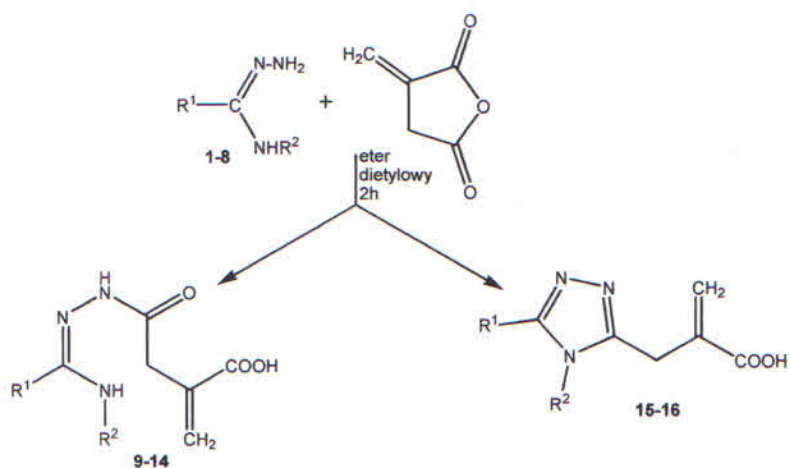


10. STRESZCZENIE

Amidrazony stanowią przydatne substraty do syntezy wielu układów heterocyklicznych pięcioczłonowych, sześcioczłonowych, siedmioczłonowych, skondensowanych oraz pochodnych o budowie liniowej i kompleksów. Otrzymane w ten sposób produkty wykazywały różnorodną aktywność biologiczną, co uzasadnia kontynuację badań w kierunku syntezy innych pochodnych.

Celem pracy było przebadanie przebiegu reakcji N^3 -podstawionych amidrazonów z bezwodnikiem itakonowym, ustalenie warunków otrzymywania produktów o budowie liniowej i cyklicznej w/w reakcji, wybór amidrazonu do syntezy ligandów z innymi bezwodnikami cyklicznymi, przeprowadzenie otrzymanych ligandów w kompleksy miedzi(II) oraz określenie aktywności biologicznej otrzymanych produktów.

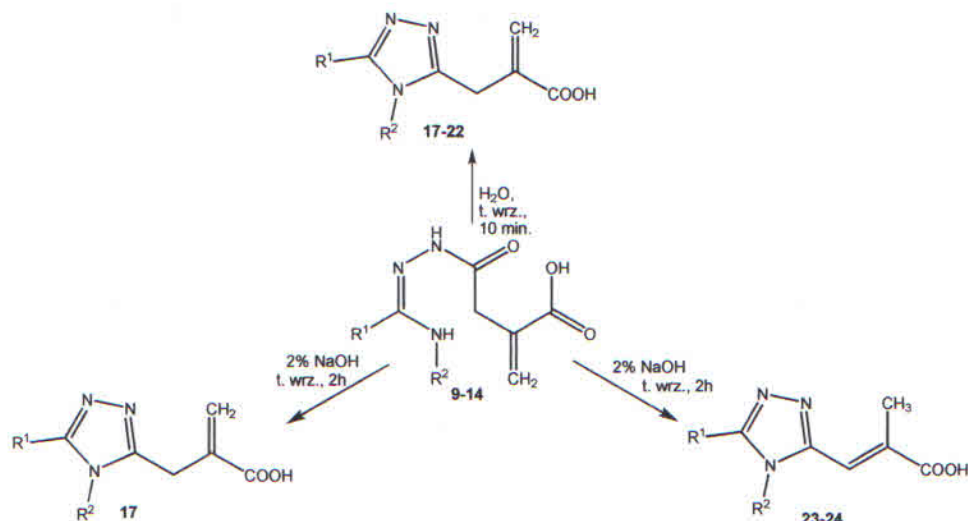
W pierwszym etapie zbadano przebieg reakcji N^3 -podstawionych amidrazonów **1-8** z bezwodnikiem itakonowym w środowisku bezwodnego eteru dietylowego. W zależności od podstawników obecnych w amidrazonach otrzymano pochodne kwasu 2-metylideno-4-oksobutanowego **9-14** lub 1,2,4-triazolu **15-16** przedstawione na **schemacie 37**.



	R^1	R^2
1, 9	2-C ₅ H ₄ N	4-NO ₂ -C ₆ H ₄
2, 10	2-C ₅ H ₄ N	2-C ₅ H ₄ N
3, 11	2-C ₅ H ₄ N	C ₆ H ₅
4, 12	4-C ₅ H ₄ N	C ₆ H ₅
5, 13	2-C ₅ H ₄ N	4-CH ₃ -C ₆ H ₄
6, 14	C ₆ H ₅	4-NO ₂ -C ₆ H ₄
7, 15	4-C ₅ H ₄ N	4-CH ₃ -C ₆ H ₄
8, 16	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅

Schemat 37.

