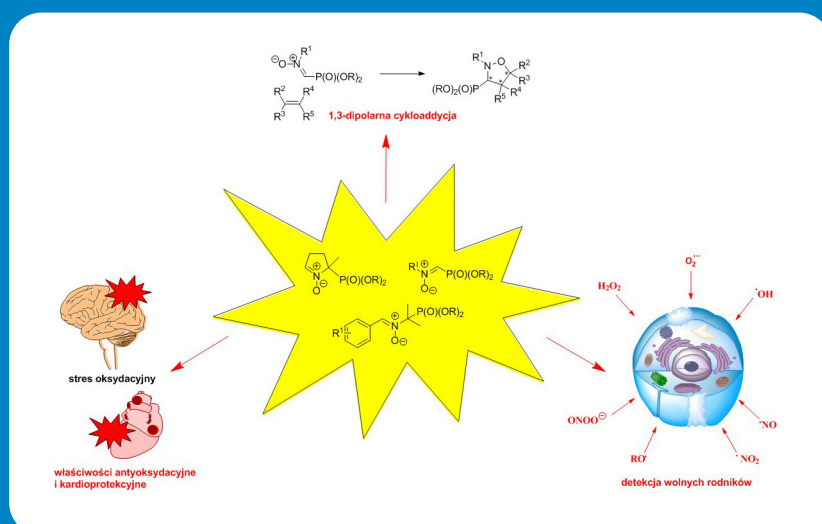





IWONA ROZPARA
IWONA E. GŁOWACKA
DOROTA G. PIOTROWSKA

SYNTEZA FOSFORNYLOWANYCH NITRONÓW ORAZ ICH ZASTOSOWANIA



IWONA ROZPARA* 
IWONA E. GŁOWACKA 
DOROTA G. PIOTROWSKA 

SYNTEZA FOSFORYLOWANYCH NITRONÓW ORAZ ICH ZASTOSOWANIA

SYNTHESIS OF PHOSPHORYLATED NITRONES AND THEIR APPLICATIONS

Zakład Chemii Bioorganicznej, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

* iwona.rozpara@umed.lodz.pl

Seria monografii naukowych dotyczących zagadnień z zakresu dyscyplin nauk farmaceutycznych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu.

Wydawnictwo recenzowane i punktowane na zasadach zgodnych z Rozporządzeniem MNiSW z dnia 22 lutego 2019 r. w sprawie ewaluacji jakości działalności naukowej (Dz.U. 2019 poz. 392 z późn. zm.).

RADA NAUKOWA

dr hab. Monika A. Olszewska, prof. uczelni – Redaktor naczelna
prof. dr hab. Monika Łukomska-Szymańska – Zastępca redaktor naczelnej
prof. dr hab. Iwona Cygankiewicz
dr hab. Małgorzata Pikala, prof. uczelni

REDAKTOR PROWADZĄCA

dr hab. Monika A. Olszewska, prof. uczelni

REDAKCJA TECHNICZNA

dr n.farm. Magdalena Rutkowska

REDAKCJA JĘZYKOWA

Magdalena Kokosińska

KOREKTA

Anna Sikorska

OPRACOWANIE GRAFICZNE

Tomasz Przybył

SYNTEZA FOSFORYLOWANYCH NITRONÓW ORAZ ICH ZASTOSOWANIA

Łódź 2021

WYDAWNICTWO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W ŁODZI

<http://wydawnictwo.umed.pl/>

[e-mail: editorial@reports.umed.pl](mailto:editorial@reports.umed.pl)

Unikatowy identyfikator Wydawnictwa: 60000

(Komunikat Ministra Edukacji i Nauki z dnia 22 lipca 2021 r. w sprawie wykazu wydawnictw publikujących recenzowane monografie naukowe)

ISBN 978-83-963099-8-3

WYDANIE PIERWSZE



© 2021. Pewne prawa zastrzeżone na rzecz autorów. Opublikowane na licencji Creative Commons Uznanie Autorstwa (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.pl>).

