydacyjnych zostały przeprowadzone we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii UAM. Zbadano aktywność cytoprotekcyjną (zdolność związków do ochrony RBC przed wolnymi rodnikami) wszystkich koniugatów pierwszej i drugiej grupy, wszystkich kompleksów i hemokompatybilnych związków indolowo-pirazolowych. Ponadto sprawdzono także właściwości chelatujące jony żelaza pochodnych indolowo-imidazolowych i indolowo-tioketonowych.

Krwinki czerwone są szczególnie narażone na utlenienie ze względu na ich rolę w transporcie tlenu i skład ich błony komórkowej, zawierającej wysoką zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w dwuwarstwie lipidowej [228]. Prowadzące do hemolizy zmiany w błonie RBC mogą być spowodowane zarówno przez reaktywne formy tlenu, jak i przez włączenie się biologicznie aktywnych cząsteczek do dwuwarstwy lipidowej.

W badaniach aktywności antyoksydacyjnej wykorzystuje się związki mogące tworzyć wolne rodniki. Przykładem takiej cząsteczki jest 2,2'-chlorowoderek-azobis(2-amidynopropanu) (AAPH), który pod wpływem temperatury rozkłada się, wytwarzając przy tym rodniki nadtlenkowy i alkoksyłowy (Rys. 31).



Rysunek 31. Termiczny rozpad AAPH z wytworzeniem rodników nadtlenkowego i alkoksyłowego.

Na rysunku 32 przedstawiono wykresy zdolności otrzymanych związków kompleksowych oraz analizowanych koniugatów indolowo-azolowych do inhibitowania hemolizy indukowanej przez wolne rodniki powstałe z rozkładu AAPH. Wyniki porównano z Troloxem, standardowym antyoksydantem, będącym rozpuszczalną w wodzie formą witaminy E.

Jak widać na rysunku 32A, aktywność cytoprotekcyjna koniugatów indolowo-imidazolowych zależy od rodzaju podstawnika obecnego w pierścieniu imidazolowym. W przypadku pochodnych z podstawnikami elektronodonorowymi wartości aktywności cytoprotekcyjnej wynoszą powyżej 60% i maleją w kolejności podstawników: metyl i etyl (**6**) > izopropyl (**5**) > etyl (**4**) > metyl (**3**). Dla pochodnej bez podstawnika w pierścieniu imidazolowym (**2**) oraz związków z podstawnikami elektronoakceptorowymi (**7**, **8**, **9**) aktywność cytoprotekcyjna przyjmuje wartości poniżej 50%.

Reakcja kompleksowania pochodnych indolowo-imidazolowych z chlorkiem cynku znacząco poprawiła aktywność cytoprotekcyjną pochodnych **2** i **9**, zwiększając jej wartość odpowiednio z $28,50 \pm 5,00\%$ na $81,15 \pm 3,57\%$ i z $23,98 \pm 6,83\%$ na $55,29 \pm 13,27\%$.

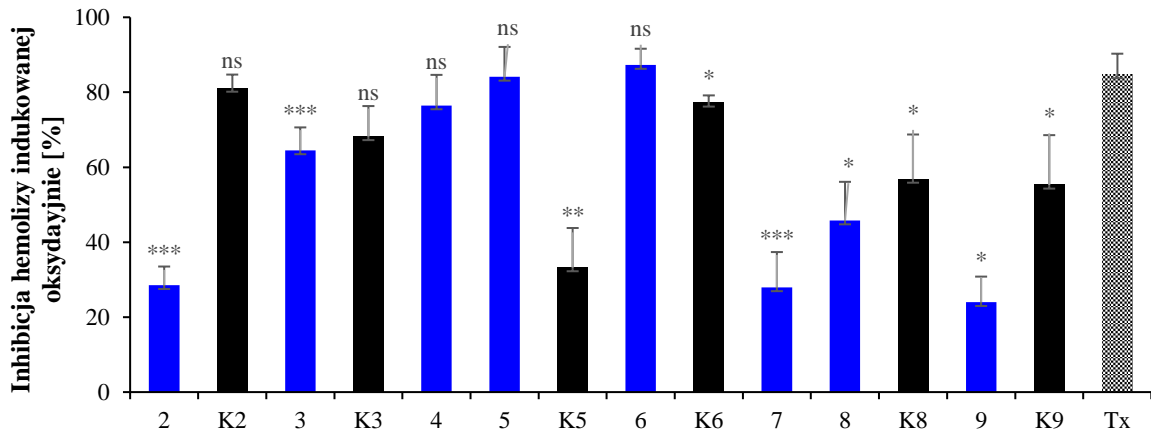
Dla większości pochodnych drugiej grupy (**10, 11, 13, 15, 16, 18, 20, 21, 23**) aktywność cytoprotekcyjna przeciwko stresowi oksydacyjnemu przyjmowała wartości powyżej 50% (Rys. 32B). Najskuteczniejszymi pochodnymi były związki **10** i **13** z wartościami aktywności cytoprotekcyjnej powyżej 90%.

Koniugaty **12, 14, 17, 19** i **22** wykazały zaskakująco niskie wartości aktywności przeciwutleniającej (poniżej 20%). Wynika to prawdopodobnie z faktu, że związki **12, 14** i **22**, podobnie jak 4-merkaptimidazol [229], w fizjologicznym pH występują w formie jonu obojnaczego. Jon tiolanowy, w obecności rodników generowanych przez AAPH, zmienia się w wywołujący hemolizę RBC rodnik tyłowy. Natomiast niska aktywność cytoprotekcyjna koniugatu **17** może być spowodowana brakiem struktur rezonansowych, które mogłyby stabilizować powstałe wolne rodniki.

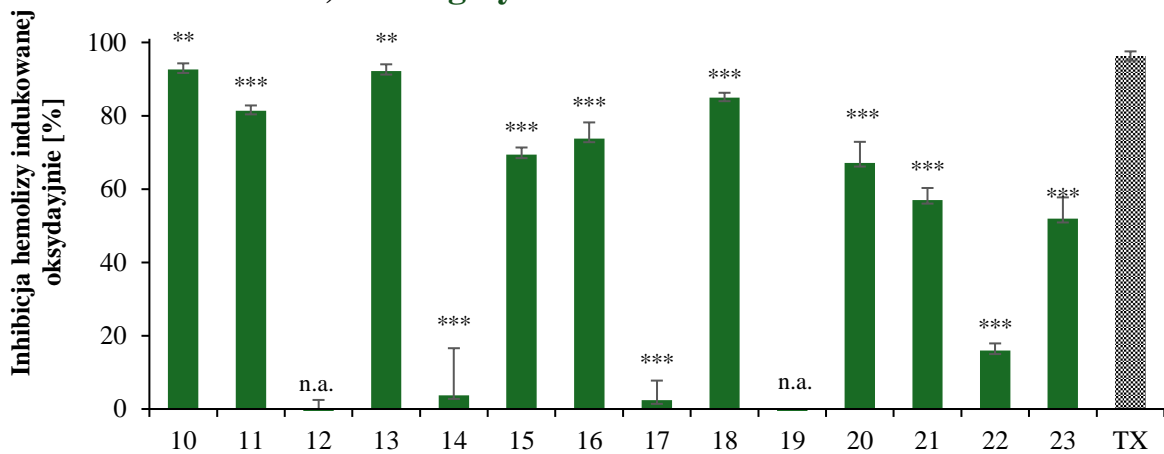
Porównując ze sobą aktywność koniugatów **18, 19** i **20**, zaskakuje brak właściwości antyoksydacyjnych pochodnej **19**. Pomocna w wytłumaczeniu tego zjawiska może być analiza struktury krystalograficznej związku opisana w rozdziale 7. *Struktura w kryształach*. W przeciwieństwie do koniugatów **18** i **20**, w przypadku pochodnej **19** grupa C=S nie uczestniczy w oddziaływaniach międzycząsteczkowych. Fakt ten może wpływać na mniejszą zdolność związku do tworzenia układów supramolekularnych (np. oddziaływań ligand/receptor) w roztworze.

W przypadku pochodnych trzeciej grupy, do badań właściwości cytoprotekcyjnych zostały wybrane tylko te koniugaty indolowo-pirazolowe, które były hemokompatybilne (związki **24, 25, 28 – 32, 36, 37**). Wszystkie analizowane pochodne wykazały znaczącą aktywność cytoprotekcyjną (>50%), chroniąc erytrocyty przed hemolizą wywołaną stresem oksydacyjnym (Rys. 32C). Wartości aktywności cytoprotekcyjnej związków z niepodstawionym pierścieniem pirazolu ($85,99 \pm 2,00\%$; **24**) i pochodnej z grupą metylową w pozycji C4 pirazolu ($84,94 \pm 7,73\%$; **25**) były porównywalne z wartością aktywności cytoprotekcyjnej standardowego przeciwutleniacza Troloxu ($86,67 \pm 1,28\%$). Ponadto znaczną aktywność cytoprotekcyjną (wartości aktywności około 80%) wykazały związki **29, 31** i **32**. Wzrost aktywności cytoprotekcyjnej wśród pozostałych koniugatów był zgodny z kolejnością podstawników: etynyl (**30**) < 5-izopropyl (**28**) < 4-bromo-3-metylo (**37**) < 3-bromo-4-metylo (**36**).

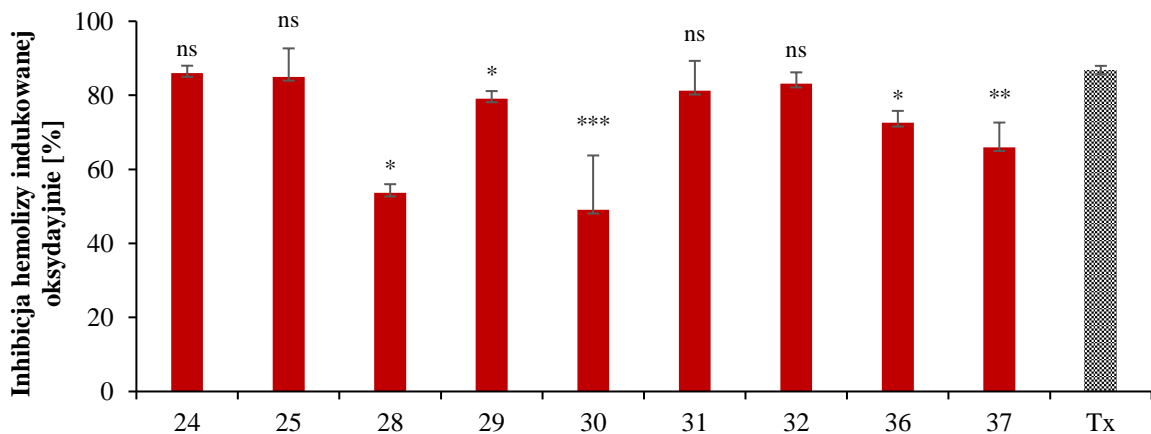
A) Koniugaty indolowo-imidazolowe i kompleksy



B) Koniugaty indolowo-tioketonowe



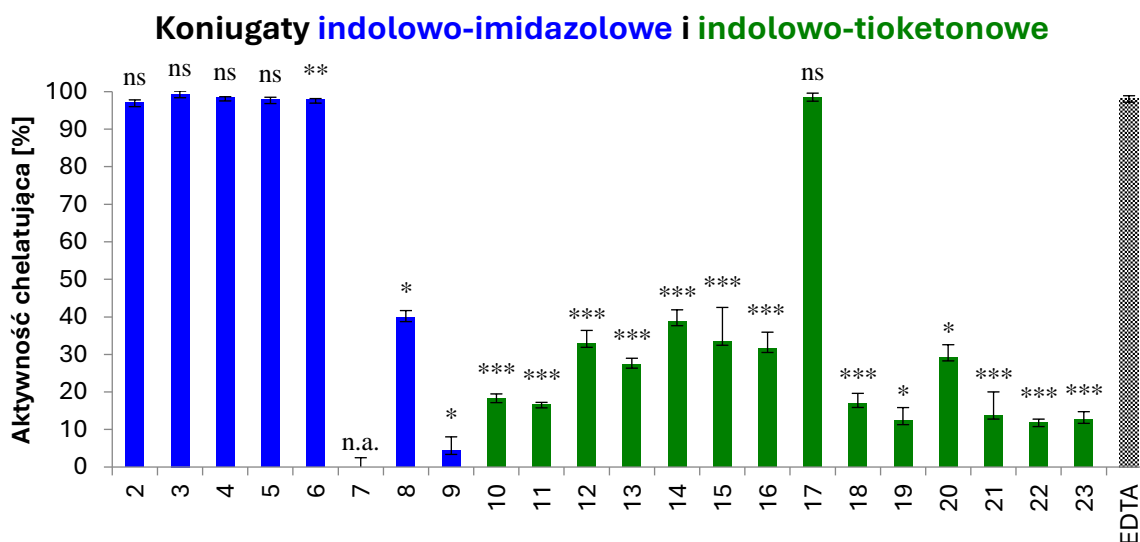
C) Koniugaty indolowo-pirazolowe



Rysunek 32. Wykresy aktywności cytoprotekcyjnej związków 2 – 9 i K2 – K9 (A), 10 – 23 (B), 24, 25, 28 – 32, 36, 37 (C), badania wykonywano w stężeniu 0,1 mg/ml. Wyniki są porównane z Troloxem (Tx; ns - różnica nieistotna statystycznie, $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$). Brak aktywności oznaczono jako „n.a.”.

Oprócz zdolności związków do ochrony RBC przed hemolizą indukowaną oksydacyjnie, miarą ich właściwości przeciwutleniających jest także zdolność do chelatowania jonów żelaza Fe^{2+} . Kationy te są utleniane w reakcjach Haber–Weissa i Fentona do jonów Fe^{3+} z wytworzeniem rodnika hydroksylowego.

Rysunek 33 przedstawia wykres aktywności chelatującej związków **2** – **23** oraz kwasu wersenowego (EDTA), standardowego chelatora. Koniugaty indolowo-imidazolowe z niepodstawionym pierścieniem imidazolu (**2**) oraz z podstawnikami alkilowymi (**3** – **6**) wykazują właściwości kompleksujące jony żelaza porównywalne do EDTA. Wśród pochodnych drugiej grupy jedynym związkiem o wartości aktywności chelatującej >90% jest pochodna **17**. Wyróżnia się ona na tle innych podobnych koniugatów faktem, że wolna para elektronowa na atomie siarki w pierścieniu tiolowym nie uczestniczy w rezonansie elektronowym i może brać udział w reakcji chelatowania.



Rysunek 33. Wykres aktywności chelatującej jony Fe^{2+} związków **2** – **23**. Wyniki są porównane z EDTA (ns - różnica nieistotna statystycznie, $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$). Brak aktywności oznaczono jako „n.a.”.

7.3. Aktywność przeciwbakteryjna

Koniugaty indolowo-azolowe oraz kompleksy zostały zbadane pod kątem właściwości przeciwbakteryjnych przeciwko dwóm szczepom bakterii Gram-dodatnich (*Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) i dwóm Gram-ujemnych (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) (Tabela 1). Wybrane do badań szczepy są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym. *Micrococcus luteus* jest oportunistyczną bakterią występującą w glebie, pyłe, wodzie i powietrzu [230]. Laseczka sienna (*Bacillus subtilis*) to modelowy mikroorganizm wykorzystywany między innymi w badaniach podziału komórek, wydzielania białka czy ruchliwości powierzchniowej [231]. Jest także odpowiedzialna za psucie się pieczywa – jego śluzowacenie [232]. Organizmem modelowym jest również pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*). Mimo że jest

elementem naturalnej mikroflory ssaków, może wywoływać choroby układu pokarmowego i moczowego [233]. *Pseudomonas fluorescens* powszechnie występuje w glebie, wodzie, roślinach oraz mikrobiocie jelitowym. Powoduje choroby roślin i prawdopodobnie przyczynia się do chorób u ludzi [234].

