

AUTOREFERAT

Dr Tomasz Pospieszny

Synteza, badania spektroskopowe i teoretyczne koniugatów kwasów żółciowych

Osiągnięcia naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowią monotematyczny cykl 11 publikacji naukowych wydanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora



Spis treści

1.	Spis publikacji obejmujących tematykę habilitacji.....	3
2.	Omówienie osiągnięć naukowych zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego.....	6
2.1.	Wprowadzenie.....	6
2.2.	Synteza, badania spektroskopowe, strukturalne i teoretyczne koniugatów kwasów żółciowych.....	9
2.1.1.	Bromoacetoksy podstawione pochodne kwasów żółciowych.....	9
2.1.2.	Czwartorzędowe sole amoniowe pochodnych kwasów żółciowych....	15
2.1.3.	Wielkocząsteczkowe pochodne kwasów żółciowych.....	27
2.1.4.	Badania <i>in silico</i> koniugatów kwasów żółciowych.....	44
2.3.	Podsumowanie i wnioski.....	48
2.4.	Literatura.....	53
3.	Dalsze perspektywy pracy badawczej.....	55

1. Spis publikacji obejmujących tematykę habilitacji

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna pt. „*Synteza, badania spektroskopowe i teoretyczne koniugatów kwasów żółciowych*” obejmuje cykl 11 monotematycznych prac [H1-H11] zawierających wyniki i interpretację prowadzonych przeze mnie badań eksperymentalnych i teoretycznych w latach 2013-2016. Trzy prace [H8], [H10], [H11] są publikacjami monoautorskimi. Publikacja [H10] stanowi pracę przeglądową o zasięgu międzynarodowym, zaś [H11] stanowi rozdział książki „*Studies in Natural Products Chemistry*”.

Nr	Publikacja	IF w roku wydania	IF 5-letni	Udział (%)	Punkty MNiSW
[H1]	T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, Spectroscopic methods and theoretical studies of bromoacetic substituted derivatives of bile acids, <i>Acta Chim. Slov.</i> , 2015 , 62, 15-27. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, analiza spektroskopowa otrzymanych związków, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	0,686	0,774	85	20
[H2]	T. Pospieszny, B. Brycki, Design and synthesis of new conjugates of bile acids with salicylic, acetylsalicylic and nicotinic acids, <i>Letters in Organic Chemistry</i> , 2016 , 13. DOI: 10.2174/1570178613666160303215734 <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	0,664	0,621	95	15
[H3]	T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, Synthesis, Molecular Structure and Spectral Properties of New Aminosteroid Analogs of Squalamine Derivatives, <i>Letters in Organic Chemistry</i> , 2015 , 12, 674-684. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, analiza spektroskopowa otrzymanych związków, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	0,664	0,621	85	15
[H4]	B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, Synthesis, spectroscopic and theoretical studies of new quaternary N,N-dimethyl-3-phthalimidopropylammonium conjugates of sterols and bile acids, <i>Molecules</i> , 2014 , 19, 4212-4233. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza pochodnych kwasów żółciowych, analiza spektroskopowa otrzymanych związków, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	2,416	2,791	50	30

[H5]	W. Kozanecka, L. Mrówczyńska, T. Pospieszny, B. Jasiewicz, M. Gierszewski, Synthesis, spectroscopy, theoretical and biological studies of new gramine-steroids salts and conjugates, <i>Steroids</i> , 2015 , 98, 92-99. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, analiza spektroskopowa otrzymanych związków, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	2,639	2,696	65	25
[H6]	T. Pospieszny, H. Koenig, B. Brycki, Synthesis and spectroscopic studies of new quasi podands from bile acid derivatives, <i>Tetrahedron Lett.</i> , 2013 , 54, 4700-4704. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, analiza spektroskopowa otrzymanych związków, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	2,391	2,295	90	25
[H7]	T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, Synthesis, spectroscopic and theoretical studies of new quasi-podands from bile acid derivatives linked by 1,2,3-triazole rings, <i>Molecules</i> , 2014 , 19, 2557-2570. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, analiza spektroskopowa otrzymanych związków, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i udział w dyskusji z recenzentami.</i>	2,416	2,791	85	30
[H8]	Tomasz Pospieszny, Design and synthesis of new bile acid-sterol conjugates linked via 1,2,3-triazole ring, <i>Helv. Chim. Acta</i> , 2015 , 98, 1337-1350. <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, badania in silico, napisanie manuskryptu i dyskusja z recenzentami.</i>	1,138	1,151	100	20
[H9]	T. Pospieszny, M. Pakiet, I. Kowalczyk, B. Brycki, Design, synthesis and application of new bile acid ligands with 1,2,3-triazole ring, <i>Supramolecular Chemistry</i> , 2016 , DOI: 10.1080/10610278.2016.1175568 <i>Udział własny: koncepcja pracy, synteza związków, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, obliczenia semiempiryczne, napisanie manuskryptu i dyskusja z recenzentami.</i>	2,394	1,970	80	25
[H10]	T. Pospieszny, Molecular Pockets, Umbrellas and Quasi Podands from Steroids: Synthesis, Structure and Applications, <i>Mini-Rev. Org. Chem.</i> , 2015 , 12, 258-270. <i>Udział własny: koncepcja pracy, napisanie manuskryptu i dyskusja z recenzentami.</i>	1,042	1,548	100	20
[H11]	T. Pospieszny, Steroidal Conjugates: Synthesis, Spectroscopic and Biological Studies, w <i>Studies in Natural Products Chemistry</i> Edited by Atta-ur	0,000	0,000	100	0,000

Rahman, Elsevier, Amsterdam, Netherlands 2015,
46, 169-200, ISBN: 978-0-444-63462-7.

Rozdział w książce.

*Udział własny: koncepcja pracy, napisanie manuskryptu
i dyskusja z recenzentami.*

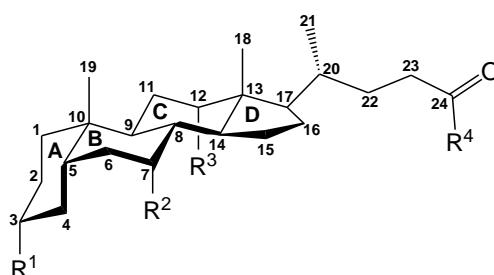
Sumaryczny Impact Factor	16,45
Średni Impact Factor	1,64
Sumaryczny 5-letni Impact Factor	17,26
Średni 5-letni Impact Factor	1,72
Sumaryczna liczba punktów MNiSW	225
Średnia sumaryczna liczba punktów MNiSW	22,5
Średni udział % habilitanta	85

Publikacje w wersji elektronicznej stanowią **Załącznik 4**, natomiast oświadczenia współautorów prac wraz z określeniem indywidualnego wkładu każdego z nich znajdują się w **Załączniku 5**.

2. Omówienie osiągnięć naukowych zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego

2.1. Wprowadzenie

Steroidy stanowią dużą i niezwykle ważną grupę związków pochodzenia naturalnego. Występują w komórkach wszystkich roślin i zwierząt pełniąc w nich funkcje: budulcowe, regulujące, transportujące, ochronne i sygnałowe [1]. Do najważniejszych steroidów należą sterole (np. cholesterol, ergosterol, stigmasterol), kwasy żółciowe (np. litocholowy, deoksycholowy, cholowy), hormony roślinne (np. brassinolid) i zwierzęce (np. estron, progesteron, testosteron) oraz glikozydy nasercowe (np. scylaren A, digitoksyna) [1-4]. Cechą wspólną steroidów jest szkielet cyklopentanoperhydrofenantrenowy rozmaicie zróżnicowany przez podstawniki i stopień nienasycenia [5,6]. Ze względu na specyficzną budowę oraz znaczną aktywność biologiczną steroidy są szeroko wykorzystywane w syntezie związków, które znajdują zastosowanie w medycynie, farmakologii, biotechnologii, kosmetologii czy nanotechnologii. Związki tego typu powinny charakteryzować się zmniejszonym działaniem toksycznym przy jednoczesnym wzroście aktywności farmakologicznej. Stanowi to najważniejsze założenie syntezy koniugatów steroidowych [7]. Niezwykle ważne i interesujące w tym względzie są kwasy żółciowe, które wpływają w znacznym stopniu na rozpuszczalność cholesterolu w żółci. Należą one do związków powierzchniowo czynnych, tzn. zmniejszają napięcie powierzchniowe, a także emulgują tłuszcze. Kwasy żółciowe najczęściej występują w postaci koniugatów z glicyną lub tauryną (Rysunek 1). Związki te charakteryzuje amfipatyczny charakter, specyficzna geometria cząsteczki (pierścienie A/B są połączone w geometrii *cis*), duży i sztywny układ pierścieni alicyklicznych, różne pod względem reaktywności chemicznej grupy hydroksylowe (3α ; $3\alpha,7\alpha$; $3\alpha,12\alpha$; $3\alpha,7\alpha,12\alpha$), łańcuch boczny (najczęściej złożony z pięciu atomów węgla) zakończony grupą karboksylową oraz czystość enancjomeryczna (Rysunek 1) [8-10].



		R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	kwask glikocholowy	OH	OH	OH	NHCH ₂ CO ₂ H
2	kwask taurocholowy	OH	OH	OH	NHCH ₂ CH ₂ SO ₃ H
3	kwask cholanowy	H	H	H	OH
4	kwask litocholowy	OH	H	H	OH
5	kwask deoksycholowy	OH	H	OH	OH
6	kwask chenodeoksycholowy	OH	OH	H	OH
7	kwask cholowy	OH	OH	OH	OH

Rysunek 1. Numeracja oraz stereochemia wybranych naturalnie występujących koniugatów kwasu cholowego z aminokwasami (1), (2) oraz kwasów żółciowych (3-7).

Modyfikacje grup funkcyjnych występujących w cząsteczkach kwasów żółciowych, umożliwiają otrzymanie pochodnych o znacznej aktywności farmakologicznej. Natomiast modyfikacja struktury, polegająca na wprowadzeniu do ich cząsteczek związków pochodzenia naturalnego, np. alkaloidów, pirymidyn, puryn, długołańcuchowych poliamin czy węglowodanów, prowadzi do otrzymania pochodnych kwasów żółciowych o znacznej aktywności biologicznej, właściwościach kompleksujących oraz możliwości rozpoznawania molekularnego przez białka czy enzymy, tworzeniu układów typu gość-gospodarz, szerokich zastosowaniach w chemii supramolekularnej czy biomimetycznej [H10], [H11]. Ponadto pochodne aminowe lub amidowe kwasów żółciowych pełnią funkcje bardzo dobrych organożelatorów czy hydrożeli [11,12], są także niezastąpione w projektowaniu sztucznych receptorów [13-22]. Syntetyczne receptory posiadające w swojej budowie elementy strukturalne kwasów żółciowych mogą zawierać od jednej do kilku jednostek steroidowych. Szczególnie często projektowane są cholafany zbudowane z dwóch jednostek kwasów żółciowych połączonych różnie zmodyfikowanymi łącznikami. Cechują się one właściwościami jonoforów, przez co mogą stanowić fragmenty systemów kanałów jonowych [22]. W zależności od modyfikacji szkieletu kwasu żółciowego oraz łącznika można je stosować w rozpoznawaniu cząsteczkowym kationów i anionów [23,24]. Jeżeli natomiast cząsteczki kwasów żółciowych są połączone ze sobą bezpośrednio z pominięciem łączników, powstają cyklocholany nazywane makrocyklicznymi laktonami [25-27]. Niezwykle interesująca i ważna z punktu widzenia chemii supramolekularnej czy inżynierii materiałowej jest zdolność z jaką kwasy żółciowe tworzą ciekłe kryształy, kryształy inkluzyjne czy też organiczne [27-29]. Powstają one najczęściej w wyniku różnego typu upakowania pochodnych węglowodorów aromatycznych w komórce elementarnej kwasów żółciowych.

Według danych literaturowych izolowanie, synteza oraz modyfikowanie nowych koniugatów steroidowych (*ang. steroid conjugates*) o różnych właściwościach fizycznych, biologicznych i przede wszystkim farmakologicznych, wzrosło znacząco w ciągu ostatnich dwóch dziesięcioleci. Na szczególną uwagę zasługuje postęp w metodach izolacji, a także projektowaniu i syntezowaniu steroidowych koniugatów z poliaminami, polialkoholami, alkaloidami, węglowodanami, nukleozasadami, który otwiera dostęp do nowych, licznych i niezwykle skutecznych leków, a także związków o właściwościach organożelujących czy kompleksujących.

Moje zainteresowania modyfikacjami kwasów żółciowych - zarówno poprzez tworzenie ich koniugatów z kwasem salicylowym, acetylosalicylowym i nikotynowym, trzeciorzędowymi aminami długołańcuchowymi, alkaloidami, tworzenie ich wielkocząsteczkowych pochodnych czy zastosowanie chemii "click" w projektowaniu nowych układów dimerycznych i związków wielkocząsteczkowych są częścią powyższego obszaru badawczego.

Przedmiotem moich zainteresowań były również właściwości fizykochemiczne oraz szczegółowa analiza strukturalna determinująca aktywność biobójczą otrzymanych koniugatów kwasów żółciowych.

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna obejmuje cykl 11 publikacji monotematycznych [H1-H11] zawierających wyniki i interpretację prowadzonych przeze mnie badań eksperymentalnych i teoretycznych w latach 2013-2016.

Realizując cel mojej pracy przeprowadziłem syntezę i pełną analizę spektroskopową oraz badania teoretyczne bromoacetoksypodstawionych pochodnych kwasów żółciowych, stanowiących podstawowe substraty w syntezie organicznej produktów pochodzenia naturalnego [H1]. Zastosowanie tych związków opisałem w pracy [H2], w której omówiłem syntezę koniugatów kwasów żółciowych z kwasem salicylowym, acetylosalicylowym i nikotynowym. Ponadto założeniem mojej pracy była synteza i analiza właściwości fizykochemicznych koniugatów kwasów żółciowych o zróżnicowanej strukturze i właściwościach – począwszy od czwartorzędowych soli alkiloamoniowych pochodnych kwasów żółciowych [H3] i bromków ftalimidopropylamoniowych pochodnych kwasów żółciowych [H4], przez sole kwasów żółciowych z graminą i porównanie ich właściwości z koniugatami graminy z cholesterolem i cholestanolem [H5], do quasi-podandów kwasów żółciowych [H6] i ich pochodnych zawierających pierścienie 1,2,3-triazolowe [H7-H9]. Poza badaniami eksperymentalnymi i teoretycznymi przedstawiłem aktualny stan wiedzy dotyczący otrzymywania i zastosowania zróżnicowanych koniugatów kwasów żółciowych w dwóch artykułach przeglądowych o zasięgu międzynarodowym [H10], [H11].

Główny cel naukowy moich badań zakładał:

- syntezę nowych koniugatów kwasów żółciowych oraz określenie ich struktury
- badanie właściwości spektroskopowych otrzymanych związków
- badanie oddziaływań wewnątrz i międzycząsteczkowych
- badania biologiczne wybranych związków
- badania semiempiryczne
- badania *in silico*

Moje badania były wykonywane przy zastosowaniu magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H i ^{13}C NMR, 2D NMR), spektroskopii w podczerwieni oraz spektrometrii masowej. Badania eksperymentalne zostały wsparte obliczeniami kwantowo-chemicznymi (PM5, *ab initio*) oraz analizą *in silico* przy zastosowaniu programu PASS (*ang. Prediction of Activity Spectra for Substances*).

Początkowy etap mojej pracy naukowej był związany z pracami wykonywanymi w Zakładzie Chemii Bioorganicznej UAM kierowanym przez prof. dr. hab. Zdzisława Paryzka. Główne zadania badawcze, które realizował prof. Z. Paryzek wraz z zespołem naukowym, dotyczyły chemii supramolekularnej steroidów, steroidowych cyklobutanonów, dimerów i związków makrocyclicznych kwasów żółciowych, reakcji ozonolizy steroidów oraz przegrupowań cząsteczkowych triterpenów. Doświadczenie oraz fundamenty wiedzy, które zdobyłem w grupie badawczej prof. Z. Paryzka, umożliwiły mi sformułowanie własnego, odrębnego tematu badawczego, którego rdzeniem są kwasy żółciowe ich modyfikacja oraz analiza właściwości spektroskopowych.

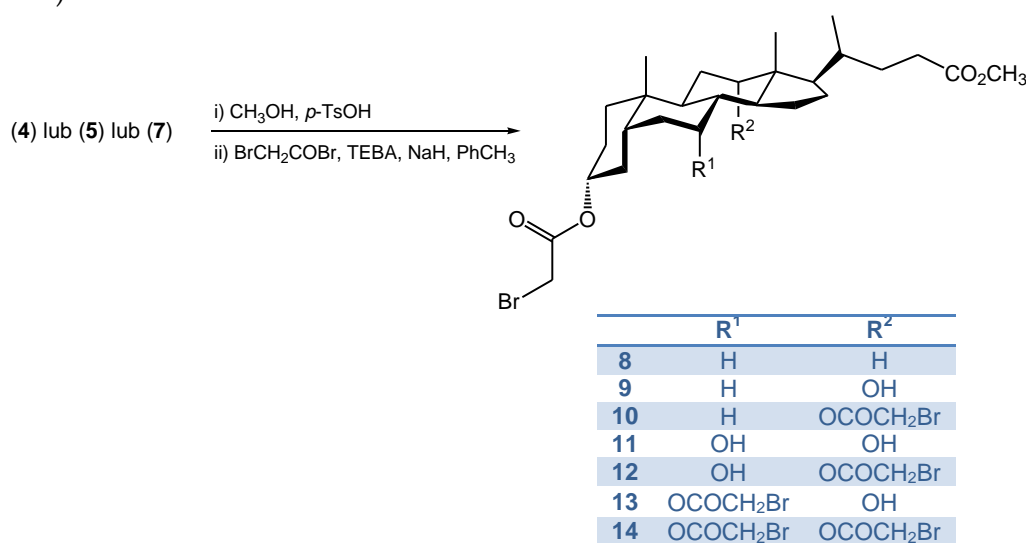
2.2. Synteza, badania spektroskopowe, strukturalne i teoretyczne koniugatów kwasów żółciowych

2.2.1 Bromoacetoksydostawione pochodne kwasów żółciowych

Modyfikowanie cząsteczek kwasów żółciowych jest niezwykle ważne z punktu widzenia otrzymywania nowych koniugatów steroidowych o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Szczególnie łatwo można przekształcać chemicznie chloroformylowe [30] i halogenoacetylowe (chloro- lub bromo-) podstawione pochodne kwasów żółciowych. Halogenoacetylowe pochodne są najczęściej otrzymywane w reakcji kwasów żółciowych z α -chloro- lub α -bromopodstawionymi chlorkami lub bromkami kwasów karboksylowych z dodatkiem węgla potasu w chloroformie lub dichlorometanie, lub z wodorkiem sodu bądź wapnia, wobec bromku tetrabutylamoniowego (TEBA) w toluenie, a także pirydyny lub 4-(dimetylo)aminopirydyny (DMAP) w toluenie [31-39]. Związki tego typu pełnią niezwykle ważną rolę w reakcji substytucji nukleofilowej z nukleofilami azotowymi, tlenowymi bądź siarkowymi. Wykorzystywane są w reakcji selektywnego alkilowania *N*-1 uracylu czy 2-tiouracylu [31,33], *N*-9 adeniny [32], *N*-1 imidazolu [35] czy *S*-alkilowania pochodnych ditiokarbaminianów [34]. Ponadto związki te są używane w syntezie azydków, będących podstawowymi substratami w chemii "click" [36-38]. Bajaj *et al.* zastosowali chloroacetoksydostawione pochodne kwasów żółciowych do otrzymywania czwartorzędowych soli alkiloamoniowych, które wykazywały znaczną aktywność cytotoxyczną [39].

Jak dotąd nikt nie podjął się selektywnej syntezy, wyodrębnienia i pełnej charakterystyki spektroskopowej (^1H NMR, ^{13}C NMR, 2D NMR, FT-IR), a także badań semiempirycznych (PM5) i *ab initio* (B3LYP) tych niezwykle użytecznych substratów w syntezie organicznej. Pierwsze, pełne doniesienia na ten temat zostały przedstawione w pracy [H1].

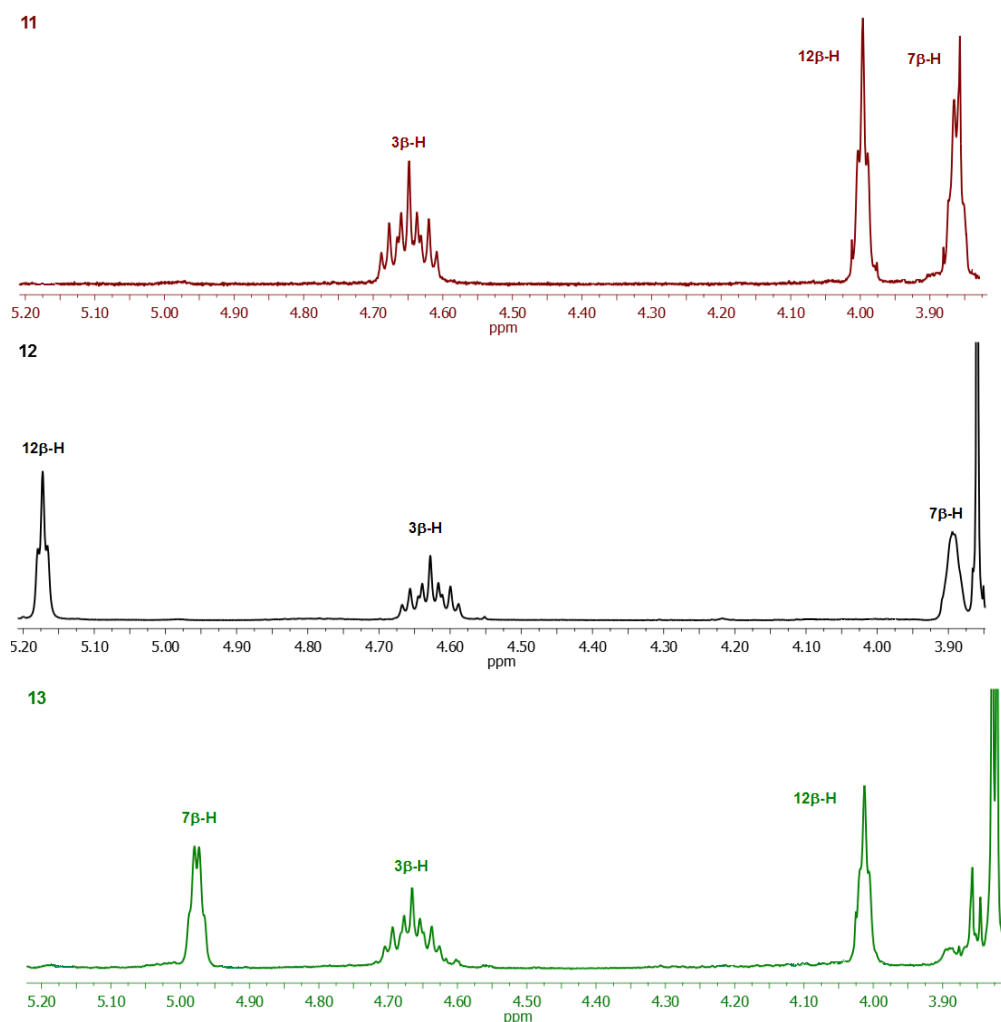
Związki (8-14) otrzymano w reakcji odpowiedniego estru metylowego kwasu żółciowego z bromkiem kwasu bromooctowego wobec wodoru sodu i TEBA w bezwodnym toluenie (Schemat 1).



Schemat 1. Selektywna synteza bromoacetoksydostawionych pochodnych kwasów żółciowych.

Wzrost reaktywności grup hydroksylowych względem reakcji acetylowania, hydrolizy czy redukcji można zestawić w następujący szereg: $3\alpha\text{-OH} > 7\alpha\text{-OH} > 12\alpha\text{-OH}$ [27]. Jest to bezpośrednio związane z ekwatorialnym położeniem grupy $3\alpha\text{-OH}$, a tym samym jej największą podatnością na czynnik reagujący. Natomiast grupa $12\alpha\text{-OH}$ jest najbardziej zatłoczona sterycznie, przez co reagujący z nią związek ma utrudniony dostęp do tej części szkieletu kwasu żółciowego. Otrzymane produkty były oczyszczane na kolumnie chromatograficznej i poddane pełnej analizie spektroskopowej.

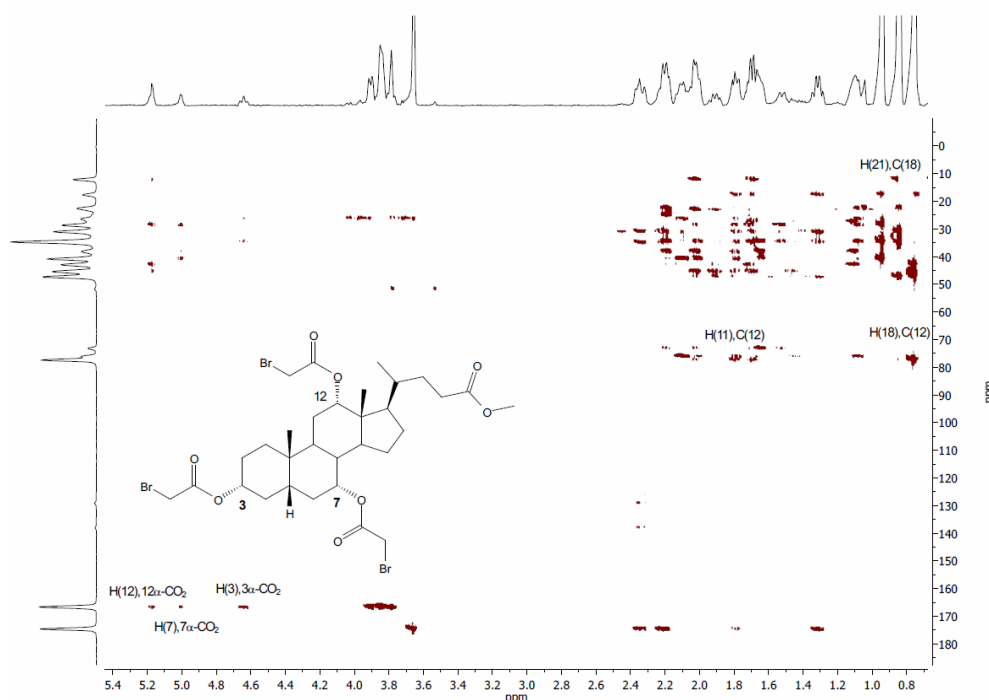
Na Rysunku 2 przedstawiono fragment widma ^1H NMR związków (**11-13**). Obecność niepodstawionych grup hydroksylowych $7\alpha\text{-OH}$ i $12\alpha\text{-OH}$ powoduje, że sygnały pochodzące od protonów $7\beta\text{-H}$ i $12\beta\text{-H}$ są położone odpowiednio przy 3,85 i 4,00 ppm. Jeżeli grupa $12\alpha\text{-OH}$ jest podstawiona przez grupę bromoacetoksyłową, wówczas protony $12\beta\text{-H}$ ulegają przesunięciu chemicznemu w kierunku wyższych wartości ppm (5,17 ppm). Podobnie, podstawienie grupy $7\alpha\text{-OH}$ powoduje przesunięcie chemiczne w kierunku wyższych wartości ppm pochodzących od protonów $7\beta\text{-H}$.



Rysunek 2. Widma ^1H -NMR w zakresie 5,20-3,80 ppm przedstawiające charakterystyczne sygnały dla związków (**11**) czerwony, (**12**) czarny oraz (**13**) zielony [H1].