Licencjobiorca: Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Zezwala się na wykorzystanie treści monografii zgodnie z licencją – pod warunkiem zachowania niniejszej informacji licencyjnej oraz wskazania autorów jako właścicieli praw do tekstu.

Spis treści

Wprowadzenie	9
1. Synteza i zastosowanie N-podstawionych C-fosforylowanych nitronów	11
1.1. Synteza N-podstawionych C-fosforylowanych nitronów	11
1.1.2. Synteza N-podstawionych C-(dialkoksyo-fosforylo)nitronów 6	11
1.1.3. N-metylo C-(dietoksyfosforyloalkilo)nitrony	13
1.2. Zastosowanie N-podstawionych C-fosforylowanych nitronów.....	14
2. Synteza i zastosowanie N-alkilofosforylowanych C-arylonitronów	17
2.1. Synteza N-alkilofosforylowanych C-arylonitronów	17
2.1.1. Nitrony typu PPN.....	17
2.1.2. Poli(fosforylowane)nitrony 42.....	20
2.1.3. Fosforylowane nitrony, pochodne tlenków difenylfosfiny	21
2.2. Zastosowanie fosforylowanych nitronów	21
3. Synteza i zastosowanie cyklicznych fosforylowanych nitronów	24
3.1. Synteza cyklicznych fosforylowanych nitronów	25
3.1.1. DEPMPO 2a oraz jego alkoksy-, alkilo- oraz arylofosforylowane pochodne.....	25
3.1.2. Deuterowane pochodne DEPMPO	28
3.1.3. Pochodne DEPMPO 2a sfunkcjonalizowane przy C3.....	28
3.1.4. Pochodne DEPMPO 2a sfunkcjonalizowane w pozycji C4 pierścienia pirolidyny	29
3.1.5. Pochodne DEPMPO 2a sfunkcjonalizowane w pozycji C5 pierścienia pirolidyny	32
3.1.6. Pochodne DEPMPO 2a z grupą dietoksyfosforylową w pozycji C2 pierścienia pirolidyny.....	34
3.1.7. Polifosforylowane pochodne DEPMPO 2a	34
3.1.8. Cykliczne analogi DEPMPO 2a	34
3.2 Zastosowanie cyklicznych fosforylowanych nitronów	35
Wnioski.....	37
Bibliografia	38

Streszczenie: Nitrony są ważną grupą związków chemicznych, które znalazły szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują fosforylowane pochodne, do których należą *N*-podstawione *C*-fosforylowane nitrony, *N*-alkilofosforylowane *C*-arylonitrony (w tym nitrony typu PPN) oraz cykliczne fosforylowane nitrony (DEPMPO oraz jego liczne analogi). Wprowadzenie grupy fosforylowej w strukturę omawianych nitronów w znaczący sposób wpłynęło na zmianę ich właściwości. *N*-podstawione *C*-fosforylowane nitrony są wykorzystywane w 1,3-dipolarnej cykloadycji prowadzącej do otrzymania izoksazolidyn sfunkcjonalizowanych grupą fosforylową, które często wykazują aktywność biologiczną. Fragment izoksazolidynowy pełni rolę pierścienia cukrowego w modyfikowanych nukleotydach o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. *N*-alkilofosforylowane *C*-arylonitrony oraz cykliczne fosforylowane nitrony są wykorzystywane przede wszystkim jako „pułapki spinowe” w spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Ponieważ stres oksydacyjny oraz nitrozacyjny (wysokie stężenie wolnych rodników) stanowią jedną z przyczyn licznych procesów patologicznych, np. chorób sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych oraz nowotworów, uzasadnione są badania właściwości przeciwutleniających oraz neuroprotektoryjnych niektórych *N*-podstawionych *C*-fosforylowanych nitronów, nitronów typu PPN oraz cyklicznych fosforylowanych nitronów. W niniejszym przeglądzie zostaną przedstawione fosforylowane nitrony, ich metody syntezy, a także ich właściwości farmakologiczne oraz zastosowanie.