Gramina (**1**) nie hamowała wzrostu żadnego z badanych szczepów bakterii, a większość koniugatów wykazała niską aktywność przeciwbakteryjną. Najlepsze okazały się związki zawierające pierścień pirazolu. Koniugaty **33** i **34** wykazały umiarkowaną, a koniugat **24** wysoką aktywność przeciwko *Micrococcus luteus*. Związki **26**, **27**, **36** i **37** natomiast inhibitowały wzrost *Pseudomonas fluorescens*. Wśród koniugatów indolowo-imidazolowych najwyższą wartość wykazał związek z niepodstawionym imidazolem. Hamował on wzrost *Micrococcus luteus* oraz *Pseudomonas fluorescens*. Kompleksowanie z $ZnCl_2$ w większości przyczyniło się do wzrostu aktywności przeciwbakteryjnej, ale nie była to znacząca zmiana.

Tabela 1. Strefy zahamowania wzrostu szczepów bakterii. 10-15 mm – umiarkowana aktywność (kolor żółty), >15 mm – wysoka aktywność (kolor zielony).

Bakteria	Strefy zahamowania wzrostu [mm]														
	Gramina, koniugaty indolowo-imidazolowe i kompleksy														
	1	2	K2	3	K3	4	5	K5	6	K6	7	8	K8	9	K9
<i>M. luteus</i>	0	21	10,6	3	6	8,8	3	3,7	6	2,4	5	8,6	8	4,3	7,6
<i>B. subtilis</i>	0	3,3	4	1	4	4,3	1,8	3	2,4	2,3	8,7	3,7	4	2,7	4,8
<i>E.coli</i>	0	4	5	1	4,3	3,8	3	3,5	3,5	3,7	4,3	5	5	3	4
<i>P. fluorescens</i>	0	14,7	3	16	3,4	3	0	0	2,3	3,3	0	0	4	0	4
Koniugaty indolowo-tioketonowe															
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
<i>M. luteus</i>	3,3	1	1	3,8	3,5	4	1,8	1,3	3	0	2,6	4	1	2	
<i>B. subtilis</i>	4,5	1	2	5	3,3	2,3	1	2	4,2	0	0	0	0	3	
<i>E.coli</i>	2	1	0	2	1	1	1	1	0	0	1	2,7	0	0	
<i>P. fluorescens</i>	4	1	1,5	4	2	2	1	3	4	0	0	0	1	5,5	
Koniugaty indolowo-pirazolowe															
	24	25	26	27	28	29	32	33	34	35	36	37	38		
<i>M. luteus</i>	16	3,5	6,5	7	4,5	4,5	5,5	12,5	11	8	5,5	5	5,5		
<i>B. subtilis</i>	0	4	8	7	0	6,5	4	7	7,5	6	8,5	7	4		
<i>E.coli</i>	6	6	21	16,8	6	5	6	5,5	5,5	5,5	16	16	6		
<i>P. fluorescens</i>	0	3,5	0	0	2	6,5	3	7,5	6	6	0	0	3		

7.4. Aktywność przeciwgrzybiczna

Aktywność przeciwgrzybiczna koniugatów indolowo-imidazolowych oraz dwóch koniugatów drugiej grupy (**19**, **20**) została zbadana przeciwko szczepom grzybów odpowiedzialnym za choroby drewna: *Coriolus versicolor*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana* i *Gloeophyllum trabeum*. Badania wykonano we współpracy z Katedrą Chemicznej Technologii Drewna, Wydziału Leśnego i Technologii Drewna Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Tabela 2 przedstawia zdolność związków **1 – 9, 19 i 20** do hamowania wzrostu grzybów. Wszystkie koniugaty w najwyższym badanym stężeniu (0,1%) w 100% inhibitowały wzrost grzybów. W niższych stężeniach najlepsza okazała się pochodna z 4,5-dichloroimidazolem (**7**). Warto też zaznaczyć aktywność związków **19 i 20**, należących do drugiej grupy pochodnych, które inhibitowały wzrost *Poria placenta* i *Coniophora puteana*, grzybów wykazujących dużą odporność na fungicydy.

Tabela 2. Aktywność przeciwgrzybiczna związków **2 – 9, 19, 20**. Wartości powyżej 50% zahamowania wzrostu grzyba zaznaczono na zielono.

Grzyb	Stężenie [%]	Związek											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	19	20	
<i>Coniophora puteana</i>	0,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,01	51	41	48	37	26	49	74	48	40	57	44	
	0,001	40	0	0	15	14	37	46	0	0	40	43	
	0,0001	41	0	0	13	13	40	0	0	0	0	0	
<i>Gleophyllum trabeum</i>	0,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,01	17	40	44	30	17	27	91	53	48	59	47	
	0,001	12	20	19	11	16	9	51	18	28	38	39	
	0,0001	12	20	15	8	12	13	28	13	17	0	17	
<i>Poria placenta</i>	0,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,01	40	47	48	32	21	41	78	45	37	71	64	
	0,001	25	20	0	18	6	0	35	17	23	54	56	
	0,0001	14	0	0	16	1	4	0	0	0	34	0	
<i>Coriolus versicolor</i>	0,1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	0,01	35	33	35	43	43	44	96	41	44	49	26	
	0,001	22	19	1	13	12	19	23	13	6	20	2	
	0,0001	18	0	0	6	13	19	0	7	0	0	0	

Kompleksy oraz wybrane koniugaty graminy z tioketonami i pochodnymi pirazolu zostały zbadane pod kątem aktywności grzybobójczej względem szczepów grzybów *Alternaria alternata*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* i *Botrytis cinera*, będących patogenami roślin oraz *Trichoderma harzianum* i *Trichoderma atroviride*, naturalnych fungicydów (Tabela 3).

Podobnie jak w przypadku badań przeciwbakteryjnych, najaktywniejsze okazały się koniugaty zawierające pierścień pirazolu. Wszystkie wykazały aktywność przeciwko przynajmniej jednemu szczepowi grzybów, przy czym związki z 2-fluoropirazolem (**32**), 2-chloropirazolem (**33**) i 2-bromopirazolem (**34**) inhibitowały wzrost wszystkich sześciu szczepów w stopniu przynajmniej umiarkowanym.

Druga grupa pochodnych okazała się szczególnie aktywna przeciwko *Botrytis cinera*. Pięć związków (**11, 18, 21 – 23**) wykazało wysoką wartość strefy zahamowania wzrostu tego

szczepu grzyba. Dla kontrastu, żaden z kompleksów nie inhibitował wzrostu *Botrytis cinera*, za to wszystkie stymulowały jego wzrost.

Tabela 3. Strefy zahamowania wzrostu szczepów grzybów. 10-15 mm – umiarkowana aktywność (kolor żółty), >15 mm – wysoka aktywność (kolor zielony). *Kompleksy jako jedyne nie inhibitowały a stymulowały wzrost *B. cinera*.

Grzyb	Strefy zahamowania/stymulacji* wzrostu [mm]												
	Gramina i kompleksy												
	1	K2	K3	K5	K6	K8	K9						
<i>A. alternata</i>	10	4,5	7,5	4,5	2,5	10	7,5						
<i>F. culmorum</i>	3,5	0	2	6	0	6,4	9,2						
<i>T. harzianum</i>	0	10	3	10	11,5	9,8	11,5						
<i>T. atroviride</i>	13	0	4	2	2	2	10						
<i>B. cinera</i>	11,2	13,3*	16,8*	17*	21,2*	15,3*	11,7*						
	Koniugaty indolowo-tioketonowe												
	10	11	12	13	14	15	16	17	18	21	22	23	
<i>A. alternata</i>	2,3	9	2	13	2,3	4,8	2,3	2	9	9	10	18	
<i>F. culmorum</i>	3,8	1	3,5	4,5	7,8	5,5	4	2,5	2,1	1	1	13,2	
<i>T. harzianum</i>	8	4	7,5	7	13	2,8	9	3,7	8	3,5	8,4	4,5	
<i>T. atroviride</i>	2,5	11	1,5	4	22	13,5	12	3	5	0	6,6	7	
<i>B. cinera</i>	3,5	16	4,3	4,5	3,3	2,3	5	4	23	17	19	16,5	
	Koniugaty indolowo-pirazolowe												
	24	25	26	27	28	29	32	33	34	35	36	37	38
<i>A. alternata</i>	6	13,5	13	11,5	0	9	12	10	11	0	15,5	12	13
<i>F. culmorum</i>	10	17,5	12,5	13,5	14	21	11	19	21	15	10	16	12,5
<i>F. graminearum</i>	12,5	9,5	16	18	0	25	10	16	18	13,5	21	20	16
<i>T. harzianum</i>	9	15,5	14,5	9,5	5,5	23	12	16	13	13,5	15,5	7,5	14,5
<i>T. atroviride</i>	15	16,5	0	0	8	10	15,5	21	19	16,5	0	11	0
<i>B. cinera</i>	7	10	19	19	9	5	11,5	11	13	7,5	7	14	19

8. Badania in silico

8.1. Właściwości fizykochemiczne związków

Podobieństwo do leków (ang. *druglikeness*) jest pojęciem używanym w projektowaniu nowych związków o znaczeniu farmakologicznym. Odnosi się ono do poszukiwania cząsteczek o parametrach fizykochemicznych jak najbardziej zbliżonych do istniejących już farmaceutyków [235].

Polarność jest jednym z najważniejszych kryteriów branych pod uwagę w ocenie podobieństwa związków do leków. Ma ona wpływ na biodostępność, biodegradację i toksyczność substancji czynnych [236]. Ważna jest także rozpuszczalność w wodzie, jako że związek lepiej

rozpuszczalny jest bardziej biodostępny i wymaga mniejszej dawki, aby osiągnąć terapeutyczne stężenie w osoczu po podaniu doustnym [237].

Reguły Lipińskiego i Vebera opisują własności fizykochemiczne pozwalające określić czy dany związek spełnia wymagania stawiane lekom. Według Lipińskiego [238] lek powinien mieć masę cząsteczkową mniejszą niż 500 g/mol, współczynnik podziału oktanol/woda (logP) mniejszy niż 5 i nie posiadać więcej niż 5 donorów wiązań wodorowych (HBD) i 10 akceptorów wiązań wodorowych (HBA). Veber natomiast uwzględnił liczbę wiązań rotacyjnych (< 10) oraz pole powierzchni polarnej (<140Å²) [239].

Parametry fizykochemiczne związków **2 - 40** i kompleksów **K2 – K9** zbadalam wykorzystując oprogramowanie SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>). Wszystkie koniugaty spełniają reguły Lipińskiego i Vebera, co sprawia, że są dobrymi kandydatami do dalszych badań biologicznych. Dodatkowo dla wszystkich pochodnych określiłam rozpuszczalność w wodzie, wchłanianie przez układ pokarmowy i zdolność do przekraczania bariery krew-mózg. Im większa dawka leku po podaniu doustnym dociera do krwiobiegu (głównie z przewodu pokarmowego), tym większa jest jej możliwość przekroczenia bariery krew-mózg poprzez bierną dyfuzję. Związki, które są w stanie pokonać tę barierę mogą działać w ośrodkowym układzie nerwowym.

*Tabela 4. Parametry fizykochemiczne wybranych związków. GI – wchłanianie przez układ pokarmowy, BBB – przepuszczalność przez barierę krew-mózg. LogS jest średnią wartością logS obliczonego trzema różnymi metodami. *Klasa rozpuszczalności – skala logS: nierozpuszczalny < -10, słabo rozpuszczalny < -6, średnio rozpuszczalny < -4, rozpuszczalny < -2, dobrze rozpuszczalny < 0.*

Związek	GI	BBB	LogS	Klasa rozpuszczalności*
2	wysoka	tak	-3,60	rozpuszczalny
K2	wysoka	tak	-7,16	słabo rozpuszczalny
3	wysoka	tak	-3,74	rozpuszczalny
K3	wysoka	tak	-7,89	słabo rozpuszczalny
4	wysoka	tak	-3,95	rozpuszczalny
5	wysoka	tak	-4,10	średnio rozpuszczalny
K5	niska	nie	-9,03	słabo rozpuszczalny
6	wysoka	tak	-4,59	średnio rozpuszczalny
K6	wysoka	nie	-9,38	słabo rozpuszczalny
7	wysoka	tak	-4,26	średnio rozpuszczalny
8	wysoka	tak	-4,46	średnio rozpuszczalny
K8	niska	nie	-10,90	nierozpuszczalny
9	wysoka	tak	-5,44	średnio rozpuszczalny
K9	niska	nie	-10,03	nierozpuszczalny
12	wysoka	tak	-3,63	rozpuszczalny
24	wysoka	tak	-3,06	rozpuszczalny

Tabela 4 przedstawia porównanie parametrów fizykochemicznych ligandów indolowo-imidazolowych, ich kompleksów i wybranych związków drugiej i trzeciej grupy. Kompleksowanie z chlorkiem cynku wpłynęło negatywnie na rozpuszczalność koniugatów z imidazolami, obniżając ją o jedną klasę. W przypadku ligandów **5**, **8** i **9** zmieniła się także ich wchłanianie

z układu pokarmowego (z wysokiej na niską), a kompleksy **K5**, **K6**, **K8** i **K9** nie są w stanie przekroczyć bariery krew-mózg.

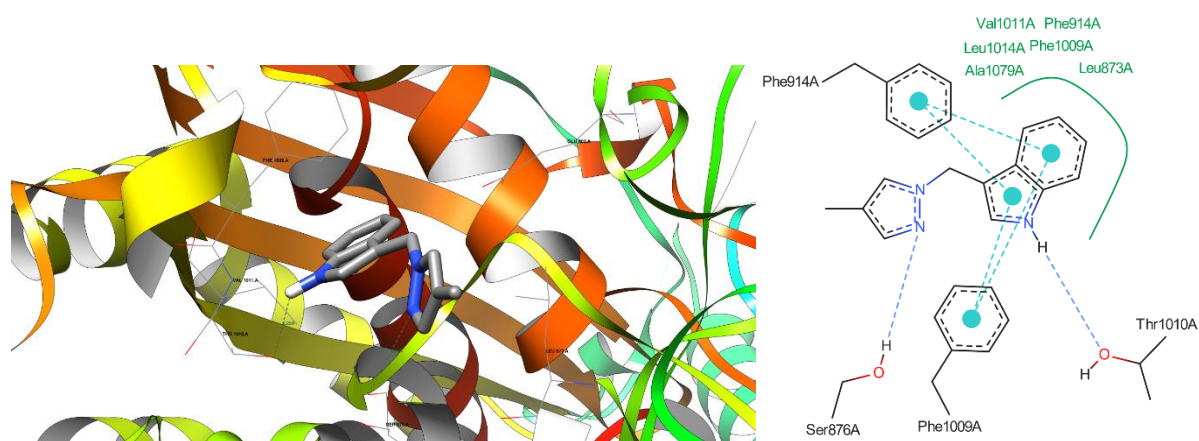
Zamiana niepodstawionego pierścienia imidazolowego (**2**) na imidazolo-2-tion (**12**) lub pirazol (**12**) nie miała większego wpływu na własności fizykochemiczne koniugatów indolowych.