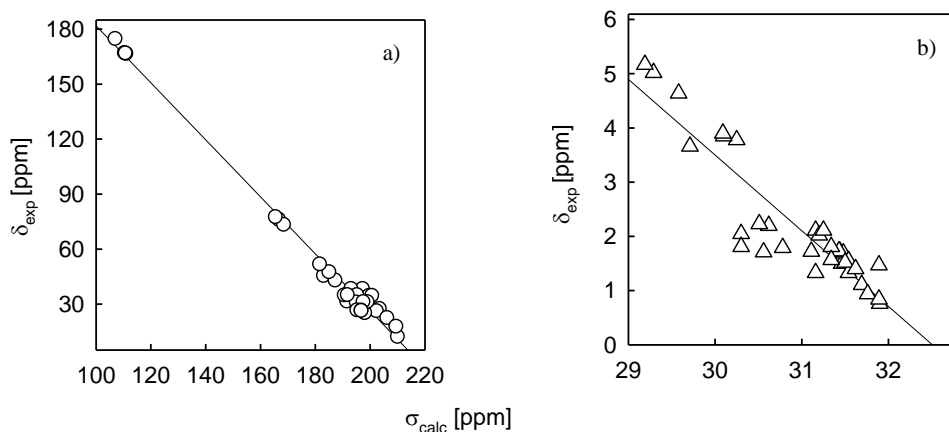
Interesujące są także sygnały pochodzące od protonów grup $3\alpha\text{-OCOCH}_2\text{Br}$, $7\alpha\text{-OCOCH}_2\text{Br}$ oraz $12\alpha\text{-OCOCH}_2\text{Br}$. Dla związków (**8-14**) w widmach ^1H NMR jest

widoczny charakterystyczny singlet występujący w przedziale 3,80–3,79 ppm, odpowiadający metylenowym protonom grupy bromoacetksylowej położonej w pozycji 3 α . Z kolei dla związków (**13**) i (**14**) widoczne są dublety położone odpowiednio przy 3,83 i 3,85 ppm, a odpowiadające protonom grupy 7 α -OCOCH₂Br. Ponadto dla związków (**10**), (**12**) i (**14**) widoczne są odpowiednio dublet i dwa singlety położone przy 3,85, 3,86 i 3,89 ppm. Obserwacje te potwierdzono w oparciu o analizę widm 2DNMR (COSY, HSQC, HMBC) 3 α ,7 α ,12 α -tribromoacetksychohanu metylu (**14**). Widmo ¹H-¹³C HSQC wskazuje korelację pomiędzy trzema wiązaniami protonów C3 β -H, C7 β -H, C12 β -H i atomem węgla grupy C=O [40]. Widmo HSQC związku (**14**) pokazano na Rysunku 3. Przecięcie sygnałów pomiędzy 3 β H/3 α -CO₂, 7 β H/7 α -CO₂, 12 β H/12 α -CO₂ potwierdza strukturę 3 α ,7 α ,12 α -tribromoacetksychohanu metylu (**14**).



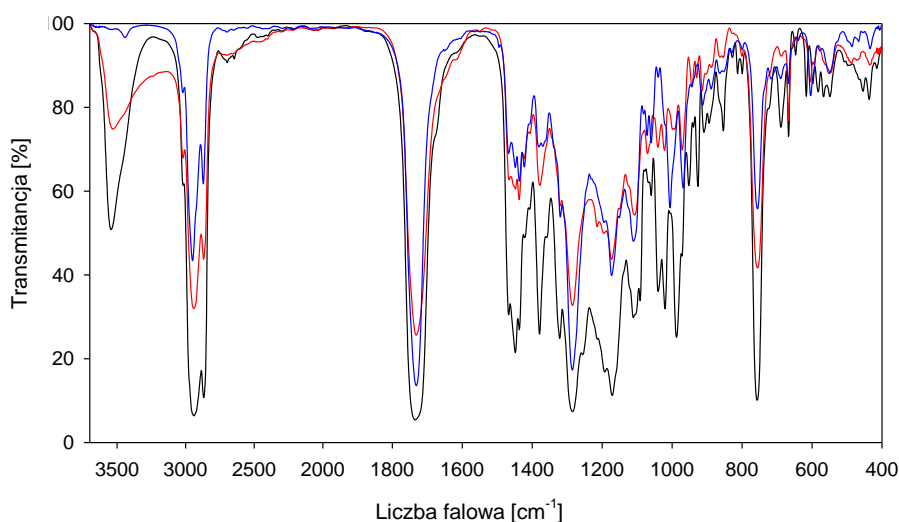
Rysunek 3. Widmo HSQC NMR w CDCl₃ 3 α ,7 α ,12 α -tribromoacetksychohanu metylu (**14**) [H1].

Ponadto, dokonano porównania eksperymentalnych przesunięć chemicznych (¹H i ¹³C NMR) i obliczonych dla wybranego związku. Korelacje pomiędzy eksperymentalnymi przesunięciami chemicznymi ¹H i ¹³C NMR (δ_{exp}) i obliczonymi (GIAO, ang. *The Gauge-independent Atomic Orbitals*) izotopowymi stałymi ekranowania (σ_{calc}) dla 3 α ,7 α ,12 α -tribromoacetksychohanu metylu (**14**) przedstawiono na Rysunku 4. Obie korelacje są liniowe, opisane przez równanie $\delta_{\text{exp}} = a + b \sigma_{\text{calc}}$. Parametr a wynosi odpowiednio dla ¹³C i ¹H 337,1619 i 45,3617, natomiast b -1,5539 i -1,3954. Bardzo dobre współczynniki korelacji ($r^2 = 0,9895$) dla ¹³C NMR i ($r^2 = 0,8322$) dla ¹H NMR 3 α ,7 α ,12 α -tribromoacetksychohanu metylu (**14**) potwierdzają zoptymalizowaną geometrię cząsteczki.



Rysunek 4. Eksperymentalne przesunięcia chemiczne (δ_{exp}) dla $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tribromoacetoksycholanu metylu (**14**) w porównaniu z izotopowymi stałymi ekranowania (σ_{calc}) przy użyciu GIAO/B3LYP/6-31G(d, s); $\delta_{\text{exp}}=a+b \sigma_{\text{calc}}$; (a) węgiel-13; (b) proton [H1].

Niezwykle istotna okazała się także analiza widm FT-IR. Widma FT-IR reprezentatywnych związków (**11**), (**13**) i (**14**) przedstawiono na Rysunku 5.

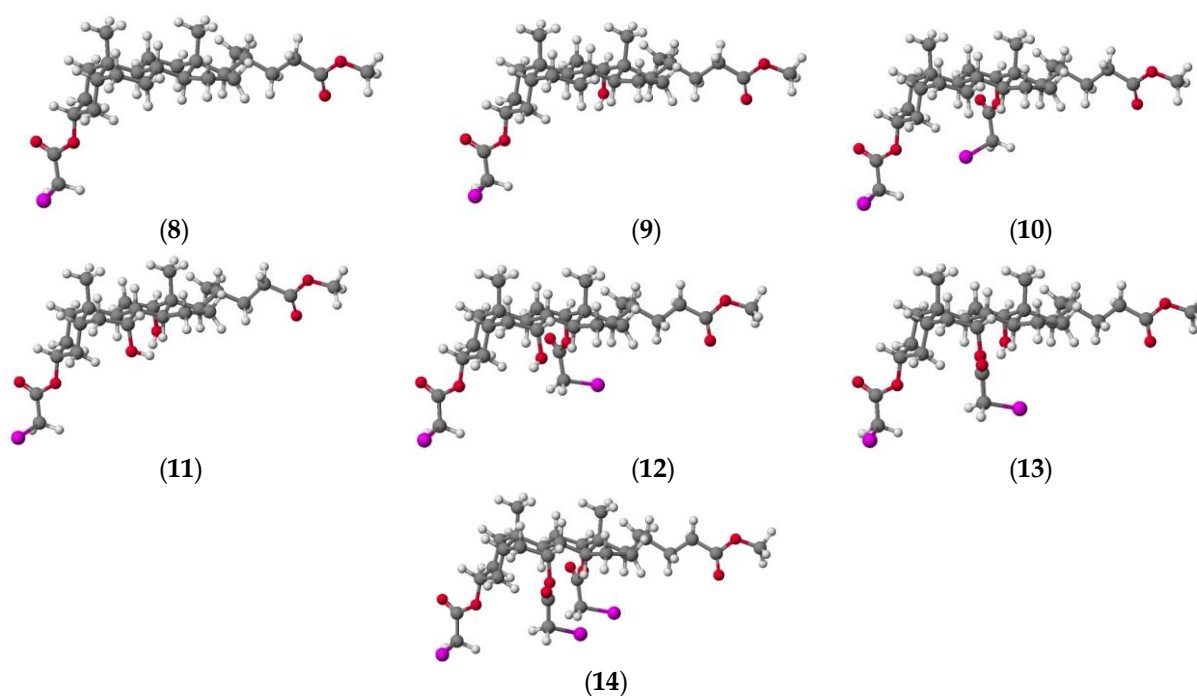


Rysunek 5. Widmo FT-IR (film) 3α -bromoacetoksy- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroksycholanu metylu (**11**) (—), $3\alpha,7\alpha$ -dibromoacetoksy- 12α -hydroksycholanu metylu (**13**) (—), $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tribromoacetoksycholanu metylu (**14**) (—) w zakresie $3600\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ [H1].

Charakterystyczne pasma obserwowane w widmach FT-IR są położone przy 3543 cm^{-1} (**9**), 3433 cm^{-1} (**11**), 3541 cm^{-1} (**12**) i 3530 cm^{-1} (**13**) i przypisane drganiom rozciągającym $\nu(\text{OH})$ grup O(7)H, O(12)H lub O(7)H i O(12)H. W każdym przypadku widoczne są także bardzo charakterystyczne dwa silne pasma w regionach $1734\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$ i $1287\text{--}1284\text{ cm}^{-1}$, które odpowiadają drganiom $\nu(\text{C}=\text{O})$ i $\nu(\text{C}-\text{O})$. Należy zauważyć, że obecność grup chloroacetoksyłowych w dwupodstawionych pochodnych estru metylowego kwasu deoksycholowego w położeniu C(3) i C(12) lub trójpodstawionych pochodnych estru metylowego kwasu cholowego w położeniu C(3), C(7) i C(12) powoduje nieznaczne przesunięcie pasm drgań grup karbonyłowych $\nu(\text{C}=\text{O})$ w kierunku wyższych liczb falowych $1737\text{--}1731\text{ cm}^{-1}$, co wynika z efektu indukcyjnego atomu chloru [37]. Ponadto, porównując

pasma drgań grupy karbonylowej $\nu(\text{C}=\text{O})$ w estrach metylowych i etylowych omawianych związków można wykazać, że pasma grupy karbonylowej estrów etylowych są przesunięte o około 20 cm^{-1} w kierunku wyższych liczb falowych [41].

Struktury otrzymanych związków obliczone metodą PM5 przy użyciu programu WinMopac 2003 przedstawione są na Rysunku 6. Najniższą wartość ciepła tworzenia wynoszącą $-425,4859\text{ kcal/mol}$ zaobserwowano dla $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -tribromoacetoksychołanu metylu (**14**). Trwałość tego związku jest związana z obecnością czterech grup estrowych w wyizolowanej cząsteczce. Z kolei wartości HOF dla $3\alpha,12\alpha$ -dibromoacetoksy- 7α -hydroksychołanu metylu (**12**) i $3\alpha,7\alpha$ -dibromoacetoksy- 12α -hydroksychołanu metylu (**13**) jako izomerów położeniowych są porównywalne (Tabela 1).



Rysunek 6. Struktury molekularne związków (8-14) obliczone metodą PM5 [H1].

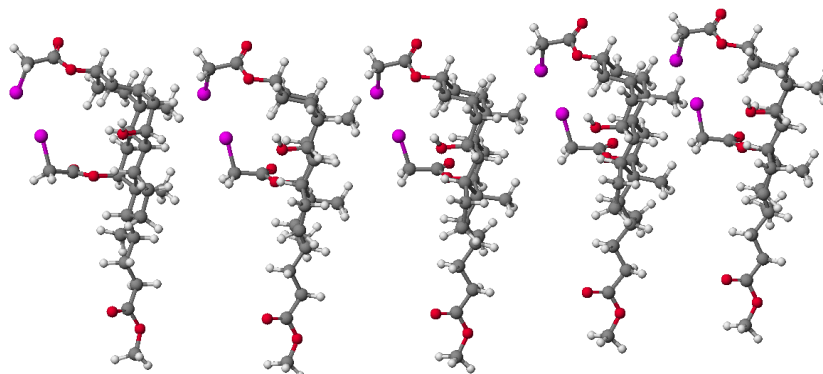
Tabela 1. Ciepło tworzenia (*ang.* heat of formation HOF) [kcal/mol] dla związków (8-14).

Związek	HOF	ΔHOF	HOF kilku cząsteczek
Litochołanu metylu	-226,5896	-	-
Deoksychołanu metylu	-268,6761	-	-
Cholan metylu	-309,3719	-	-
8	-266,3263	-39,7367	-1348,8740
9	-308,5947	-39,9186	-1558,2560
10	-345,9485	-77,2724	-1744,5095
11	-348,0126	-38,6407	-1756,1661
12	-386,0620	-76,6901	-1941,6084
13	-388,6102	-79,2383	-1957,0453
14	-425,4859	-116,1140	-2108,7200

$$\Delta\text{HOF} = \text{HOF}_{\text{związków(8-14)}} - \text{HOF}_{\text{estrów metylowych kwasów żółciowych}}$$

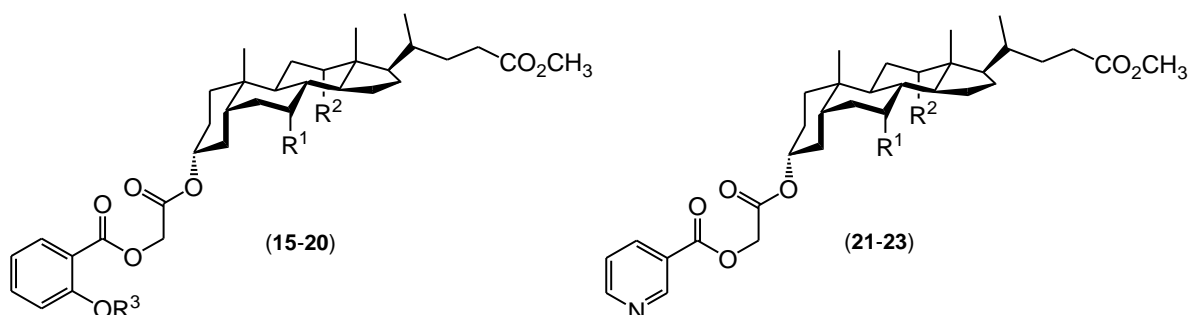
Układ przestrzenny $3\alpha,12\alpha$ -dibromoacetoksy- 7α -hydroksychołanu metylu (**12**) przedstawiono na Rysunku 7. Ciepło tworzenia (**12**) ma wartość $-1941,6084\text{ [kcal/mol]}$,

a odległości pomiędzy grupami karbonylowymi $3\alpha\text{-CO}_2$ i $12\alpha\text{-CO}_2$ wynoszą odpowiednio 8,03 Å i 7,45 Å. Z kolei odległości pomiędzy grupami $\text{C}(24)\text{O}_2$ są równe 7,68 Å. Kompensacja ładunku następuje w wyniku międzycząsteczkowych oddziaływań elektrostatycznych.



Rysunek 7. Układ przestrzenny związku $3\alpha,12\alpha$ -dibromoacetoksy- 7α -hydroksycholanu metylu (**12**) [H1].

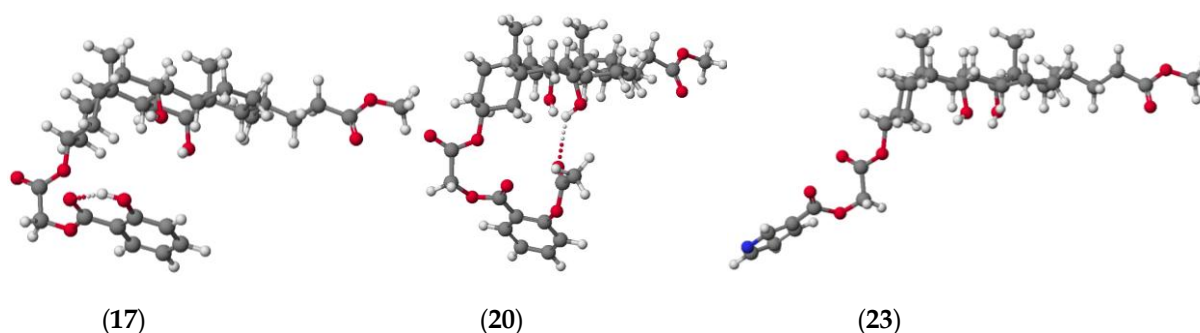
Trzy spośród omówionych powyżej związków: 3α -bromoacetoksylicholan metylu (**8**), 3α -bromoacetoksydeoksycholan metylu (**9**) oraz 3α -bromoacetoksylicholan metylu (**11**) wykorzystano w syntezie nowych, nieznanych dotąd w literaturze chemicznej koniugatów kwasów żółciowych z kwasem salicylowym (**15-17**), acetylosalicylowym (**18-20**) oraz nikotynowym (**21-23**) (Rysunek 8) [H2]. Związki te zostały otrzymane w reakcji estryfikacji bromoacetoksyopodstawionych pochodnych kwasów żółciowych (**8**), (**9**), (**11**) z kwasem salicylowym, acetylosalicylowym lub nikotynowym przy użyciu katalitycznej ilości 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) w bezwodnym toluenie. Synteza tego typu koniugatów jest szczególnie interesująca i uzasadniona, gdyż koniugaty np. aspiryny w połączeniu z polimerem alkoholu winylowego mają podobną aktywność do aspiryny, ale są mniej toksyczne. Otrzymane nowe koniugaty kwasów żółciowych mogą być również potencjalnymi prolekami [H2].



	R ¹	R ²	R ³	R ¹	R ²	R ³	R ¹	R ²
15	H	H	H	18	H	Ac	21	H
16	H	OH	H	19	H	Ac	22	H
17	OH	OH	H	20	OH	Ac	23	OH

Rysunek 8. Koniugaty bromoacetoksyopodstawionych pochodnych kwasów żółciowych z kwasem salicylowym (**15-17**), acetylosalicylowym (**18-20**) i nikotynowym (**21-23**).

Wszystkie koniugaty zostały scharakteryzowane spektroskopowo (^1H NMR, ^{13}C NMR, FT-IR) i spektrometrycznie (ESI-MS). Wyznaczono także ich struktury molekularne. Na Rysunku 9 przedstawiono przykładowe struktury koniugatów (17), (20) oraz (23).

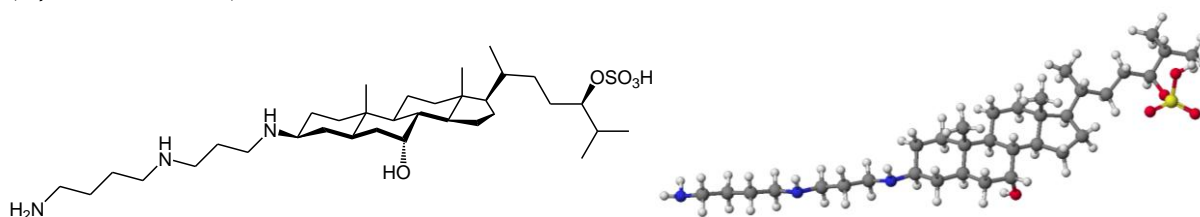


Rysunek 9. Struktury molekularne związków (17), (20) i (23) obliczone metodą PM5 [H2].

Najniższe wartości HOF zostały wyznaczone dla pochodnych kwasu cholowego (17), (20), (23). Zwiększenie liczby grup hydroksylowych w szkielecie kwasu żółciowego wpływa na obniżenie wartości ciepła tworzenia. Ponadto niższe wartości HOF zaobserwowano dla koniugatów kwasów żółciowych z kwasem acetylosalicylowym (20), co można wytłumaczyć poprzez zmniejszenie reaktywności grupy fenolowej kwasu salicylowego. Na obniżenie ciepła tworzenia wpływa również wiązanie wodorowe pomiędzy grupą hydroksylową kwasu cholowego i karbonylową kwasu acetylosalicylowego [H2].

2.1.2. Czwartorzędowe sole amoniowe pochodnych kwasów żółciowych

Jednym z najważniejszych i najlepiej poznanych koniugatów steroidowych jest skwalamina (Rysunek 10) [42]. Została ona po raz pierwszy wyizolowana z wątroby kolenia pospolitego (*Squalus acanthias*) [43-46].

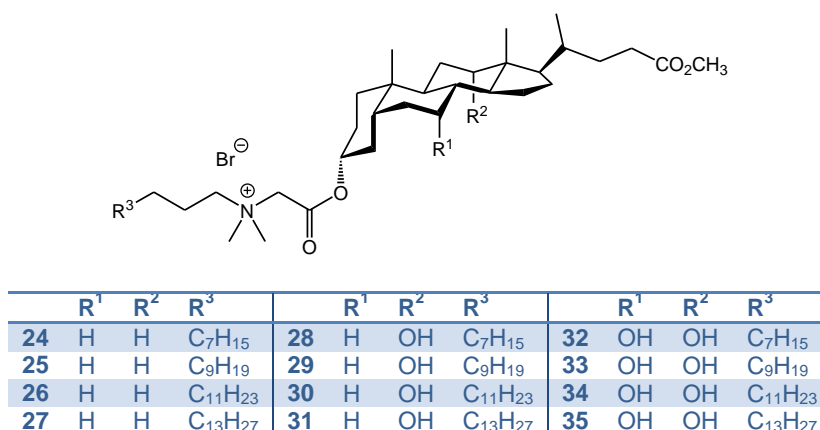


Rysunek 10. Skwalamina oraz jej struktura molekularna [42].

Skwalamina jest antybiotykiem o bardzo szerokim spektrum aktywności drobnoustrojowej obejmującej bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, grzyby, pierwotniaki, a także wirusy [47-55]. Tak duże spektrum aktywności biologicznej spowodowało, że wiele ośrodków badawczych zajęło się projektowaniem, syntezą oraz określaniem właściwości nowych koniugatów steroidowo-aminowych [56-64]. Główne kryteria syntezy biologicznie czynnych koniugatów steroidów i poliamin zostały podane przez Salunke *et al.* [7]. Koniugaty tego typu powinny zawierać sztywny, duży szkielet hydrofobowy i przyłączony do niego elastyczny hydrofilowy łańcuch zawierający polarną grupę. Grupy siarczanowe powinny być łatwo usuwane i zastępowane innymi grupami polarnymi np. hydroksylowymi lub karboksylowymi. Z kolei szkielet steroidowy może być modyfikowany na różne sposoby,

natomiast struktura łańcucha poliaminowego jest mniej istotna. Brycki i współpracownicy otrzymali, określili właściwości i opisali serię analogów skwalaminy [65,66]. W kolejnych pracach rozszerzyłem badania na kwasy żółciowe i opisałem koniugaty typu czwartorzędowych soli alkiloamoniowych kwasów żółciowych modyfikowanych zarówno w pozycji C(3) jak i C(24) [H3-H5].

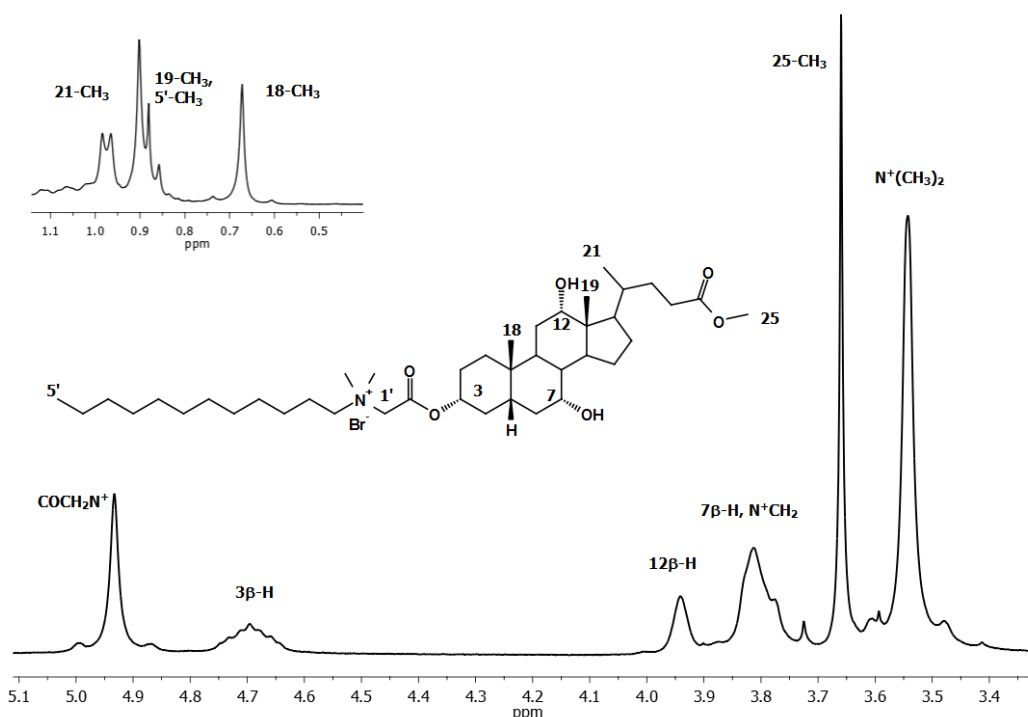
Przeprowadziłem reakcje dwucząsteczkowej substytucji nukleofilowej pomiędzy bromoacetoksy podstawionymi pochodnymi kwasów: lithocholowego (8), deoksycholowego (9) i cholowego (11) z trzeciorzędowymi aminami długołańcuchowymi: *N,N*-dimetylo-*N*-decylaminą (24, 28, 32), *N,N*-dimetylo-*N*-dodecylaminą (25, 29, 33), *N,N*-dimetylo-*N*-tetradecylaminą (26, 30, 34) oraz *N,N*-dimetylo-*N*-heksadecylaminą (27, 31, 35) (Rysunek 11) [H3].



Rysunek 11. Czwartorzędowe sole alkiloamoniowe kwasów żółciowych (24-35).

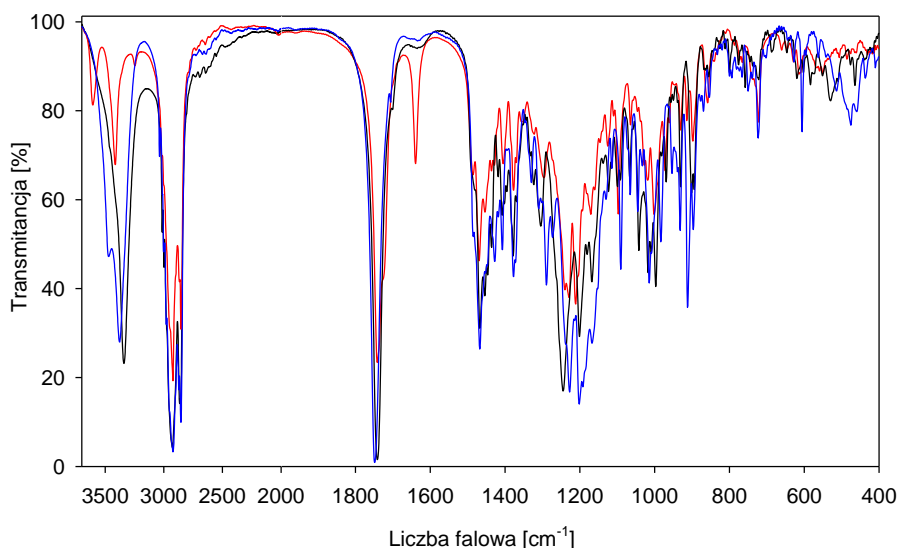
Zgodnie z mechanizmem reakcji substytucji nukleofilowej zmiana rozpuszczalnika z etanolu lub acetonu na acetonitryl w znaczący sposób skróciła czas prowadzenia reakcji ze stu do trzech godzin. Tak zmodyfikowane warunki reakcji wpłynęły korzystnie na wydajności prowadzonych reakcji. Struktury wszystkich koniugatów zostały określone i potwierdzone przy użyciu metod spektroskopowych (¹H, ¹³C NMR, FT-IR) oraz spektrometrii masowej. Ponadto wyznaczono także struktury molekularne poszczególnych związków [H3].

Na Rysunku 12 przedstawiono przykładowe widmo ¹H NMR bromku *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-7 α ,12 α -dihydrokso-5 β -cholan-24-ianu metylu)-*N*-dodecylammoniumowego. W widmie tym widoczny jest charakterystyczny multiplet odpowiadający protonowi 3 β -H, mieszczący się w przedziale 4,76–4,61 ppm. Ponadto, widać szerokie singlety (bs) przy 3,95 i 3,82 ppm odpowiadające protonom 12 β -H i 7 β -H. Wszystkie te sygnały są nieznacznie tylko przesunięte względem analogicznych protonów w związku (11). Protony grupy metylenowej N⁺CH₂ tworzą szeroki i rozmyty multiplet w zakresie 3,88–3,73 ppm i wchodzą w zakres sygnału protonu 7 β -H przez co znacznie go rozszerzają. W widmie ¹H NMR widać także wyraźny wpływ czwartorzędowego atomu azotu na odsłanianie protonów grupy metylenowej C(1')H₂. Sygnał tych protonów jest położony w przedziale 5,01–4,90 ppm tworząc szeroki singlet i jest przesunięty w kierunku wyższych wartości ppm względem sygnału protonów grupy CH₂Br związku (11) o około 1,2 ppm. Sygnał pochodzący od sześciu protonów grup metylowych przyłączonych do czwartorzędowego atomu azotu jest widoczny przy 3,53 ppm jako szeroki singlet.