Słowa kluczowe: fosforylowane nitrony, *N*-podstawione *C*-fosforylowane nitrony, *N*-alkilofosforylowane *C*-arylonitrony, nitrony typu PPN, cykliczne fosforylowane nitrony, DEPMPO, wolne rodniki

Abstract: Nitrones are an important group of chemical compounds which have found wide application in many fields. Among them, phosphorylated derivatives are of special interest, including *N*-substituted *C*-phosphorylated nitrones, *N*-alkylphosphorylated *C*-arylnitrones (including PPN-type nitrones) cyclic phosphorylated nitrones (DEPMPO and its analogues). The introduction of the phosphoryl group significantly changed properties of the nitrones. *N*-substituted *C*-phosphorylated nitrones are applied in 1,3-dipolar cycloaddition for the preparation of isoxazolidines functionalized with phosphoryl group, which often exhibit biological activity. Isoxazolidine moiety mimics natural sugar in modified nucleotides exhibiting promising antiviral and anticancer activities. *N*-alkylphosphorylated *C*-arylnitrones and cyclic phosphorylated nitrones are used in the electron spin resonance (EPR) spin-trapping technique. Since oxidative and nitrosative stress (high concentration of the free radicals) are one of the causes of numerous pathological processes, e.g. cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and cancer, studies on the antioxidant and neuroprotective properties of some *N*-substituted *C*-phosphorylated nitrones, PPN-type nitrones cyclic phosphorylated nitrones are justified. In this review synthetic methods, pharmacological properties and the application of phosphorylated nitrones will be presented.

Keywords: phosphorylated nitrones, *N*-substituted *C*-phosphorylated nitrones, *N*-alkylphosphorylated *C*-arylnitrones, PPN-type nitrones, cyclic phosphorylated nitrones, DEPMPO, free radicals

Wykaz skrótów:

A549 – linia komórkowa gruczolakoraka płuc

Ac – grupa acetylowa

Ac₂O – bezwodnik octowy

Ach – acetylocholina (test wykorzystywany do określenia funkcji mikrokrążenia)

AcOH – kwas octowy

AcONH₄ – octan amonu

AMP – adenozyno-5'-monofosforan

AMPK – kinaza białkowa aktywowana przez AMP

ATP – adenozyno-5'-trifosforan

AZT – 3'-azydo-3'-dideoksytymidyna

BAEC – bydlęce komórki śródbłonna aorty

Bu – grupa butylowa

c-GMP – cykliczny 3',5'-monofosforan guanozyny

CSA – kwas kamforosulfonowy

DBOPNs – (dibenzylfosforylo)nitrony

DCE – 1,2-dichloroetan

DEOPNs – (dietoksyfosforylo)nitrony

DIBAL-H – wodorek diizobutyloglinu

DMD – dimetylo-dioksiran

DME – eter dimetylowy

DMF – *N,N*-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DPPH – rodnik 2,2-difenyl-1-pikrohydrazylowy (spektrofotometryczna metoda badająca właściwości przeciwutleniające)

EC₅₀ – stężenie badanej substancji powodujące pożądany efekt u 50% badanej populacji

EPR – spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego

Et – grupa etylowa

EtOH – etanol

FMCA – fluorymetryczny test cytotoxyczności

Glut-4 – transporter glukozy

GPx – peroksydaza glutationowa

GSH – glutation

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności

IC₁₀ – stężenie badanej substancji hamujące wzrost komórek w 10% (tzw. pierwsza dawka toksyczna)

IC₅₀ – stężenie badanej substancji hamujące wzrost komórek w 50%

***i*-Pr** – grupa izopropylowa

LDA – diizopropylamidek litu

LDH – dehydrogenaza mleczanowa (test cytotoksyczności mierzący aktywność dehydrogenazy mleczanowej)