8.2. Dokowanie molekularne

W związku z wysoką aktywnością cytoprotekcyjną koniugatów **10**, **13**, **24**, **25** i **32** zostały one wybrane do badań dokowania molekularnego. Sprawdzono ich powinowactwo do trzech domen białkowych: mieloperoksydazy (MPO; 1DNU), dehydrogenazy ksantynowej (1N5X) i cyklooksygenazy-2 (COX-2; 4COX). Enzymy te mogą generować reaktywne formy tlenu podczas reakcji lub jako część mechanizmu obronnego przed patogenami, a inhibicja ich aktywności może przyczynić się do zmniejszenia stresu oksydacyjnego [240–242].

Wszystkie badane pochodne wykazywały podobne lub wyższe powinowactwo do 1DNU i 1N5X, w porównaniu do związków referencyjnych – melatoniny (1DNU) i febukosostatu (1N5X). W przypadku 4COX, koniugaty indolowe wykazały mniejsze powinowactwo do białka niż referencyjna indometacyna.

Rysunek 34 przedstawia interakcje **25** z 1N5X. Związek ten wykazał najniższą energię wiązania ze wszystkich badanych koniugatów. Niepodstawiony atom azotu w pierścieniu pirazolu może tworzyć wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową serotoniny Ser876A, a grupa NH indolu może łączyć się z grupą OH tyrozyny Thr1010A.



Rysunek 34. Przedstawienie możliwego tworzenia oddziaływań między domeną białka 1N5X a koniugatem **25**. Niebieskie linie przerywane — wiązania wodorowe, linie cyjanowe przerywane — oddziaływania π - π , zielone linie ciągłe — kontakty hydrofobowe.

Podsumowanie

Celem mojej pracy doktorskiej było otrzymanie nowych koniugatów indolowych i ich kompleksów o potencjalnym zastosowaniu farmakologicznym. Zsyntezowałam łącznie 39 koniugatów indolowo-azolowych, z czego 35 nowych, oraz 6 kompleksów z ligandami indolowo-imidazolowymi.

Nowo otrzymane związki scharakteryzowałam metodami spektroskopowymi (^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR, MS). Dla większości z nich została określona struktura w kryształach.

Analiza krystalograficzna wykonana została w Zakładzie Krystalografii Wydziału Chemii UAM (prof. dr hab. Urszula Rychlewska, dr Beata Warżajtis). Dzięki niej możliwe było zidentyfikowanie drugiej formy tautomerycznej koniugatu z 3-bromo-5-metylopirazolem, a także wyjaśnienie aktywności biologicznej pochodnej z benzotiazolo-2-tionem.

Badania właściwości hemolitycznych, cytoprotekcyjnych i chelatujących przeprowadzono we współpracy z Zakładem Biologii Komórki Wydziału Biologii UAM (prof. UAM dr hab. Lucyna Mrówczyńska), przy czym część badań wykonałam samodzielnie, podczas odbywanego tam stażu. Większość otrzymanych przeze mnie związków jest hemokompatybilna, a duża ich część wykazuje dobre właściwości antyoksydacyjne. Analiza zależności między budową pochodnych a ich aktywnością pozwoliła na zidentyfikowanie elementów struktury koniugatów odpowiedzialnych za ich właściwości hemolityczne, cytoprotekcyjne i chelatujące.

Badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej zrealizowano we współpracy z Katedrą Gleboznawstwa i Mikrobiologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii (prof. UPP dr hab. Justyna Starzyk) oraz z Katedrą Chemicznej Technologii Drewna, Wydziału Leśnego i Technologii Drewna (prof. UPP dr hab. Grzegorz Cofta) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W większości koniugaty i kompleksy nie wykazały znaczącej aktywności przeciwbakteryjnej. Za to wszystkie związki pierwszej grupy w najwyższym stężeniu całkowicie inhibowały wzrost grzybów odpowiedzialnych za choroby drewna. Dodatkowo koniugaty trzeciej grupy wykazały aktywność przeciwgrzybiczą przeciwko szczepom będącymi patogenami roślin.

Wszystkie otrzymane koniugaty spełniają reguły Lipińskiego i Vebera i są związkami lekopodobnymi. Dodatkowo, w większości charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, dobrą wchłanialnością z układu pokarmowego oraz są w stanie przekroczyć barierę krew-mózg.

Badania dokowania molekularnego przeprowadzono w Zakładzie Chemii Kwantowej Wydziału Chemii UAM (mgr Damian Nowak). Wybrane koniugaty z drugiej i trzeciej grupy, wykazujące najwyższą aktywność cytoprotekcyjną, mogą łączyć się z enzymami odpowiedzialnymi za generowanie wolnych rodników.

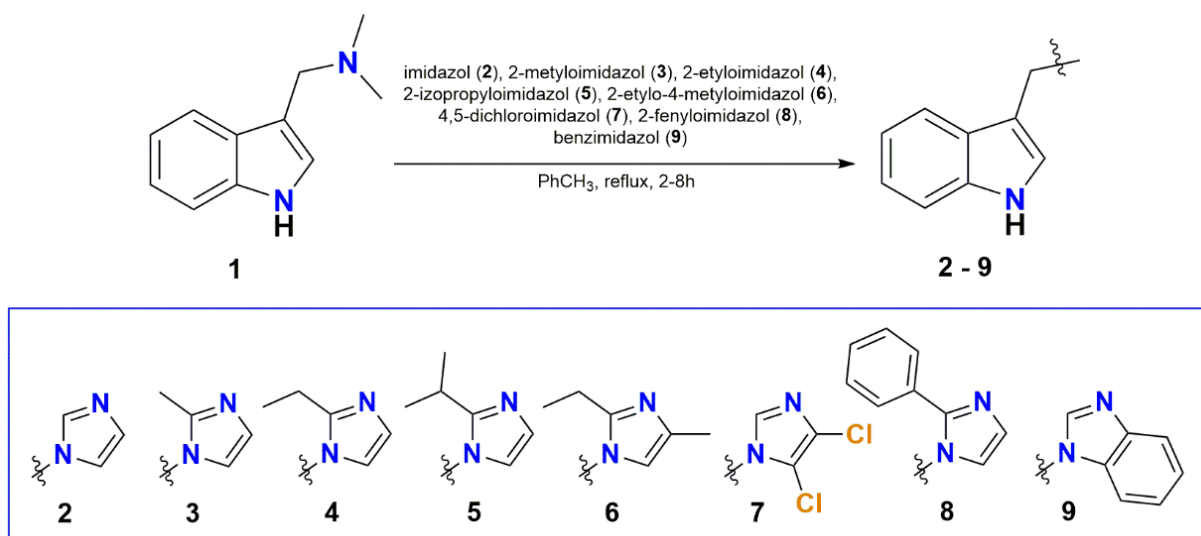
Dokładniejsze opisy syntez, analizę strukturalną i krystalograficzną oraz dodatkowe wyniki badań opisano w publikacjach [P1 – P4].

Porównanie numeracji związków w rozprawie doktorskiej i publikacjach

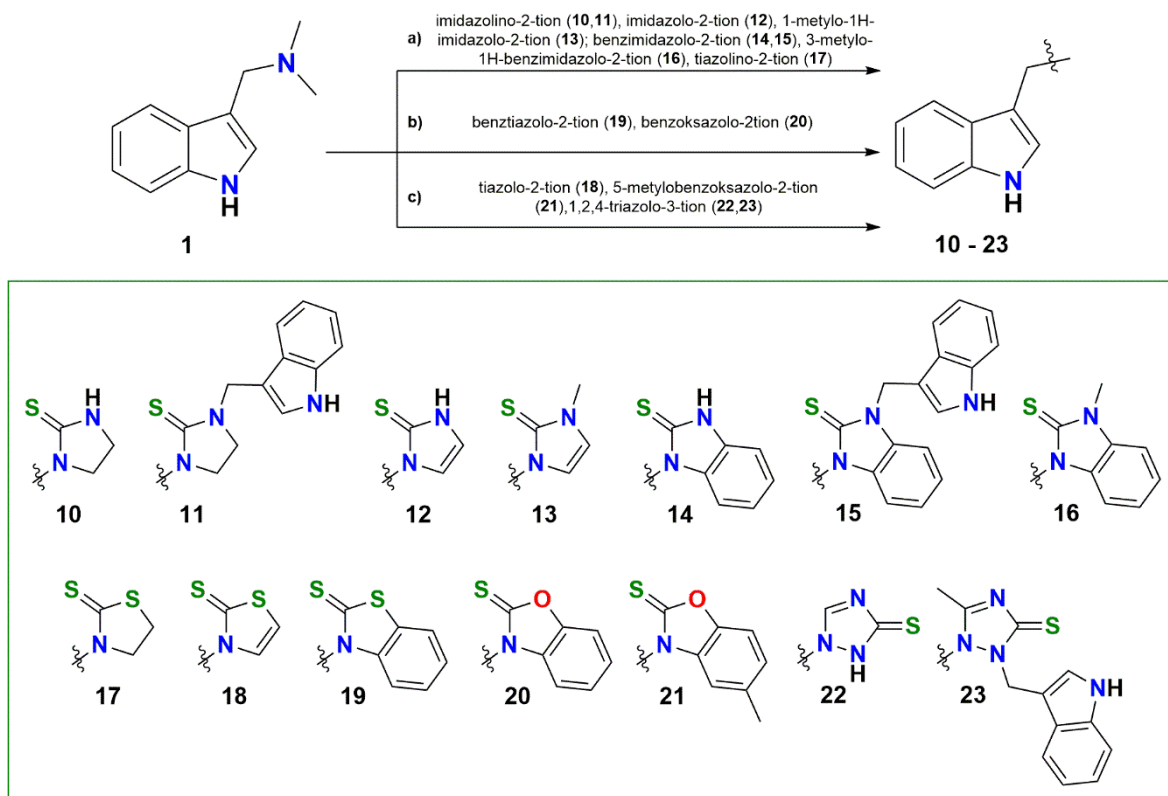
Tabela 5. Porównanie numeracji związków w rozprawie doktorskiej i publikacjach [**P1** – **P4**].

Rozprawa doktorska	Publikacja	Rozprawa doktorska	Publikacja
P1		P3	
2	2	10	2
3	3	11	3
4	4	12	4
5	5	13	5
5	5	14	6
6	6	15	7
7	7	16	8
8	8	17	9
9	9	18	10
19	10	21	11
20	11	22	12
		23	13
P2		P4	
K2	1	24	2
K3	2	25	3
K5	3	26	4
K6	4	27	5
K8	5	28	6
K9	6	29	7
		30	8
		31	9
		32	10
		33	11
		34	12
		35	13
		36	14
		37	15
		38	16
		39	17
		40	18

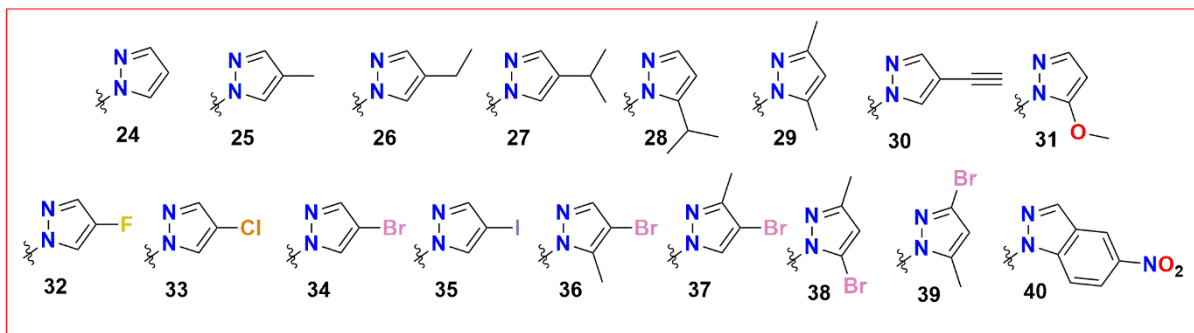
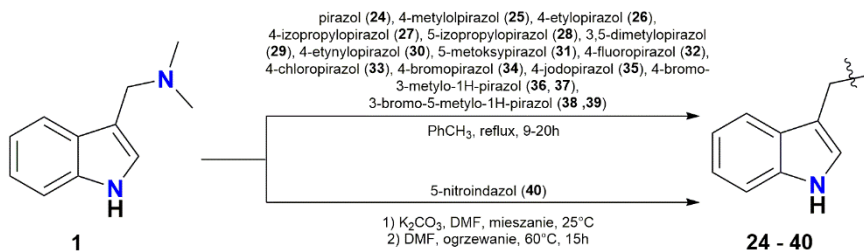
Schematy przeprowadzanych syntez



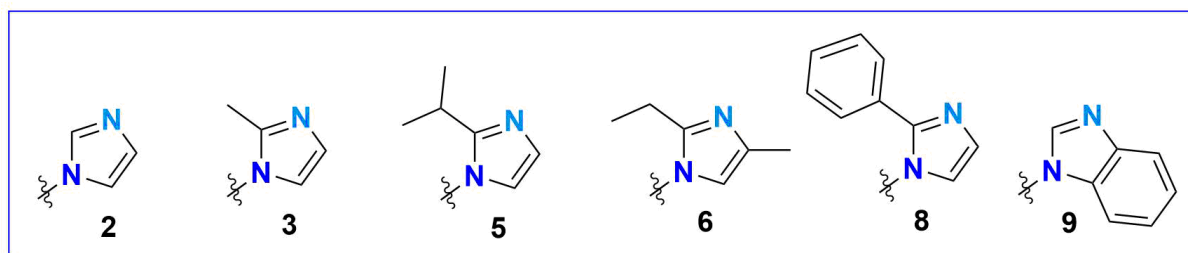
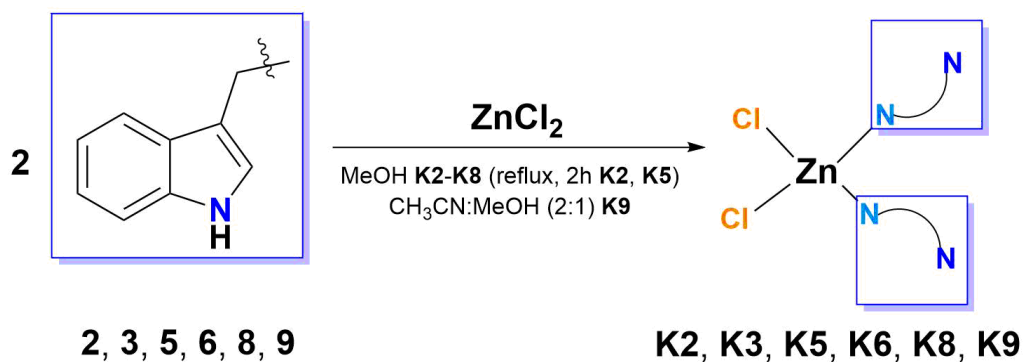
Schemat 1. Schemat syntezy koniugatów indolowo-imidazolowych 2 – 9.



Schemat 2. Schemat syntezy koniugatów indolowo-tioketonowych 10 – 23. a) (gramina:azol 1:2) pierwszy etap: EtOH, NaOH, drugi etap: EtOH, reflux, 3 – 14 h; b) PhCH₃, reflux, 2 – 8 h; c) EtOH, reflux, 5 – 10 h.