Następnie podjęto próbę cyklizacji związków **9-14** w różnych warunkach. W wyniku ogrzewania związków **10-14** w temperaturze wrzenia wody otrzymano z dobrą wydajnością pochodne kwasu 2-(1,2,4-triazol-3-yl)metyloprop-2-enowego **18-22**. Podczas ogrzewania związku **9** w wodnym roztworze ługu sodowego powstał związek **17**. Inny przebieg miała cyklizacja związków **10-11** w środowisku zasadowym - otrzymano pochodne kwasu (*E*)-3-(1,2,4-triazol-3-yl)metyloprop-2-enowego **23-24**, będące izomerami związków **18-19** (schemat 38).



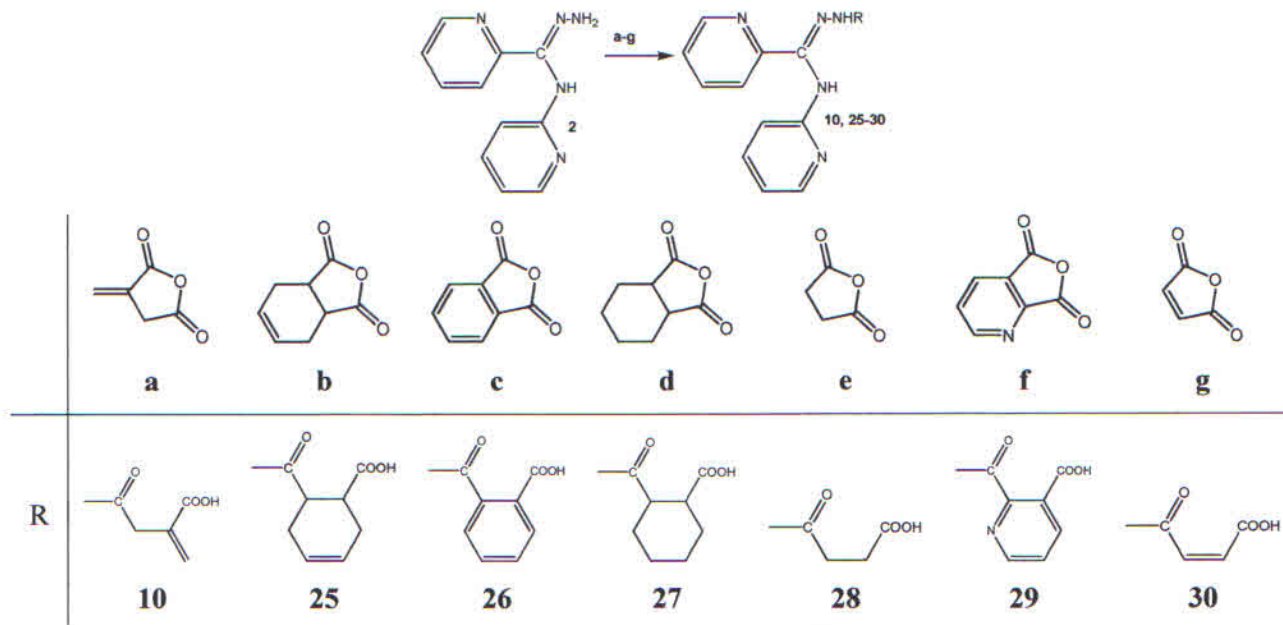
	R ¹	R ²
9, 17	2-C ₅ H ₄ N	4-NO ₂ -C ₆ H ₄
10, 18, 23	2-C ₅ H ₄ N	2-C ₅ H ₄ N
11, 19, 24	2-C ₅ H ₄ N	C ₆ H ₅
12, 20	4-C ₅ H ₄ N	C ₆ H ₅
13, 21	2-C ₅ H ₄ N	4-CH ₃ -C ₆ H ₄
14, 22	C ₆ H ₅	4-NO ₂ -C ₆ H ₄

Schemat 38.