***m*-CPBA** – kwas *m*-chloronadbenzoesowy

MDA – dialdehyd malonowy

Me – grupa metylowa

MeOH – metanol

MK-801 – dizocylpina; niekompetycyjny inhibitor receptora NMDA

MTT – test cytotoksyczności polegający na pomiarze aktywności dehydrogenazy mitochondrialnej

MW – promieniowanie mikrofalowe

***n*-BuLi** – *n*-butylolit

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu

pEC₅₀ – $-\log_{10}(EC_{50})$

Ph – grupa fenyłowa

Pr – grupa propylowa

PSII – fotoukład II

PSPO – odczynnik Davis'a; 3-fenylo-2-(fenylosulfonyl)-1,2-oksazyrydyna

RFA – reaktywne formy azotu

RFT – reaktywne formy tlenu

R_{max} – relaksacja maksymalna

RSC – kora pomiędzy formacją hipokampa i płatem ciemieniowym

SBA₁₅-NH₂ – krzemionka typu SBA₁₅ sfunkcjonalizowana grupą aminową

S_N2 – substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa

SNP – nitroprusydek sodu (test wykorzystywany do określenia funkcji mikrokrążenia)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

THF – tetrahydrofuran

TMSCI – chlorek trimetylosililu

TMSOTf – triflurometanosulfonian trimetylosililu

TRAP – metoda oznaczania całkowitej zdolności zmiatania wolnych rodników

TRIMEB-NH₂×HCl – chlorowodorek 6-monodeoksy-6-monoaminopermetylo β-cyklodekstryny

TROLOX – kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy; pochodna witaminy E

VPB – przedwczesne pobudzenie komorowe

VT – częstoskurcz komorowy

VF – migotanie komór

Wprowadzenie

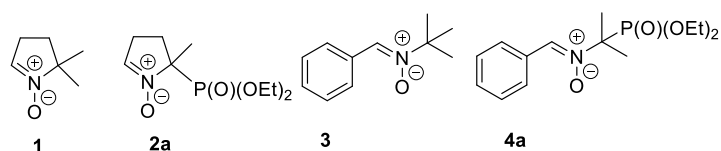
Po raz pierwszy wolne rodniki zostały zidentyfikowane w organizmach żywych w roku 1954 (Commoner i in., 1954). Początkowo próby wyjaśnienia ich znaczenia podjął się Harman, który twierdził, że proces starzenia wywołany jest poprzez uszkodzenie komórek i tkanek pod wpływem działania wolnych rodników (Harman, 1956). W następnych latach określono funkcję dysmutazy ponadtlenkowej, odpowiedzialnej za rozkład anionorodnika ponadtlenkowego (McCord i Fridovic, 1969). Od tego czasu rozpoczęły się intensywne prace nad zbadaniem funkcji wolnych rodników w organizmach żywych.