Schemat 3. Schemat syntezy koniugatów indolowo-pirazolowych 24 – 40.



Schemat 4. Schemat syntezy kompleksów koniugatów indolowo-imidazolowych z chlorkiem cynku.

Bibliografia

1. Schreiber, C.L.; Smith, B.D. Molecular Conjugation Using Non-Covalent Click Chemistry. *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 393–400, doi:10.1038/s41570-019-0095-1.
2. Yang, X.; Pan, Z.; Choudhury, M.R.; Yuan, Z.; Anifowose, A.; Yu, B.; Wang, W.; Wang, B. Making Smart Drugs Smarter: The Importance of Linker Chemistry in Targeted Drug Delivery. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 2682–2713, doi:10.1002/med.21720.
3. Yang, Y.; Wang, S.; Ma, P.; Jiang, Y.; Cheng, K.; Yu, Y.; Jiang, N.; Miao, H.; Tang, Q.; Liu, F.; et al. Drug Conjugate-Based Anticancer Therapy - Current Status and Perspectives. *Cancer Lett.* **2023**, *552*, 215969, doi:10.1016/j.canlet.2022.215969.
4. Negash, K.H.; Norris, J.K.S.; Hodgkinson, J.T. Siderophore-Antibiotic Conjugate Design: New Drugs for Bad Bugs? *Molecules* **2019**, *24*, 3314, doi:10.3390/molecules24183314.
5. Greco, F.; Vicent, M.J. Combination Therapy: Opportunities and Challenges for Polymer–Drug Conjugates as Anticancer Nanomedicines. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2009**, *61*, 1203–1213, doi:10.1016/j.addr.2009.05.006.
6. Wang, N.; Luo, J.; Deng, F.; Huang, Y.; Zhou, H. Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fphar.2022.839808.
7. Feng, J.; Zheng, Y.; Ma, W.; Ihsan, A.; Hao, H.; Cheng, G.; Wang, X. Multitarget Antibacterial Drugs: An Effective Strategy to Combat Bacterial Resistance. *Pharmacol. Ther.* **2023**, *252*, 108550, doi:10.1016/j.pharmthera.2023.108550.
8. Alkhzem, A.H.; Woodman, T.J.; Blagbrough, I.S. Design and Synthesis of Hybrid Compounds as Novel Drugs and Medicines. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 19470–19484, doi:10.1039/D2RA03281C.
9. Sheyi, R.; de la Torre, B.G.; Albericio, F. Linkers: An Assurance for Controlled Delivery of Antibody-Drug Conjugate. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 396, doi:10.3390/pharmaceutics14020396.
10. Zawilska, J.B.; Wojcieszak, J.; Olejniczak, A.B. Prodrugs: A Challenge for the Drug Development. *Pharmacol. Rep.* **2013**, *65*, 1–14, doi:10.1016/s1734-1140(13)70959-9.
11. Datta, L.P.; Manchineella, S.; Govindaraju, T. Biomolecules-Derived Biomaterials. *Biomaterials* **2020**, *230*, 119633, doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119633.
12. Meares, C.F. Bioconjugate Chemistry☆. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2014 ISBN 978-0-12-409547-2.
13. Li, F.; Mahato, R.I. Bioconjugate Therapeutics: Current Progress and Future Perspective. *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*, 1321–1324, doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00263.
14. Mu, R.; Yuan, J.; Huang, Y.; Meissen, J.K.; Mou, S.; Liang, M.; Rosenbaum, A.I. Bioanalytical Methods and Strategic Perspectives Addressing the Rising Complexity of Novel Bioconjugates and Delivery Routes for Biotherapeutics. *BioDrugs* **2022**, *36*, 181–196, doi:10.1007/s40259-022-00518-w.
15. Bansal, R.; Suryan, A. A Comprehensive Review on Steroidal Bioconjugates as Promising Leads in Drug Discovery. *ACS Bio Med Chem Au* **2022**, *2*, 340–369, doi:10.1021/acsbio-medchemau.1c00071.
16. Benizri, S.; Gissot, A.; Martin, A.; Vialet, B.; Grinstaff, M.W.; Barthélémy, P. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications. *Bioconjugate Chem.* **2019**, *30*, 366–383, doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00761.
17. Wadhawan, A.; Chatterjee, M.; Singh, G. Present Scenario of Bioconjugates in Cancer Therapy: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5243, doi:10.3390/ijms20215243.
18. Shinde, S.; Folliero, V.; Chianese, A.; Zannella, C.; De Filippis, A.; Rosati, L.; Prisco, M.; Falanga, A.; Mali, A.; Galdiero, M.; et al. Synthesis of Chitosan-Coated Silver Nanoparticle

- Bioconjugates and Their Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Bacteria. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 9340, doi:10.3390/app11199340.
19. Romano, M.R.; Berti, F.; Rappuoli, R. Classical- and Bioconjugate Vaccines: Comparison of the Structural Properties and Immunological Response. *Curr. Opin. Immunol.* **2022**, *78*, 102235, doi:10.1016/j.coi.2022.102235.
 20. Su, Z.; Xiao, D.; Xie, F.; Liu, L.; Wang, Y.; Fan, S.; Zhou, X.; Li, S. Antibody–Drug Conjugates: Recent Advances in Linker Chemistry. *Acta Pharm. Sin. B* **2021**, *11*, 3889–3907, doi:10.1016/j.apsb.2021.03.042.
 21. Tsuchikama, K.; An, Z. Antibody-Drug Conjugates: Recent Advances in Conjugation and Linker Chemistries. *Protein & Cell* **2018**, *9*, 33–46, doi:10.1007/s13238-016-0323-0.
 22. Soltan, O.M.; Shoman, M.E.; Abdel-Aziz, S.A.; Narumi, A.; Konno, H.; Abdel-Aziz, M. Molecular Hybrids: A Five-Year Survey on Structures of Multiple Targeted Hybrids of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *225*, 113768, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113768.
 23. Müller-Schiffmann, A.; Sticht, H.; Korth, C. Hybrid Compounds. *BioDrugs* **2012**, *26*, 21–31, doi:10.2165/11597630-000000000-00000.
 24. Pedrosa, M. de O.; Cruz, R.M.D. da; Viana, J. de O.; Moura, R.O. de; Ishiki, H.M.; Filho, J.M.B.; Diniz, M.F.F.M.; Scotti, M.T.; Scotti, L.; Mendonca, F.J.B. Hybrid Compounds as Direct Multitarget Ligands: A Review. *Curr. Top. Med. Chem.* *17*, 1044–1079, doi:10.2174/1568026616666160927160620.
 25. Padhi, D.; Govindaraju, T. Mechanistic Insights for Drug Repurposing and the Design of Hybrid Drugs for Alzheimer’s Disease. *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 7088–7105, doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00335.
 26. Zhu, M.; Tse, M.W.; Weller, J.; Chen, J.; Blainey, P.C. The Future of Antibiotics Begins with Discovering New Combinations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2021**, *1496*, 82–96, doi:10.1111/nyas.14649.
 27. Singh, A.K.; Kumar, A.; Singh, H.; Sonawane, P.; Paliwal, H.; Thareja, S.; Pathak, P.; Grishina, M.; Jaremko, M.; Emwas, A.-H.; et al. Concept of Hybrid Drugs and Recent Advancements in Anticancer Hybrids. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1071, doi:10.3390/ph15091071.
 28. Morais, T.S. Recent Advances in the Development of Hybrid Drugs. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 889, doi:10.3390/pharmaceutics16070889.
 29. Marshall, C.M.; Federice, J.G.; Bell, C.N.; Cox, P.B.; Njardarson, J.T. An Update on the Nitrogen Heterocycle Compositions and Properties of U.S. FDA-Approved Pharmaceuticals (2013–2023). *J. Med. Chem.* **2024**, *67*, 11622–11655, doi:10.1021/acs.jmedchem.4c01122.
 30. Kumari, A.; Singh, R.K. Medicinal Chemistry of Indole Derivatives: Current to Future Therapeutic Prospectives. *Bioorg. Chem.* **2019**, *89*, 103021, doi:10.1016/j.bioorg.2019.103021.
 31. Sundberg, R.J. Electrophilic Substitution Reactions of Indoles. In *Heterocyclic Scaffolds II: Reactions and Applications of Indoles*; Gribble, G.W., Ed.; Topics in Heterocyclic Chemistry; Springer: Berlin, Heidelberg, 2010; pp. 47–115 ISBN 978-3-642-15733-2.
 32. Kałużna-Czaplińska, J.; Gątarek, P.; Chirumbolo, S.; Chartrand, M.S.; Bjørklund, G. How Important Is Tryptophan in Human Health? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 72–88, doi:10.1080/10408398.2017.1357534.
 33. Corpas, F.J.; Gupta, D.K.; Palma, J.M. Tryptophan: A Precursor of Signaling Molecules in Higher Plants. In *Hormones and Plant Response*; Gupta, D.K., Corpas, F.J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2021; pp. 273–289 ISBN 978-3-030-77477-6.

34. Candelieri, F.; Simone, M.; Leonardi, A.; Rossi, M.; Amaretti, A.; Raimondi, S. Indole and P-Cresol in Feces of Healthy Subjects: Concentration, Kinetics, and Correlation with Microbiome. *Front. Mol. Med* **2022**, *2*, doi:10.3389/fmmed.2022.959189.
35. Berstad, A.; Raa, J.; Valeur, J. Indole - the Scent of a Healthy "Inner Soil." *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 27997, doi:10.3402/mehd.v26.27997.
36. Mindt, M.; Beyraghdar Kashkooli, A.; Suarez-Diez, M.; Ferrer, L.; Jilg, T.; Bosch, D.; Martins Dos Santos, V.; Wendisch, V.F.; Cankar, K. Production of Indole by *Corynebacterium Glutamicum* Microbial Cell Factories for Flavor and Fragrance Applications. *Microb. Cell Fact* **2022**, *21*, 45, doi:10.1186/s12934-022-01771-y.
37. Omar, F.; Tareq, A.M.; Alqahtani, A.M.; Dhama, K.; Sayeed, M.A.; Emran, T.B.; Simal-Gandara, J. Plant-Based Indole Alkaloids: A Comprehensive Overview from a Pharmacological Perspective. *Molecules* **2021**, *26*, 2297, doi:10.3390/molecules26082297.
38. Ziegler, J.; Facchini, P.J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2008**, *59*, 735–769, doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092730.
39. Braekman, J.C.; Daloz, D.; Pasteels, J.M. Alkaloids in Animals. In *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*; Roberts, M.F., Wink, M., Eds.; Springer US: Boston, MA, 1998; pp. 349–378 ISBN 978-1-4757-2905-4.
40. Bhambhani, S.; Kondhare, K.R.; Giri, A.P. Diversity in Chemical Structures and Biological Properties of Plant Alkaloids. *Molecules* **2021**, *26*, 3374, doi:10.3390/molecules26113374.
41. Adibah, K.Z.M.; Azzreena, M.A.; Adibah, K.Z.M.; Azzreena, M.A. Plant Toxins: Alkaloids and Their Toxicities. *GSC Biol. Pharm. Sci.* **2019**, *6*, doi:10.30574/gscbps.2019.6.2.0003.
42. Mitra, S.; Prova, S.R.; Sultana, S.A.; Das, R.; Nainu, F.; Emran, T.B.; Tareq, A.M.; Uddin, Md.S.; Alqahtani, A.M.; Dhama, K.; et al. Therapeutic Potential of Indole Alkaloids in Respiratory Diseases: A Comprehensive Review. *Phytomedicine* **2021**, *90*, 153649, doi:10.1016/j.phymed.2021.153649.
43. Kokubo, Y.; Nishizaka, M.; Ube, N.; Yabuta, Y.; Tebayashi, S.; Ueno, K.; Taketa, S.; Ishihara, A. Distribution of the Tryptophan Pathway-Derived Defensive Secondary Metabolites Gramine and Benzoxazinones in Poaceae. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2017**, *81*, 431–440, doi:10.1080/09168451.2016.1256758.
44. Wibowo, J.T.; Ahmadi, P.; Rahmawati, S.I.; Bayu, A.; Putra, M.Y.; Kijjoa, A. Marine-Derived Indole Alkaloids and Their Biological and Pharmacological Activities. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 3, doi:10.3390/md20010003.
45. Plazas, E.; Faraone, N. Indole Alkaloids from Psychoactive Mushrooms: Chemical and Pharmacological Potential as Psychotherapeutic Agents. *Biomedicines* **2023**, *11*, 461, doi:10.3390/biomedicines11020461.
46. Chen, Y.-L.; Dai, Y.-H.; Wang, A.-D.; Zhou, Z.-Y.; Lei, M.; Liu, J.; Lin, B.; Xia, M.-Y.; Wang, D. Two New Indole Alkaloids from Toad Venom of *Bufo Bufo Gargarizans*. *Molecules* **2020**, *25*, 4511, doi:10.3390/molecules25194511.
47. Suliphuldevara Mathada, B.; Gunavanthrao Yernale, N.; Basha, J.N. The Multi-Pharmacological Targeted Role of Indole and Its Derivatives: A Review. *ChemistrySelect* **2023**, *8*, e202204181, doi:10.1002/slct.202204181.
48. Umer, S.M.; Solangi, M.; Khan, K.M.; Saleem, R.S.Z. Indole-Containing Natural Products 2019–2022: Isolations, Reappraisals, Syntheses, and Biological Activities. *Molecules* **2022**, *27*, 7586, doi:10.3390/molecules27217586.
49. Nisha; Singh, S.; Sharma, N.; Chandra, R. The Indole Nucleus as a Selective COX-2 Inhibitor and Anti-Inflammatory Agent (2011–2022). *Org. Chem. Front.* **2022**, *9*, 3624–3639, doi:10.1039/D2QO00534D.
50. Lima, E.; Medeiros, J. Marine Organisms as Alkaloid Biosynthesizers of Potential Anti-Alzheimer Agents. *Marine Drugs* **2022**, *20*, 75, doi:10.3390/md20010075.