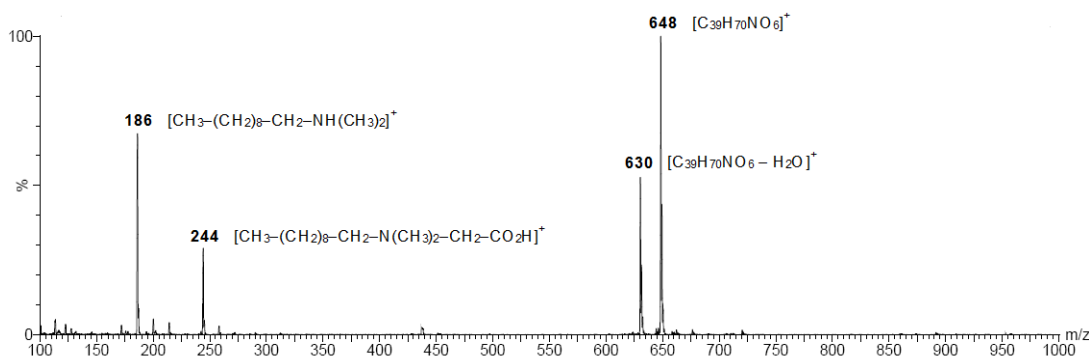
Rysunek 12. Widmo $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz) bromku *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-7 α ,12 α -dihydrokso-5 β -cholan-24-ianu metylo)-*N*-dodecyłamonioowego (**33**) [H3].

Na Rysunku 13 przedstawiono widmo FT-IR związków (**25**), (**29**) i (**33**). Różnice w szerokich pasmach absorpcji w zakresie 3500-3000 cm^{-1} odpowiadające drganiom rozciągającym grup $\nu(\text{OH})$ są ściśle powiązane z liczbą niepodstawionych grup hydroksylowych w cząsteczkach koniugatów kwasów żółciowych. W widmie FT-IR związku (**25**) znajdują się dwa pasma drgań rozciągających przy 3606 i 3414 cm^{-1} , odpowiadające drganiom rozciągającym cząsteczki wody. Z kolei w widmie związku (**29**) pasmo przy 3338 cm^{-1} jest typowe dla drgań rozciągających związanej wodorowo grupy $\nu(\text{OH})$. Natomiast w widmie FT-IR koniugatu (**33**) zawierającego dwie niepodstawione grupy hydroksylowe w położeniu 7 α -OH i 12 α -OH widać bardzo silne dwa pasma usytuowane przy 3474 i 3376 cm^{-1} , które powstają w wyniku drgań rozciągających obu grup OH. W widmie FT-IR koniugatu (**25**) drgania zginające OH w cząsteczce wody $\delta(\text{HOH})$ dają ostre pasmo przy 1639 cm^{-1} . Ponadto w widmach w podczerwieni związków (**25**) (**29**) i (**33**) drgania rozciągające grup $\nu(\text{CH}_2)$ i $\nu(\text{CH}_3)$ zaobserwowano w regionie 3081-2951 cm^{-1} . Z kolei drgania deformacyjne $\delta(\text{CH}_2)$ i $\delta(\text{CH}_3)$ są widoczne w regionie 1471-1352 cm^{-1} . Intensywne pasma deformacyjne $\gamma(\text{CH}_2)$ grup metylenowych są położone w zakresie 870-610 cm^{-1} . Drgania rozciągające $\nu(\text{COO})$ grupy karboksylowej zaobserwowano przy 1742; 1741 i 1749 cm^{-1} odpowiednio dla związków (**25**), (**29**) i (**33**).



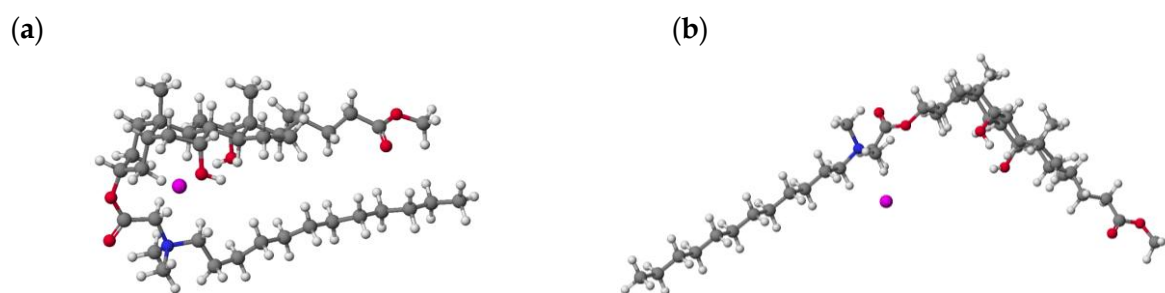
Rysunek 13. Widmo FT-IR (KBr) związków (25) (—), (29) (—), (33) (—) w zakresie 3600–400 cm^{-1} [H3].

W widmach masowych analizowanych koniugatów można zaobserwować niewielką fragmentację masową, która jest zdecydowanie analityczna. W widmach ESI-MS wykonanych w metanolu, wszystkich związków widoczny jest jon molekularny i zaledwie kilka jonów fragmentarycznych. Najczęściej jonem o intensywności względnej 100% jest jon powstający w wyniku pęknięcia wiązania $\text{CH}_2(\text{sp}^3)\text{-N}(\text{sp}^3)(\text{CH}_3)_2$. W przedstawionym na Rysunku 14 widmie związku (32) można jednak prześledzić fragmentację masową. Jonem podstawowym jest jon M^+ [$\text{C}_{39}\text{H}_{70}\text{NO}_6^+$] zawierający szkielet steroidowy o intensywności względnej 100% położony przy m/z 648. Charakterystyczna eliminacja cząsteczki wody prowadzi do powstania jonu fragmentarycznego [$\text{C}_{39}\text{H}_{68}\text{NO}_5^+$] przy m/z 630 (50%). Ponieważ w pochodnych kwasu deoksycholowego (25), (29) i (33) nie zaobserwowano eliminacji cząsteczki wody z jonu molekularnego można stwierdzić, że odchodząca cząsteczka wody pochodzi od grupy hydroksylowej $7\alpha\text{-OH}$. Ponadto w widmie ESI-MS związku (32) widoczne są dodatkowe dwa jony fragmentaryczne przy m/z 244 (28%) i 186 (70%). Pierwszy z nich powstaje w wyniku hydrolizy wiązania $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-O}(\text{sp}^3)$, a drugi w wyniku rozpadu wiązania $\text{CH}_2(\text{sp}^3)\text{-N}(\text{sp}^3)(\text{CH}_3)_2$ i wewnątrzcząsteczkowego przegrupowania protonu, w wyniku czego aminowy atom azotu zostaje czwartorzędowany.



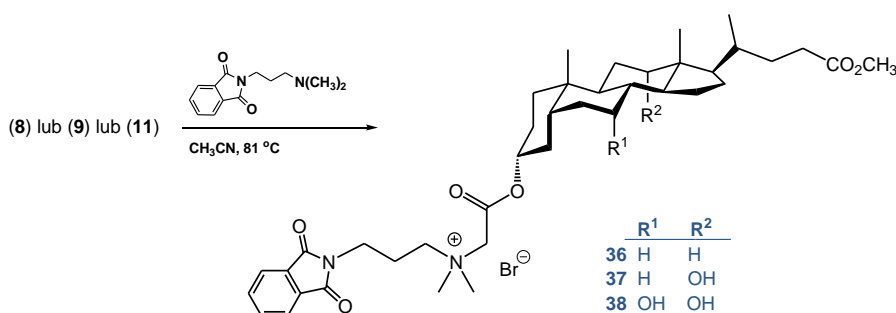
Rysunek 14. Widmo ESI-MS w trybie jonów dodatnich bromku *N,N*-dimetylo-(3α -acetoksy- $7\alpha,12\alpha$ -dihydroksi- 5β -cholan-24-ianu metylu)-*N*-decylamoniowego (32) [H3].

Struktury molekularne konformerów *syn* i *anti* koniugatu (**33**) obliczone metodą PM5 przedstawiona Rysunku 15. Najniższe wartości HOF dla czwartorzędowych koniugatów alkiloamoniowych kwasów żółciowych (**24-35**) są widoczne dla koniugatów kwasu cholowego (**32-34**). Na obniżenie wartości HOF ma wpływ zarówno liczba grup hydroksylowych w szkieletie steroidowym jak i zwiększanie długość łańcucha alkiloamoniowego. Wartości HOF dla konformerów *anti* są nieco niższe niż dla konformerów *syn*. Można to wytłumaczyć tym, iż układ przestrzenny konformerów *anti* tworzy stabilne kompleksy typu gość-gospodarz. Kompleksy takie mogą być stabilizowane przez wiązania wodorowe lub oddziaływania elektrostatyczne, wynikające z liczby grup hydroksylowych w cząsteczce kwasu żółciowego – im więcej grup hydroksylowych tym niższe wartości ciepła tworzenia. W przypadku konformerów *syn* obserwuje się zwiększenie wartości ciepła tworzenia, co jest związane ze zmniejszeniem dostępu do powierzchni koniugatu.



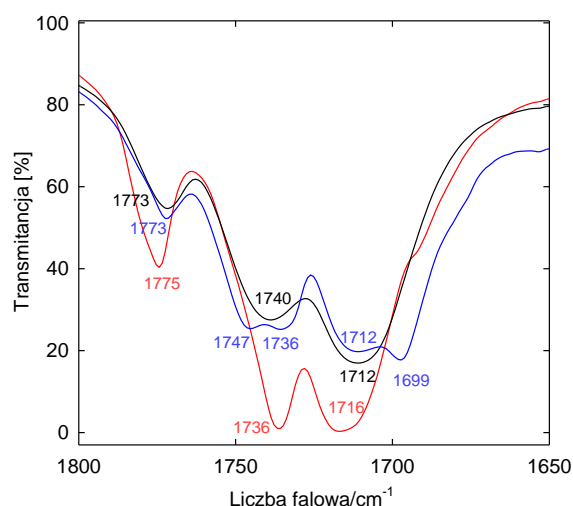
Rysunek 15. Struktury molekularne koniugatu (**33**) obliczone metodą PM5 – konformer *syn* (a), *anti* (b) [H3].

Niezwykle istotną funkcję biologiczną pełnią także *N*-ftalimidowe pochodne, których zdolność hamowania α -glukozydazy wykorzystana jest w substancjach o aktywności farmakologicznej. Związki tego typu są badane między innymi pod kątem eradykacji zarodźca sierpowatego (*Plasmodium falciparum*) wywołującego malarię. Pierwotniak ten jest przyczyną największej liczby zgonów ludzi na świecie. Problem ten zwrócił moją uwagę, dlatego też postanowiłem otrzymać nowe *N*-ftalimidowe pochodne kwasów żółciowych o potencjalnych właściwościach przeciwpierwotniakowych. Na Schemacie 2 została przedstawiona synteza bromków: *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-5 β -cholan-24-ian metylu)-3-*N*-ftalimidopropyloamoniowego (**36**), *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-12 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ian metylu)-3-*N*-ftalimidopropyloamoniowego (**37**) oraz *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-7 α ,12 α -dihydroksy-5 β -cholan-24-ian metylu)-3-*N*-ftalimidopropyloamoniowego (**38**) [H4].



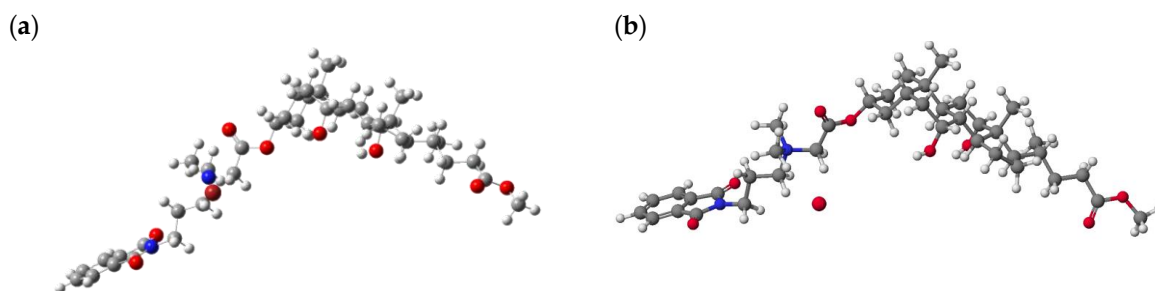
Schemat 2. Synteza *N*-ftalimidowych podstawionych pochodnych kwasów żółciowych (**36-38**).

Widma FT-IR *N*-ftalimidowych pochodnych kwasów żółciowych (**36-38**) przedstawiają charakterystyczne pasma przy 1775–1773 cm⁻¹ odpowiadające drganiom rozciągającym grupy karbonylowej $\nu_{as}(C=O)$ w części ftalimidowej (Rysunek 16) [67,68]. Z kolei symetryczne drgania rozciągające $\nu_s(C=O)$ występują w widmie FT-IR jako szerokie, niesymetryczne pasma o dużej intensywności przy 1716–1699 cm⁻¹, co sugeruje nierównocенność grup karbonylowych w części ftalimidowej. W widmie FT-IR koniugatu kwasu litocholowego (**36**) (Rysunek 16, niebieska linia) widać charakterystyczne pasma drgań $\nu_{as}(C=O)$ i $\nu_s(C=O)$ ugrupowania ftalimidowego przy odpowiednio 1773 cm⁻¹ oraz w 1712 i 1699 cm⁻¹. W tym przypadku drgania $\nu_{as}(C=O)$ i $\nu_s(C=O)$ są niesymetryczne w porównaniu do pasm karbonylowych pochodnych kwasu deoksycholowego (**37**) i cholowego (**38**). Nierównocенność $\nu_{as}(C=O)$ w widmie FT-IR obserwuje się również dla *N,N*-bis-(ftalimidopropyl)-*N*-propyloaminy [69]. W przeciwieństwie do powyższego przykładu w monohydracie chlorowodoru *N,N*-dimetylo-3-ftalimidopropylamoniowego i *N*-*n*-butylotetrachloroftalimidzie nie zaobserwowano rozszczepienia pasma drgań grupy karbonylowej mimo różnych oddziaływań każdej grupy karbonylowej w strukturze supramolekularnej [70,71]. Ponadto drgania rozciągające $\nu(COO)$ w grupie karboksylowej w podczerwieni występują przy 1747–1736 cm⁻¹ (Rysunek 16).



Rysunek 16. Widmo FT-IR w zakresie drgań grupy karbonylowej dla koniugatów (**36**) (—), (**37**) (—), (**38**) (—) [H4].

Dla badanych związków zoptymalizowano struktury molekularne metodą PM5 oraz B3LYP/6-31G(d,p) (Rysunek 17). Ciepło tworzenia [kcal/mol] oraz energię [a.u.] przedstawiono w Tabeli 2.



Rysunek 17. Struktura molekularna koniugatu (**38**) wyznaczono metodami B3LYP (a) i PM5 (b).

Podobnie jak w poprzednich przypadkach, najniższe wartości ciepła tworzenia zaobserwowano dla pochodnej kwasu cholowego, na co ma wpływ obecność dwóch wolnych grup hydroksylowych, które mogą brać udział w tworzeniu między- jak i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Potwierdzają to również badania wykonane przy pomocy metody B3LYP/6-31G(d,p) (Tabela 2).

Tabela 2. Ciepło tworzenia (HOF) [kcal/mol] oraz energia [a.u.] kwasów żółciowych (4), (5), (7) i ich koniugatów (36-38).

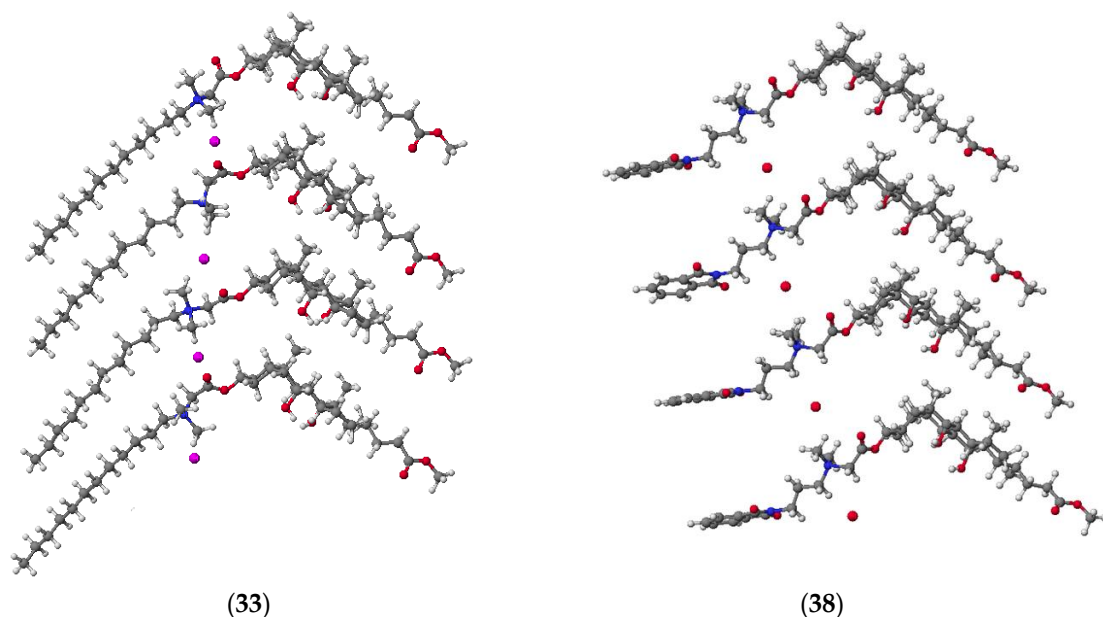
Związek	HOF [kcal/mol]	Δ HOF [kcal/mol]	Energia [a.u.]	Δ E [a.u.]
4	-236.1585	-	-1204.997432	-
5	-278.4616	-	-1263.040016	-
7	-318.1685	-	-1337.190617	-
36	-306.6215	-70.4630	-4640.248926	-3435.251494
37	-348.9986	-70.5370	-4714.391510	-3451.351494
38	-388.2588	-70.0903	-4788.548913	-3451.358296

$$\Delta\text{HOF} = \text{HOF}_{\text{koniugat (36-38)}} - \text{HOF}_{\text{kwas żółciowy (4,5,7)}}$$

$$\Delta E = E_{\text{koniugat (36-38)}} - E_{\text{kwas żółciowy (4,5,7)}}$$

Długości wiązań wodorowych C(4')-H \cdots Br i C(2')-H \cdots Br oraz oddziaływanie pomiędzy czwartorzędowym atomem azotu i anionem bromkowym N(2) \cdots Br są porównywalne dla obu metod, chociaż wartości wyznaczone metodą B3LYP są nieco krótsze – szczególnie dla wiązania C(4')-H \cdots Br. Różnice pomiędzy strukturami obliczonymi metodą PM5 i B3LYP/6-31G(d,p) występują natomiast w kątach torsyjnych C(7')-N(1)-C(6')-C(5'), C(8')-C(7')-N(1)-C(6'), C(5')-C(4')-N(2)-C(2') oraz C(6')-C(5')-C(4')-N(2).

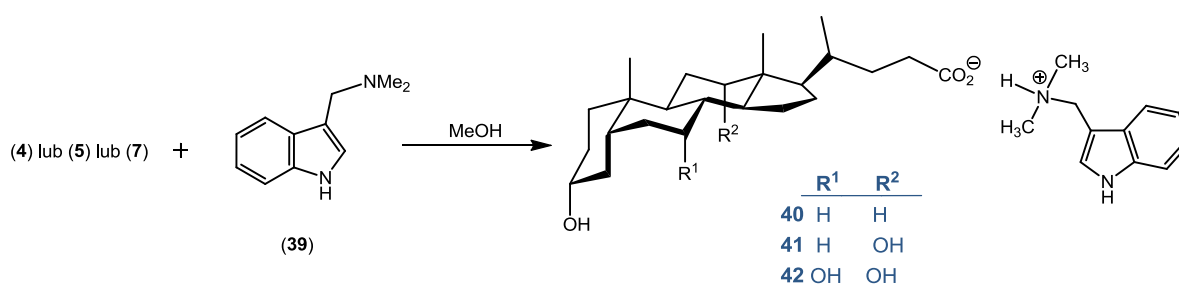
Porównanie układu przestrzennego i interakcji bromku *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-7 α ,12 α -dihydrokso-5 β -cholan-24-ianu metylu)-*N*-dodecylamoniowego (33) oraz bromku *N,N*-dimetylo-(7 α ,12 α -dihydrokso-5 β -cholan-24-ianu metylu)-3-*N*-ftalimidopropylamoniowego (38) przedstawiono na Rysunku 18. Końcowe ciepło tworzenia dla układu cząsteczek (33) wynosi -2030,3194 kcal/mol, natomiast dla (38) -1358,893 kcal/mol. Z kolei odległości pomiędzy czwartorzędowym atomem azotu i anionem bromkowym (N \cdots Br) wynosi odpowiednio 3,94 Å i 4,33 Å. Kompensacja ładunków następuje poprzez międzycząsteczkowe oddziaływania elektrostatyczne, co jest bardzo dobrym potwierdzeniem wniosku, że wewnątrzcząsteczkowe interakcje mają wpływ na zmniejszenie wartości ciepła tworzenia. W strukturze supramolekularnej badanych koniugatów oddziaływania elektrostatyczne są zarówno intramolekularne (N \cdots Br) jak i intermolekularne (N \cdots Br \cdots N \cdots Br), podczas gdy w zoptymalizowanej strukturze pojedynczej cząsteczki oddziaływania międzycząsteczkowe są nieobecne.



Rysunek 18. Układ przestrzenny koniugatów (33) i (38).

Realizując cel mojej pracy przeprowadziłem także syntezę koniugatów kwasów żółciowych i graminy (39). Gramina jest alkaloidem indolowym, izolowanym z jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*). Jej biochemicznym prekursorem jest tryptofan, który w wyniku biosyntetycznych modyfikacji traci dwa atomy węgla z łańcucha bocznego, zachowując egzocykliczny atom azotu z grupy aminowej. Gramina wykazuje znaczną aktywność farmakologiczną między innymi podnosi ciśnienie tętnicze krwi, rozluźnia naczynia krwionośne, przyspiesza regenerację mięśni gładkich oskrzeli, pełni istotną rolę w procesie metabolizmu aminokwasów. Alkaloid ten znalazł zastosowanie jako lek przeciwko zapaleniu oskrzeli czy astmy oskrzelowej, a jej pochodne są aktywnymi czynnikami przeciwnowotworowymi.

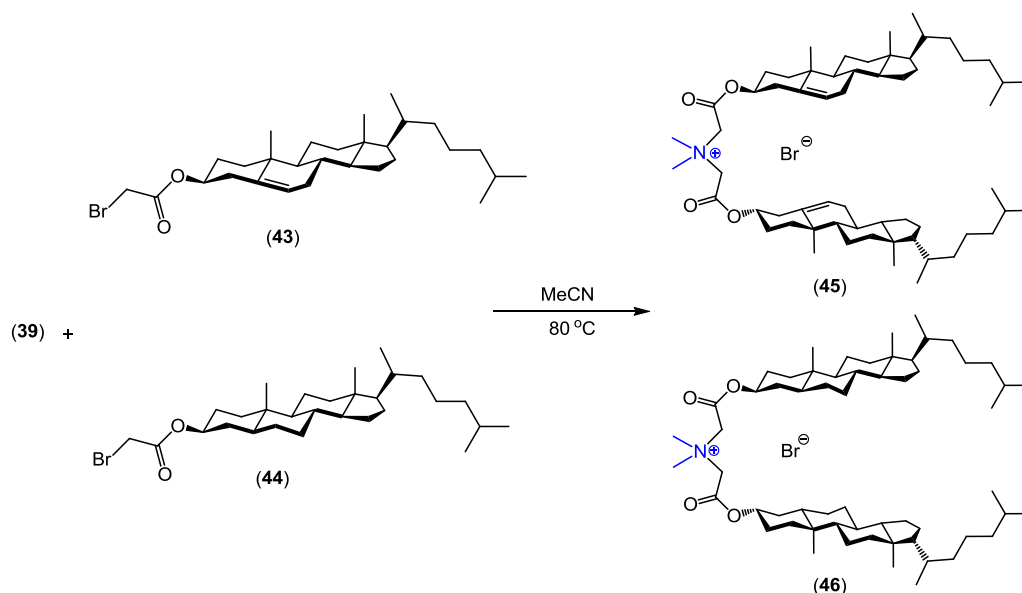
Jednym z etapów koncepcji pracy była synteza adduktów kwasów żółciowych i graminy (40-42) [H5] (Schemat 3). Struktury otrzymanych adduktów zostały potwierdzone poprzez analizę spektroskopową i analizę elementarną.



Schemat 3. Synteza adduktów kwasów żółciowych z graminą (40-42).

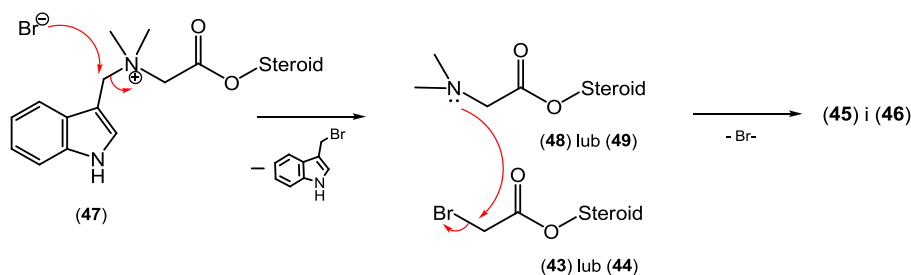
Kolejnym etapem polegał na syntezie nowych koniugatów kwasów żółciowych z graminy jako trzeciorzędowej aminy oraz 3 α -bromoacetoksy-podstawionych pochodnych kwasów żółciowych (8), (9) i (11). Z uwagi na trudności syntetyczne, postanowiono przeprowadzić reakcje modelowe z użyciem mniej sfunkcjonalizowanych cząsteczek pochodnych steroli:

3β-bromooctanu cholesterylu (**43**) i 3β-bromooctanu dihydrocholesterylu (**44**) oraz graminy. Otrzymano symetryczne związki dimeryczne, które zawierały w swojej strukturze części sterolowe połączone czwartorzędowym atomem azotu pochodzącym z cząsteczki alkaloidu (Schemat 4).



Schemat 4. Synteza dimerów pochodnych cholesterolu i dihydrocholesterolu (**45**) i (**46**) [H5].

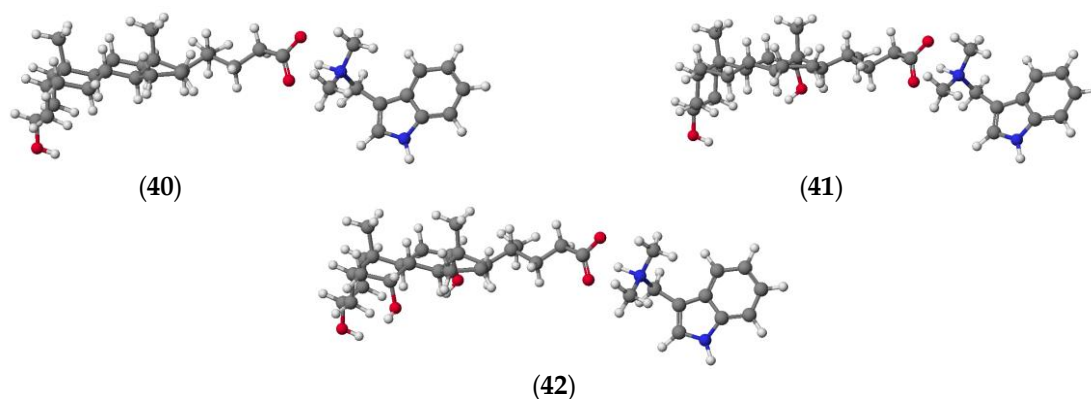
Strukturę otrzymanych związków potwierdzono za pomocą metod spektralnych (^1H i ^{13}C NMR, FT-IR), a także przy użyciu spektrometrii mas (ESI-MS). Mechanizm powstawania nowych, nieoczekiwanych produktów wytłumaczono w oparciu o teorię miękkich i twardych kwasów i zasad Pearsona [72-74]. Pierwszym krokiem jest bezpośrednia reakcja *N*-alkilowania cząsteczki graminy 3β-bromooctanem cholesterylu (**43**) lub 3β-bromooctanem dihydrocholesterylu (**44**) w wyniku czego tworzy się monopodstawiony addukt typu (**47**) (miękki kwas). W następstwie ataku anionu bromkowego (miękką zasadą) na grupę metylenową cząsteczki graminy powstaje 3-(bromometyleno)-1*H*-indol oraz związki monopodstawione (**48**) i (**49**). Ostatecznym etapem reakcji jest atak trzeciorzędowego atomu azotu monomerów (**48**) i (**49**) na grupę metylenową kolejnych cząsteczek 3β-bromooctanu cholesterylu (**43**) lub 3β-bromooctanu dihydrocholesterylu (**44**) w wyniku czego powstają dimery (**45**) i (**46**) (Schemat 5).