Obecnie wolne rodniki zawierające atom tlenu zaliczane są do RFT (tzw. reaktywnych form tlenu; ang. *Reactive oxygen species*, ROS), natomiast wolne rodniki zawierające atom azotu – do RFA (tzw. reaktywnych form azotu; ang. *Reactive nitrogen species*, RNS) (Di Meo i in., 2016). Pełnią one funkcję cząstek sygnałowych, dzięki czemu mogą wpływać na różnorodne procesy fizjologiczne niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Podczas skurczu mięśni, kiedy konieczny jest nadmiar glukozy, generowany jest nadtlenek wodoru (H_2O_2) aktywujący AMPK (kinazę białkową aktywowaną przez AMP), która pośredniczy w aktywacji białek transportowych Glut-4 odpowiedzialnych za transport glukozy do mięśni (Sandstrom i in., 2006). Także rodnik tlenu azotu inicjuje transport glukozy do mięśni, jednak odbywa się to z udziałem innego szlaku metabolicznego, w którym mediatorem jest cGMP (cykliczny -3',5'-monofosforan guanozyny) (Deshmukh i in., 2010). RFT (głównie H_2O_2) są również cząstkami wpływającymi w sposób pośredni na proliferację komórek poprzez aktywację szlaku sygnałowego Wnt/ β -katenina, który wywołuje ten proces poprzez aktywację transkrypcji genów: *c-Myc* i *Cykliny D1* (Funato i in., 2007). Dodatkowo aktywacja powyższego szlaku może uchronić przed apoptozą (Chen i in., 2001; Longo i in., 2002). Nadtlenek wodoru jest również przekaźnikiem wtórnym pobudzającym płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), w związku z czym w znaczący sposób wpływa na wzrost komórek (Sundaresan i in., 1995). Anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\bullet-}$ pełni rolę wewnątrzkomórkowej wtórnej cząsteczki sygnalizacyjnej, aktywującej ścieżkę sygnalizacyjną ras/rac -Raf1-MAPK (Buetler i in., 2004; Griendling i in., 2000). RFT (takie jak H_2O_2 czy $\bullet OH$) oraz RFA (anion kwasu nadtlenoazotowego $ONOO^-$) mogą stymulować pracę kanałów wapniowych odpowiadających za transport jonów Ca^{2+} poprzez zwiększenie lub zmniejszenie aktywności tych kanałów (Adachi i in., 2004; Hool i Corry, 2007). Wolne rodniki wpływają również na pH w komórkach – wraz ze spadkiem stężenia anionorodnika ponadtlenkowego oraz wzrostem stężenia nadtlenu wodoru zmniejsza się pH (Pervaiz i Clement, 2007). Reaktywne formy tlenu odgrywają ponadto ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Fagocyty, jedne z komórek odpornościowych organizmu, w momencie zetknięcia się z obcymi drobnoustrojami wytwarzają anionorodnik ponadtlenkowy, który następnie jest przekształcany w H_2O_2 . Zjawisko to nazywane jest wybuchem tlenowym, tzw. respiratory burst (Babior, 1984; Bartosz, 2008).

Jak pokazują powyższe przykłady, RFT oraz RFA w niewielkim stężeniu są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Z drugiej strony ich nadmiar jest wysoce szkodliwy (Valko i in., 2007). W związku z tym, w celu zachowania odpowiedniego stężenia reaktywnych form tlenu oraz azotu w organizmie, wytworzony został system antyoksydacyjny unieszkodliwiający RFA oraz RFT, w którego skład wchodzi nieenzymatyczne antyoksydanty, takie jak witamina C, witamina E, glutation (GSH), karotenoidy oraz enzymatyczne antyoksydanty, np. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) i peroksydaza glutationowa (GPx) (Hensley i in., 2000; Valko i in., 2007). W szczególnych przypadkach, kiedy system antyoksydacyjny jest zaburzony i występuje znaczny wzrost wolnych rodników, mamy do czynienia z tzw. stresem oksydacyjnym (wysokie stężenie RFT) oraz stresem nitrozacyjnym (wysokie stężenie RFA), co skutkuje wystąpieniem licznych patologicznych procesów (Valko i in., 2007). Podczas stresu oksydacyjnego oraz nitrozacyjnego reaktywne formy tlenu oraz azotu mogą wywołać uszkodzenia DNA (Brown i Borutaite, 2001; Dizdaroglu i in., 2002), białek (Pryor i in., 1994; Stadtman, 2004) oraz peroksydację lipidów (Esterbauer i in., 1991; Marnett, 1999). W wyniku tych procesów mogą nastąpić zaburzenia transkrypcji, błędy replikacyjne, zaburzenie szlaków sygnałowych oraz powstawać mutagenne produkty, np. dialdehyd malonowy (MDA), co jest związane z procesem karcynogenezy (Valko i in., 2006; Valko i in., 2007). Wykazano również związek nadmiernej produkcji RFA i RFT z wystąpieniem chorób sercowo-naczyniowych (Bartosz, 2008; Bahorun i in., 2006; Dhalla i in.,