51. Chiu, Y.-J.; Lin, C.-H.; Lin, C.-Y.; Yang, P.-N.; Lo, Y.-S.; Chen, Y.-C.; Chen, C.-M.; Wu, Y.-R.; Yao, C.-F.; Chang, K.-H.; et al. Investigating Therapeutic Effects of Indole Derivatives Targeting Inflammation and Oxidative Stress in Neurotoxin-Induced Cell and Mouse Models of Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2642, doi:10.3390/ijms24032642.
52. Zhu, Y.; Zhao, J.; Luo, L.; Gao, Y.; Bao, H.; Li, P.; Zhang, H. Research Progress of Indole Compounds with Potential Antidiabetic Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *223*, 113665, doi:10.1016/j.ejmech.2021.113665.
53. Chen, Q.; Wu, C.; Zhu, J.; Li, E.; Xu, Z. Therapeutic Potential of Indole Derivatives as Anti-HIV Agents: A Mini-Review. *Curr. Top. Med. Chem.* **22**, 993–1008, doi:10.2174/1568026621666211012111901.
54. Girgis, A.S.; Panda, S.S.; Kariuki, B.M.; Bekheit, M.S.; Barghash, R.F.; Aboshouk, D.R. Indole-Based Compounds as Potential Drug Candidates for SARS-CoV-2. *Molecules* **2023**, *28*, 6603, doi:10.3390/molecules28186603.
55. Martemucci, G.; Costagliola, C.; Mariano, M.; D'andrea, L.; Napolitano, P.; D'Alessandro, A.G. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen* **2022**, *2*, 48–78, doi:10.3390/oxygen2020006.
56. Aranda-Rivera, A.K.; Cruz-Gregorio, A.; Arancibia-Hernández, Y.L.; Hernández-Cruz, E.Y.; Pedraza-Chaverri, J. RONS and Oxidative Stress: An Overview of Basic Concepts. *Oxygen* **2022**, *2*, 437–478, doi:10.3390/oxygen2040030.
57. Reddy, V.P. Oxidative Stress in Health and Disease. *Biomedicines* **2023**, *11*, 2925, doi:10.3390/biomedicines11112925.
58. Marques, M.M.M.S.B.; Ferreira, L.M. da S.P. Analysis of the Antioxidant Activity of an Indole Library: Cyclic Voltammetry versus ROS Scavenging Activity. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 101–106, doi:10.1016/j.tetlet.2010.10.172.
59. Tan, D.; Reiter, R.J.; Manchester, L.C.; Yan, M.; El-Sawi, M.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Kohen, R.; Allegra, M.C.; Hardelan, R. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 181–197, doi:10.2174/1568026023394443.
60. Muñoz-Jurado, A.; Escribano, B.M.; Caballero-Villarraso, J.; Galván, A.; Agüera, E.; Santamaría, A.; Túnez, I. Melatonin and Multiple Sclerosis: Antioxidant, Anti-Inflammatory and Immunomodulator Mechanism of Action. *Inflammopharmacol* **2022**, *30*, 1569–1596, doi:10.1007/s10787-022-01011-0.
61. Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Plummer, B.F.; Hardies, L.J.; Weintraub, S.T.; Vijayalaxmi, null; Shepherd, A.M. A Novel Melatonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of in Vivo Hydroxyl Radical Generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 614–620, doi:10.1006/bbrc.1998.9826.
62. Binici, E.E.; Akıncıoğlu, H.; Kılınç, N. Indole-3-Carbinol (I3C): Inhibition Effect on Monoamine Oxidase A (MAO-A), Monoamine Oxidase B (MAO-B) and Cholinesterase Enzymes, Antioxidant Capacity and Molecular Docking Study. *ChemistrySelect* **2023**, *8*, e202301727, doi:10.1002/slct.202301727.
63. Negatu, D.A.; Gengenbacher, M.; Dartois, V.; Dick, T. Indole Propionic Acid, an Unusual Antibiotic Produced by the Gut Microbiota, With Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, doi:10.3389/fmicb.2020.575586.
64. Goboza, M.; Meyer, M.; Aboua, Y.G.; Oguntibeju, O.O. In Vitro Antidiabetic and Antioxidant Effects of Different Extracts of Catharanthus Roseus and Its Indole Alkaloid, Vindoline. *Molecules* **2020**, *25*, 5546, doi:10.3390/molecules25235546.
65. Sabi, E.M.; AlAfaleq, N.O.; Mujamammi, A.H.; Al-Shouli, S.T.; Althafar, Z.M.; Bin Dahman, L.S.; Sumaily, K.M. Gramine Exerts Cytoprotective Effects and Antioxidant Properties Against H₂O₂-Induced Oxidative Stress in HEK 293 Cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2024**, *196*, 3471–3487, doi:10.1007/s12010-023-04693-6.

66. Elkamhawy, A.; Oh, N.K.; Gouda, N.A.; Abdellattif, M.H.; Alshammari, S.O.; Abourehab, M.A.S.; Alshammari, Q.A.; Belal, A.; Kim, M.; Al-Karmalawy, A.A.; et al. Novel Hybrid Indole-Based Caffeic Acid Amide Derivatives as Potent Free Radical Scavenging Agents: Rational Design, Synthesis, Spectroscopic Characterization, In Silico and In Vitro Investigations. *Metabolites* **2023**, *13*, 141, doi:10.3390/metabo13020141.
67. Kudličková, Z.; Michalková, R.; Salayová, A.; Ksiažek, M.; Vilková, M.; Bekešová, S.; Mojžiš, J. Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Indole Hybrid Chalcones and Their Antiproliferative and Antioxidant Activity. *Molecules* **2023**, *28*, 6583, doi:10.3390/molecules28186583.
68. Yadav, S.K.; Yadav, R.K.; Yadava, U. Computational Investigations and Molecular Dynamics Simulations Envisioned for Potent Antioxidant and Anticancer Drugs Using Indole-Chalcone-Triazole Hybrids. *DNA Repair* **2020**, *86*, 102765, doi:10.1016/j.dnarep.2019.102765.
69. Gavadia, R.; Rasgania, J.; Sahu, N.; Varma-Basil, M.; Chauhan, V.; Kumar, S.; Mor, S.; Singh, D.; Jakhar, K. Synthesis of Indole-Functionalized Isoniazid Conjugates with Potent Antimycobacterial and Antioxidant Efficacy. *Future Med. Chem.* **2024**, *16*, 1731–1747, doi:10.1080/17568919.2024.2379240.
70. Anastassova, N.; Stefanova, D.; Hristova-Avakumova, N.; Georgieva, I.; Kondeva-Burdina, M.; Rangelov, M.; Todorova, N.; Tzoneva, R.; Yancheva, D. New Indole-3-Propionic Acid and 5-Methoxy-Indole Carboxylic Acid Derived Hydrazone Hybrids as Multifunctional Neuroprotectors. *Antioxidants* **2023**, *12*, 977, doi:10.3390/antiox12040977.
71. Kumar Madugula, A.; Kiran, B.; Suresh Varma Dendukuri, B.N.; Kishore, T.V.N.; Srinivasa Rao, P.; Ranagaih, G.; Jagadeesh, K. Synthesis, Characterization, and Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Drug Likeness Properties of Indole Containing 1,3,4-Oxadiazoles. *Results Chem.* **2024**, *9*, 101664, doi:10.1016/j.rechem.2024.101664.
72. Arumugam, N.; Almansour, A.I.; Alkaltham, M.F.; Soliman, S.M.; Viswanathan, V.; Priya, R.V.; Karuppaiah, P.; Alaqeel, S.I.; Dege, N.; Perumal, K. Synthesis, Structural Determination, *in Vitro* Antioxidant and Antibacterial Efficacy of Dispirooxindolopyrrolidine Embedded Indole Heterocycle. *J. Mol. Struct.* **2024**, *1295*, 136680, doi:10.1016/j.molstruc.2023.136680.
73. Jagadeesan, S.; Karpagam, S.; Noor, A.; Basu, R. Indole 3-Heterocyclic Derivative: A Potential Antioxidant, Antidiabetic Agent and Their Docking Study on Alpha Amylase. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1291*, 136027, doi:10.1016/j.molstruc.2023.136027.
74. KATHROTIYA, H.G.; PATEL, M.P. An Efficient Synthesis of 3'-Indolyl Substituted Pyrido[1,2-a]Benzimidazoles as Potential Antimicrobial and Antioxidant Agents. *J. Chem. Sci.* **2013**, *125*, 993–1001, doi:10.1007/s12039-013-0468-9.
75. Ashok, D.; Gundu, S.; Aamate, V.K.; Devulapally, M.G. Conventional and Microwave-Assisted Synthesis of New Indole-Tethered Benzimidazole-Based 1,2,3-Triazoles and Evaluation of Their Antimycobacterial, Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Mol. Divers.* **2018**, *22*, 769–778, doi:10.1007/s11030-018-9828-1.
76. Nagai, H.; Kim, Y.H. Cancer Prevention from the Perspective of Global Cancer Burden Patterns. *J. Thorac. Dis.* **2017**, *9*, 448–451, doi:10.21037/jtd.2017.02.75.
77. Dhiman, A.; Sharma, R.; Singh, R.K. Target-Based Anticancer Indole Derivatives and Insight into Structure–activity Relationship: A Mechanistic Review Update (2018–2021). *Acta Pharm. Sin. B* **2022**, *12*, 3006–3027, doi:10.1016/j.apsb.2022.03.021.
78. Malapelle, U.; Ricciuti, B.; Baglivo, S.; Pepe, F.; Pisapia, P.; Anastasi, P.; Tazza, M.; Sidoni, A.; Liberati, A.M.; Bellezza, G.; et al. Osimertinib. In *Small Molecules in Oncology*; Martens, U.M., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 257–276 ISBN 978-3-319-91442-8.

79. Laubach, J.P.; Moreau, P.; San-Miguel, J.F.; Richardson, P.G. Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4767–4773, doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0530.
80. Gallogly, M.M.; Lazarus, H.M. Midostaurin: An Emerging Treatment for Acute Myeloid Leukemia Patients. *J. Blood Med.* **2016**, *7*, 73–83, doi:10.2147/JBM.S100283.
81. Qin, R.; You, F.-M.; Zhao, Q.; Xie, X.; Peng, C.; Zhan, G.; Han, B. Naturally Derived Indole Alkaloids Targeting Regulated Cell Death (RCD) for Cancer Therapy: From Molecular Mechanisms to Potential Therapeutic Targets. *J. Hematol. Oncol.* **2022**, *15*, 133, doi:10.1186/s13045-022-01350-z.
82. Biersack, B. 3,3'-Diindolylmethane and Its Derivatives: Nature-Inspired Strategies Tackling Drug Resistant Tumors by Regulation of Signal Transduction, Transcription Factors and microRNAs. *Cancer Drug Resist.* **2020**, *3*, 867–878, doi:10.20517/cdr.2020.53.
83. Jia, Y.; Wen, X.; Gong, Y.; Wang, X. Current Scenario of Indole Derivatives with Potential Anti-Drug-Resistant Cancer Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *200*, 112359, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112359.
84. Hassan, A.S.; Moustafa, G.O.; Awad, H.M.; Nossier, E.S.; Mady, M.F. Design, Synthesis, Anticancer Evaluation, Enzymatic Assays, and a Molecular Modeling Study of Novel Pyrazole–Indole Hybrids. *ACS Omega* **2021**, *6*, 12361–12374, doi:10.1021/acsomega.1c01604.
85. Kryshchynshyn-Dylevych, A.; Radko, L.; Finiuk, N.; Garazd, M.; Kashchak, N.; Posyniak, A.; Niemczuk, K.; Stoika, R.; Lesyk, R. Synthesis of Novel Indole-Thiazolidinone Hybrid Structures as Promising Scaffold with Anticancer Potential. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *50*, 116453, doi:10.1016/j.bmc.2021.116453.
86. Gavadia, R.; Rasgania, J.; Sahu, N.; Nimesh, S.; Loveleen, L.; Mor, S.; Jakhar, K. Synthesis of Indole-Linked Thiadiazoles and Their Anticancer Action against Triple-Negative Breast Cancer. *Chem. Biodiversity* **2024**, *21*, e202302000, doi:10.1002/cbdv.202302000.
87. Al-Warhi, T.; El Kerdawy, A.M.; Aljaeed, N.; Ismael, O.E.; Ayyad, R.R.; Eldehna, W.M.; Abdel-Aziz, H.A.; Al-Ansary, G.H. Synthesis, Biological Evaluation and In Silico Studies of Certain Oxindole–Indole Conjugates as Anticancer CDK Inhibitors. *Molecules* **2020**, *25*, 2031, doi:10.3390/molecules25092031.
88. Bocci, V. The Neglected Organ: Bacterial Flora Has a Crucial Immunostimulatory Role. *Perspect. Biol. Med.* **1992**, *35*, 251–260.
89. Deussenbery, C.; Wang, Y.; Shukla, A. Recent Innovations in Bacterial Infection Detection and Treatment. *ACS Infect. Dis.* **2021**, *7*, 695–720, doi:10.1021/acsinfectdis.0c00890.
90. Kong, Q.; Yang, Y. Recent Advances in Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2021**, *35*, 127799, doi:10.1016/j.bmcl.2021.127799.
91. May Zin, W.W.; Buttachon, S.; Dethoup, T.; Pereira, J.A.; Gales, L.; Inácio, Â.; Costa, P.M.; Lee, M.; Sekeroglu, N.; Silva, A.M.S.; et al. Antibacterial and Antibiofilm Activities of the Metabolites Isolated from the Culture of the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Eurotium Chevalieri* KUFA 0006. *Phytochemistry* **2017**, *141*, 86–97, doi:10.1016/j.phytochem.2017.05.015.
92. Mulwa, L.S.; Jansen, R.; Praditya, D.F.; Mohr, K.I.; Wink, J.; Steinmann, E.; Stadler, M. Six Heterocyclic Metabolites from the Myxobacterium *Labilithrix Luteola*. *Molecules* **2018**, *23*, 542, doi:10.3390/molecules23030542.
93. Gos, F.M.W.R.; Savi, D.C.; Shaaban, K.A.; Thorson, J.S.; Aluizio, R.; Possiede, Y.M.; Rohr, J.; Glienke, C. Antibacterial Activity of Endophytic Actinomycetes Isolated from the Medicinal Plant *Vochysia Divergens* (Pantanal, Brazil). *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, doi:10.3389/fmicb.2017.01642.