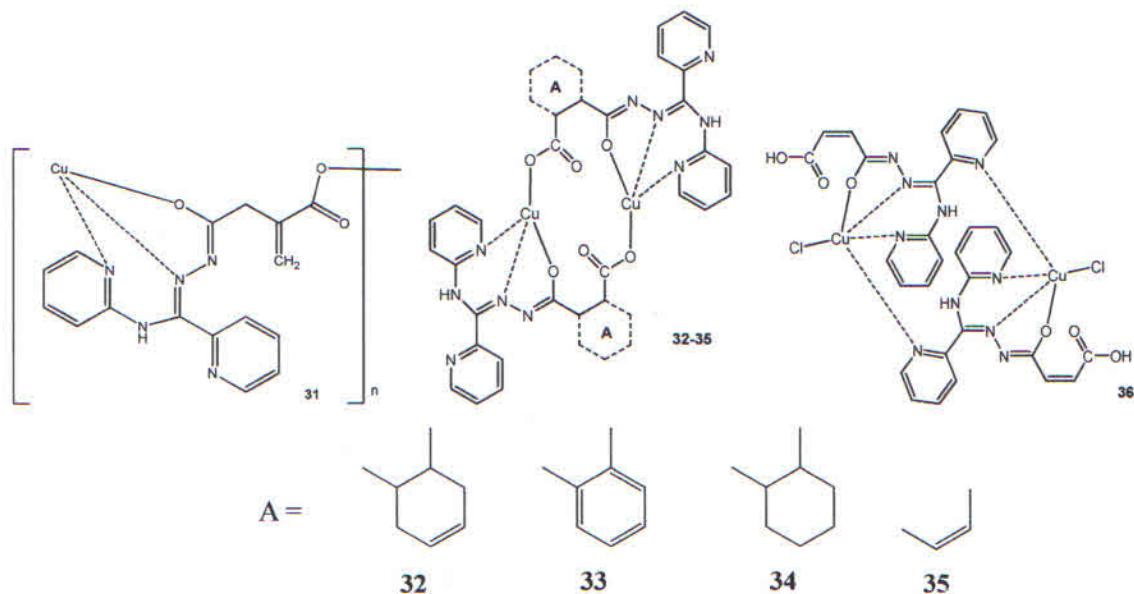
Kolejnym etapem pracy była synteza ligandów **10, 25-30**, które otrzymano w reakcji amidrazonu **2** z bezwodnikami cyklicznymi **a-g**. Reakcje prowadzono w środowisku eterowym, jedynie do syntezy pochodnej kwasu 2-propenowego **30** jako rozpuszczalnik zastosowano mniej polarny toluen (schemat 39). Amidrazon **2** wybrano ze względu na łatwość tworzenia przez jego pochodne kompleksów z miedzią(II) w formie kryształów oraz opisaną w piśmiennictwie aktywność przeciwbakteryjną i przeciwnowotworową pochodnych pirydyno-2-karbohydrazonamidu.

Struktury otrzymanych związków **9-30** potwierdzono za pomocą analizy spektroskopowej (¹H NMR, IR) oraz krystalograficznej 11 monokryształów, dodatkowo

dla pochodnych 1,2,4-triazolu **15-24** wykonano badania ^{13}C NMR oraz MS. Na podstawie analizy widm ^1H NMR stwierdzono, że związki **9-14** o strukturze liniowej i ligandy **25-30** występują w roztworze DMSO w dwóch formach pozostających w równowadze dynamicznej, prawdopodobnie są to izomery *Z/E*.



W wyniku reakcji ligandów **10, 25-30** z octanem miedzi(II) lub chlorkiem miedzi(II) otrzymano kompleksy **31-36** przedstawione na **rys. 52**. Ponieważ w przypadku kompleksów miedzi(II) **31-36** analiza NMR nie była możliwa ze względu na paramagnetyczne właściwości jonów miedzi, tożsamość tych związków ustalono za pomocą analizy rentgenograficznej monokryształów oraz w oparciu o widma w podczerwieni.



Badania strukturalne wykazały, że otrzymano trzy rodzaje produktów: kompleks **31** o budowie polimerycznej oraz związku **32-35** o budowie dimerycznej oraz pochodną **36** wykazującą inny układ koordynacyjny wokół kationu miedzi od pozostałych kompleksów.

Zaobserwowano wpływ środowiska kompleksowania liganda **30** na strukturę otrzymanego produktu: w reakcji z obojętnym roztworem chlorku miedzi(II) otrzymano kompleks **36** o strukturze bipiramidy trygonalnej, natomiast zasadowy roztwór octanu miedzi(II) sprzyjał powstawaniu związku **35** o strukturze płaskiej kwadratowej.

Przeprowadzona analiza struktury kryształów wykazała, że ligandy **10**, **25-29** występują w ciele stałym w postaci izomeru *Z*, natomiast w kompleksach **31-36** obecny jest wyłącznie izomer *E*.

Wyznaczono chromatograficzne parametry lipofilowości związków **9-30** za pomocą techniki TLC. Opracowano metodę identyfikacji związków **9-14** i **25-30** na chromatogramie poprzez reakcję z jonami miedzi(II). Związki **15-24** nie ulegały w tych warunkach reakcji kompleksowania. Najwyższe wartości współczynnika lipofilowości R_{M0} posiadały związki **14**, **25** i **27**, natomiast wśród pochodnych triazolu związki **15**, **16**, **21** i **22**.