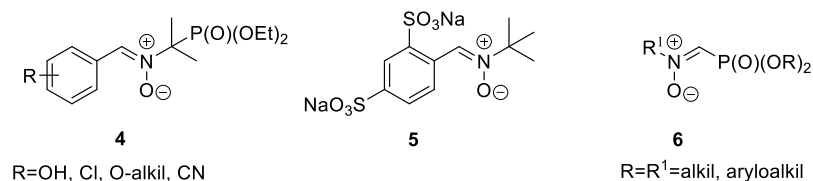
2000), np. miażdżycy (Bartosz, 2008; Vogiatzi i in., 2009), urazów niedokrwienno-reperfuzyjnych (Bartosz, 2008; Perrelli i in., 2011), nadciśnienia (Harrison i in., 2007) i kardiomiopatii cukrzycowej (Kaludercic i Di Lisa, 2020). Liczne badania wykazują wpływ RFA oraz RFT na rozwój chorób neurodegeneracyjnych (Bartosz, 2008; Popa-Wagner i in., 2013), np. choroby Parkinsona (Bartosz, 2008; Zuo i Motherwell, 2013), choroby Alzheimera (Bartosz, 2008; Huang i in., 2016) czy stwardnienia rozsianego (van Horssen i in., 2011). Stwierdzono, że mózg jest podatny na negatywne działanie wolnych rodników (Popa-Wagner i in., 2013) ze względu na wysoką zawartość lipidów, które pod wpływem ich działania mogą ulec peroksydacji do *trans*-4-hydroksynon-2-enalu (toksyczny dla aksonów i oligodendrocytów) (Comporti, 1989; Esterbauer i in., 1991; McCracken i in., 2000), ze względu na słaby mechanizm antyoksydacyjny (Cao i in., 1988; Piantadosi i Zhang, 1996) oraz duże zużycie tlenu, które prowadzi do wysokiego uwalniania anionorodnika ponadtlenkowego (Bartosz, 2008).

Jak wykazano powyżej, wolne rodniki biorą udział w licznych procesach fizjologicznych oraz patologicznych, jednak ze względu na swoją wysoką reaktywność ich wykrycie jest niezwykle trudne, szczególnie rodnika hydroksylowego (Michaels i Hunt, 1973; Nakken i Pihl, 1965). Z tego względu do detekcji tych indywidualów chemicznych w systemach biologicznych wykorzystuje się spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) z zastosowaniem tzw. pułapek spinowych. Pułapki spinowe są to związki, które muszą wykazywać duże powinowactwo do wolnych rodników i wchodzić z nimi w reakcje, a co za tym idzie – tworzyć nowe, trwalsze rodniki, tzw. addukty spinowe, które następnie mogą zostać wykryte oraz scharakteryzowane (Perkins, 1980; Villamena i Zweier, 2004). Ze względu na stosunkowo wysoką trwałość nitrony są jedną z ważniejszych grup związków stosowanych jako pułapki spinowe, tzw. spin-trapping agents (Villamena i Zweier, 2004). Do tej pory zaprojektowano wiele nitronów wykorzystywanych jako pułapki spinowe, wśród których największe znaczenie ma cykliczny nitron DMPO **1** (ang. *5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide*) (Arroyo i in., 1987; Finkelstein i in., 1980) oraz jego liczne analogi, w tym związki zawierające atom fosforu, np. nitron DEPMPO **2a** (ang. *5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline-N-oxide*) (Frejaville i in., 1995; Liu i in., 1999) (Ryc. 1). Drugą grupę stanowią „liniowe” nitrony, do których zalicza się *N*-*tert*-butylo- α -fenylnitron (PBN) **3** (ang. *N-benzylidene-tert-butylamine N-oxide*) (Janzen i in., 1992; Kalyanaraman i in., 1993) oraz jego analogi, np. nitron PPN **4a** (ang. *N-benzylidene-1-diethoxyphosphoryl-1-methylethylamine N-oxide*) (Ryc. 1) (Zeghdaoui i in., 1995).