94. Limbadri, S.; Luo, X.; Lin, X.; Liao, S.; Wang, J.; Zhou, X.; Yang, B.; Liu, Y. Bioactive Novel Indole Alkaloids and Steroids from Deep Sea-Derived Fungus *Aspergillus Fumigatus* SCSIO 41012. *Molecules* **2018**, *23*, 2379, doi:10.3390/molecules23092379.
95. Liu, Y.; Cui, Y.; Lu, L.; Gong, Y.; Han, W.; Piao, G. Natural Indole-Containing Alkaloids and Their Antibacterial Activities. *Arch. Pharm.* **2020**, *353*, 2000120, doi:10.1002/ardp.202000120.
96. Yan, Y.; Li, X.; Zhang, C.; Lv, L.; Gao, B.; Li, M. Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics* **2021**, *10*, 318, doi:10.3390/antibiotics10030318.
97. Cai, X.-Y.; Wang, J.-P.; Shu, Y.; Hu, J.-T.; Sun, C.-T.; Cai, L.; Ding, Z.-T. A New Cytotoxic Indole Alkaloid from the Fungus *Penicillium Polonicum* TY12. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36*, 2270–2276, doi:10.1080/14786419.2020.1828406.
98. Qin, M.; Gao, W.; Wang, H.; Yin, S.; Hu, J.; Gao, W.; Ding, C. Monoterpenoid Indole Alkaloids from the Stem Barks of *Voacanga Africana* and Their Chemotaxonomic Significance. *Biochem. Syst. Ecol.* **2024**, *116*, 104863, doi:10.1016/j.bse.2024.104863.
99. Hao, W.; Ma-Long, Q.; Kun, F.; Wen, G.; Rui-Rong, G.; Shan-Ze, Y.; Wei-Yan, H.; Lan-Chun, Z.; Rong-Ping, Z.; Hao-Fei, Y.; et al. Two New Antimicrobial Monoterpenoid Indole Alkaloids from the Roots of *Rauvolfia Yunnanensis*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2023**, *25*, 429–437, doi:10.1080/10286020.2022.2104258.
100. Pájaro-González, Y.; Cabrera-Barraza, J.; Martelo-Ramírez, G.; Oliveros-Díaz, A.F.; Urrego-Álvarez, J.; Quiñones-Fletcher, W.; Díaz-Castillo, F. In Vitro and In Silico Antistaphylococcal Activity of Indole Alkaloids Isolated from *Tabernaemontana Cymosa* Jacq (Apocynaceae). *Sci. Pharm.* **2022**, *90*, 38, doi:10.3390/scipharm90020038.
101. Qiongxian, Y.; Jun, D.; Zhenfeng, Z.; Tongyou, L.; Zhicong, T.; Zhenyou, T. The Therapeutic Potential of Indole Hybrids, Dimers, and Trimers against Drug-Resistant ESKAPE Pathogens. *Arch. Pharm.* **2024**, *357*, e2400295, doi:10.1002/ardp.202400295.
102. Meng, T.; Hou, Y.; Shang, C.; Zhang, J.; Zhang, B. Recent Advances in Indole Dimers and Hybrids with Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Arch. Pharm.* **2021**, *354*, 2000266, doi:10.1002/ardp.202000266.
103. Zhou, Y.; Ju, Y.; Yang, Y.; Sang, Z.; Wang, Z.; He, G.; Yang, T.; Luo, Y. Discovery of Hybrids of Indolin-2-One and Nitroimidazole as Potent Inhibitors against Drug-Resistant Bacteria. *J. Antibiot.* **2018**, *71*, 887–897, doi:10.1038/s41429-018-0076-5.
104. Stukenbrock, E.; Gurr, S. Address the Growing Urgency of Fungal Disease in Crops. *Nature* **2023**, *617*, 31–34, doi:10.1038/d41586-023-01465-4.
105. Yang, M.-L.; Chen, J.; Sun, M.; Zhang, D.-B.; Gao, K. Antifungal Indole Alkaloids from *Winchia Calophylla*. *Planta Med.* **2016**, *82*, 712–716, doi:10.1055/s-0042-102459.
106. Yu, H.-F.; Ding, C.-F.; Zhang, L.-C.; Mohamed, K.-H.; Dai, Z.; Wei, X.; Li, X.-N.; Liu, Y.-P.; Zhang, R.-P.; Luo, X.-D. Alstoscholarisine L, a Novel Caged Monoterpenoid Indole Alkaloid with Antifungal Activity from *Alstonia Scholaris*. *Fitoterapia* **2025**, *180*, 106341, doi:10.1016/j.fitote.2024.106341.
107. Singh, U.P.; Sarma, B.K.; Mishra, P.K.; Ray, A.B. Antifungal Activity of Venenatine, an Indole Alkaloid Isolated from *Alstonia Venenata*. *Folia Microbiol.* **2000**, *45*, 173–176, doi:10.1007/BF02817419.
108. Long, S.-Y.; Li, C.-L.; Hu, J.; Zhao, Q.-J.; Chen, D. Indole Alkaloids from the Aerial Parts of *Kopsia Fruticosa* and Their Cytotoxic, Antimicrobial and Antifungal Activities. *Fitoterapia* **2018**, *129*, 145–149, doi:10.1016/j.fitote.2018.06.017.
109. Campana, R.; Sisti, M.; Sabatini, L.; Lucarini, S. Marine Bisindole Alkaloid 2,2-Bis(6-Bromo-3-Indolyl)Ethylamine to Control and Prevent Fungal Growth on Building Material: A Potential Antifungal Agent. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 5607–5616, doi:10.1007/s00253-019-09895-9.

110. Jahng, Y. Progress in the Studies on Tryptanthrin, an Alkaloid of History. *Arch. Pharm. Res.* **2013**, *36*, 517–535, doi:10.1007/s12272-013-0091-9.
111. Lin, C.-J.; Chang, Y.-L.; Yang, Y.-L.; Chen, Y.-L. Natural Alkaloid Tryptanthrin Exhibits Novel Anticryptococcal Activity. *Med. Mycol.* **2020**, myaa074, doi:10.1093/mmy/myaa074.
112. Tugume, L.; Ssebambulidde, K.; Kasibante, J.; Ellis, J.; Wake, R.M.; Gakuru, J.; Lawrence, D.S.; Abassi, M.; Rajasingham, R.; Meya, D.B.; et al. Cryptococcal Meningitis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2023**, *9*, 1–18, doi:10.1038/s41572-023-00472-z.
113. Hesse-Macabata, J.; Morgner, B.; Elsner, P.; Hipler, U.-C.; Wiegand, C. Tryptanthrin Promotes Keratinocyte and Fibroblast Responses in Vitro after Infection with *Trichophyton Benhamiae* DSM6916. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1863, doi:10.1038/s41598-020-58773-2.
114. Pagniez, F.; Lebouvier, N.; Na, Y.M.; Ourliac-Garnier, I.; Picot, C.; Le Borgne, M.; Le Pape, P. Biological Exploration of a Novel 1,2,4-Triazole-Indole Hybrid Molecule as Antifungal Agent. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 398–403, doi:10.1080/14756366.2019.1705292.
115. Al-Wabli, R.I.; Alsulami, M.A.; Bukhari, S.I.; Moubayed, N.M.S.; Al-Mutairi, M.S.; Attia, M.I. Design, Synthesis, and Antimicrobial Activity of Certain New Indole-1,2,4-Triazole Conjugates. *Molecules* **2021**, *26*, 2292, doi:10.3390/molecules26082292.
116. He, B.; Hu, Y.; Xing, L.; Qing, Y.; Meng, K.; Zeng, W.; Sun, Z.; Wang, Z.; Xue, W. Antifungal Activity of Novel Indole Derivatives Containing 1,3,4-Thiadiazole. *J. Agric. Food Chem.* **2024**, *72*, 10227–10235, doi:10.1021/acs.jafc.3c09303.
117. Chauhan, S.; Verma, V.; Kumar, D.; Gupta, R.; Gupta, S.; Bajaj, A.; Kumar, A.; Parshad, M. N-Heterocycles Hybrids: Synthesis, Antifungal and Antibiofilm Evaluation. *Synth. Commun.* **2022**, *52*, 898–911, doi:10.1080/00397911.2022.2056852.
118. Orechoff, A.; Norkina, S. Über Die Alkaloide von *Arundo Donax* L. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**, *68*, 436–437, doi:10.1002/cber.19350680312.
119. Madinaveitia, J. 404. The Alkaloids of *Arundo Donax* L. *J. Chem. Soc.* **1937**, 1927–1929, doi:10.1039/JR9370001927.
120. Pathak, M.P.; Policegoudra, R.S.; Goyary, D.; Das, A.; Mandal, S.; Chakraborti, S.; Bora, N.S.; Islam, J.; Patowary, P.; Raju, P.S.; et al. Safety Evaluation of an Oat Grain Alkaloid Gramine by Genotoxicity Assays. *Drug Chem. Toxicol.* **2018**, *41*, 147–154, doi:10.1080/01480545.2017.1322605.
121. Coulman, B.E.; Woods, D.L.; Clark, K.W. Identification of Low Alkaloid Genotypes of Reed Canary Grass. *Can. J. Plant Sci.* **1976**, *56*, 837–845, doi:10.4141/cjps76-136.
122. Świącicki, W.; Jach, K. Variation and Evolution of Alkaloid Complex in Yellow Lupine (*Lupinus luteus* L.) during Domestication. *Acta Agrobot.* **1980**, *33*, 177–195, doi:10.5586/aa.1980.015.
123. Johns, S.R.; Lamberton, J.A.; Occolowitz, J.L. 1,5-Dimethoxy-3-(Dimethylaminomethyl)Indole, the Major Alkaloid from *Gymnacranthera paniculata* (A. DC.) Warb. Var. *Zippeiana* (Miq.) J. Sinclair (Family Myristicaceae). *Aust. J. Chem.* **1967**, *20*, 1737–1742, doi:10.1071/ch9671737.
124. Jasiewicz, B.; Kozanecka-Okupnik, W.; Przygodzki, M.; Warzajtis, B.; Rychlewska, U.; Pospieszny, T.; Mrówczyńska, L. Synthesis, Antioxidant and Cytoprotective Activity Evaluation of C-3 Substituted Indole Derivatives. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 15425, doi:10.1038/s41598-021-94904-z.
125. Kozanecka-Okupnik, W.; Jasiewicz, B.; Pospieszny, T.; Jastrzab, R.; Skrobańska, M.; Mrówczyńska, L. Spectroscopy, Molecular Modeling and Anti-Oxidant Activity Studies on Novel Conjugates Containing Indole and Uracil Moiety. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1169*, 130–137, doi:10.1016/j.molstruc.2018.05.057.

126. Berdzik, N.; Jasiewicz, B.; Ostrowski, K.; Sierakowska, A.; Szlaużys, M.; Nowak, D.; Mrówczyńska, L. Novel Gramine-Based Bioconjugates Obtained by Click Chemistry as Cytoprotective Compounds and Potent Antibacterial and Antifungal Agents. *Nat. Prod. Res.* **2024**, *38*, 3721–3727, doi:10.1080/14786419.2023.2261139.
127. Diker, K.; de Maindreville, M.D.; Lévy, J. Synthesis and Resolution of a C₂-Symmetrical Indolo-2,3-Quinodimethane Dimer. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 7459–7462, doi:10.1016/S0040-4039(99)01348-9.
128. Semenov, B.B.; Granik, V.G. Chemistry of N-(1H-Indol-3-ylmethyl)-N,N-Dimethylamine (Gramine): A Review. *Pharm. Chem. J.* **2004**, *38*, 287–310, doi:10.1023/B:PHAC.0000048140.06266.63.
129. Dias, S.L.; Chuang, L.; Liu, S.; Seligmann, B.; Brendel, F.L.; Chavez, B.G.; Hoffie, R.E.; Hoffie, I.; Kumlehn, J.; Bültmeier, A.; et al. Biosynthesis of the Allelopathic Alkaloid Gramine in Barley by a Cryptic Oxidative Rearrangement. *Science* **2024**, *383*, 1448–1454, doi:10.1126/science.adk6112.
130. Ramu, A.; Kathiresan, S.; Ali Ahmed, B. Gramine Inhibits Angiogenesis and Induces Apoptosis via Modulation of TGF- β Signalling in 7,12 Dimethylbenz[a]Anthracene (DMBA) Induced Hamster Buccal Pouch Carcinoma. *Phytomedicine* **2017**, *33*, 69–76, doi:10.1016/j.phymed.2017.05.008.
131. Canton, M.C.; Holguin, F.O.; Boeing, W.J. Alkaloid Gramine to Control Algal Invaders: Algae Inhibition and Gramine Persistence. *Bioresour. Technol. Rep.* **2019**, *7*, 100304, doi:10.1016/j.biteb.2019.100304.
132. Xiao, X.; Huan, Q.; Huang, Y.; Liu, Z.; Liu, Y.; Li, R.; Wang, M.; Wang, Z. Gramine Sensitizes *Klebsiella Pneumoniae* to Tigecycline Killing. *Phytomedicine* **2024**, *126*, 155421, doi:10.1016/j.phymed.2024.155421.
133. Kozanecka-Okupnik, W.; Sierakowska, A.; Berdzik, N.; Kowalczyk, I.; Mrówczyńska, L.; Jasiewicz, B. New Triazole-Bearing Gramine Derivatives – Synthesis, Structural Analysis and Protective Effect against Oxidative Haemolysis. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36*, 3413–3419, doi:10.1080/14786419.2020.1864364.
134. Zhang, X.-H.; Guo, Q.; Wang, H.-Y.; Li, Y.-H.; Khamis, M.Y.; Ma, L.-Y.; Wang, B.; Liu, H.-M. Gramine-Based Structure Optimization to Enhance Anti-Gastric Cancer Activity. *Bioorg. Chem.* **2021**, *107*, 104549, doi:10.1016/j.bioorg.2020.104549.
135. Ke, S.; Shi, L.; Cao, X.; Yang, Q.; Liang, Y.; Yang, Z. Heterocycle-Functional Gramine Analogues: Solvent- and Catalyst-Free Synthesis and Their Inhibition Activities against Cell Proliferation. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *54*, 248–254, doi:10.1016/j.ejmech.2012.05.003.
136. Feng, K.; Li, X.; Yu, L. Synthesis, Antibacterial Activity, and Application in the Antifouling Marine Coatings of Novel Acylamino Compounds Containing Gramine Groups. *Prog. Org. Coat.* **2018**, *118*, 141–147, doi:10.1016/j.porgcoat.2017.10.027.
137. Kurek, J.; Sierakowska, A.; Berdzik, N.; Jasiewicz, B. Colchicine, Caffeine, Gramine, and Their Derivatives as Potential Herbicides, Fungicides, and Insecticides. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 10081, doi:10.3390/ijms251810081.
138. Lu, A.; Wang, T.; Hui, H.; Wei, X.; Cui, W.; Zhou, C.; Li, H.; Wang, Z.; Guo, J.; Ma, D.; et al. Natural Products for Drug Discovery: Discovery of Gramines as Novel Agents against a Plant Virus. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 2148–2156, doi:10.1021/acs.jafc.8b06859.
139. Wei, Y.; Shi, L.; Wang, K.; Liu, M.; Yang, Q.; Yang, Z.; Ke, S. Discovery of Gramine Derivatives That Inhibit the Early Stage of EV71 Replication in Vitro. *Molecules* **2014**, *19*, 8949–8964, doi:10.3390/molecules19078949.
140. Ghani, U. Chapter Five - Azoles and Related Derivatives. In *Alpha-Glucosidase Inhibitors*; Ghani, U., Ed.; Elsevier, 2020; pp. 119–136 ISBN 978-0-08-102779-0.