Schemat 5. Proponowany mechanizm powstawania dimerów (**45**) i (**46**) [H5].

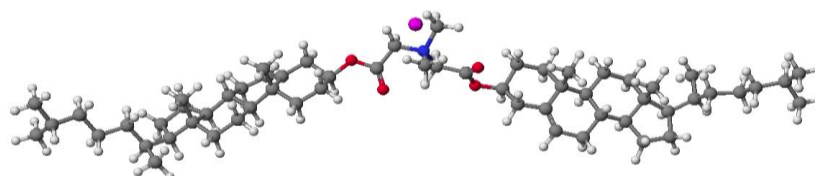
Na Rysunku 19 przedstawiono struktury molekularne adduktów kwasów żółciowych z gramina wyznaczone metodą PM5. Z przeprowadzonych badań semiempirycznych

wynika, że najniższą wartość HOF ma addukt (**42**). Ponadto pierścienie cząsteczki graminy są zorientowane prostopadłe do szkieletu steroidowego. Natomiast proton grupy $N^+(CH_3)_2H$ jest umiejscowiony pomiędzy dwoma atomami tlenu grupy karboksylowej. Odległość pomiędzy protonem a atomami tlenu grupy karboksylowej wynosi 1.76 Å, natomiast pomiędzy protonem i atomem azotu 1.26 Å.



Rysunek 19. Obliczone metodą PM5 struktury adduktów alkaloidowo-steroidowych (**40-42**).

Wyznaczono także ciepło tworzenia powstałych dimerów sterolowych. Wyniki obliczeń wskazują na większą trwałość dimeru powstałego z dihydrocholesterolu. Można to wytłumaczyć brakiem wiązań wielokrotnych w cząsteczce związku. Jednocześnie badania semiempiryczne nie wyjaśniły, dlaczego nie powstały oczekiwane koniugaty. Ciepło tworzenia pochodnej dihydrocholesterolowej wynosi $-389,8861$ kcal/mol, natomiast dla cholesterolowej $-344,1652$ kcal/mol. Na Rysunku 20 przedstawiono strukturę molekularną dimeru (**45**).

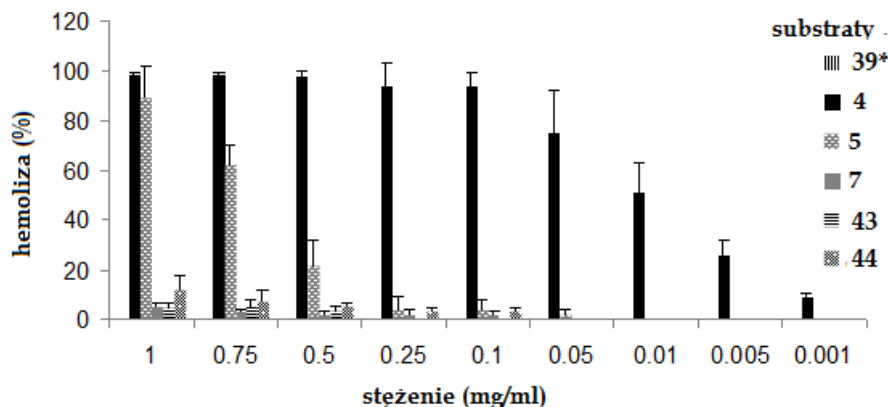


Rysunek 20. Struktura molekularna dimeru (**45**) [H5].

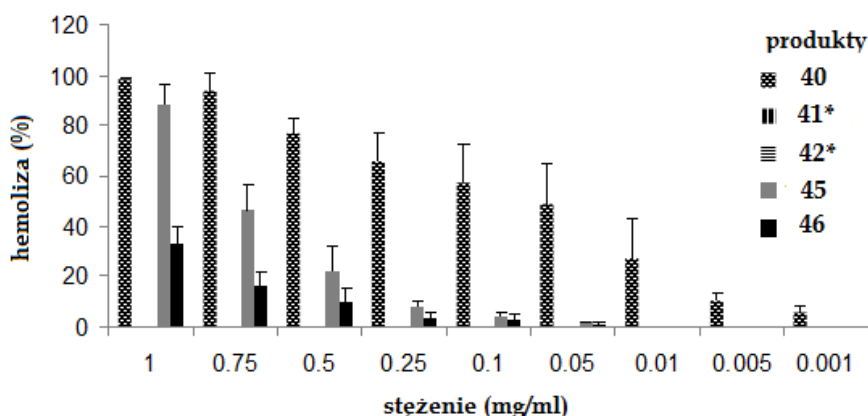
Ponadto współpracując z Zakładem Biologii Komórki Instytutu Biologii Eksperymentalnej na Wydziale Biologii UAM, zbadałem aktywność biologiczną adduktów (**40-42**) oraz dimerów (**45**) i (**46**). W literaturze chemicznej istnieją interesujące doniesienia dotyczące hemolitycznej aktywności adduktów kwasów żółciowych z nikotyną i jej pochodnymi [75]. Wyniki pozyskane dla produktów porównano z aktywnością biologiczną substratów tj.: graminy (**39**), kwasu lithocholowego (**4**), deoksycholowego (**5**) i cholowego (**7**) oraz 3β -bromooctanu cholesterylu (**43**) i 3β -bromooctanu dihydrocholesterylu (**44**). Jako miarę aktywności biologicznej przyjęto właściwości cytotoksyczne związków względem erytrocytów ludzkich oraz zdolność modyfikacji kształtu tych komórek. Aktywność cytotoksyczną mierzono spektrofotometrycznie poprzez ocenę uwalniania hemoglobiny i wyrażenie wyników jako udział procentowy hemolizy. Gramina była jedynym niehemolitycznym związkiem stosowanym w badaniach.

Zmienne stopnie hemolizy, zmieniające się w granicach od 8% do 100%, wykrywano po inkubacji z kwasami żółciowymi (4), (5) i (7) w zakresie stężeń od 0,001 mg/ml do 1 mg/ml (Rysunek 21a). Stopień hemolizy jest zależny od hydrofobowości kwasów żółciowych, co można przedstawić w szeregu: kwas monohydroksylowy > kwas dihydroksylowy > kwas trihydroksylowy. Z kolei bromooctany steroli (43) i (44) wykazują słabą hemolizę – od 4% do 16%, w zakresie stężeń od 0,5 mg/ml do 1 mg/ml (Rysunek 21a).

(a)



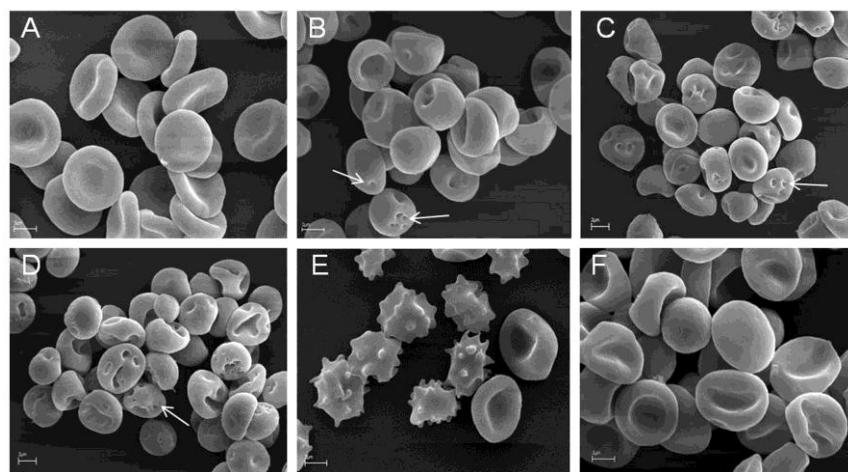
(b)



Rysunek 21. Hemoliza (%) indukowana przez badane związki (po 60 minutach inkubacji w temperaturze 37 °C). Substraty (a), produkty (b). *Nie zaobserwowano hemolizy powyżej stężenia 1 mg/ml dla: graminy (39), adduktu graminy z kwasem deoksycholowym (41) i adduktu graminy z kwasem cholowym (42) [H5].

Nieoczekiwanie, addukty kwasów deoksycholowego i cholowego z graminą nie wykazywały hemolizy (Rysunek 21b). Addukt graminy i kwasu lithocholowego (40) wykazuje mniejszą aktywność hemolityczną niż sam kwas lithocholowy (4). Wartość H_{50} (stężenie związku powodującego 50% hemolizy) dla adduktu kwas lithocholowy-gramina (0,061 mg/mL) była prawie siedmiokrotnie wyższa niż dla samego kwasu lithocholowego (0,009 mg/ml). Z kolei oba nowe dimery steroli i graminy wykazywały wyższy udział procentowy hemolizy niż odpowiadające im substraty sterolowe. Na Rysunku 21b widać wzrost hemolizy indukowanej o 80% wywołanej przez dimer (45) przy stężeniu 1 mg/ml, w porównaniu do 3 β -bromoacetoksycholesterolu (43). Podobną korelację, ale mniej wyraźną można zaobserwować dla dimeru (46) i 3 β -bromoacetoksydihydrocholesterolu (44).

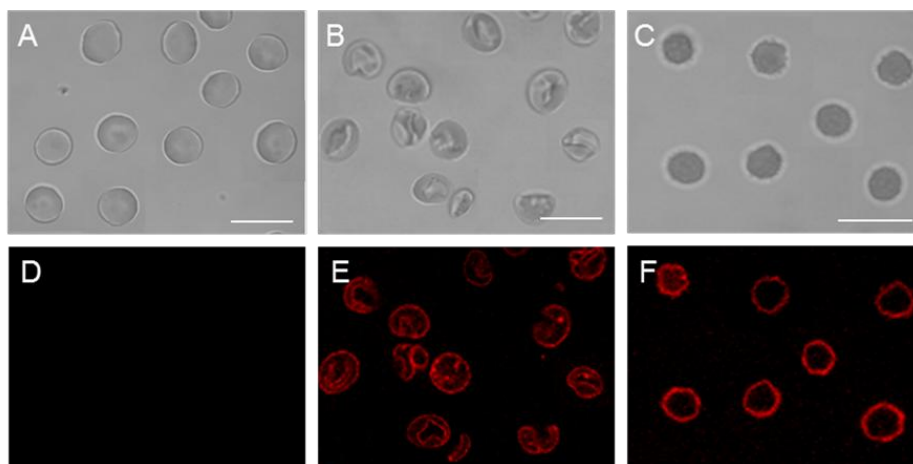
Równoległe z badaniami hemolizy opisano morfologię krwinek czerwonych uzyskaną z obrazów elektronowego mikroskopu skaningowego (Rysunek 22). Komórki erytrocytów charakteryzuje dyskokytarny kształt, który w zależności od czynników fizycznych jak i chemicznych może ulegać zmianie. Traktowanie komórek erytrocytów adduktami kwasów żółciowych i graminy, powoduje przekształcenie dyskokytu w stomatocyt (Rysunek 22B, C, D). Takie zmiany morfologii erytrocytów, jak również uwolnienie mikropęcherzyków (tzw. pęcherzyków endo) z ich błony komórkowej są typowe po ekspozycji kwasów żółciowych i nie wykazują żadnego wpływu graminy na transformację kształtu komórek erytrocytów. Natomiast zmiana kształtu komórek erytrocytów wywołana dimerami (45) i (46) (Rysunek 22E, F), wskazuje, że ulegają one stosunkowo łatwemu włączeniu do błony komórkowej erytrocytów. Stabilny kształt echinocyty wywołany działaniem dimeru (45) zaobserwowano przy jego niskim stężeniu, co można wyjaśnić jego akumulacją w zewnętrznej warstwie dwuwarstwy białkowo-lipidowej czerwonej krwinki (Rysunek 22E).



Rysunek 22. Wpływ na morfologię ludzkich erytrocytów (obserwowany pod elektronowym mikroskopem skaningowym): PBS (próbka kontrolna) (A); adduktu kwas lithocholowy-gramina 0,005 mg/ml (B); adduktu kwas deoksycholowy-gramina 1 mg/ml (C); adduktu kwas cholowy-gramina 1 mg/ml (D); 3 β -bromoacetoksycholesterol-gramina 0,25 mg/ml (E); 3 β -bromoacetoksydihydrocholesterol-gramina 0,25 mg/ml (F). Związki nie wywołujące (C,D) lub wywołujące słabą (5-10%) hemolizę (B,E,F). Strzałki pokazują pęcherzyki endo w stomatocytach [H5].

Przeprowadzono także ocenę asymetrii i płynności erytrocytów przeprowadzając test z Merocjaniną 540 (MC540). MC540 jest anionowym, lipofilnym związkiem fluoroforowym, który nie przenika przez błony do wnętrza komórek. Zmiana asymetrii i płynności erytrocytów wywołana przez badany związek umożliwia wnikanie cząsteczek MC540 pomiędzy strukturalne pofałdowania błony. Barwnik umiejscawia się pomiędzy domenami błony, ale nie łączy się z nimi ściśle, co można obserwować pod mikroskopem konfokalnym. Obecność czerwonej fluorescencji w błonie erytrocytów (czerwone obrysy komórek) świadczy o modyfikującym działaniu badanego związku na asymetrię i płynność dwuwarstwy lipidowej (Rysunek 23). Na Rysunku 23A i 23D widać naturalny dyskokytarny kształt erytrocytów. Natomiast na Rysunku 23B/E i 23C/F widać wyraźny wpływ, wywołany badanymi związkami, na zmianę w strukturze molekularnej dwuwarstwy lipidowej. Otrzymane wyniki wskazują, że na zmianę dyskokytarnego kształtu erytrocytów

na kształt stomatocytu lub echinocytu wpływają zarówno kwasy żółciowe, jak i ich addukty z graminą, a także dimer (45).

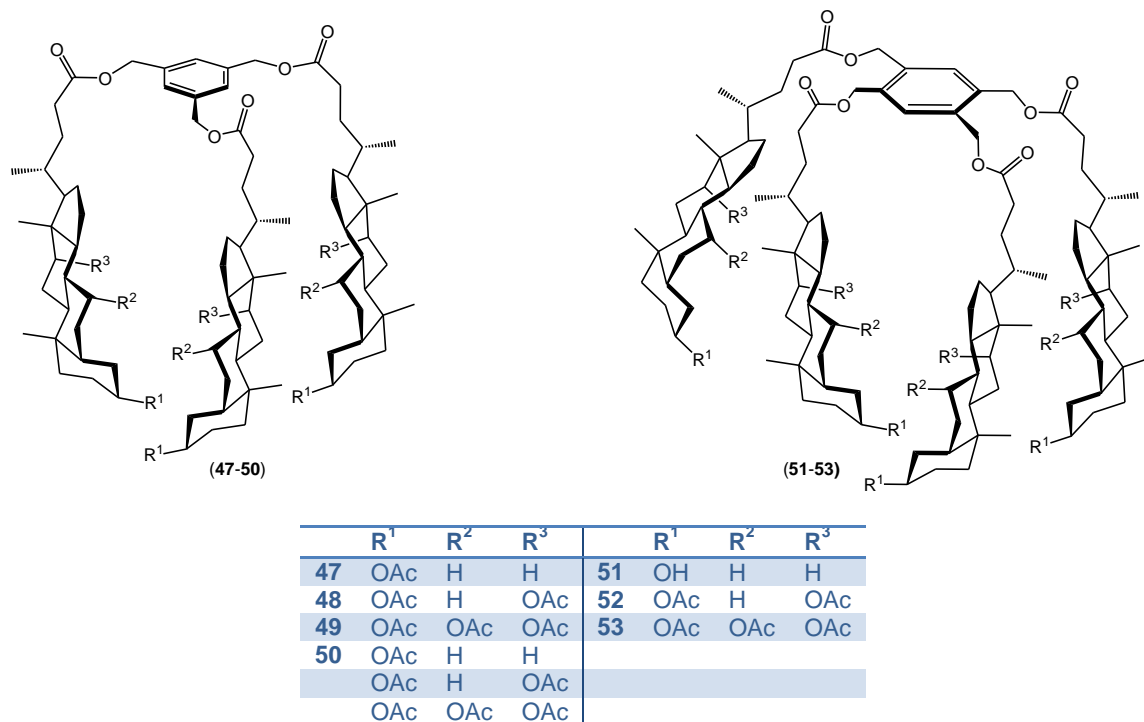


Rysunek 23. Zaburzenia w asymetrii i upakowaniu fosfolipidów w błonie erytrocytów z wykorzystaniem MC540 (zdjęcia wykonane za pomocą mikroskopu konfokalnego): (A/D) próbka kontrolna; (B/E) stomatocyty indukowane przez kwas lithocholowy 0,00005 mg/mL; (C/F) echinocyty indukowane przez koniugat gramina-3 β -bromoacetoksycholesterol 0,15 mg/mL [H5].

2.1.3. Wielkocząsteczkowe pochodne kwasów żółciowych

W ostatnich latach zwrócono szczególną uwagę na wielkocząsteczkowe pochodne kwasów żółciowych. W tym nurcie badawczym zaprojektowano, otrzymano i badano zastosowanie tzw. molekularnych kieszeni [76-82] i parasoli [83-93]. Najnowszy przegląd literaturowy dotyczący tych zagadnień przedstawiłem w pracy [H10]. Związki te są zbudowane z przynajmniej dwóch amfifilowych części połączonych labilnym łańcuchem z centralnym atomem. Z kolei tworzenie wielkocząsteczkowych pochodnych steroidów zawierających sztywną "platformę" pierścienia aromatycznego po raz pierwszy opisał w 2008 roku zespół hiszpańskich uczonych [94,95]. Otrzymali oni pochodne estronu i estradiolu połączonych z pierścieniem benzenu poprzez pierścień 1,2,3-triazolu. Zwróciło to moją uwagę i ukierunkowało moje zainteresowanie badawcze na syntezę pochodnych zawierających szkielety kwasów żółciowych [H6,H7].

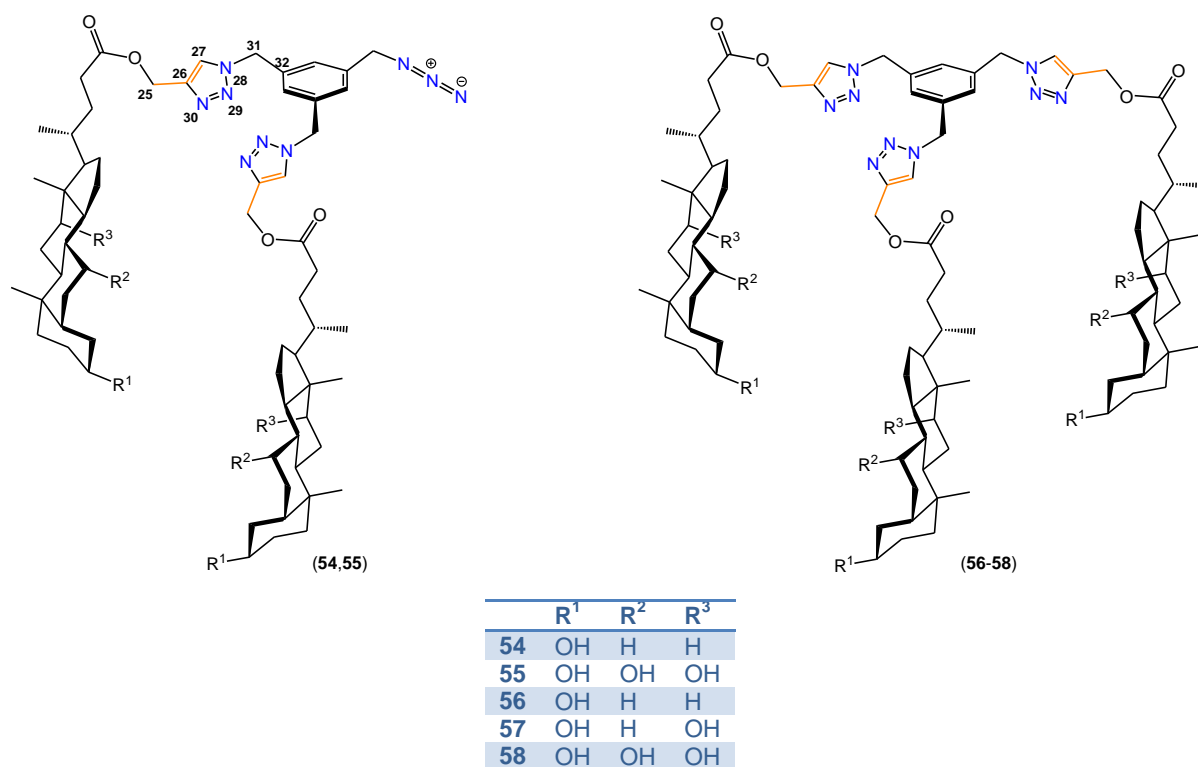
W pracy [H6] skupiłem się na syntezie i badaniu właściwości fizykochemicznych nowych wielkocząsteczkowych estrów 3 α -acetoksy-, 3 α ,12 α -diacetoksy- oraz 3 α ,7 α ,12 α -triacetoksy-podstawionych pochodnych kwasów żółciowych z 1,3,5-tris(bromometyleno)benzenem i 1,2,4,5-tetrakis(bromometyleno)benzenem. Struktury związków (47-53) przedstawiono na Rysunku 24. Związki te zostały otrzymane w reakcji bezpośredniego alkilowania jonów karboksylowych kwasów żółciowych 1,3,5-tris(bromometyleno)benzenem lub 1,2,4,5-tetrakis(bromometyleno)benzenem za pomocą katalitycznej ilości 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU) w bezwodnym toluenie [96]. DBU jako mocna zasada oraz słaby nukleofil generuje jon karboksylowy. Jest to bardzo skuteczna reakcja estryfikacji, zależna jednak silnie od polarności rozpuszczalnika. Najlepsze wydajności dla odpowiednich estrów otrzymano w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak toluen.



Rysunek 24. Quasi-podandy pochodnych kwasów żółciowych (47-53).

Z kolei zainspirowany pracą Luo *et al.* [80] postanowiłem przeprowadzić reakcję syntezy quasi-podandów pochodnych kwasów żółciowych zawierających w strukturze dodatkowo pierścienie 1,2,3-triazolowe [H7]. Założenia chemii "click" są stosunkowo nowe i stanowią bardzo atrakcyjną metodę nowoczesnej syntezy organicznej. Produkty powstałe w chemii "click" są stabilne w rozpuszczalnikach o różnej polarności, w tym w wodzie, odporne na utlenianie i redukcję. Ponadto pierścienie 1,2,3-triazoli bardzo często uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych, co zwiększa trwałość badanych układów. Szczególnie skuteczną jest metoda wykorzystująca katalityczne ilości miedzi(I) w 1,3-dipolarnej cykloadycji (reakcja Huisgena) pomiędzy terminalnymi alkinami i azydkami. Jest to bardzo prosty sposób syntezy pierścieni 1,2,3-triazolu. Zastosowanie reakcji Huisgena w tworzeniu wielkocząsteczkowych pochodnych kwasów żółciowych jest niezwykle przydatne [80-82].

W pracy [H7] skupiłem się na syntezie i badaniu właściwości fizykochemicznych quasi-podandów, które otrzymano w reakcji estrów propargilowych kwasów żółciowych oraz 1,3,5-tris(azydometyleno)benzenu w mieszaninie *t*-butanol/woda, z dodatkiem askorbinianu sodu, CuSO₄·5H₂O w temperaturze 65 °C. Wszystkie substraty otrzymano z bardzo dobrymi wydajnościami (>85%). Na Rysunku 25 przedstawiono struktury otrzymanych związków (54-58). Zgodnie z założeniem pracy otrzymano trzy związki tripodstawione (56-58), oraz dwa związki dipodstawione (54,55), posiadające wolną grupę azydkową.



Rysunek 25. Struktury i numeracja quasi-podandów pochodnych kwasów żółciowych zawierających dodatkowe pierścienie 1,2,3-triazolowe (54-58).

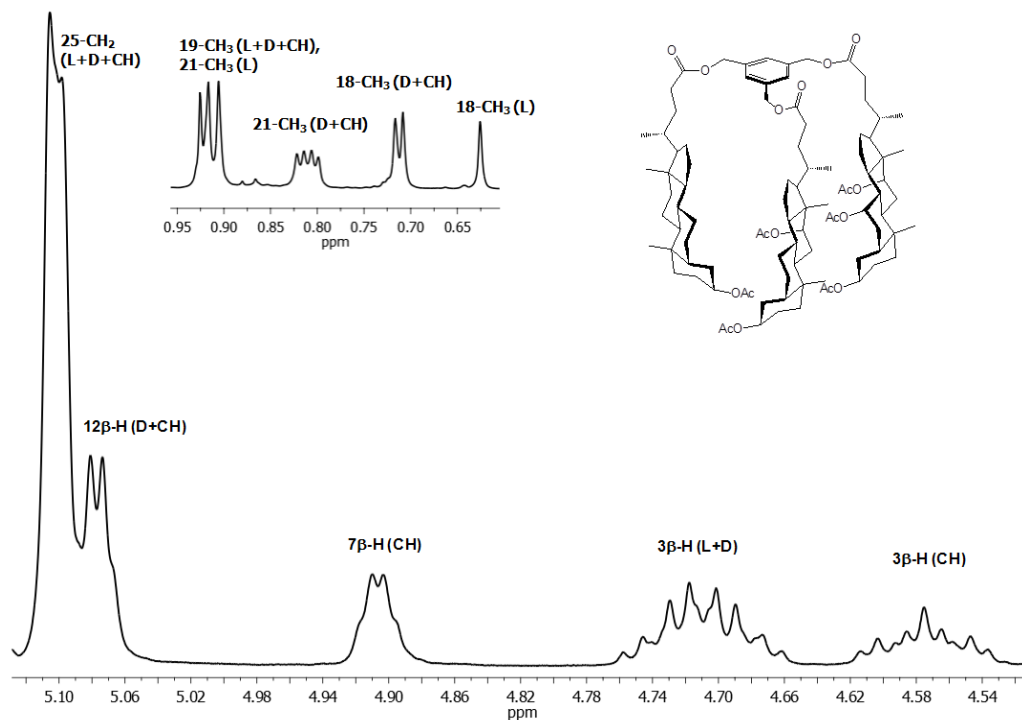
Wszystkie opisane powyżej koniugaty, w przeciwieństwie do molekularnych kieszeni czy parasoli posiadają sztywną "platformę" benzenową. Pozwala to na łatwiejsze generowanie konformerów z odpowiednią geometrią. Pierścień aromatyczny jest płaski, dzięki czemu może łatwo wchodzić w interakcje z powierzchnią, na przykład biopolimerów. Może on spełniać funkcję specyficznej kotwicy w układach biologicznych. Struktury wszystkich opisanych powyżej quasi-podandów zostały przeze mnie potwierdzone przez analizę spektroskopową (¹H-NMR, ¹³C-NMR i FT-IR) i spektrometrię masową, oraz przebadane przy pomocy metod semiempirycznych (PM5).

W Tabeli 3 przedstawiono diagnostyczne przesunięcia chemiczne protonów szkieletu steroidowego występujące w widmach ¹H NMR związków (47-58). W przypadku koniugatów (47-53) do grup hydroksylowych 3 α -OH, 7 α -OH i 12 α -OH wprowadzono blokady acetoksyłowe. Miało to na celu zwiększenie liczby atomów elektronodonorowych i zbadanie oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych związków. Blokada grup hydroksylowych spowodowała, że przesunięcia chemiczne protonów 3 β -H, 7 β -H i 12 β -H ulegają przesunięciu do wyższych wartości ppm o około 1 ppm względem przesunięć protonów sąsiadujących z niepodstawionymi grupami hydroksylowymi. Szczególnie interesujące jest widmo ¹H NMR związku (50), który posiada w swojej strukturze trzy różne pochodne kwasów żółciowych (Rysunek 26).