Wstępną ocenę właściwości biologicznych otrzymanych związków przeprowadzono w oparciu o zgodność z regułą Lipińskiego oraz wartości powierzchni polarnej cząsteczki (TPSA). Związki **10-30** spełniały warunki „reguły pięciu” oraz charakteryzowały się umiarkowanymi wartościami TPSA, co może świadczyć o ich korzystnych parametrach farmakokinetycznych (biodostępność, wchłanianie, przenikanie przez błony komórkowe). Kompleksy **32-36** nie spełniały reguły Lipińskiego oraz posiadały zbyt dużą powierzchnię polarną cząsteczki, co może znacząco obniżyć ich wchłanianie i przenikanie przez błony biologiczne. Kompleks **31** został wykluczony z badań biologicznych ze względu na słabą rozpuszczalność w DMSO i innych rozpuszczalnikach.

Potencjalną aktywność biologiczną otrzymanych związków przewidziano za pomocą programu PASS Online. Według przeprowadzonych obliczeń większość związków **9-30** może wykazywać aktywność przeciwwirusową, a także wpływać stymulująco na funkcje nerek i proces erytropoezy. Najszersze spektrum możliwych efektów farmakologicznych uzyskano dla pochodnych 1,2,4-triazolu **15-22**.

Wyniki wstępnych badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* nad aktywnością biologiczną otrzymanych związków pozwalają stwierdzić, że:

- pochodne **9-36** wykazały słabszą od tetracykliny (MIC = 1-16 $\mu\text{g/ml}$) aktywność bakteriostatyczną. Najaktywniejsze związki hamowały w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ wzrost gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* (**30**, **35**, **36**), pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* (**36**), paciorkowca kałowego *Enterococcus faecalis* (**22**)

lub prątków *Mycobacterium smegmatis* (30, 34 i 35);

- związki 9-30 były nietoksyczne wobec ludzkich jednojądrzastych komórek krwi (PBMC) w stężeniach do 50 µg/ml, jedynie związki 11 i 19 posiadające podstawniki 2-pirydylowy i fenyłowy powodowały w tym stężeniu nekrozę komórek;

- najsilniejszy efekt antyproliferacyjny wobec ludzkich PBMC wykazywały w stężeniu 50 µg/ml związki 13 i 29 oraz pochodne triazolu 15, 23, 24. Trzy ostatnie związki wykazywały w stężeniu 100 µg/ml zbliżone działanie do ibuprofenu zastosowanego w tej samej dawce;

- bardzo silne, porównywalne do ibuprofenu zahamowanie syntezy TNF-α rzędu 98% zaobserwowano dla pochodnych triazolu 15, 23 i 24 w stężeniu 10 µg/ml, nieznacznie słabsze działanie wykazywał ligand 27;

- najsilniejsze zahamowanie syntezy IL-6 (rzędu 35%) wywoływała pochodna triazolu 22 posiadająca podstawnik fenyłowy i 4-nitrofenyłowy;

- związki 15, 23 i 24 wykazywały silniejszą aktywność przeciwzapalną od pozostałych pochodnych triazolu 16-22, daje to podstawę do przeprowadzenia dalszych badań nad określeniem mechanizmu ich działania;

- ligandy 10, 25-30 wykazywały słabą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórek nowotworowych HL-60 i były nieaktywne wobec komórek MCF-7 i HT-29, najsilniejszą aktywność wykazywał związek 30. Dla kompleksów 33 i 34 zaobserwowano wzrost aktywności cytotoksycznej w stosunku do macierzystych ligandów, natomiast dla związku 35 zmniejszenie lub zanik pierwotnej aktywności;

- kompleks 32 w stężeniu 10 µg/ml wykazywał istotną aktywność cytotoksyczną wobec komórek raka okrężnicy CX-1 oraz raka naskórka A-431, natomiast w stężeniu 100 µg/ml hamował porównywalnie do cisplatyny proliferację komórek linii nowotworowych L-1210, SW 948, CX-1 i A-431. Związek 32 jest około pięćdziesięciokrotnie mniej toksyczny od cisplatyny, co stwarza nadzieję, że mógłby się on stać potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym.

Związek 21 wykazał niską toksyczność oraz słaby wpływ depresyjny na ośrodkowy układ nerwowy myszy. Ponadto w dawce 100 mg/kg i.p. wykazywał aktywność przeciwdrgawkową, natomiast w dawce 12,5-100 mg/kg i.p. istotnie wydłużał czas snu tiopentalowego.