141. Belen'kii, L.I.; Chuvylkin, N.D. Alternative Mechanisms of Electrophilic Substitution in Azole Series. *Russ. Chem. Bull.* **2016**, *65*, 1441–1447, doi:10.1007/s11172-016-1471-3.
142. Horner, K.E.; Karadakov, P.B. Shielding in and around Oxazole, Imidazole, and Thiazole: How Does the Second Heteroatom Affect Aromaticity and Bonding? *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 7150–7157, doi:10.1021/acs.joc.5b01010.
143. Van Daele, R.; Spriet, I.; Wauters, J.; Maertens, J.; Mercier, T.; Van Hecke, S.; Brüggemann, R. Antifungal Drugs: What Brings the Future? *Med. Mycol.* **2019**, *57*, S328–S343, doi:10.1093/mmy/myz012.
144. Jørgensen, L.N.; Heick, T.M. Azole Use in Agriculture, Horticulture, and Wood Preservation – Is It Indispensable? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fcimb.2021.730297.
145. Devasia, J.; Nizam, A.; V. L., V. Azole-Based Antibacterial Agents: A Review on Multistep Synthesis Strategies and Biology. *Polycyclic Aromat. Compd.* **2022**, *42*, 5474–5495, doi:10.1080/10406638.2021.1938615.
146. Monapathi, M.E.; Oguegbulu, J.C.; Adogo, L.; Klink, M.; Okoli, B.; Mtunzi, F.; Modise, J.S. Pharmaceutical Pollution: Azole Antifungal Drugs and Resistance of Opportunistic Pathogenic Yeasts in Wastewater and Environmental Water. *Appl. Environ. Soil Sci.* **2021**, *2021*, 9985398, doi:10.1155/2021/9985398.
147. Brosnan, M.E.; Brosnan, J.T. Histidine Metabolism and Function. *J. Nutr.* **2020**, *150*, 2570S-2575S, doi:10.1093/jn/nxaa079.
148. Rosemeyer, H. The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 361–401, doi:10.1002/cbdv.200490033.
149. Zhang, Y.; Morar, M.; Ealick, S.E. Structural Biology of the Purine Biosynthetic Pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3699–3724, doi:10.1007/s00018-008-8295-8.
150. Curutchet, C.; Poater, J.; Solà, M.; Elguero, J. Analysis of the Effects of N-Substituents on Some Aspects of the Aromaticity of Imidazoles and Pyrazoles. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 8571–8577, doi:10.1021/jp204263p.
151. Kumar, V.; Kaur, K.; Gupta, G.K.; Sharma, A.K. Pyrazole Containing Natural Products: Synthetic Preview and Biological Significance. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *69*, 735–753, doi:10.1016/j.ejmech.2013.08.053.
152. Lökov, M.; Tshepelevitsh, S.; Heering, A.; Plieger, P.G.; Vianello, R.; Leito, I. On the Basicity of Conjugated Nitrogen Heterocycles in Different Media. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *2017*, 4475–4489, doi:10.1002/ejoc.201700749.
153. Katritzky, A.R.; Ramsden, C.A.; Joule, J.A.; Zhdankin, V.V. 2.4 - Structure of Five-Membered Rings with Two or More Heteroatoms. In *Handbook of Heterocyclic Chemistry (Third Edition)*; Katritzky, A.R., Ramsden, C.A., Joule, J.A., Zhdankin, V.V., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 2010; pp. 139–209 ISBN 978-0-08-095843-9.
154. Alkorta, I.; Elguero, J.; Liebman, J.F. The Annular Tautomerism of Imidazoles and Pyrazoles: The Possible Existence of Nonaromatic Forms. *Struct. Chem.* **2006**, *17*, 439–444, doi:10.1007/s11224-006-9065-6.
155. Elguero, J.; Alkorta, I.; Claramunt, R.M.; Cabildo, P.; Cornago, P.; Farrán, M.Á.; García, M.Á.; López, C.; Pérez-Torralba, M.; María, D.S.; et al. Structure of NH-Benzazoles (1H-Benzimidazoles, 1H- and 2H-Indazoles, 1H- and 2H-Benzotriazoles). *Chem. Heterocycl. Compd.* **2013**, *49*, 177–202, doi:10.1007/s10593-013-1237-x.
156. Claramunt, R.M.; María, M.D.S.; Infantes, L.; Cano, F.H.; Elguero, J. The Annular Tautomerism of 4(5)-Phenylimidazole. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 564–568, doi:10.1039/B109079H.
157. Tolomeu, H.V.; Fraga, C.A.M. Imidazole: Synthesis, Functionalization and Physicochemical Properties of a Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Molecules* **2023**, *28*, 838, doi:10.3390/molecules28020838.

158. Siwach, A.; Verma, P.K. Synthesis and Therapeutic Potential of Imidazole Containing Compounds. *BMC Chemistry* **2021**, *15*, 12, doi:10.1186/s13065-020-00730-1.
159. Alghamdi, S.S.; Suliman, R.S.; Almutairi, K.; Kahtani, K.; Aljatli, D. Imidazole as a Promising Medicinal Scaffold: Current Status and Future Direction. *Drug Des. Devel. Ther.* **2021**, *15*, 3289–3312, doi:10.2147/DDDT.S307113.
160. Rulhania, S.; Kumar, S.; Nehra, B.; Gupta, G.; Monga, V. An Insight into the Medicinal Perspective of Synthetic Analogs of Imidazole. *J. Mol. Struct.* **2021**, *1232*, 129982, doi:10.1016/j.molstruc.2021.129982.
161. Hernández Ceruelos, A.; Romero-Quezada, L.C.; Ruvalcaba Ledezma, J.C.; López Contreras, L. Therapeutic Uses of Metronidazole and Its Side Effects: An Update. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 397–401, doi:10.26355/eurrev_201901_16788.
162. Keam, S.J. Pretomanid: First Approval. *Drugs* **2019**, *79*, 1797–1803, doi:10.1007/s40265-019-01207-9.
163. Thomas, X.; Elhamri, M. Tipifarnib in the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Biol.: Targets Ther.* **2007**, *1*, 415–424, doi:10.2147/btt.s12160303.
164. Al-Majed, A.-R.A.; Assiri, E.; Khalil, N.Y.; Abdel-Aziz, H.A. Chapter Three - Losartan: Comprehensive Profile. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*; Brittain, H.G., Ed.; Academic Press, 2015; Vol. 40, pp. 159–194.
165. Maat, L.; Beyerman, H.C. Chapter 5 The Imidazole Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Brossi, A., Ed.; Academic Press, 1984; Vol. 22, pp. 281–333.
166. Jin, W.; Chen, X.; Dai, P.; Yu, L. Lepidiline C and D: Two New Imidazole Alkaloids from *Lepidium Meyenii* Walpers (Brassicaceae) Roots. *Phytochem. Lett.* **2016**, *17*, 158–161, doi:10.1016/j.phytol.2016.07.001.
167. Sawaya, A.C.H.F.; Vaz, B.G.; Eberlin, M.N.; Mazzafera, P. Screening Species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as Sources of Pilocarpine and Other Imidazole Alkaloids. *Genet. Resour. Crop. Evol.* **2011**, *58*, 471–480, doi:10.1007/s10722-011-9660-2.
168. Gross, H.; Kehraus, S.; König, G.M.; Woerheide, G.; Wright, A.D. New and Biologically Active Imidazole Alkaloids from Two Sponges of the Genus *Leucetta*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1190–1193, doi:10.1021/np020050c.
169. Lin, Y.-H.; Fang, L.-H.; Du, G.-H. Pilocarpine. In *Natural Small Molecule Drugs from Plants*; Du, G.-H., Ed.; Springer: Singapore, 2018; pp. 309–312 ISBN 978-981-10-8022-7.
170. Liwen, C.; Zhiqi, C.; Chaohua, D.; Wei, C.; Hong, Z.; Junming, W. Changes to Outflow Structures After Pilocarpine in Primary Open Angle Glaucoma Compared With Healthy Individuals Using Optical Coherence Tomography. *J. Glaucoma* **2023**, *32*, doi:10.1097/IJG.0000000000002165.
171. Mousavi, S.A.; Rajavi, Z.; Sabbaghi, H.; Abdi, S.; Montazerin, N.; Kheiri, B.; Monfared, A.H.-; Sheibani, K.; Jaldian, H.B. Pharmacological Treatment of Presbyopia Using Pilocarpine 1.25% Eye Drops. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **2024**, *19*, 468–475, doi:10.18502/jovr.v19i4.14578.
172. Kapourani, A.; Kontogiannopoulos, K.N.; Barmplexis, P. A Review on the Role of Pilocarpine on the Management of Xerostomia and the Importance of the Topical Administration Systems Development. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 762, doi:10.3390/ph15060762.
173. Gerasimova, E.L.; Gazizullina, E.R.; Borisova, M.V.; Igdisanova, D.I.; Nikiforov, E.A.; Moseev, T.D.; Varaksin, M.V.; Chupakhin, O.N.; Charushin, V.N.; Ivanova, A.V. Design and Antioxidant Properties of Bifunctional 2H-Imidazole-Derived Phenolic Compounds—A New Family of Effective Inhibitors for Oxidative Stress-Associated Destructive Processes. *Molecules* **2021**, *26*, 6534, doi:10.3390/molecules26216534.

174. Agili, F. Novel Thiazole Derivatives Containing Imidazole and Furan Scaffold: Design, Synthesis, Molecular Docking, Antibacterial, and Antioxidant Evaluation. *Molecules* **2024**, *29*, 1491, doi:10.3390/molecules29071491.
175. Rossi, R.; Ciofalo, M. An Updated Review on the Synthesis and Antibacterial Activity of Molecular Hybrids and Conjugates Bearing Imidazole Moiety. *Molecules* **2020**, *25*, 5133, doi:10.3390/molecules25215133.
176. Wu, L.; Fan, L.; Shi, L.; Wang, C.; Pan, Z.; Xu, C.; Yang, G. Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of Imidazole Chitosan Derivatives. *Carbohydr. Res.* **2024**, *544*, 109238, doi:10.1016/j.carres.2024.109238.
177. Sadeghian, S.; Bekhradi, F.; Mansouri, F.; Razmi, R.; Mansouri, S.G.; Poustforoosh, A.; Khabnadideh, S.; Zomorodian, K.; Zarehshahabadi, Z.; Rezaei, Z. Imidazole Derivatives as Novel and Potent Antifungal Agents: Synthesis, Biological Evaluation, Molecular Docking Study, Molecular Dynamic Simulation and ADME Prediction. *J. Mol. Struct.* **2024**, *1302*, 137447, doi:10.1016/j.molstruc.2023.137447.
178. Khan, M.; Shah, S.R.; Khan, F.; Halim, S.A.; Rahman, S.M.; Khalid, M.; Khan, A.; Al-Harrasi, A. Efficient Synthesis with Green Chemistry Approach of Novel Pharmacophores of Imidazole-Based Hybrids for Tumor Treatment: Mechanistic Insights from In Situ to In Silico. *Cancers* **2022**, *14*, 5079, doi:10.3390/cancers14205079.
179. P, S.; C, L.; J, A.; R, G.; Ka, W. Imidazoles as Potential Anticancer Agents: An Update on Recent Studies. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26144213.
180. Marinescu, M. Benzimidazole-Triazole Hybrids as Antimicrobial and Antiviral Agents: A Systematic Review. *Antibiotics* **2023**, *12*, 1220, doi:10.3390/antibiotics12071220.
181. Deng, C.; Yan, H.; Wang, J.; Liu, B.; Liu, K.; Shi, Y. The Anti-HIV Potential of Imidazole, Oxazole and Thiazole Hybrids: A Mini-Review. *Arabian J. Chem.* **2022**, *15*, 104242, doi:10.1016/j.arabjc.2022.104242.
182. Gao, Y.; Huang, D.-C.; Liu, C.; Song, Z.-L.; Liu, J.-R.; Guo, S.-K.; Tan, J.-Y.; Qiu, R.-L.; Jin, B.; Zhang, H.; et al. Streptochlorin Analogues as Potential Antifungal Agents: Design, Synthesis, Antifungal Activity and Molecular Docking Study. *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, *35*, 116073, doi:10.1016/j.bmc.2021.116073.
183. Li, Z.-Z.; Tangadanchu, V.K.R.; Battini, N.; Bheemanaboina, R.R.Y.; Zang, Z.-L.; Zhang, S.-L.; Zhou, C.-H. Indole-Nitroimidazole Conjugates as Efficient Manipulators to Decrease the Genes Expression of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 723–735, doi:10.1016/j.ejmech.2019.06.093.
184. Alam, M.A. Pyrazole: An Emerging Privileged Scaffold in Drug Discovery. *Future Med. Chem.* **2023**, *15*, 2011–2023, doi:10.4155/fmc-2023-0207.
185. Li, G.; Cheng, Y.; Han, C.; Song, C.; Huang, N.; Du, Y. Pyrazole-Containing Pharmaceuticals: Target, Pharmacological Activity, and Their SAR Studies. *RSC Med. Chem.* *13*, 1300–1321, doi:10.1039/d2md00206j.
186. Hongjin Zhai; Zhang, S.; Ampomah-Wireko, M.; Wang, H.; Cao, Y.; Yang, P.; Yang, Y.; Frejat, F.O.A.; Wang, L.; Zhao, B.; et al. Pyrazole: An Important Core in Many Marketed and Clinical Drugs. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2022**, *48*, 1175–1189, doi:10.1134/S1068162022060280.
187. Chen, Y.; Tortorici, M.A.; Garrett, M.; Hee, B.; Klamerus, K.J.; Pithavala, Y.K. Clinical Pharmacology of Axitinib. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, *52*, 713–725, doi:10.1007/s40262-013-0068-3.
188. Hitchcock, A.M.; Kufel, W.D.; Dwyer, K.A.M.; Sidman, E.F. Lenacapavir: A Novel Injectable HIV-1 Capsid Inhibitor. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2024**, *63*, 107009, doi:10.1016/j.ijantimicag.2023.107009.

189. Frey, R.; Becker, C.; Saleh, S.; Unger, S.; van der Mey, D.; Mück, W. Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Riociguat. *Clin. Pharmacokinet.* **2018**, *57*, 647–661, doi:10.1007/s40262-017-0604-7.
190. Goldstein, I.; Lue, T.F.; Padma-Nathan, H.; Rosen, R.C.; Steers, W.D.; Wicker, P.A. Oral Sildenafil in the Treatment of Erectile Dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 1397–1404, doi:10.1056/NEJM199805143382001.
191. Zhang, S.; Ye, Y.; Zhang, Q.; Luo, Y.; Wang, Z.-C.; Wu, Y.-Z.; Zhang, X.-P.; Yi, C. Current Development of Pyrazole–Azole Hybrids With Anticancer Potential. *Future Med. Chem.* **2023**, *15*, 1527–1548, doi:10.4155/fmc-2023-0138.
192. Xu, Z.; Zhuang, Y.; Chen, Q. Current Scenario of Pyrazole Hybrids with in Vivo Therapeutic Potential against Cancers. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *257*, 115495, doi:10.1016/j.ejmech.2023.115495.
193. Chalkha, M.; Nour, H.; Chebbac, K.; Nakkabi, A.; Bahsis, L.; Bakhouch, M.; Akhazzane, M.; Bourass, M.; Chtita, S.; Bin Jordan, Y.A.; et al. Synthesis, Characterization, DFT Mechanistic Study, Antimicrobial Activity, Molecular Modeling, and ADMET Properties of Novel Pyrazole-Isoxazoline Hybrids. *ACS Omega* **2022**, *7*, 46731–46744, doi:10.1021/acsomega.2c05788.
194. Goel, T.; Jain, N.; Bansode, D. Review on Pyrazole Hybrids as Anti-Microbial Agents. *Lett. Org. Chem.* *21*, 320–332, doi:10.2174/1570178620666230731161939.
195. Oulous, A.; Daoudi, N.E.; Harit, T.; Cherfi, M.; Bnouham, M.; Malek, F. New Pyrazole-Tetrazole Hybrid Compounds as Potent α -Amylase and Non-Enzymatic Glycation Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2022**, *69*, 128785, doi:10.1016/j.bmcl.2022.128785.
196. Alia Abdulaziz Alfi; Alharbi, A.; Qurban, J.; Abualnaja, M.M.; Abumelha, H.M.; Saad, F.A.; El-Metwaly, N.M. Molecular Modeling and Docking Studies of New Antioxidant Pyrazole-Thiazole Hybrids. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1267*, 133582, doi:10.1016/j.molstruc.2022.133582.
197. Barghady, N.; Chalkha, M.; Yamari, I.; Aflak, N.; Abchir, O.; Chebbac, K.; Nakkabi, A.; Chtita, S.; Chkirate, K.; Mague, J.T.; et al. Synthesis, Characterization, Mechanistic Study, *in-Vitro* and *in-Silico* Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of Novel Pyrazole-Pyrazoline Hybrid Systems. *J. Mol. Struct.* **2024**, *1309*, 138087, doi:10.1016/j.molstruc.2024.138087.
198. El-Miligy, M.M.M.; Al-Kubeisi, A.K.; Bekhit, M.G.; El-Zemity, S.R.; Nassra, R.A.; Hazzaa, A.A. Towards Safer Anti-Inflammatory Therapy: Synthesis of New Thymol–Pyrazole Hybrids as Dual COX-2/5-LOX Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2023**, *38*, 294–308, doi:10.1080/14756366.2022.2147164.
199. Naglah, A.M.; Almehizia, A.A.; Ghazwani, M.; Al-Wasidi, A.S.; Naglah, A.A.; Aboulthana, W.M.; Hassan, A.S. In Vitro Enzymatic and Computational Assessments of Pyrazole–Isatin and Pyrazole–Indole Conjugates as Anti-Diabetic, Anti-Arthritic, and Anti-Inflammatory Agents. *Pharmaceutics* **2025**, *17*, 293, doi:10.3390/pharmaceutics17030293.
200. Hassan, A.S. Antimicrobial Evaluation, in Silico ADMET Prediction, Molecular Docking, and Molecular Electrostatic Potential of Pyrazole-Isatin and Pyrazole-Indole Hybrid Molecules. *J. Iran Chem. Soc.* **2022**, *19*, 3577–3589, doi:10.1007/s13738-022-02551-6.
201. Li, Z.; Bhowmik, S.; Sagresti, L.; Brancato, G.; Smith, M.; Benson, D.E.; Li, P.; Merz, K.M.Jr. Simulating Metal-Imidazole Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **2024**, *20*, 6706–6716, doi:10.1021/acs.jctc.4c00581.
202. Sundberg, R.J.; Martin, R.B. Interactions of Histidine and Other Imidazole Derivatives with Transition Metal Ions in Chemical and Biological Systems. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 471–517, doi:10.1021/cr60290a003.
203. Supuran, C.T. Structure and Function of Carbonic Anhydrases. *Biochem. J.* **2016**, *473*, 2023–2032, doi:10.1042/BCJ20160115.