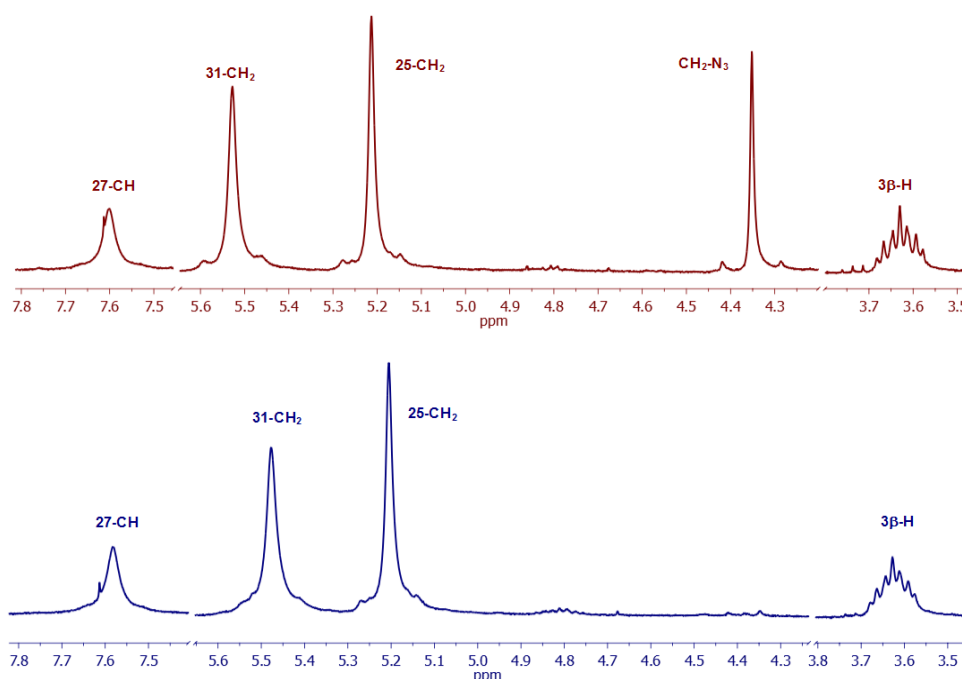
Tabela 3. Przesunięcia chemiczne protonów związków (47-58).

Związek	Proton		
	3 β -H	7 β -H	12 β -H
47	4,75-4,69	-	-
48	4,74-4,66	-	5,07
49	4,61-4,54	4,90	5,10
50	4,76-4,66 4,60-4,54	4,91/4,90	5,08/5,07
51	4,76-4,68	-	-
52	4,75-4,67	-	5,07
53	4,61-4,54	4,90	5,08
54	3,68-3,58	-	-
55	3,47-3,34	3,82	3,93
56	3,66-3,59	-	-
57	3,61-3,59	-	3,96
58	3,21-3,15	3,61	3,78

W widmie ^1H widoczne są dwa bardzo charakterystyczne multiplety 4,76-4,66 ppm i 4,60-4,54 ppm, które przypisano trzem protonom C3 β -H. Ponadto widoczne są trzy singlety grupy CH₃-18 przy 0,72, 0,71 i 0,63 ppm oraz dwa singlety grupy CH₃-19 przy 0,93 i 0,92 ppm, odpowiadające dziewięciu protonom. W widmie ^1H NMR koniugatu (**50**) można zauważyć także bardzo charakterystyczny dublet przy 0,91 ppm oraz dublet dubletów przy 0,81 ppm, które przypisano protonom grupy CH₃-21. W widmie widać także dwa szerokie singlety protonów C12 β -H przy 5,08 i 5,07 ppm, a także dwa singlety dla protonów C7 β -H przy 4,91 i 4,90 ppm (Rysunek 26).

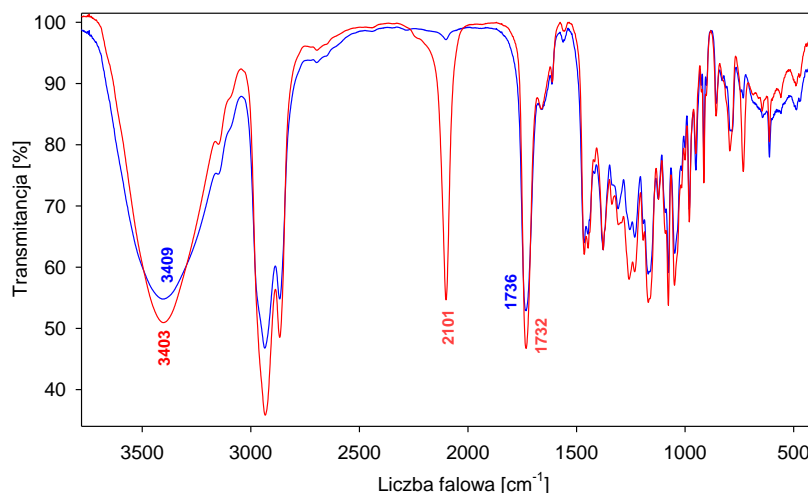
**Rysunek 26.** Widmo ^1H NMR związku (**50**).

Z kolei w widmach ^1H NMR związków (**54**) i (**55**) był widoczny intensywny singlet przy 4,35 ppm pochodzący od protonów grupy metylenowej $\text{CH}_2\text{-N}_3$. Jest to sygnał diagnostyczny, który nie występuje w widmach związków tripodstawionych (**56-58**) (Rysunek 27). Natomiast sygnały dwóch protonów metylenowych grup $\text{CO-CH}_2\text{-triazol}$ i $\text{Ph-CH}_2\text{-triazol}$ są położone jako singlety odpowiednio w zakresach 5,21-5,10 i 5,57-5,48 ppm. We wszystkich widmach związków wielkocząsteczkowych zawierających pierścienie 1,2,3-triazolowe widoczne są singlety usytuowane odpowiednio w przedziałach 7,62-7,61 ppm przypisane do dwóch protonów pierścieni triazolowych związków (**54,44**) oraz w zakresie 8,17-7,58 ppm przypisane trzem protonom pierścieni triazolowych dla związków (**56-58**).



Rysunek 27. Widmo ^1H NMR w zakresie 7,8-3,55 ppm dla związków (**54**) (czerwony) i (**58**) (niebieski) [H7].

W widmach FT-IR (film) wszystkich zsyntetyzowanych związków przy użyciu metod chemii "click" zaobserwowano bardzo charakterystyczne pasma położone przy 3441-3358 cm^{-1} , które odpowiadają drganiom rozciągającym związanych wodorowo grup $\nu\text{O}(3)\text{-H}$, $\nu\text{O}(7)\text{-H}$ i $\nu\text{O}(12)\text{-H}$. Z kolei obecność dwóch charakterystycznych i silnych pasm w przedziale 1739-1732 cm^{-1} i 1260-1225 cm^{-1} przypisano odpowiednio drganiom rozciągającym grup $\nu(\text{C=O})$ i $\nu(\text{C-O})$. Ponadto dla związków (**54**) i (**55**) zaobserwowano intensywne pasmo przy około 2100 cm^{-1} , które jest związane z obecnością drgań rozciągających grupy $\nu(\text{N=N}^+=\text{N}^-)$. Widma FT-IR związków (**55**) i (**58**) przedstawiono na Rysunku 28.



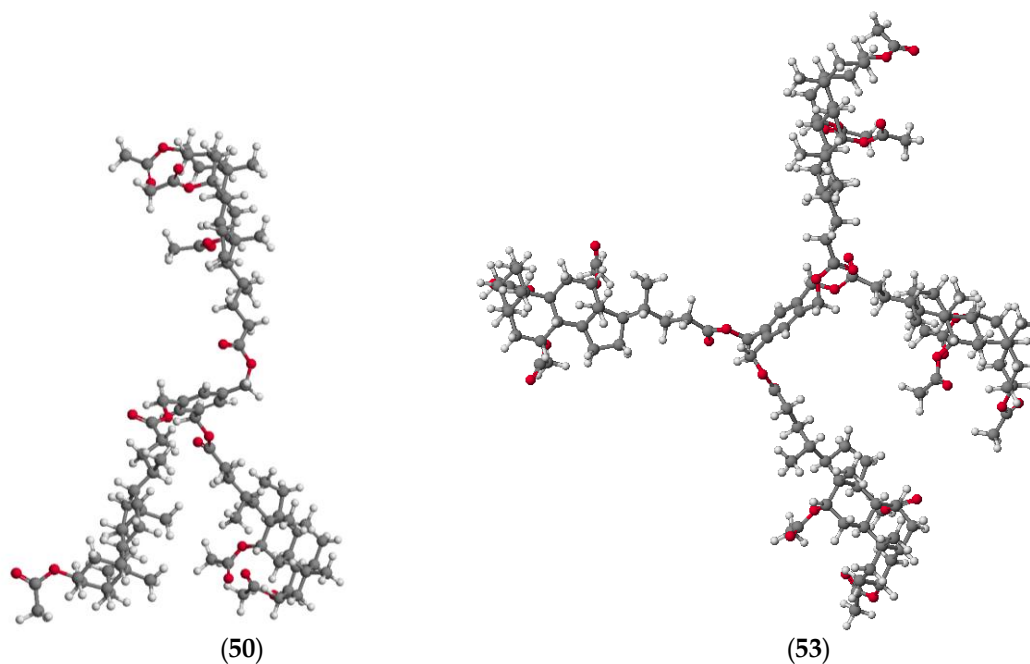
Rysunek 28. Widmo FT-IR związków (55) (—) i (58) (—) w zakresie 3600–500 cm^{-1} [H7].

Ponadto dla wszystkich wielkocząsteczkowych pochodnych kwasów żółciowych wyznaczono struktury molekularne. Ostateczne wartości HOF [kcal/mol] przedstawiono w Tabeli 4. Przykładowe struktury molekularne związków (50) i (53) pokazano na Rysunku 29, zaś związków (55) i (58) na Rysunku 30.

Z przeprowadzonych badań wynika, że najniższe wartości HOF mają pochodne kwasu cholowego (49) i (53). Trwałość tych związków można wytłumaczyć obniżeniem ich reaktywności poprzez zablokowanie grup hydroksylowych, a tym samym zwiększeniem wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań elektrostatycznych. W przypadku związku (50) zawierającego w swojej strukturze trzy różne kwasy żółciowe następuje wzrost wartości HOF, co z kolei można wytłumaczyć brakiem zachowania symetrii i tym samym zaburzeniem stabilizujących oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych. Ponadto wartości HOF dla tetrapodstawionych pochodnych benzenu są niższe niż wartości trójpodstawionych pochodnych benzenu. Wynika to z tworzenia naprzemiennego układu steroidu w strukturze, a tym samym zmniejszenia elektrostatycznych i sterycznych interakcji pomiędzy szkieletami kwasów żółciowych. Ten układ przestrzenny kwasów żółciowych może ułatwić formowanie stabilnych kompleksów gość-gospodarz.

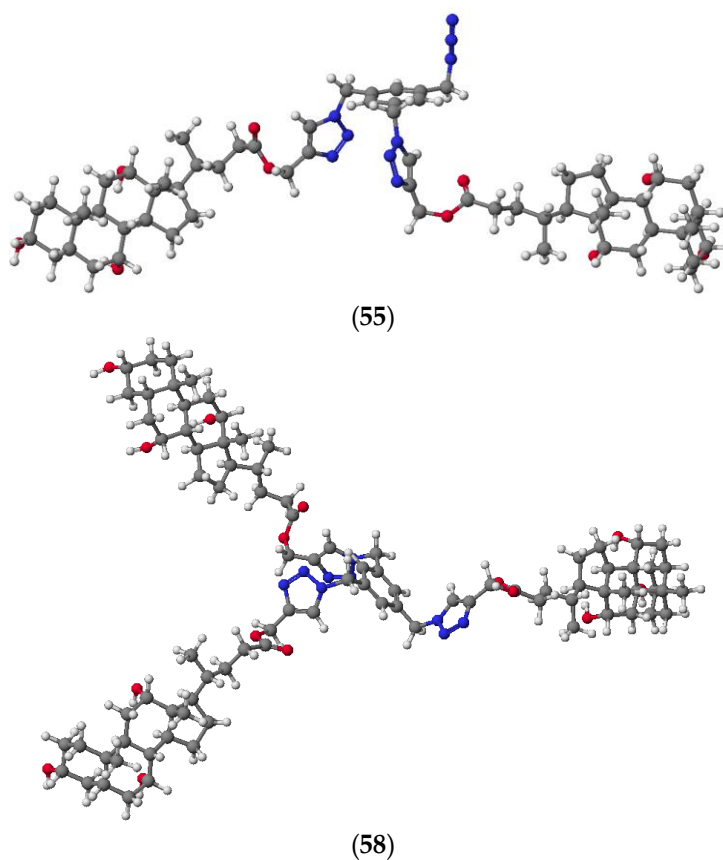
Tabela 4. Ciepło tworzenia (HOF) [kcal/mol] dla związków (47-58).

Związek	HOF [kcal/mol]	Związek	HOF [kcal/mol]
47	-790.2419	54	-217.30
48	-1056.5849	55	-382.73
49	-1307.3404	56	-440.71
50	-1049.0739	57	-568.23
51	-1060.0673	58	-694.62
52	-1407.2389	-	-
53	-1739.4799	-	-



Rysunek 29. Struktury molekularne związków (50) i (53) obliczone metodą PM5 [H6].

W przypadku wielkocząsteczkowych pochodnych kwasów żółciowych posiadających wolne grupy hydroksylowe najniższe wartości HOF obserwuje się dla związków zawierających w swojej strukturze szkielety kwasu cholowego (55) i (58) (Tabela 4, Rysunek 30).



Rysunek 30. Struktury molekularne związków (55) i (58) obliczone metodą PM5 [H7].

Jest to spowodowane wzrostem liczby grup hydroksylowych, co sprzyja tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Jednocześnie wykazano, że monopodstawione pochodne kwasów żółciowych zawierające pierścień 1,2,3-triazolowy nie mogą powstawać, ponieważ wartości ich ciepła tworzenia są stosunkowo wysokie (około -66 kcal/mol). Natomiast we wszystkich strukturach quasi-podandów zaobserwowano oddziaływanie stackingowe π - π pomiędzy dwoma pierścieniami 1,2,3-triazolowymi. Obliczone odległości międzypłaszczyznowe wynoszą około $5,5$ Å dla związków dipodstawionych i około $5,7$ Å dla związków tripodstawionych, za wyjątkiem pochodnej kwasu cholowego (**58**). W przypadku związku (**58**) na zmniejszenie odległości pomiędzy pierścieniami 1,2,3-triazolowymi ma wpływ większa liczba wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych O-H \cdots O.

Obliczone odległości są większe o około $1,7$ Å w porównaniu do klasycznych oddziaływań stackingowych π - π , co można wytłumaczyć bezpośrednim połączeniem pierścieni 1,2,3-triazolowych ze sztywnym pierścieniem benzenowym, determinującym zwiększenie odległości. Powyższe wnioski potwierdzają wyznaczone wielkości kątów wiązania między atomami N(28)-C(31)-C(32) atomów (Tabela 5).

Tabela 5. Odległość między atomami N(28)-N(28') [Å] i kąt wiązania [°] N(28)-C(31)-C(32) związków (**54-58**).

Związek	Odległość [Å] N(28)-N(28')	Kąt wiązania [°] N(28)-C(31)-C(32)
54	5,49	110,8
55	5,49	110,8
56	5,75	110,8
57	5,73	111,7
58	5,46	110,8

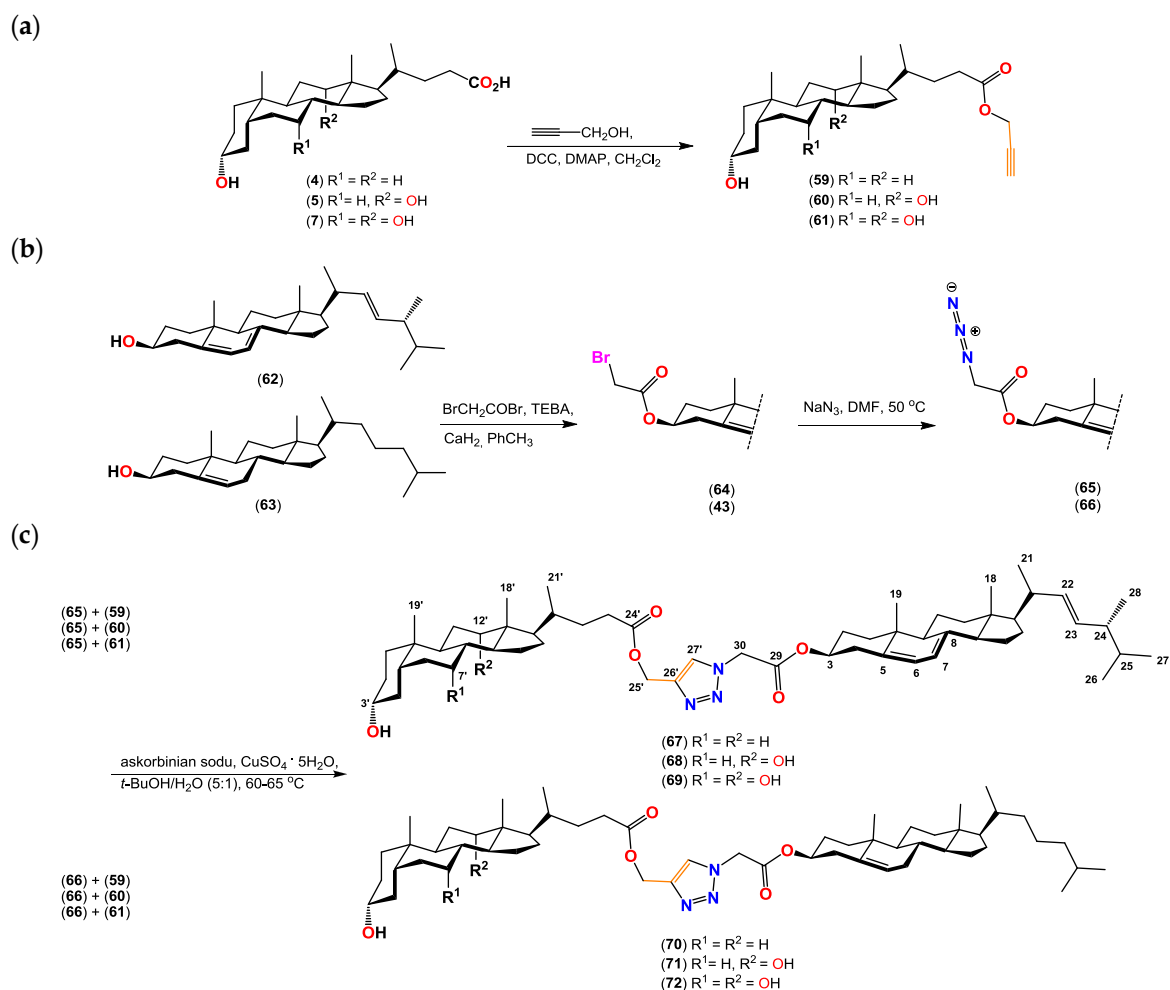
Porównując wartości ciepła tworzenia wielkocząsteczkowych związków tripodstawionych (**47-49**) i zawierających pierścień 1,2,3-triazolowy (**56-58**) należy stwierdzić, że blokowanie grup hydroksylowych obniża wartość HOF. Zatem trwałość związków wielkocząsteczkowych jest bardziej zależna od reaktywności grup funkcyjnych, a nie wewnątrzcząsteczkowej stabilizacji struktury wiązaniami wodorowymi czy też oddziaływaniami stackingowymi π - π .

Prowadząc badania w obszarze chemii "click" postanowiłem przeprowadzić syntezę nieznaną dotąd w literaturze chemicznej koniugatów kwasów żółciowych i steroli połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym [**H8**]. Koniugaty steroidowe posiadające w swojej strukturze pierścień 1,2,3-triazolowy otrzymuje się z wysoką wydajnością. Koniugaty cholesterolu z pochodnymi chalkonów czy monosacharydów połączone pierścieniem 1,2,3-triazolowym wykazywały różną aktywność przeciwbakteryjną oraz cytotoksyczną [97].

Estry propargilowe kwasów żółciowych (**59-61**), oraz 3β -bromoocetan ergosterylu (**64**) i 3β -bromoocetan cholesterylu (**43**), zostały otrzymane zgodnie z procedurami znanymi w literaturze [**H1,H7**]. Wszystkie związki wydzielono z bardzo dobrymi wydajnościami 85-94%. 3β -Azydoocetan ergosterylu (**65**) i cholesterylu (**66**) były syntetyzowane w reakcji odpowiednich 3β -bromoocetanów steroli z azydkiem sodu w DMF w temperaturze 50 °C.

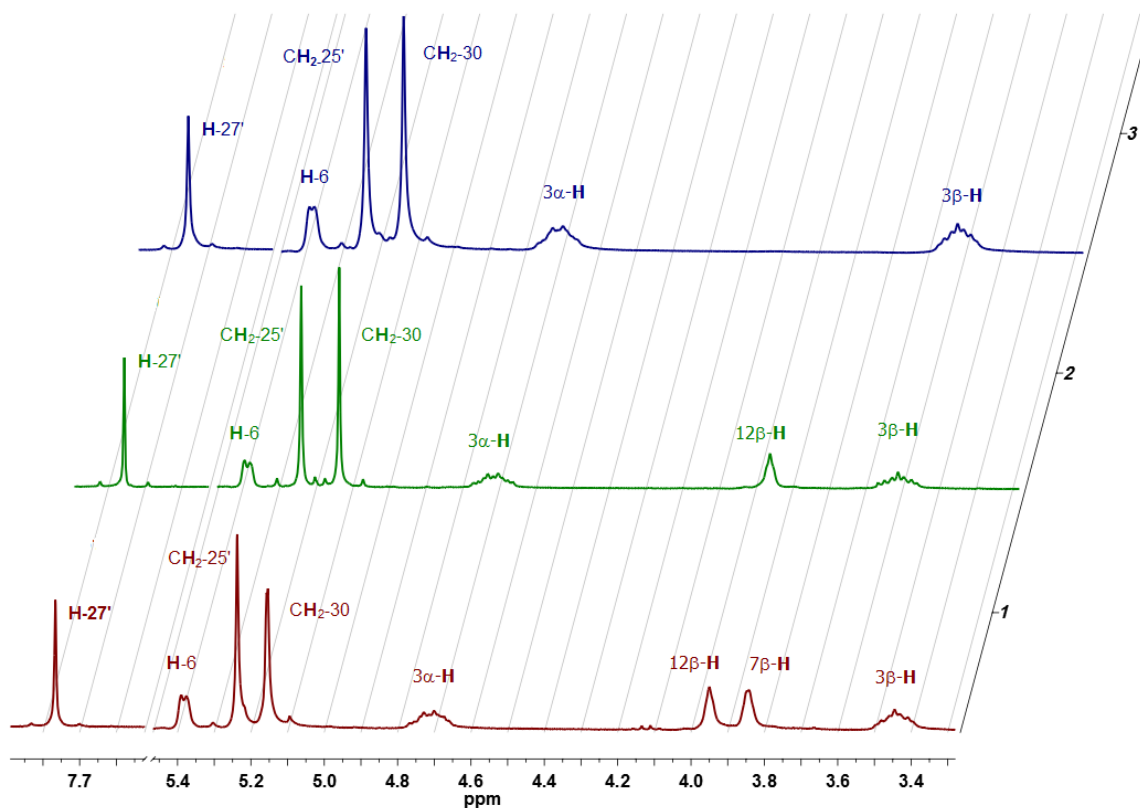
Oba związki otrzymano z bardzo dobrymi wydajnościami (>95%). Struktury tych związków zostały potwierdzone na podstawie analizy spektroskopowej (^1H i ^{13}C NMR, FT-IR) oraz spektrometrii mas (ESI-MS). Jest to pierwsze pełne literaturowe doniesienie na temat syntezy i analizy spektroskopowej 3β -azydooctanu ergosterolu (**65**) i 3β -azydooctanu cholesterolu (**66**).

Związki (**59-61**) oraz (**65**) i (**66**) stanowiły substraty w reakcji chemii "click". Reakcje prowadzono w standardowych warunkach ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, askorbinian sodu) w dwóch różnych mieszaninach rozpuszczalników: $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:1) i $\text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1). W obu przypadkach otrzymano takie same wyniki. Wszystkie produkty zostały oczyszczone na kolumnie chromatograficznej. Szczególną uwagę należało zwrócić na pochodne ergosterolu (**67-69**), ponieważ mogą one ulegać fotochemicznej transformacji w pochodne witaminy D. Jest to związane z elektrocyklicznym otwarciem pierścienia B cząsteczki ergosterolu w wyniku czego powstaje układ heksatrienowy, który w kolejnym kroku ulega [1,7] sigmatropowemu przeniesieniu protonu. Na Schemacie 6 przedstawiono reakcje otrzymywania estrów propargilowych kwasów żółciowych (**59-61**), azydków steroli (**65,66**) oraz koniugatów kwasów żółciowych i steroli połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym (**67-72**).



Schemat 6. Synteza estrów propargilowych kwasów żółciowych (**59-61**) (a), azydków steroli (**65,66**) (b) oraz koniugatów kwasów żółciowych i steroli połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym (**67-72**) (c).

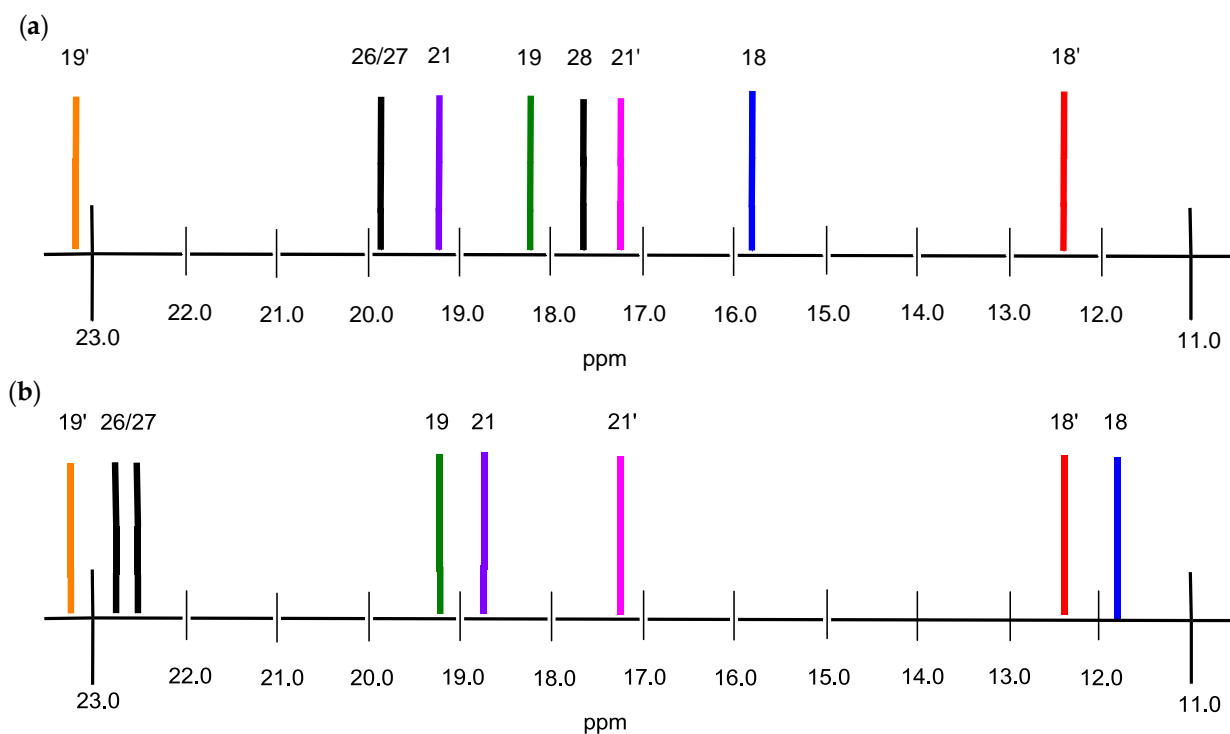
W widmach ^1H NMR badanych koniugatów (**67-72**) widoczne są bardzo wyraźne sygnały protonów H-27' pierścieni 1,2,3-triazolowych oraz grup metylenowych CH_2 -25' i CH_2 -30. W kierunku wysokich wartości ppm (7,77-7,75 ppm) przesunięte są sygnały protonów H-27', które tworzą charakterystyczny singlet. Jest to związane z obecnością elektrojennych atomów azotu oraz elektronów π pierścienia triazolowego. Natomiast diagnostyczne protony grup metylenowych CH_2 -25' i CH_2 -30 tworzą także singlety położone odpowiednio przy 5,24 ppm i 5,15-5,13 ppm. Na Rysunku 31 przedstawiono zestawienie widm ^1H NMR koniugatów kwasu lithocholowego (**70**), deoksycholowego (**71**) i cholowego (**72**) połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym z cholesterolem.



Rysunek 31. Widma ^1H NMR w zakresie 7,8-3,40 ppm związków (**70**) (—), (**71**) (—) i (**72**) (—).