204. Ramezanzpour, A.; Karami, K.; Kharaziha, M.; Zakariazadeh, M.; Lipkowski, J.; Shahpiri, A.; Azizi, N.; Namazian, M. A Mononuclear PdII Complex with Naphcon; Crystal Structure, Experimental and Computational Studies of the Interaction with DNA/BSA and Evaluation of Anticancer Activity. *Polyhedron* **2021**, *206*, 115333, doi:10.1016/j.poly.2021.115333.
205. Mahdy, A.R.E.; Abu Ali, O.A.; Serag, W.M.; Fayad, E.; Elshaarawy, R.F.M.; Gad, E.M. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Co(II) and Zn(II) Complexes of Imidazoles-Based Azo-Functionalized Schiff Bases. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1259*, 132726, doi:10.1016/j.molstruc.2022.132726.
206. Krishna, G.A.; Dhanya, T.M.; Shanty, A.A.; Raghu, K.G.; Mohanan, P.V. Transition Metal Complexes of Imidazole Derived Schiff Bases: Antioxidant/Anti-Inflammatory/Antimicrobial/Enzyme Inhibition and Cytotoxicity Properties. *J. Mol. Struct.* **2023**, *1274*, 134384, doi:10.1016/j.molstruc.2022.134384.
207. Beheshti, A.; Nozarian, K.; Mousavifard, E.S.; Abrahams, C.T.; Mayer, P.; Gajda, R.; Woźniak, K.; Motamedi, H. Design and Construction of the Imidazole-2-Thione-Based Copper(I) Complexes by Varying the Co-Anion and Synthesis Conditions and Verifying Their Antimicrobial Activity. *J. Solid State Chem.* **2021**, *294*, 121874, doi:10.1016/j.jssc.2020.121874.
208. Wall, G.M. Naphazoline Hydrochloride. In *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*; Brittain, H.G., Ed.; Academic Press, 1992; Vol. 21, pp. 307–344.
209. Pisoschi, A.M.; Pop, A.; Iordache, F.; Stanca, L.; Predoi, G.; Serban, A.I. Oxidative Stress Mitigation by Antioxidants - An Overview on Their Chemistry and Influences on Health Status. *European J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112891, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112891.
210. Bayir, H. Reactive Oxygen Species. *Crit. Care Med.* **2005**, *33*, S498-501, doi:10.1097/01.ccm.0000186787.64500.12.
211. Tsoi, B.; Yi, R.-N.; Cao, L.-F.; Li, S.-B.; Tan, R.-R.; Chen, M.; Li, X.-X.; Wang, C.; Li, Y.-F.; Kurihara, H.; et al. Comparing Antioxidant Capacity of Purine Alkaloids: A New, Efficient Trio for Screening and Discovering Potential Antioxidants *in Vitro* and *in Vivo*. *Food Chem.* **2015**, *176*, 411–419, doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.087.
212. Rehman, S.; Khan, H. Advances in Antioxidant Potential of Natural Alkaloids. *Curr. Bioact. Compd.* **2017**, *13*, 101–108.
213. Singh, T.P.; Singh, O.M. Recent Progress in Biological Activities of Indole and Indole Alkaloids. *Mini Rev. Med. Chem.* **2018**, *18*, 9–25, doi:10.2174/1389557517666170807123201.
214. Pillaiyar, T.; Uzair, M.; Ullah, S.; Schnakenburg, G.; Müller, C.E. Decarboxylative Coupling Reaction of 2-(1H-Indol-3-Yl)Acetic Acids with Indole, Azaindole, Benzimidazole and Indazole Derivatives. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 4286–4293, doi:10.1002/adsc.201900688.
215. Cravotto, G.; Demartin, F.; Palmisano, G.; Penoni, A.; Radice, T.; Tollari, S. Novel Cyclometallated Pd(II) and Pt(II) Complexes with Indole Derivatives and Their Use as Catalysts in Heck Reaction. *J. Organomet. Chem.* **2005**, *690*, 2017–2026, doi:10.1016/j.jorganchem.2004.11.042.
216. Maret, W. Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 82–91, doi:10.3945/an.112.003038.
217. Stiles, L.I.; Ferrao, K.; Mehta, K.J. Role of Zinc in Health and Disease. *Clin. Exp. Med.* **2024**, *24*, 38, doi:10.1007/s10238-024-01302-6.
218. Marreiro, D. do N.; Cruz, K.J.C.; Morais, J.B.S.; Beserra, J.B.; Severo, J.S.; de Oliveira, A.R.S. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants* **2017**, *6*, 24, doi:10.3390/antiox6020024.

219. Mohapatra, R.K.; Dash, M.; Mishra, U.K.; Mahapatra, A.; Dash, D.C. Synthesis, Spectral Characterization, and Fungicidal Activity of Transition Metal Complexes With Benzimidazolyl-2-Hydrazones of Glyoxal, Diacetyl, and Benzil. *Synth. React. Inorg., Met.-Org., Nano-Met. Chem.* **2014**, *44*, 642–648, doi:10.1080/15533174.2013.776592.
220. Zhao, J.; Li, S.; Zhao, D.; Chen, S.; Hu, J. Metal and Structure Tuned in Vitro Antitumor Activity of Benzimidazole-Based Copper and Zinc Complexes. *J. Coord. Chem.* **2013**, *66*, 1650–1660, doi:10.1080/00958972.2013.789505.
221. Ling, N.; Wang, X.; Zeng, D.; Zhang, Y.-W.; Fang, X.; Yang, H.-X. Synthesis, Characterization and Biological Assay of Three New Benzotriazole-Based Zn(II) Complexes. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1206*, 127641, doi:10.1016/j.molstruc.2019.127641.
222. Yernale, N.G.; Matada, B.S.; Vibhutimath, G.B.; Biradar, V.D.; Karekal, M.R.; Udayagiri, M.D.; Hire Mathada, M.B. Indole Core-Based Copper(II), Cobalt(II), Nickel(II) and Zinc(II) Complexes: Synthesis, Spectral and Biological Study. *J. Mol. Struct.* **2022**, *1248*, 131410, doi:10.1016/j.molstruc.2021.131410.
223. Dillon, C.T.; Hambley, T.W.; Kennedy, B.J.; Lay, P.A.; Zhou, Q.; Davies, N.M.; Biffin, J.R.; Regtop, H.L. Gastrointestinal Toxicity, Antiinflammatory Activity, and Superoxide Dismutase Activity of Copper and Zinc Complexes of the Antiinflammatory Drug Indomethacin. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 28–37, doi:10.1021/tx020078o.
224. Delaere, D.; Raspoet, G.; Nguyen, M.T. Thiol–Thione Tautomerism in Thioformic Acid: Importance of Specific Solvent Interactions. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 171–177, doi:10.1021/jp983298c.
225. García-Báez, E.V.; Padilla-Martínez, I.I.; Cruz, A.; Rosales-Hernández, M.C. ¹³C-NMR Chemical Shifts in 1,3-Benzazoles as a Tautomeric Ratio Criterion. *Molecules* **2022**, *27*, 6268, doi:10.3390/molecules27196268.
226. Nath, N.K.; Nangia, A. Isomorphous Crystals by Chloro–Methyl Exchange in Polymorphic Fuchsones. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 5411–5425, doi:10.1021/cg3010097.
227. Amin, K.; Dannenfelser, R.-M. In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1173–1176, doi:10.1002/jps.20627.
228. Fujii, J.; Homma, T.; Kobayashi, S.; Warang, P.; Madkaikar, M.; Mukherjee, M.B. Erythrocytes as a Preferential Target of Oxidative Stress in Blood. *Free Radical Res.* **2021**, *55*, 781–799, doi:10.1080/10715762.2021.1873318.
229. Vo, Q.V.; Hang, D.T.N.; Hoa, N.T.; Nam, P.C.; Duong, T.Q.; Mechler, A. The Radical Scavenging Activity of 4-Mercaptoimidazole: Theoretical Insights into the Mechanism, Kinetics and Solvent Effects. *New J. Chem.* **2023**, *47*, 10381–10390, doi:10.1039/D3NJ01800H.
230. Shi, X.; Qiu, S.; Ji, L.; Lu, H.; Wu, S.; Chen, Q.; Zou, X.; Hu, Q.; Feng, T.; Chen, S.; et al. Pathogenic Characterization of a *Micrococcus Luteus* Strain Isolated from an Infant. *Front. Pediatr.* **2023**, *11*, doi:10.3389/fped.2023.1303040.
231. Kovács, Á.T. *Bacillus Subtilis*. *Trends Microbiol.* **2019**, *27*, 724–725, doi:10.1016/j.tim.2019.03.008.
232. Thompson, J.M.; Dodd, C.E.R.; Waites, W.M. Spoilage of Bread by *Bacillus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad. on* **1993**, *32*, 55–66, doi:10.1016/0964-8305(93)90039-5.
233. Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L.T. Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123–140, doi:10.1038/nrmicro818.
234. Taylor, T.B.; Silby, M.W.; Jackson, R.W. *Pseudomonas Fluorescens*. *Trends Microbiol.* **2025**, *33*, 250–251, doi:10.1016/j.tim.2024.11.005.
235. Vistoli, G.; Pedretti, A.; Testa, B. Assessing Drug-Likeness – What Are We Missing? *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 285–294, doi:10.1016/j.drudis.2007.11.007.
236. Roleira, F.M.F.; Siquet, C.; Orrù, E.; Garrido, E.M.; Garrido, J.; Milhazes, N.; Podda, G.; Paiva-Martins, F.; Reis, S.; Carvalho, R.A.; et al. Lipophilic Phenolic Antioxidants:

- Correlation between Antioxidant Profile, Partition Coefficients and Redox Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 5816–5825, doi:10.1016/j.bmc.2010.06.090.
237. Savjani, K.T.; Gajjar, A.K.; Savjani, J.K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharm* **2012**, *2012*, 195727, doi:10.5402/2012/195727.
238. Lipinski, C.A. Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discov. Today Technol.* **2004**, *1*, 337–341, doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
239. Veber, D.F.; Johnson, S.R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B.R.; Ward, K.W.; Kopple, K.D. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615–2623, doi:10.1021/jm020017n.
240. Kargapolova, Y.; Geißen, S.; Zheng, R.; Baldus, S.; Winkels, H.; Adam, M. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants* **2021**, *10*, 562, doi:10.3390/antiox10040562.
241. Chung, H.Y.; Baek, B.S.; Song, S.H.; Kim, M.S.; Huh, J.I.; Shim, K.H.; Kim, K.W.; Lee, K.H. Xanthine Dehydrogenase/Xanthine Oxidase and Oxidative Stress. *Age (Omaha)* **1997**, *20*, 127–140, doi:10.1007/s11357-997-0012-2.
242. Desai, S.J.; Prickril, B.; Rasooly, A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. *Nutr. Cancer* **2018**, *70*, 350–375, doi:10.1080/01635581.2018.1446091.

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Koniugaty indolowe – synteza, analiza strukturalna i ocena aktywności biologicznej

mgr Karolina Babiczuk

Promotor: prof. UAM dr hab. Beata Jasiewicz

Celem mojej pracy doktorskiej była synteza koniugatów indolowych oraz ich kompleksów, a także analiza strukturalna i ocena aktywności biologicznej otrzymanych związków.

Wykorzystując graminę zsyntezowałam ponad trzydzieści nowych koniugatów indolowo-azolowych, w których pierścień azolu połączony jest z indolem łącznikiem metylenowym. Ze względu na strukturę można podzielić je na trzy grupy: 1) indolowo-imidazolowe, 2) indolowo-tioketonowe, 3) indolowo-pirazolowe. Koniugaty pierwszej grupy wykorzystałam jako ligandy w reakcji kompleksowania z chlorkiem cynku.

Wszystkie nowe pochodne zostały scharakteryzowane za pomocą spektrometrii mas oraz spektroskopii FT-IR i NMR, a dla większości została określona struktura w kryształach.

We współpracy z Wydziałem Biologii UAM zbadalam właściwości hemolityczne i antyoksydacyjne związków. Dokowanie molekularne pozwoliło na określenie powinowactwa wybranych pochodnych do enzymów uczestniczących w stresie oksydacyjnym.

Dodatkowo we współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym w Poznaniu zbadano właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne związków. Wszystkie koniugaty i kompleksy zostały też sprawdzone pod kątem ich podobieństwa do leków dzięki wykorzystaniu metod *in silico*.

Przeprowadzona analiza właściwości biologicznych otrzymanych pochodnych pozwoliła określić zależność między strukturą chemiczną związku a jego aktywnością biologiczną.

Summary of doctoral dissertation

Indole conjugates – synthesis, structural analysis and evaluation of biological activity

MSc Karolina Babijczuk

Supervisor: Prof. UAM Dr hab. Beata Jasiewicz

The aim of my doctoral thesis was to synthesize indole conjugates and their complexes, as well as to analyze the structure and evaluate the biological activity of the obtained compounds.

Using gramine, I synthesized over thirty new indole-azole conjugates in which the azole is attached to the indole through a methylene linker. Based on their structure, they can be divided into three groups: 1) indole-imidazole, 2) indole-thioketone, and 3) indole-pyrazole. The conjugates of the first group were used as ligands in the complexation reaction with zinc chloride.

All new derivatives were characterized by mass spectrometry, FT-IR, and NMR spectroscopy and for most of them the crystal structures were determined.

In collaboration with the Faculty of Biology of Adam Mickiewicz University, I investigated the compounds' hemolytic and antioxidant properties. Molecular docking allowed us to determine the affinity of selected derivatives to enzymes involved in oxidative stress.

In addition, studies in collaboration with the University of Life Sciences in Poznań determined the compounds' antibacterial and antifungal properties. Also, the druglikeness of all conjugates and complexes were tested using *in silico* methods.

A comprehensive analysis of the biological activity of the obtained derivatives established the relationship between the compound's chemical structure and its biological properties.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy
doktorskiej i materiały uzupełniające