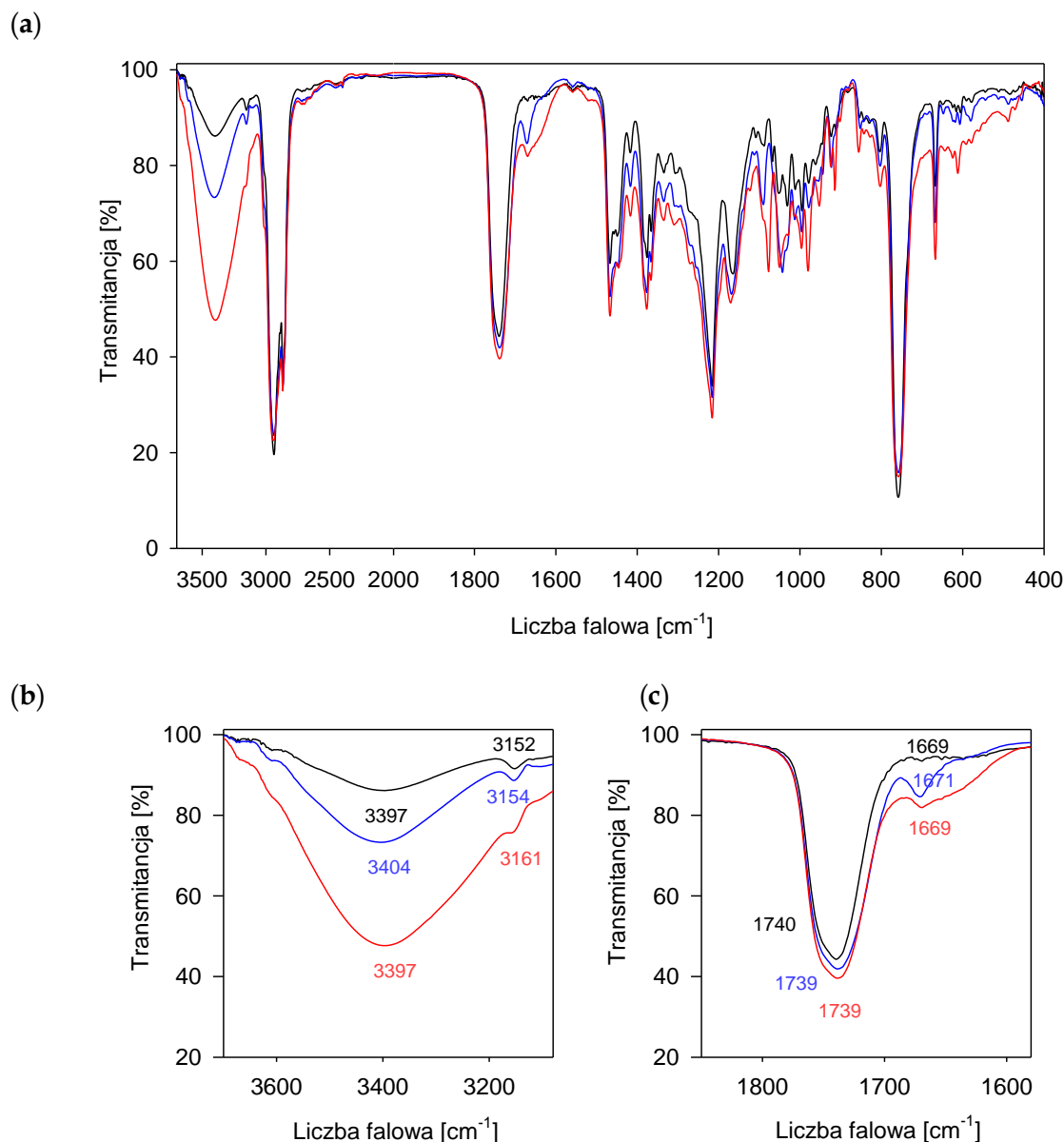
W widmach ^{13}C NMR wszystkich otrzymanych związków widoczne są różnice w położeniu grup metylowych. Atomy węgla grup metylowych CH_3 -18 i CH_3 -19 szkieletu steroidowego pochodnych ergosterolu (**65**), oraz (**67-69**) dają sygnały położone odpowiednio w zakresach 15,83-15,80 ppm i 18,25-18,22 ppm. Natomiast dla pochodnych cholesterolu (**66**) i (**70-72**) znajdują się w przedziałach 11,84-11,82 ppm i 19,27-19,24 ppm. W przypadku części steroidowej otrzymanych koniugatów zawierającej szkielet kwasów żółciowych sygnały atomów węgla grup CH_3 -18' oraz CH_3 -19', znajdują się odpowiednio w zakresach 12,67-11,97 ppm i 23,61-23,12 ppm. Charakterystyczne przesunięcia chemiczne atomów węgla grup metylowych obecnych w łańcuchu bocznym ergosterolu i cholesterolu dla grupy CH_3 -21 są odpowiednio położone przy 19,64-19,61 ppm i 18,69-18,67 ppm. Z kolei w łańcuchu bocznym kwasów żółciowych atomy węgla grupy CH_3 -21' są położone przy 18,23-17,25 ppm. Natomiast dla grup CH_3 -26 i CH_3 -27 steroli umieszczone są w zakresie 19,97-19,94 ppm dla związków (**65**), (**67-69**) oraz 22,80-22,77 ppm dla związku (**66**) i 22,55-

22,52 ppm dla związków (70-72). Ponadto dla pochodnych ergosterolu atomy węgla grupy CH₃-28 są widoczne w zakresie 17,65-17,62 ppm. Analityczne różnice w widmach ¹³C-NMR grup metylowych przedstawiłem na Rysunku 32.



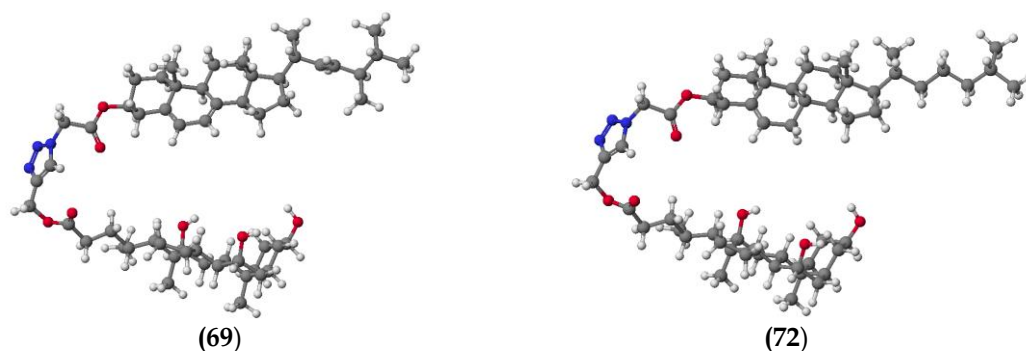
Rysunek 32. Różnice analityczne w położeniu grup metylowych koniugatów (69) (a) i (72) (b) w widmach ¹³C NMR [H8].

Widma w podczerwieni koniugatów (70-72) przedstawiono na Rysunku 33a. Najbardziej charakterystyczne w widmie FT-IR otrzymanych związków są pasma przy 3397, 3404 i 3397 cm⁻¹ odpowiadające drganiom rozciągającym grup OH (Rysunek 33b). Pozycja i intensywność tych pasm zależy od stopnia asocjacji koniugatów i liczby grup hydroksylowych. Pasma te wskazują na złożoną strukturę zgodną z udziałem grup hydroksylowych w tworzeniu międzycząsteczkowych wiązań wodorowych. Podobny efekt zaobserwowano dla drgań grup estrowych $\nu(\text{C}=\text{O})$ które leżą odpowiednio przy 1740, 1739 oraz 1739 cm⁻¹ (Rysunek 31c). Z kolei zazwyczaj silne pasma drgań $\nu(\text{C}=\text{C})$ są stosunkowo słabe dla koniugatów steroidowych i obserwuje się je przy 1669, 1671, 1669 cm⁻¹ (Rysunek 33c). W widmach FT-IR wszystkich badanych koniugatów zaobserwowano dodatkowe silne pasmo drgań wiązania $\nu(\text{C}-\text{O})$ znajdujące się przy 1216 cm⁻¹ dla (70-72) oraz silne pasmo drgań grupy OCO-C występuje w zakresie 1170-1164 cm⁻¹.



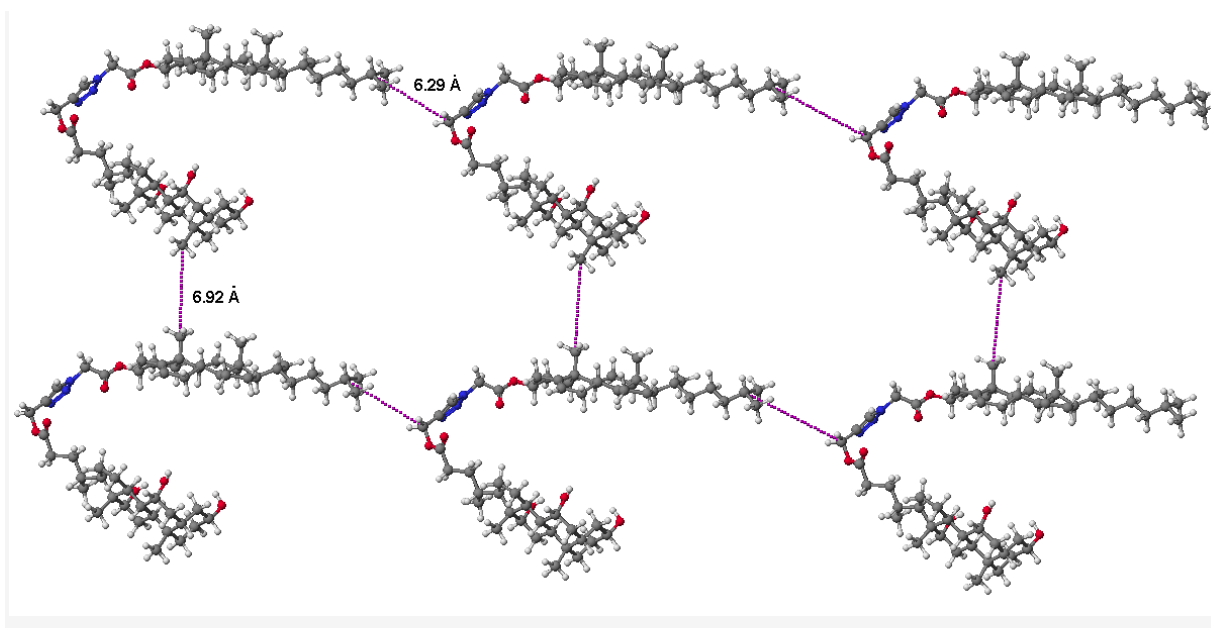
Rysunek 33. Widma FT-IR koniugatów (70) (—), (71) (—) i (72) (—) w zakresie 3600–400 cm^{-1} (a), 3600–3100 cm^{-1} (b) i 1800–1600 cm^{-1} (c) [H8].

Dla otrzymanych koniugatów wyznaczono także wartości ciepła tworzenia (Rysunek 34). Najniższe wartości HOF ma koniugat kwasu cholowego zawierający w swojej budowie część cholesterolową (72). Grupy hydroksylowe sprzyjają tworzeniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych oraz oddziaływaniu elektrostatycznemu, zaś zmniejszenie nienasylenia cząsteczki wpływa na zmniejszenie wartości HOF.



Rysunek 34. Struktury molekularne koniugatów (69) i (72) obliczone metodą PM5 [H8].

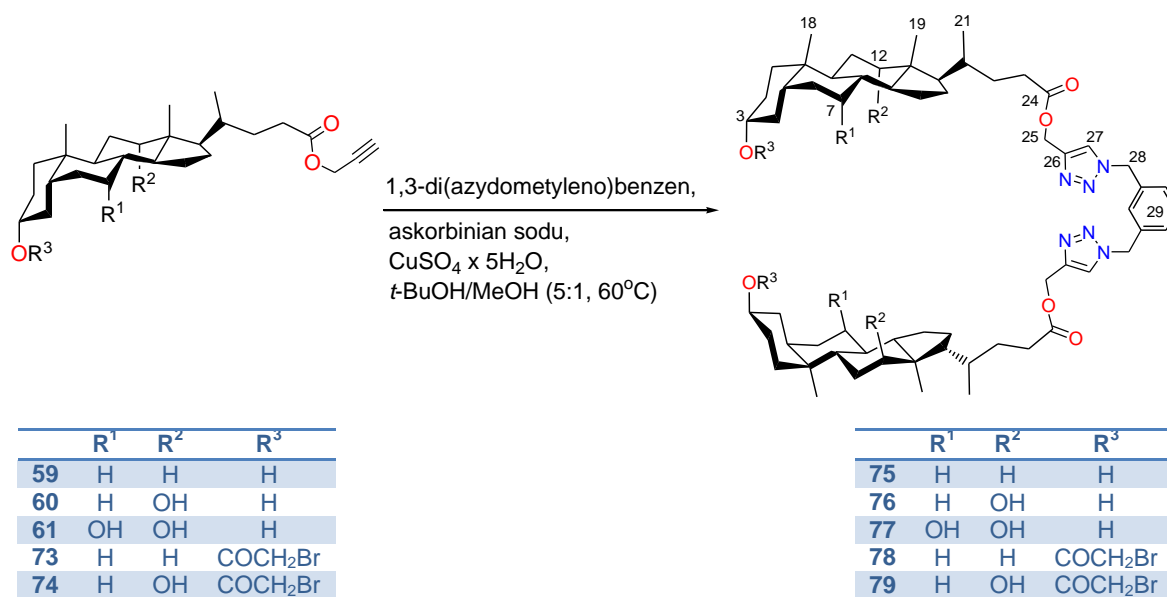
Przeanalizowano także układ przestrzenny i interakcje koniugatu (72) (Rysunek 35). Ciepło tworzenia dla układu cząsteczek wynosi $-2277,1838$ kcal/mol, a odległości pomiędzy atomami C(19)–C(19') oraz C(25)–C(25') sąsiadujących koniugatów wynoszą odpowiednio $6,92$ Å i $6,29$ Å. Uzyskany układ przestrzenny oraz charakteryzujące go wartości stanowią bardzo dobre potwierdzenie wniosku, że wzajemne interakcje międzycząsteczkowe zmniejszają wartości ciepła tworzenia.



Rysunek 35. Układ przestrzenny koniugatu (72) obliczony metodą PM5 [H8].

Otrzymałem także trzy nowe dimery kwasów żółciowych połączone pierścieniami 1,2,3-triazolowymi (75-77) oraz dwa dimery podstawione w położeniu C(3) szkieletu steroidowego grupami bromoacetoksyłowymi (78) i (79) (Schemat 7) [H9]. Koniugaty te otrzymano w reakcji estrów propargilowych kwasów żółciowych (59-61) lub ich bromoacetoksy podstawionych pochodnych (73) i (74) oraz 1,3-di(azydometyleno)benzenu w mieszaninie *t*-butanol/metanol (5:1) w obecności askorbinianu sodu i $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ w 60°C . Wszystkie związki otrzymano z dobrymi wydajnościami i scharakteryzowano za pomocą metod spektroskopowych (^1H i ^{13}C NMR, FT-IR) oraz spektrometrii mas (ESI, MALDI). Wyznaczono także ich strukturę molekularną przy użyciu metody PM5. Koniugaty (75-77) zastosowano jako ligandy w syntezie adduktów z kwasem ftalowym, tereftalowym

i 4-aminobenzoesowym (PABA, witamina B₁₀). Wykazano, że addukty powstają w wyniku tworzenia się wiązania wodorowego pomiędzy grupami hydroksylowymi szkieletu steroidowego a grupami karboksylowymi dodanych kwasów aromatycznych.



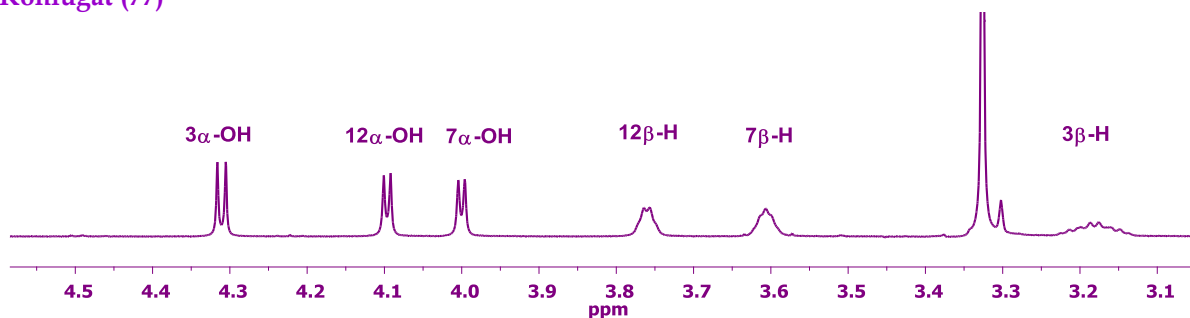
Schemat 7. Synteza koniugatów kwasów żółciowych połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym (75-79).

Widma ¹H NMR związków (75-77) wykonano w dwóch rozpuszczalnikach CDCl₃ i DMSO-d₆. We wszystkich przypadkach sygnały protonów pierścieni benzenowych znajdują się w zakresie 7,43-7,20 ppm. Natomiast sygnał protonu pierścienia triazolowego C(27)H tworzy charakterystyczny singlet przy około 7,55 ppm w CDCl₃ lub 8,18 ppm w DMSO-d₆. Z kolei sygnały protonów metylenowych C(25)H są położone w podobnym zakresie (około 5,19 ppm). W widmach ¹H NMR związków (75-77) widać charakterystyczne multiplety w zakresie 3,68-3,14 ppm, które przypisano sygnałom protonów 3β-H szkieletu steroidowego. Z kolei w widmach ¹H NMR związków (75-77) wykonanych w DMSO-d₆ jako rozpuszczalniku sygnały protonów grup hydroksylowych 3α-OH dla wszystkich związków, występują jako dublety odpowiednio przy 4,45, 4,46 oraz 4,31 ppm. Natomiast protony grup hydroksylowych 12α-OH w związkach (76) i (77), oraz 7α-OH w (77) są położone przy 4,18, 4,10 i 4,00 ppm. W widmach ¹H NMR związków (78) i (79) są obecne charakterystyczne singlety protonów grupy 3α-OCOCH₂Br położone w zakresie 3,84-3,80 ppm. Jest to zgodne z wynikami opisanymi w pracy [H1].

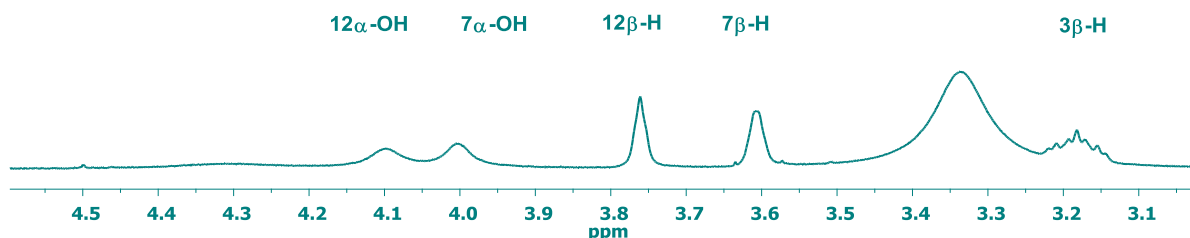
Na Rysunku 36 przedstawiono widma ¹H NMR koniugatu (77) i jego adduktów z kwasem ftalowym, tereftalowym i 4-aminobenzoesowym. Charakterystyczną cechą pojawiającą się w widmach ¹H NMR odpowiednich adduktów jest obecność poszerzonych sygnałów protonów 3β-H i 12β-H oraz poszerzonych i wypłaszczonych sygnałów pochodzących od protonów grup 3α-OH i 12α-OH. W widmie ¹H NMR adduktu dimeru (77) z kwasem ftalowym widać, że sygnały pochodzące od protonów grup 7α-OH oraz 12α-OH zostały znacznie spłaszczone, zaś sygnał pochodzący od protonu grupy 3α-OH znika. Jest to związane z udziałem tych grup w tworzenia międzycząsteczkowych wiązań wodorowych, czemu także sprzyja położenie grup karboksylowych w cząsteczce kwasu ftalowego

w pozycji *orto*. Obecność grup blokujących w położeniu C(3) szkieletu steroidowego w koniugatach (78) i (79) uniemożliwia tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy koniugatami a kwasami aromatycznymi i powstanie adduktów. Wynika z tego wniosek, iż tylko grupy hydroksylowe uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych, zaś atomy azotu pierścienia triazolowego nie biorą w nim udziału.

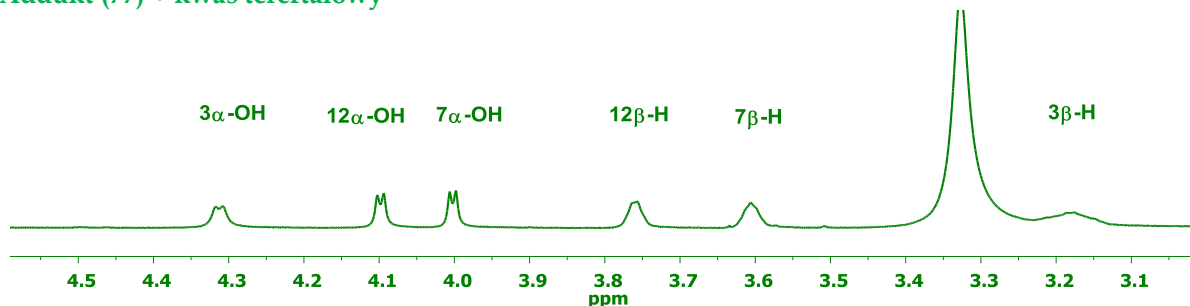
Koniugat (77)



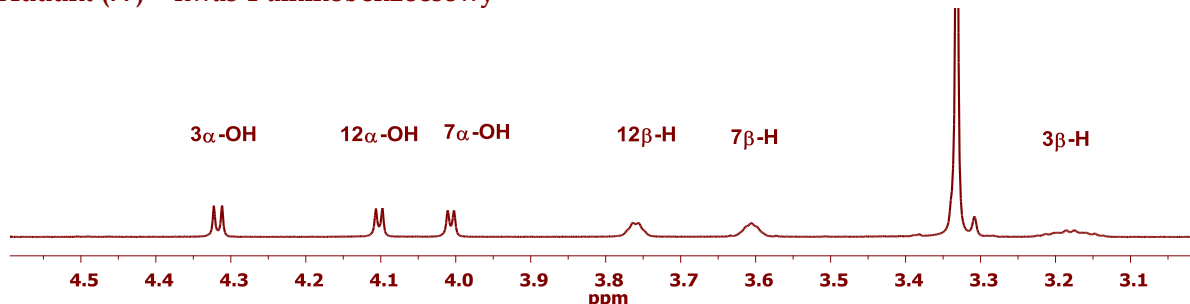
Addukt (77) + kwas fталowy



Addukt (77) + kwas tereftalowy



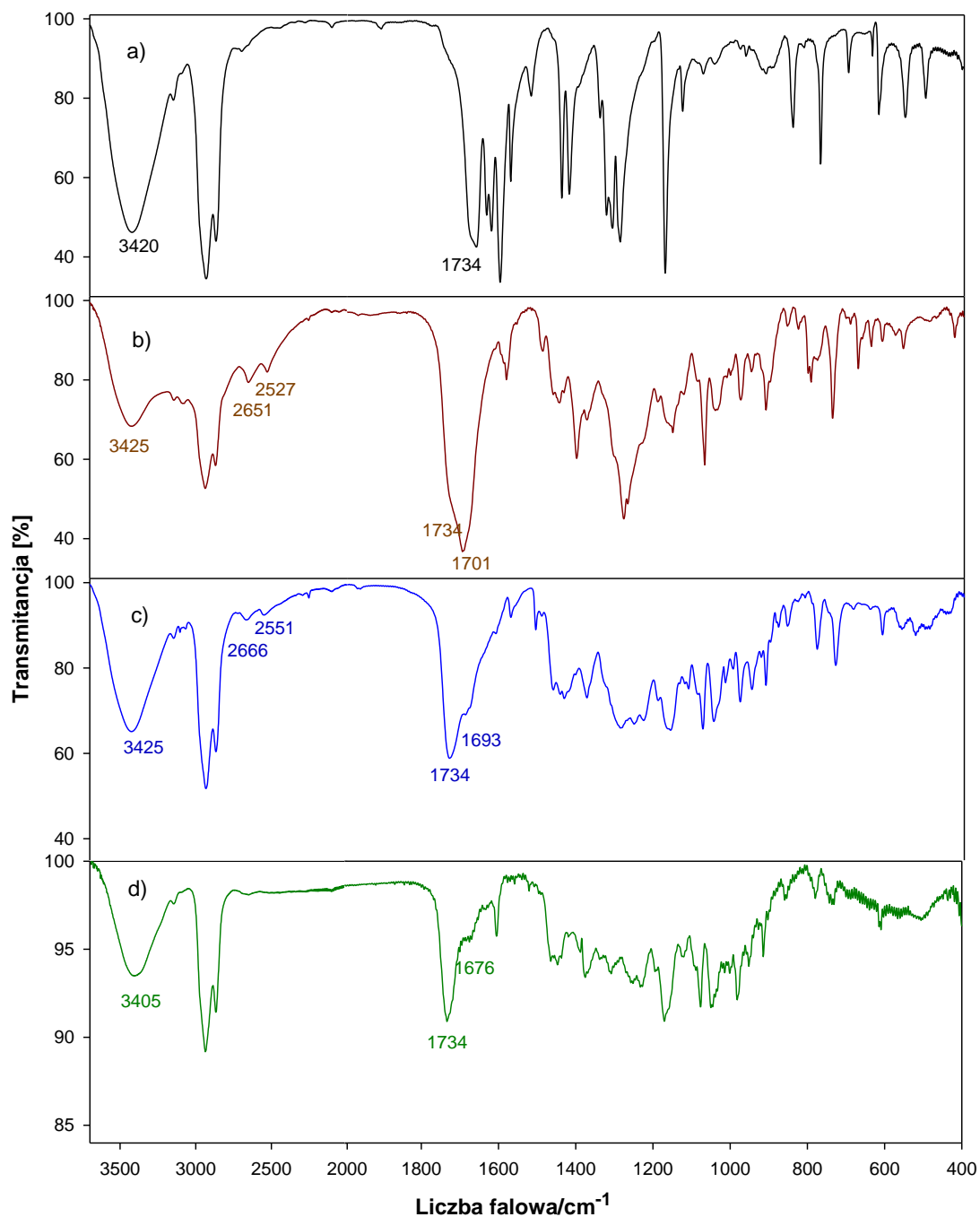
Addukt (77) + kwas 4-aminobenzoesowy



Rysunek 36. Widma ^1H NMR w zakresie 4,5-3,0 ppm związków (77) i jego adduktów z kwasem fталowym, tereftalowym i 4-aminobenzoesowym [H9].

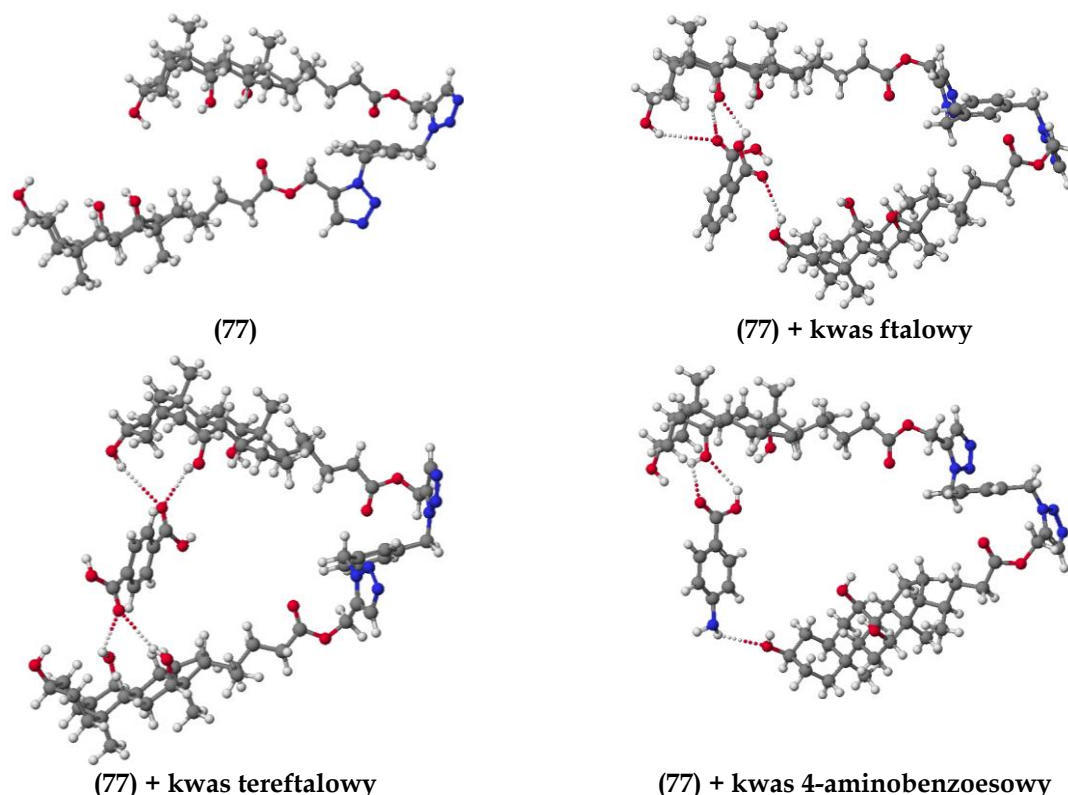
Widma FT-IR dimeru (75) i jego adduktów z kwasem fталowym, tereftalowym i 4-aminobenzoesowym pokazano na Rysunku 37. Intensywne szerokie pasmo absorpcji

w regionie 3500-3300 cm^{-1} odpowiada drganiom rozciągającym $\nu(\text{OH})$ i $\nu(\text{NH})$. W adduktach pasmo to jest szerokie i przesunięte w stronę niższych częstotliwości ze względu na tworzenie wewnątrz- i międzycząsteczkowych wiązań wodorowych (Rysunek 37). Obecność wiązań wodorowych w cząsteczce powoduje również przesunięcie drgań rozciągających $\nu(\text{C}=\text{O})$ w stronę niższych częstotliwości: 1734 cm^{-1} dimer (75), 1734 i 1701 cm^{-1} addukt dimeru (75) z kwasem ftalowym, 1734 i 1693 cm^{-1} addukt dimeru (75) z kwasem tereftalowym oraz 1734 i 1676 cm^{-1} addukt dimeru (75) z kwasem 4-aminobenzoesowym (Rysunek 37).



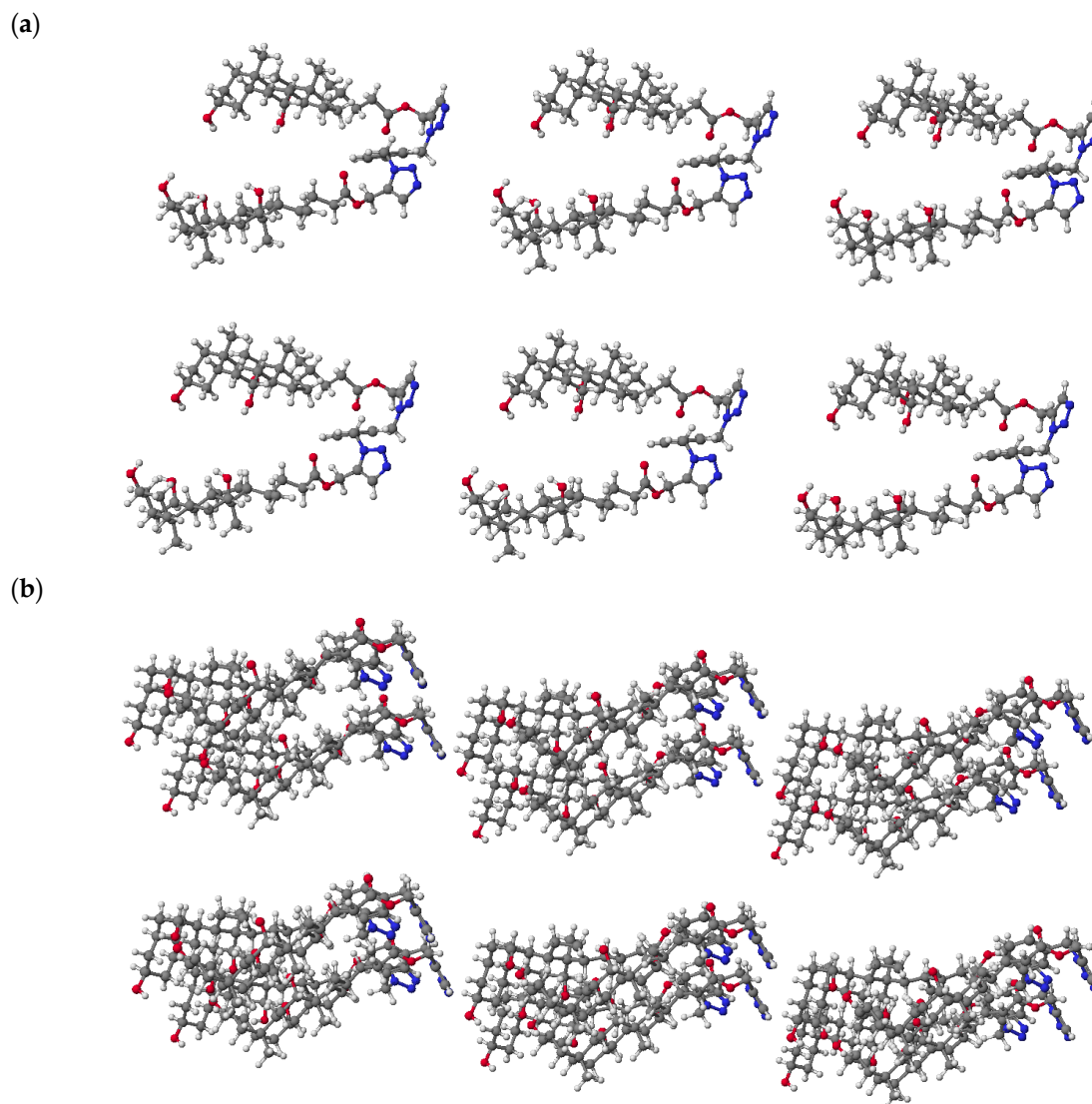
Rysunek 37. Widma FT-IR dimeru (75) (a) i jego adduktów z kwasem ftalowym (b), tereftalowym (c) i 4-aminobenzoesowym (d) [H9].

Dla otrzymanych koniugatów wyznaczono także wartości ciepła tworzenia (Rysunek 38). Wykazano, że wraz ze wzrostem liczby wolnych grup hydroksylowych w szkielecie steroidowym zmniejsza się ciepło tworzenia. Z kolei dimery (78) i (79) mają niższe wartości ciepła tworzenia niż dimery z niepodstawionymi grupami hydroksylowymi. Jest to związane ze zwiększeniem trwałości dimeru poprzez obecność stabilniejszej grupy estrowej w wyizolowanej cząsteczce. Ponadto, wszystkie addukty mają mniejsze HOF niż tworzące je dimery. Jest to związane z tworzeniem wiązań wodorowych, co zostało potwierdzone za pomocą analizy widm ^1H NMR i FT-IR.



Rysunek 38. Struktury molekularne koniugatu (77) i jego adduktów obliczone metodą PM5 [H9].

Przeanalizowano także układ przestrzenny i interakcje koniugatu (77) (Rysunek 39a). Ciepło tworzenia dla układu cząsteczek wynosi $-2737,5566$ kcal/mol, a odległości pomiędzy pierścieniami benzenowymi, jak również pierścieniami triazolowymi i atomami węgla C(3) wynoszą odpowiednio 19.1 Å and 8.9 Å. Z kolei dla układu supramolekularnego ciepło tworzenia wynosi -5481.8837 kcal/mol (Rysunek 39b). Cząsteczki są ułożone w formie specyficznego kanału, przez który mogą być przenoszone jony lub cząsteczki obojętne.



Rysunek 39. Układ przestrzenny koniugatu (77) obliczony metodą PM5 dla sześciu cząsteczek (a) oraz 12 (b) [H9].

2.1.4. Badania *in silico* koniugatów kwasów żółciowych

Poszukiwania nowych związków chemicznych, zarówno poprzez syntezę jak i modyfikacje oraz izolację z organizmów żywych, wiążą się z opracowaniem ich działania farmakologicznego lub toksycznego. Przeprowadzenie badań *in vitro*, a w ich konsekwencji *in vivo* jest czasochłonne i kosztowne. Dlatego też zastosowanie badań *in silico* przy użyciu programu komputerowego PASS (*ang. Prediction of Activity Spectra for Substances* – Przewidywanie Spektrum Aktywności Substancji) wydaje się niezwykle użyteczne, bowiem nie tylko skraca czas poszukiwań, ale także typuje możliwy rodzaj aktywności biologicznej, co z kolei umożliwia szybszą selekcję materiału do badań farmakologicznych [98,99]. Ponadto program PASS na podstawie wzoru strukturalnego cząsteczki przewiduje nie tylko potencjalne działanie farmakologiczne, ale także toksyczne, co umożliwia projektowanie substancji o konkretnych preferencjach. Działanie programu polega na porównaniu

struktury badanego związku z wzorami związków znajdującymi się w bazie danych (250 000 związków aktywnych biologicznie, 5500 aktywności biologicznych). Zastosowanie programu PASS jest szczególnie przydatne do określania aktywności biologicznej związków zawierających w swojej strukturze związek pochodzenia naturalnego lub też metabolitów wtórnych. W literaturze można znaleźć przykłady niezwykle skutecznego zastosowania programu PASS w poszukiwaniu nieznanych dotąd związków o działaniu farmakologicznym [100-103].

Program PASS określa prawdopodobieństwo wystąpienia danej aktywności PA (*ang. probability "to be active"*) oraz jego brak PI (*ang. probability "to be inactive"*). Wartości PA > 0,7 oznaczają wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia określonej aktywności biologicznej w przeprowadzonych badaniach. Należy podkreślić, że jeżeli badana substancja ma w strukturze elementy substancji znanej i wykazującej aktywność biologiczną (farmakologiczną lub toksyczną) to prawdopodobieństwo aktywności eksperymentalnej wzrasta. Jeżeli wartości PA danych związków są umiejscowione w przedziale 0,5-0,7 to prawdopodobieństwo potwierdzenia aktywności biologicznej w badaniach laboratoryjnych jest zdecydowanie mniejsze. Z kolei potwierdzenie aktywności biologicznej w badaniach laboratoryjnych dla związków mających wartości PA < 0,5 jest znikome. Na podstawie tych założeń można przeprowadzić z dużym powodzeniem diagnozowanie aktywności farmakologicznej. W niniejszej pracy wybrałem te rodzaje aktywności biologicznej, które były przewidywane dla potencjalnego związku z najwyższym prawdopodobieństwem aktywności (PA).

Dla bromoacetoksydostawionych pochodnych kwasów żółciowych (**8-14**) do najczęściej przewidywanej aktywności biologicznej należy zaliczyć inhibitory hydrolazy acylokarnityny (PA>95%), hydrolazy alkenylglicerofosfocholiny (PA>90%), alkiloacetylglicerofosfatazy (PA>90%), a także dehydrogenazy aldehydu D-mlekowego, glukanu endo-1,3-beta-D-glukozydazy, monooksygenazy glicerylowo-eterowe czy antagonistę cholesterolu (Pa>80%) (Tabela 6) [H1]. Natomiast koniugaty (**15-23**) wykazują antagonistyczną aktywność wobec cholesterolu, hipercholesterolemii, a także są inhibitorami hydrolazy alkenylglicerofosfocholiny. Dodatkowo koniugaty kwasów żółciowych i kwasu salicylowego (**15-17**) z bardzo dużym prawdopodobieństwem (PA>90%) mogą pełnić rolę związków żółciopędnych czy znieczulających. Natomiast koniugaty kwasów żółciowych i kwasu acetylosalicylowego (**18-20**) z dużym prawdopodobieństwem są bardzo dobrymi analeptykami oddechowymi [H2].

Natomiast czwartorzędowe sole alkiloamoniowe kwasów żółciowych (**24-35**) wykazują znaczne prawdopodobieństwo aktywności (PA>90%) jako inhibitory hydrolazy acylokarnityny, hydrolazy alkenylglicerofosfocholiny, alkiloacetylglicerofosfatazy i monooksygenazy glicerolowo-eterowej. Natomiast jako antagonist cholesterolu i inhibitor dekstranazy wykazują aktywność farmakologiczną z prawdopodobieństwem ponad 80%. Z drugiej strony koniugaty pochodne kwasu deoksycholowego (**28-31**), jako jedyne, wykazują aktywności biologiczną powyżej 80% jako inhibitory hydrolazy alkenylglicerofosfoetanolaminy, glukanu endo-1,3-β-D-glukozydazy i reduktazy glutationowej. Podobne wnioski można wyciągnąć wobec koniugatów (**32-35**), których prawdopodobieństwo aktywności powyżej 80% występuje wobec pobudzania żółci i dwóch inhibitorów: monooksygenazy flawinowej i desaturazy plasmanyloetanolaminy. Pochodne

zarówno kwasu deoksycholowego (28-31) jak i kwasu cholowego (32-35) ze znacznym prawdopodobieństwem (PA>80%) wykazują aktywność biologiczną w stosunku do inhibitorów: dehydrogenazy aldehydu D-mlekowego, decylazy *N*-(długołańcuchowych acylopodstawionych) etanoloaminy i liazy fosfatydyloinozytolo diacyloglicerolowej. Wobec koniugatów zawierających długie łańcuchy alkilowe można wyciągnąć wniosek, iż długość łańcucha alkilowego nie ma wpływu na oszacowanie aktywności farmakologicznej, zaś zasadniczym fragmentem jest szkielet steroidowy oraz obecność czwartorzędowego atomu azotu, co potwierdzają dotychczasowe wyniki eksperymentalne [H3].

Z kolei czwartorzędowe sole ftalimidopropyloamoniowe pochodne kwasów żółciowych (36-38) są potencjalnymi inhibitorami monooksygenazy glicerolowo-eterowej, hydrolazy acylokarnityny i alkiloacetylglicerofosfatazy. W przypadku pozostałych aktywności biologicznych prawdopodobieństwo jest mniejsze od 80%. Warto też podkreślić, że najwięcej potencjalnych aktywności biologicznych wykazywała pochodna kwasu deoksycholowego (37), co najprawdopodobniej można wytłumaczyć optymalnym oddziaływaniem pomiędzy grupą hydroksylową 12 α -OH pierścienia steroidowego, anionem bromkowym i pierścieniem ftalimidowym [H4].

Tabela 6. Prawdopodobieństwo aktywności biologicznej (PA) dla związków (8-14).

Aktywność biologiczna (PA>80%)	Związek						
	8	9	10	11	12	13	14
Inhibitor hydrolazy acylokarnityny	96	98	97	99	98	98	97
Polipowatości gruczołakowatej	81	-	-	82	82	-	-
Inhibitor hydrolazy alkenyloglicerofosfocholiny	94	97	95	96	94	96	92
Inhibitor hydrolazy alkenyloglicerofosfoetanolaminy	81	89	82	85	81	85	-
Inhibitor alkiloacetylglicerofosfatazy	94	97	95	95	94	95	92
Pobudzenie żółci	-	86	-	90	87	86	-
Antagonista cholesterolu	89	85	81	88	88	82	-
Substrat CYP3A	-	82	-	83	-	83	-
Substrat CYP3A4	81	84	-	85	82	85	-
Inhibitor dekstranazy	88	-	89	91	88	91	83
Inhibitor dehydrogenazy aldehydu D-mlekowego	-	-	-	86	81	81	-
Inhibitor glukanu endo-1,3- β -D-glukozydazy	87	95	89	91	88	91	83
Inhibitor monooksygenazy glicerolowo-eterowej	-	86	84	89	88	88	86
Inhibitor peptydoglikanu glikozylotransferazy	83	91	85	87	84	87	-
Inhibitor desaturazy plasmanyloetanolaminy	-	-	-	84	81	81	-
Inhibitor reduktazy glutationowej	-	88	81	81	-	81	-
Inhibitor reduktazy epoksydowej witaminy K	-	81	-	87	83	83	-

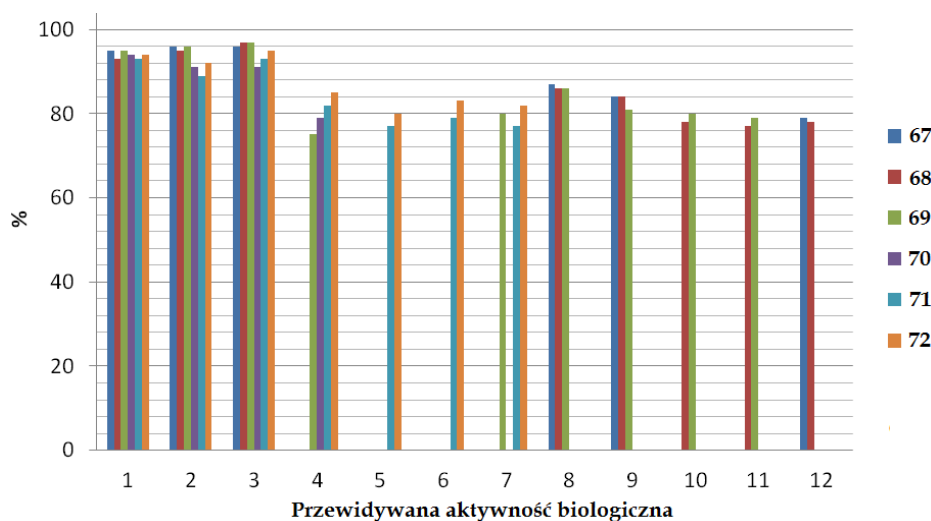
Natomiast dla związków wielkocząsteczkowych (47-53) prawdopodobieństwo aktywności biologicznej było wyznaczone powyżej 85%, a uzyskane dane w badaniach *in silico* przedstawiono w Tabeli 7 [H6]. Według tych danych, do najczęściej przewidywanych rodzajów aktywności biologicznej należy zaliczyć aktywność wobec zapalenia spojówek, antyhipercholesterolemii i hipercholesterolemii, a także toksyczności oczną i hipolipemiczną. Warto podkreślić, że otrzymane koniugaty wykazują znaczną toksyczność, co dodatkowo potwierdza użyteczność programu PASS w poszukiwaniu aktywności toksykologicznej nowych związków. W przypadku związków (54-58) program PASS okazał się ograniczony, bowiem dla związków (56-58) masa molowa była większa niż 1200 g/mol co wiązało się z niemożnością wyznaczenia prawdopodobieństwa aktywności biologicznej. Jednocześnie

koniugaty dipodstawione (54) i (55) wykazywały prawdopodobieństwo aktywności biologicznej jako antagoniści cholesterolu, a także inhibitory monoooksygenazy glicerolowo-eterowej, alkiloacetyloglicerofosfatazy czy hydrolazy acylokarnityny i hydrolazy alkenyloglicerofosfocholiny [H7].

Tabela 7. Prawdopodobieństwo aktywności biologicznej (PA) dla związków (47-53).

Aktywność biologiczna (PA>85%)	Związek						
	47	48	49	50	51	52	53
Zapalenie spojówek	95	95	94	95	95	94	93
Antyhipercholesterolemia	92	89	91	89	93	92	93
Analeptyk oddechowy	91	-	-	-	91	-	-
Hipercholesterolemia	91	88	89	88	91	88	89
Toksyczność oczna	89	87	89	87	87	86	87
Hipolipemia	87	88	91	88	89	89	93
Analeptyk	87	86	-	86	86	-	-
Teratogenność	87	-	-	-	88	86	-
Zaburzenia behawioralne	86	-	-	-	87	-	-
Embriotoksyczność	86	-	-	-	87	-	-
Hepatoprotektant	85	-	-	-	-	-	-
Cholestaza	-	87	-	87	-	87	-

Na Rysunku 36 przedstawiono prawdopodobieństwo aktywności biologicznej (PA) dla związków (67-72) [H8].



(1) Antagonista cholesterolu; (2) Antyhipercholesterolemia; (3) Hipolipemia; (4) Leczenie chorób rozrostowych; (5) Inhibitor CYP7; (6) Inhibitor hydrolazy acylokarnityny; (7) Inhibitor monoooksygenazy glicerolowo-eterowej; (8) Inhibitor *O*-acetylotransferazy alkoholowej; (9) Stymulant kaspazy 3; (10) Substrat CYP3A4; (11) Substrat CYP3A; (12) Inhibitor oksoreduktazy.

Rysunek 36. Prawdopodobieństwo aktywności biologicznej (PA) dla związków (67-72) [H8].

Największe prawdopodobieństwo aktywności biologicznej związków (67-69) jest przewidziane dla: inhibitorów monoooksygenazy glicerolowo-eterowej, oksydoreduktazy i *O*-acetylotransferazy alkoholowej, a także substratów CYP3A4 i CYP3A. Z kolei dla związków (70-72) stosunkowo duże PA jest dla antagonisty cholesterolu, antyhipercholesterolemia i hipolipemii.

2.3. Podsumowanie i wnioski

Zadanie naukowe, którego realizacji i rozwiązania się podjąłem, polegało na syntezie i analizie spektroskopowej oraz zbadaniu właściwości, zróżnicowanych strukturalnie pochodnych kwasów żółciowych. Z uwagi na obecność w strukturze wielu koniugatów czwartorzędowego atomu azotu lub pierścieni 1,2,3-triazolowych związki te mogą stanowić alternatywę dla stosowanych obecnie środków terapeutycznych, zwłaszcza przeciwdrobnoustrojowych. Otrzymane związki zostały także przebadane *in silico*, co umożliwi szybsze i łatwiejsze poszukiwanie docelowego farmakologicznego zastosowania badanych koniugatów.

Prowadzone przeze mnie badania naukowe były skoncentrowane na:

- 1) otrzymaniu niezwykle funkcjonalnych w syntezie organicznej bromoacetoksy podstawionych pochodnych kwasów żółciowych [H1];
- 2) syntezie koniugatów kwasów żółciowych z kwasem salicylowym, acetylosalicylowym i nikotynowym [H2];
- 3) syntezie czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych kwasów żółciowych [H3],[H4]
- 4) syntezie adduktów kwasów żółciowych z graminą [H5];
- 5) syntezie wielkocząsteczkowych pochodnych kwasów żółciowych [H6-H9];
- 6) dogłębnej analizie spektroskopowej i spektrometrycznej wszystkich otrzymanych koniugatów [H1-H9];
- 7) badaniach semiempirycznych i *ab initio* otrzymanych związków [H1-H9];
- 8) badaniach *in silico* koniugatów kwasów żółciowych [H1-H4], [H6-H8].

W omówionym cyklu publikacji otrzymałem, scharakteryzowałem i opisałem:

- 1) syntezę 59 nowych pochodnych kwasów lithocholowego, deoksycholowego i cholowego, w tym: bromopodstawionych pochodnych kwasów żółciowych, koniugatów kwasów żółciowych z kwasem salicylowym, acetylosalicylowym i nikotynowym, czwartorzędowych soli alkiloamoniowych kwasów żółciowych, bromków ftalimidopropyloamoniowych pochodnych kwasów żółciowych, adduktów kwasów żółciowych z graminą, tri- i tetrapodstawionych quasi-podandów opartych na sztywnym pierścieniu benzenowym, quasi-podandów zawierających dodatkowe pierścienie 1,2,3-triazolowe, mieszanych koniugatów kwasów żółciowych i steroli połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym oraz dimerycznych ligandów kwasów żółciowych zawierających pierścienie 1,2,3-triazolowe;
- 2) dogłębną analizę spektroskopową ^1H , ^{13}C NMR, 2D NMR, FT-IR oraz spektrometryczną ESI-MS wszystkich otrzymanych koniugatów kwasów żółciowych;
- 3) strukturę molekularną związków przy użyciu metod semiempirycznych i *ab initio*;
- 4) wpływ adduktów kwasów żółciowych i graminy na hemolizę erytrocytów;
- 5) powstawanie adduktów dimerycznych ligandów kwasów żółciowych i kwasów aromatycznych;
- 6) badania *in silico* koniugatów kwasów żółciowych, które umożliwiają przewidywanie aktywności farmakologicznej oraz ich toksyczności.

Istotnym wkładem do nauki przeprowadzonych przeze mnie badań jest:

1. Opracowanie dogodnych i wydajnych metod syntezy bromoacetoksydostawionych pochodnych kwasów żółciowych.

Opracowałem metodę otrzymywania oraz rozdzielania chromatograficznego niezwykle użytecznych substratów w syntezie produktów naturalnych: 3 α -bromoacetoksyliocholanu metylu, 3 α -bromoacetoksydeoksycholanu metylu, 3 α ,12 α -dibromoacetoksydeoksycholanu metylu, 3 α -bromoacetoksyliocholanu metylu, 3 α ,7 α -dibromoacetoksyliocholanu metylu, 3 α ,12 α -dibromoacetoksyliocholanu metylu, 3 α ,7 α ,12 α -tribromoacetoksyliocholanu metylu. Podałem po raz pierwszy w literaturze światowej pełną analizę spektroskopową otrzymanych związków w oparciu o interpretację widm ^1H i ^{13}C NMR, 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC), FT-IR. Liniowa korelacja pomiędzy eksperymentalnymi i obliczonymi przesunięciami chemicznymi ^1H i ^{13}C NMR potwierdziła zoptymalizowaną geometrię cząsteczek. Określiłem strukturę molekularną oraz wyznaczyłem trwałości otrzymanych związków, poprzez analizę ciepła tworzenia. Ponadto, przeprowadziłem badania *in silico* ułatwiające znalezienie zastosowania otrzymanych związków w farmakologii czy toksykologii. Zastosowałem otrzymane związki do syntezy nowych koniugatów kwasów żółciowych i kwasów salicylowego, acetylosalicylowego i nikotynowego. Nowe koniugaty zostały scharakteryzowane spektroskopowo, zoptymalizowałem także ich strukturę molekularną.

2. Otrzymanie i scharakteryzowanie czwartorzędowych alkiloamoniowych pochodnych kwasów żółciowych.

Otrzymałem i scharakteryzowałem przy użyciu metod spektroskopowych (^1H i ^{13}C NMR, FT-IR) oraz spektrometrii masowej koniugaty kwasów żółciowych z trzeciorzędowymi aminami długołańcuchowymi *N,N*-dimetylo-*N*-decyloaminą, *N,N*-dimetylo-*N*-dodecyloaminą, *N,N*-dimetylo-*N*-tetradecyloaminą oraz *N,N*-dimetylo-*N*-heksadecyloaminą. Ponadto, zoptymalizowałem struktury molekularne poszczególnych koniugatów. Z otrzymanych danych wynika, że najniższe wartości HOF dla czwartorzędowych koniugatów alkiloamoniowych kwasów żółciowych charakteryzują koniugaty kwasu cholowego. Efektem wpływającym na to jest liczba grup hydroksylowych w szkieletach steroidowych jak i zwiększanie długości łańcucha alkiloamoniowego. Porównałem także wartości ciepła tworzenia dla konformerów *anti* i konformerów *syn*. Z analizy danych wynika, że wartości HOF są niższe dla konformerów *anti*. Wiąże się to z faktem, iż układ przestrzenny konformerów *anti* tworzy stabilne kompleksy typu gość-gospodarz. Kompleksy te mogą być stabilizowane przez wiązania wodorowe lub oddziaływania elektrostatyczne, co jest ściśle powiązane z liczbą grup hydroksylowych w cząsteczce kwasu żółciowego. Wartości ciepła tworzenia są niższe dla związków z większą liczbą grup hydroksylowych. W przypadku konformerów *syn* zostały zaobserwowane większe wartości ciepła tworzenia, co można tłumaczyć zmniejszeniem dostępu do powierzchni koniugatu.

Otrzymałem także serię bromków: *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-5 β -cholan-24-ianu metylu)-3-*N*-ftalimidopropyloamoniowego, *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-12 α -hydroksy-5 β -cholan-24-ianu metylu)-3-*N*-ftalimidopropyloamoniowego oraz *N,N*-dimetylo-(3 α -acetoksy-7 α ,12 α -dihydroksy-5 β -cholan-24-ianu metylu)-3-*N*-ftalimidopropyloamoniowego. Z analizy widm

FT-IR *N*-ftalimidowych pochodnych kwasów żółciowych wynika nierównocześnieść grupy karbonylowej w części ftalimidowej. Wyzaczyłem także wartości HOF dla otrzymanych koniugatów metodą PM5. Najniższe wartości ciepła tworzenia charakteryzują pochodną kwasu cholowego, na co ma wpływ obecność dwóch wolnych grup hydroksylowych, które mogą brać udział w tworzeniu między- jak i wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Wniosek ten potwierdziły podobne zależności, które zaobserwowałem dla wyników otrzymanych przy pomocy metody B3LYP/6-31G(d,p).

3. Otrzymanie i scharakteryzowanie adduktów kwasów żółciowych z graminą.

Z uwagi na znaczną aktywność biologiczną kwasów żółciowych oraz graminę – alkaloidu indolowego otrzymałem i opisałem addukty kwasów żółciowych z graminą. Struktury związków zostały potwierdzone poprzez analizę spektroskopową i analizę elementarną. Otrzymałem symetryczne związki dimeryczne, które zawierały w swojej strukturze część sterolową oraz fragment alkaloidu z czwartorzędowym atomem azotu. Struktury otrzymanych związków zostały potwierdzone za pomocą metod spektralnych (^1H i ^{13}C NMR, FT-IR), a także przy użyciu spektrometrii masowej (ESI-MS). Wyjaśniłem także mechanizm powstawania produktów w oparciu o teorię miękkich i twardych kwasów i zasad Pearsona. Z analizy danych pozyskanych z obliczeń semiempirycznych metodą PM5 wynika, że pierścienie cząsteczki graminę są zorientowane prostopadle do szkieletu steroidowego. Z kolei proton z grupy $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{H}$ jest umiejscowiony pomiędzy dwoma atomami tlenu grupy karboksylowej. Odległość pomiędzy protonem, a atomami tlenu grupy karboksylowej wynosi 1.76 Å, zaś pomiędzy protonem i atomem azotu 1.26 Å.

Badano właściwości cytotoksyczne związków względem erytrocytów ludzkich oraz zdolność modyfikacji kształtu tych komórek. Aktywność cytotoksyczną mierzono spektrofotometrycznie, poprzez ocenę uwalniania hemoglobiny i wyrażenie wyników jako procent hemolizy. Gramina była jedynym niehemolitycznym związkiem stosowanym w badaniach. Zmienne stopnie hemolizy w przedziale od 8% do 100%, określono po inkubacji z kwasami żółciowymi w zakresie stężeń od 0,001 mg/ml do 1 mg/ml. Wykazano, że stopień hemolizy jest zależny od hydrofobowości kwasów żółciowych, co można przedstawić w szeregu: kwas monohydroksylowy > kwas dihydroksylowy > kwas trihydroksylowy. Z kolei bromooctany steroli wykazują słabą hemolizę – od 4% do 16% – w zakresie stężeń od 0,5 mg/ml do 1 mg/ml. Addukty kwasów deoksycholowego i cholowego z graminą nie wykazywały hemolizy. Addukt graminę i kwasu lithocholowego wykazywał mniejszą aktywność hemolityczną niż sam kwas lithocholowy. Wartość H_{50} dla adduktu kwasu lithocholowego z graminą była prawie siedmiokrotnie wyższa niż dla samego kwasu lithocholowego. Natomiast dimery steroli i graminę wykazywały wyższy procent hemolizy niż odpowiadające im substraty sterolowe.

Oznaczono także morfologię krwinek czerwonych w obrazach mikroskopowych otrzymanych elektronowym mikroskopem skaningowym. Traktowane komórki erytrocytów adduktami kwasów żółciowych i graminę, powoduje przekształcenie dyskocyta w stomatocyt. Natomiast zmiana kształtu komórek erytrocytów wywołana dimerami (45) i (46) wskazuje, że ulegają one stosunkowo łatwemu włączeniu do błony komórkowej erytrocytów. Stabilny kształt echinocyta wywołany działaniem dimeru (45)

zaobserwowano przy jego niskim stężeniu, co można wyjaśnić jego akumulacją w zewnętrznej warstwie błony białkolipidowej czerwonej krwinki.

4. Opracowanie oryginalnych metod syntezy nowych wielkocząsteczkowych pochodnych kwasów żółciowych.

Opracowałem wydajną syntezę i przeanalizowałem właściwości fizykochemiczne wielkocząsteczkowych estrów 3 α -acetoksy-, 3 α ,12 α -diacetoksy- oraz 3 α ,7 α ,12 α -triacetoksy-podstawionych pochodnych kwasów żółciowych z 1,3,5-tris(bromometyleno)benzenem i 1,2,4,5-tetrakis(bromometyleno)benzenem. Związki te zostały otrzymane w reakcji bezpośredniego alkilowania jonów karboksylowych kwasów żółciowych 1,3,5-tris(bromometyleno)benzenem lub 1,2,4,5-tetrakis(bromometyleno)benzenem za pomocą katalitycznej ilości DBU w bezwodnym toluenie. Jest to bardzo dogodna metoda prowadzenia reakcji estryfikacji. Najwyższe wydajności dla odpowiednich estrów otrzymałem w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak toluen.

Zmodyfikowałem także struktury quasi-podandów pochodnych kwasów żółciowych poprzez wprowadzenie do nich pierścieni 1,2,3-triazolowych przy użyciu chemii "click". Koniugaty te zostały otrzymane w reakcji estrów propargilowych kwasów żółciowych oraz 1,3,5-tris(azydometyleno)benzenu w mieszaninie *t*-butanol/woda, z dodatkiem askorbinianu sodu, CuSO₄·5H₂O w temperaturze 65 °C. Wszystkie substraty otrzymałem z bardzo dobrymi wydajnościami (>85%). Koniugaty te, posiadają sztywną "platformę" benzenową, co pozwala na łatwiejsze generowanie konformerów z odpowiednią geometrią. Pierścień aromatyczny jest płaski, dzięki czemu może łatwo wchodzić w interakcje z powierzchnią, na przykład biopolimerów. Może on spełniać funkcję specyficznej kotwicy w układach biologicznych. Z analizy danych uzyskanych metodami semiempirycznymi wynika, że najniższe wartości HOF mają wszystkie pochodne kwasu cholowego. Trwałość tych związków można wytłumaczyć obniżeniem ich reaktywności poprzez zablokowanie grup hydroksylowych (quasi-podandów nie zawierające pierścieni 1,2,3-triazolowych w strukturze), a tym samym zwiększeniem wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań elektrostatycznych. Ponadto, struktury quasi-podandów zawierające pierścień 1,2,3-triazolowe w strukturze są stabilizowane poprzez oddziaływanie stackingowe π - π pomiędzy dwoma pierścieniami 1,2,3-triazolowymi. Obliczone odległości międzypłaszczyznowe wynoszą około 5,5 Å dla związków dipodstawionych i około 5,7 Å dla związków tripodstawionych, za wyjątkiem pochodnej kwasu cholowego.

Otrzymałem i scharakteryzowałem koniugaty kwasów żółciowych i steroli połączonych pierścieniem 1,2,3-triazolowym. Wszystkie związki wydzieliłem z bardzo dobrymi wydajnościami powyżej 85%, a ich struktury zostały potwierdzone na podstawie analizy spektroskopowej (¹H i ¹³C NMR, FT-IR) oraz spektrometrii mas (ESI-MS). Reakcje prowadziłem w standardowych warunkach (CuSO₄·5H₂O, askorbinian sodu) w dwóch różnych mieszaninach rozpuszczalników: *t*-BuOH/H₂O (5:1) i DMF/H₂O (4:1). W obu przypadkach otrzymałem wyniki porównywalne. Przeprowadziłem także analizę widm ¹³C NMR wszystkich otrzymanych koniugatów. Na szczególną uwagę zasługują grupy metylowe szkieletu steroidowego (CH₃-18, CH₃-19, CH₃-21, CH₃-26, CH₃-27, CH₃-28) które mogą być wykorzystywane w różnieniu analitycznym badanych koniugatów.

Otrzymałem także i scharakteryzowałem dimery kwasów żółciowych połączone pierścieniami 1,2,3-triazolowymi oraz dimery podstawione w położeniu C(3) szkieletu steroidowego grupami bromoacetoksyłowymi. Wyzaczyłem również ich strukturę molekularną przy użyciu metody PM5. Koniugaty z niepodstawionymi grupami hydroksyłowymi zastosowałem jako ligandy w syntezie adduktów z kwasem ftalowym, tereftalowym i 4-aminobenzoesowym. Wykazałem, że addukty powstają w wyniku tworzenia się wiązania wodorowego pomiędzy grupą hydroksylową szkieletu steroidowego a dodanymi kwasami aromatycznymi. Obecność grup blokujących w położeniu C(3) szkieletu kwasów żółciowych w dimerach uniemożliwiało tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy koniugatami a kwasami aromatycznymi, co sugeruje, że atomy azotu pierścieni triazolowych nie uczestniczą w tworzeniu wiązań wodorowych.

5. Przeprowadzenie badań *in silico* koniugatów kwasów żółciowych.

Zastosowanie badań *in silico* przy użyciu programu komputerowego PASS (*ang. Prediction of Activity Spectra for Substances* – Przewidywanie Spektrum Aktywności Substancji) umożliwia szybszą selekcję materiału do badań farmakologicznych. Wyzaczyłem przewidywaną aktywność dla otrzymanych związków z prawdopodobieństwem większym od 85%. Przeprowadzone badania *in silico* zwiększają tym samym szansę na szybsze znalezienie farmakologicznego zastosowania otrzymanych koniugatów kwasów żółciowych.

Optymalizacja syntez (zastosowanie substytucji nukleofilowej, metod chemii „click”) oraz zastosowanie szeregu różnorodnych metod fizykochemicznych wspartych wynikami obliczeń kwantowo-chemicznych pozwala sformułować wnioski dotyczące właściwości strukturalnych i spektroskopowych koniugatów kwasów żółciowych, że struktura molekularna przedstawionych koniugatów kwasów żółciowych zależy między innymi od wewnątrzcząsteczkowych interakcji. Mają one wpływ na zmniejszenie wartości ciepła tworzenia. W strukturach supramolekularnych badanych koniugatów oddziaływania elektrostatyczne są zarówno intramolekularne jak i intermolekularne. Ponadto w oparciu o badania *in silico* można przypuszczać, że obserwowane różnice właściwości koniugatów kwasów żółciowych wpływają na zróżnicowanie ich aktywności farmakologicznej. Wszystkie związki powinny wykazywać tendencję do mniejszej toksyczności i większej aktywności farmakologicznej względem substratów.

Mając na uwadze, stwierdzenie że *“Nature continues to be the main source of inspiration for synthetic chemists in their quest to make novel conjugates, which can have different physical, biological and medicinal properties. Nature makes these conjugates from mixed biosynthesis and some of these chimeras are found to exhibit unusual biological properties”*[7], ciągła modyfikacja chemiczna kwasów żółciowych – jednych z najważniejszych związków pochodzenia naturalnego – daje nam nadzieję na tworzenie nowych połączeń mających różnorodne zastosowania praktyczne.

2.4. Literatura

- [H1] T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, *Acta Chim. Slov.*, **62**, **2015**, 15-27.
- [H2] T. Pospieszny, B. Brycki, *Lett. Org. Chem.*, **13**, **2016**.
DOI: 10.2174/1570178613666160303215734
- [H3] T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, *Lett. Org. Chem.*, **12**, **2015**, 674-684.
- [H4] B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, *Molecules*, **19**, **2014**, 4212-4233.
- [H5] W. Kozanecka, L. Mrówczyńska, T. Pospieszny, B. Jasiewicz, M. Gierszewski, *Steroids*, **98**, **2015**, 92-99.
- [H6] T. Pospieszny, H. Koenig, B. Brycki, *Tetrahedron Lett.*, **54**, **2013**, 4700-4704.
- [H7] T. Pospieszny, H. Koenig, I. Kowalczyk, B. Brycki, *Molecules*, **19**, **2014**, 2557-2570.
- [H8] T. Pospieszny, *Helv. Chim. Acta*, **98**, **2015**, 1337-1350.
- [H9] T. Pospieszny, M. Pakiet, I. Kowalczyk, B. Brycki, *Supramolecular Chemistry*, **2016**.
DOI:10.1080/10610278.2016.1175568
- [H10] T. Pospieszny, *Mini-Rev. Org. Chem.*, **12**, **2015**, 258-270.
- [H11] T. Pospieszny, *Natural Products Chemistry*, Edited by Atta-ur Rahman, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, **46**, **2015**, 169-200. ISBN: 978-0-444-63462-7
- [1] P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach 3rd Ed.*, Wiley and Sons, London, **2009**, str. 247-298.
- [2] I. Kirson, E. Glotter, *J. Nat. Prod.*, **44**, **1981**, 633-647.
- [3] H. Gao, J.R. Dias, *Org. Prep. Proced. Int.*, **32**, **1999**, 145-166.
- [4] M. Fetizon, F.J. Kakis, V. Ignatiadou-Ragoussis, *J. Org. Chem.*, **38**, **1973**, 4308-4311.
- [5] Z. Paryzek, M. Piasecka, T. Pospieszny, I. Skiera, *Steroidy wybrane zagadnienia i ćwiczenia*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, **2011**, str. 32-59.
- [6] D. Lednicer, *Steroid Chemistry at a Glance*, Wiley and Sons, London, **2011**.
- [7] D. B. Salunke, B. G. Hazra, V. S. Pore, *Curr. Med. Chem.*, **13**, **2006**, 813-847.
- [8] S. Mukhopadhyay, U. Maitra; *Current Science*, **87**, **2004**, 1666-1683.
- [9] A. P. Davis, *Chem. Soc. Rev.*, **22**, **1993**, 243-253.
- [10] L. Yuexian, J. R. Dias, *Chem. Rev.*, **97**, **1997**, 283-304.
- [11] S. Bhat, U. Maitra, *Molecules*, **12**, **2007**, 2181-2189.
- [12] S. Bhat, U. Maitra, *Tetrahedron*, **63**, **2007**, 7309-7320.
- [13] P. Willimann, T. Marti, A. Fürer, F. Diederich, F., *Chem. Rev.*, **97**, **1997**, 1567-1608.
- [14] J. Tamminen, E. Kolehmainen, *Molecules*, **6**, **2001**, 21-46.
- [15] H. Gao, J. R. Dias, *J. Prakt. Chem.*, **339**, **1997**, 187-190.
- [16] L. Yuexian, J. R. Dias, *Org. Prep. Proced. Int.*, **28**, **1996**, 203-209.
- [17] H. P. Hsieh, J.G. Muller, C.J. Burrows, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, **1994**, 12077-12078.
- [18] Z. Paryzek, R. Joachimiak, M. Piasecka, T. Pospieszny, *Tetrahedron Lett.*, **46**, **2012**, 6212-6215.
- [19] H. M. Willemen, T. Vermonden, A. T. M. Marcelis, E. J. R. Sudhölter, *Eur. J. Org. Chem.*, **2001**, 2329-2335.
- [20] H. M. Willemen, T. Vermonden, A. T. M. Marcelis, E. J. R. Sudhölter, *Langmuir*, **18**, **2002**, 7102-7106.
- [21] A. Valkonen, M. Lahtinen, E. Virtanen, S. Kaikkonen, E. Kolehmainen, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, **2004**, 1233-1241.
- [22] M. Yoshii, M. Yamamura, A. Satake, Y. Kobuke, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, **2004**, 2619-2623.
- [23] P. Chattopadhyay, P. S. Pandey, *Tetrahedron*, **12**, **2007**, 8620-2624.
- [24] B. H. Kim, H. P. Hong, K. T. Cho, J. H. On, Y. M. Jun, I. S. Jeong, G. S. Cha, H. Nam, *Talanta*, **66**, **2005**, 794-804.
- [25] J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: UK, **2009**, str.118-120, 278-281.
- [26] H. Dodziuk, *Wstęp do chemii supramolekularnej*, Wydawnictwo UW, Warszawa, **2008**, str. 218-221.
- [27] E. Virtanen, E. Kolehmainen, *Eur. J. Org. Chem.*, **16**, **2004**, 3385-3399.
- [28] K. Nakano, K. Sada, Y. Kurozumi, M. Miyata; *Chem. Eur. J.*, **7**, **2001**, 209-220.
- [29] E-H. Ryu, A. Ellern, Y. Zhao; *Tetrahedron*, **62**, **2006**, 6808-6813.

- [30] Z. Paryzek, I. Skiera, *J. Chem. Res.*, **38**, **2014**, 597–599.
- [31] P. Chattopadhyay, P. S. Pandey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, **2007**, 1553–1557.
- [32] R. Rai, P. S. Pandey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, **2005**, 2923–2925.
- [33] T. Pospieszny, I. Małecka, Z. Paryzek, *Tetrahedron Lett.*, **51**, **2010**, 4166–4169.
- [34] H. Wang, W.-H. Chan, *Tetrahedron*, **63**, **2007**, 8825–8830.
- [35] V. K. Khatri, S. Upreti, P. S. Pandey, *Org. Lett.*, **8**, **2006**, 1755–1758.
- [36] A. Kumar, R. K. Chhatra, P. S. Pandey, *Org. Lett.*, **12**, **2010**, 24–27.
- [37] N. G. Aher, V. S. Pore, S. P. Patil, *Tetrahedron*, **63**, **2007**, 12927–12934.
- [38] T. Pospieszny, I. Małecka, Z. Paryzek, *Tetrahedron Lett.*, **53**, **2012**, 301–305.
- [39] V. Sreekanth, S. Bansal, R. K. Motiani, S. Kundu, S. K. Muppu, T. D. Majumdar, K. Panjamurthy, S. Sengupta, A. Bajaj, *Bioconjugate Chem.*, **24**, **2013**, 1468–1484.
- [40] H. Simpson, *Organic Structure Determination Using 2-D NMR Spectroscopy*, Academic Press Elsevier, Amsterdam, **2008**.
- [41] K. N. Kuhajda, S. M. Cvjetičanin, E. A. Djurendić, M. N. Sakač, K. M. P. Gaši, V. V. Kojić, G. M. Bogdanović, *Hem. Ind.*, **63**, **2009**, 313–318.
- [42] B. Brycki, H. Koenig, T. Pospieszny, *Molecules*, **20**, **2015**, 1–14.
- [43] K. S. Moore, S. Wehrli, H. Roder, M. Rogers Jr.; J. N. Forrest, D. McCrimmon, M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, **1993**, 1354–1358.
- [44] S. Wehrli, K. S. Moore, H. S. Roder, S. Durell, M. Zasloff, *Steroids*, **58**, **1993**, 370–378.
- [45] A. Sadownik, G. Deng, V. Janout, S. L. Regen, E. M. Bernard, K. Kikuchi, D. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, **1995**, 6138–6139.
- [46] M. N. Rao, A. E. Shinnar, L.A. Noecker, T. L. Chao, B. Feibush, B. Snyder, I. Sharkansky, A. Sarkahian, X. Zhang, S. R. Jones, *J. Nat. Prod.*, **63**, **2000**, 631–635.
- [47] H. S. Kim, B. S. Choi, K.C. Kwon, S. O. Lee, H. J. Kwak, C. H. Lee, *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, **2000**, 2059–2065.
- [48] P. Bhargava, J. L. Marshall, W. Dahut, N. Rizvi, N. Trocky, J. I. Williams, H. Hait, S. Song, K. J. Holroyd, M. J. Hawkins, *Clin. Cancer Res.*, **7**, **2001**, 3912–3919.
- [49] B. A. Teicher, J. I. Williams, H. Takeuchi, G. Ara, R.S. Herbst, D. Buxton, *Anticancer Res.*, **18**, **1998**, 2567–2573.
- [50] J. H. Schiller, G. Bittner, *Clin. Cancer Res.*, **5**, **1999**, 4287–4294.
- [51] J. I. Williams, S. Weitman, C. M. Gonzalez, C. H. Jundt, J. Marty, S. D. Stringer, K. J. Holroyd, M. P. McLane, Q. Chen, M. Zasloff, *Clin. Cancer Res.*, **7**, **2001**, 724–733.
- [52] D. Li, J. I. Williams, R. J. Pietras, *Oncogene*, **21**, **2002**, 2805–2814.
- [53] B. T. Walker, T.A. Houston, *Tuberculosis*, **93**, **2013**, 102–103.
- [54] A. K. Sills Jr., J. I. Williams, B. M. Tyler, D. S. Epstein, E. P. Sipos, J. D. Davis, M. P. McLane, S. Pitchford, K. Cheshire, F. H. Gannon, *Cancer Res.*, **58**, **1998**, 2784–2792.
- [55] E. Novotná, K. Waisser, J. Kuneš, K. Palát, V. Buchta, J. Stolaríková, R. Beckert, V. Wsól, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, **347**, **2014**, 381–386.
- [56] M. Zasloff, A. P. Adams, B. Beckerman, A. Campbell, Z. Han, E. Luijten, I. Meza, J. Julander, A. Mishra, W. Qu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, **2011**, 15978–15983.
- [57] W. A. Kinney, X. Zhang, J. I. Williams, S. Johnston, R. S. Michalak, M. Deshpande, L. Dostal, J. P. N. Rosazza, *Org. Lett.*, **2**, **2000**, 2921–2922.
- [58] X. D. Zhou, F. Cai, W. S. Zhou, *Tetrahedron Lett.*, **42**, **2001**, 2537–2539.
- [59] X.-D. Zhou, F. Cai, W.-S. Zhou, *Tetrahedron*, **58**, **2002**, 10293–10299.
- [60] A. L. Weis, T. Bakos, I. Alferiev, X. Zhang, B. Shao, W. A. Kinney, *Tetrahedron Lett.*, **40**, **1999**, 4863–4864.
- [61] S. Khabnadideh, C. L. Tan, S. L. Croft, H. Kendrick, V. Yardley, I. H. Gilbert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, **2000**, 1237–1239.
- [62] B. Choucair, M. Dherbomez, C. Roussakis, L. E. Khriel, *Tetrahedron*, **60**, **2004**, 11477–11486.
- [63] S. L. Hussey, E. He, B. R. Peterson, *Org. Lett.*, **4**, **2002**, 415–418.
- [64] Y. Shu, R. S. Jones, W. A. Kinney, B. S. Selinsky, *Steroids*, **67**, **2002**, 291–304.
- [65] B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, *Molecules*, **60**, **2013**, 14961–14976.
- [66] B. Brycki, H. Koenig, I. Kowalczyk, T. Pospieszny, *Molecules*, **19**, **2014**, 9419–9434.
- [67] I. M. Gulis, A. I. Komyak, K. A. Saechnikov, V. A. Tsvirko, *J. Appl. Spectrosc.*, **58**, **1993**, 36–39.
- [68] B. A. Poyor, P. M. Palmer, P. M. Andrews, M. B. Berger, T. Troxler, M. R. Topp, *Chem. Phys. Lett.*, **271**, **1997**, 19–26.

- [69] B. Brycki, I. Kowalczyk, J. Werner, T. Borowiak, I. Wolska, *J. Mol. Struct.*, 791, **2006**, 137–143.
- [70] B. Brycki, I. Kowalczyk, A. Zieliński, T. Borowiak, I. Wolska, *J. Mol. Struct.*, 874, **2008**, 145–150.
- [71] T. Borowiak, I. Wolska, P. Jenz, I. Kowalczyk, B. Brycki, A. Sztul, *J. Mol. Struct.*, 891, **2008**, 205–213.
- [72] R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, **1963**, 3533–3539.
- [73] R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.*, 45, **1968**, 643–648.
- [74] T.-L. Ho, *Chem. Rev.*, 75, **1975**, 1–20.
- [75] B. Jasiewicz, L. Mrówczyńska, K. Malczewska-Jaskóła, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, **2014**, 1104–1107.
- [76] U. Maitra, S. Mukhopadhyay, A. Sarkar, P. Rao, S. S. Indi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, **2001**, 2281–2283.
- [77] Nonapp, U. Maitra, *Org. Biomol. Chem.*, 6, **2008**, 657–669.
- [78] J. Luo, Y. Chen, X. X. Zhu, *Langmuir*, 25, **2009**, 10913–10917.
- [79] F. Werner, H.-J. Schneider, *J. Incl. Phenom. Mol. Recogn.*, 41, **2002**, 37–40.
- [80] J. Luo, Y. Chen, X. X. Zhu, *Synlett*, 14, **2007**, 2201–2204.
- [81] J. Zhang, J. Luo, X. X. Zhu, M. J. N. Junk, D. Hinderberger, *Langmuir*, 26, **2010**, 2958–2962.
- [82] J. Zhang, M. J. N. Junk, J. Luo, D. Hinderberger, X. X. Zhu, *Langmuir*, 26, **2010**, 13415–13421.
- [83] V. Janout, M. Lanier, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, **1996**, 1573–1574.
- [84] V. Janout, M. Lanier, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 119, **1997**, 640–647.
- [85] V. Janout, M. Lanier, G. Deng, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, 8, **1997**, 891–895.
- [86] V. Janout, C. Di Giorgio, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, **2000**, 2671–2672.
- [87] V. Janout, L. Zhang, I. V. Staina, C. D. Giorgio, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, **2001**, 5401–5406.
- [88] S. Vijayaraghavan, B. Jing, T. Vrablik, T.-C. Ting-Chao Chou, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, 14, **2003**, 667–671.
- [89] V. Janout, I. V. Staina, P. Bandyopadhyay, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, **2001**, 9926–9927.
- [90] V. Janout, B. W. Jing, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, 13, **2002**, 351–356.
- [91] V. Janout, B. Jing, I. V. Staina, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, **2003**, 4436–4437.
- [92] V. Janout, S. L. Regen, *Bioconjugate Chem.*, 20, **2009**, 183–192.
- [93] V. Janout, B. W. Jing, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, **2005**, 15862–15870.
- [94] P. Ramírez-López, M. C. de la Torre, H. E. Montenegro, M. M. A. Asenjo, M. A. Sierra, *Org. Lett.*, 10, **2008**, 3555–3558.
- [95] P. Ramírez-López, M. C. de la Torre, M. Asenjo, J. Ramírez- Castellanos, J. M. González-Calbet, A. Rodríguez-Gimeno, C. Ramírez de Arellano, M. A. Sierra, *Chem. Commun.*, 47, **2011**, 10281–10283.
- [96] A. Huczyński, A. Domańska, I. Paluch, J. Stefańska, B. Brzezinski, F. Bartl, *Tetrahedron Lett.*, 49, **2008**, 5572–5575.
- [97] M. R. El Sayed Aly, H. A. Saad, S. H. Abdel-Hafez, *Beilstein J. Org. Chem.*, 11, **2015**, 1922–1932.
- [98] Pharma Expert Predictive Services © 2011–2014, Version 2.0. Available online: <http://www.pharmaexpert.ru/PASSOnline/> (accessed on 1 November 2013).
- [99] J. Jaškowiak, P. Kowalski, *Czasopismo Techniczne Ch*, 1, **2007**, 37–45.
- [100] V. V. Poroikov, D. A. Filimonov, Y. V. Borodina, A. A. Lagunin, A. Kos, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 40, **2000**, 1349–1355.
- [101] V. V. Poroikov, D. A. Filimonov, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 16, **2002**, 819–824.
- [102] V. V. Poroikov, D. A. Filimonov, *Predictive Toxicology*; C. Helma, Ed.; Taylor and Francis: Boca Raton, FL, USA, **2005**; 459–478.
- [103] A. V. Stepanchikova, A. A. Lagunin, D. A. Filimonov, V. V. Poroikov, *Curr. Med. Chem.*, 10, **2003**, 225–233.

3. Dalsze perspektywy pracy badawczej

W najbliższej przyszłości będę kontynuował rozpoczęte przeze mnie dotychczas badania, które zamierzam realizować poprzez syntezę nowych koniugatów kwasów żółciowych.

Szczególnie chciałbym rozwinąć aspekt związany z wykorzystaniem ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych.

Realizacja moich planów badawczych będzie związana z funkcjonalizacją grupy C(24) szkieletu kwasów żółciowych poprzez tworzenie długołańcuchowych amidów lub amin, zawierających w swojej strukturze kilka atomów azotu. Ponadto chciałbym rozwinąć moje badania o próby syntezy nowych koniugatów kwasów żółciowych z alkaloidami i ditiolami. Wybór tych związków jest uzasadniony poprzez ich wysoką i specyficzną aktywność biologiczną. Dlatego też, otrzymane koniugaty steroidowe powinny charakteryzować się zwiększoną aktywnością biologiczną w porównaniu z ich elementami składowymi. Chemiczna modyfikacja grup funkcyjnych kwasów żółciowych umożliwi syntezę koniugatów o zróżnicowanych właściwościach kompleksujących, inkluzyjnych i żelujących. Planuję także przeprowadzenie reakcji selektywnego tiolowania i selenowania wybranych koniugatów. Otrzymane koniugaty zostaną poddane badaniom fizyko-chemicznym obejmującym analizę spektroskopową (^1H i ^{13}C NMR, 2D NMR, FT-IR, EI-MS, ESI-MS, MALDI), jak i również badaniom *in silico* i *in vivo*. Wyznaczone zostaną także minima energetyczne oraz najkorzystniejsze konformacje otrzymanych koniugatów przy użyciu programu CAChe Fujitsu. Przeprowadzone zostaną badania aktywności biostatycznej i biobójczej w stosunku do grzybów (MIC) i dla wybranych koniugatów steroidowych. Przeprowadzone badania pozwolą na uzyskanie istotnych informacji dotyczących nowych koniugatów steroidowych. W szczególności badania określą dobór optymalnych warunków przeprowadzenia efektywnej syntezy, zdolności kompleksotwórczych czy też żelujących. Uzyskane wyniki pozwolą na wykorzystanie badanych układów jako mikrobiocydów o szerokim spektrum działania biobójczego przeciwko pleśniom i drożdżom.