Rycina 1. Wzory nitronów DMPO **1**, DEPMPO **2a**, PBN **3** oraz PPN **4a**.

Nitrony są wykorzystywane nie tylko w detekcji wolnych rodników, ale mogą również stanowić potencjalne terapeutyki w zwalczaniu licznych chorób, których podłoże stanowi stres oksydacyjny lub nitrozacyjny. Pierwsze tego typu badania zostały przeprowadzone już w latach 80. ubiegłego wieku i dotyczyły działania hamującego PBN **3** we wstrząsach pourazowych (Novelli i in., 1985, 1986). Dalsze badania wykazały neuroprotektynne działanie PBN **3** w udarze niedokrwinnym (Carney i in., 1991; Floyd, 1990). W późniejszych latach zsyntezowano jego pochodną NXY-059 **5** (Ryc. 2) o właściwościach neuroprotektynnych, obecnie znaną pod nazwą OKN-007 **5** (Fong i Rhoney, 2006; Shuaib i in., 2007). Niestety, na etapie zaawansowanych badań klinicznych nitron ten okazał się nieskuteczny (Antonic i in., 2018). Wykazano natomiast jego wpływ na zmniejszanie się glejaka wielopostaciowego (Floyd i in., 2013; Garteiser i in., 2010; He i in., 2011; Towner i in., 2019). Można także znaleźć prace dotyczące właściwości przeciwutleniających nitronów typu PPN **4** (Cassien i in., 2016) oraz *N*-podstawionych *C*-(dialkoksylfosforyl)nitronów **6** (Ryc. 2) (Piotrowska i in., 2019).



Rycina 2. Ogólny wzór nitronów typu PPN **4**, wzór nitronu NXY-059 (OKN-007) **5** oraz *N*-podstawionych *C*-(dialkoksylfosforylo)nitronów **6**.

Nitrony ze względu na swoją budowę stanowią także użyteczne substraty w reakcjach 1,3-dipolarnej cykloaddycji z alkenami prowadzących do otrzymania podstawionych izoksazolidyn (Padwa i in., 1984). Warto zwrócić uwagę, że w wyniku reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji mogą być generowane nawet trzy centra stereogeniczne, przy czym ich konfiguracja jest zależna od podstawników obecnych w alkenie (Gothelf i Jorgensen, 1998; Padwa i in., 1984; Pellissier, 2007). Wiele pochodnych izoksazolidyn uzyskanych w wyniku reakcji nitronów z alkenami wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową (Damodiran i in., 2009; Kumar i in., 2003). Ponadto fragment izoksazolidynowy pełni rolę pierścienia cukrowego w modyfikowanych nukleotydach o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej oraz przeciwwirusowej (Chiacchio i in., 2005; Piotrowska i in., 2017; Romeo i in., 2012).

Na szczególną uwagę zasługują związki zawierające w swojej strukturze wiązanie C–P, które jest odporne na hydrolizę kwasową i zasadową, a także działanie enzymu fosfatazy oraz fosfodiesterazy (Cao i in., 2019). Liczne badania wykazały, że wprowadzenie grupy dietoksyfosforylowej do nitronów powszechnie stosowanych jako tzw. pułapki spinowe znacząco poprawia ich właściwości. Przede wszystkim obecność tej grupy wpływa na zwiększenie trwałości nitronów oraz ich adduktów z wolnymi rodnikami (Tuccio i in., 1995; Zeghdaoui i in., 1995), a dodatkowo fosforowa stała sprzężenia pozwala rozróżnić poszczególne rodniki w badanych układach (Zeghdaoui i in., 1995).

Z uwagi zarówno na duże znaczenie nitronów w detekcji wolnych rodników w systemach biologicznych, jak również ich potencjalne zastosowanie jako terapeutyków w leczeniu chorób neurologicznych oraz znaczenie w syntezie organicznej związków biologicznie ważnych, w niniejszym przeglądzie zostanie omówiona grupa nitronów zawierających w swojej strukturze atom fosforu. Nitrony, ze względu na swoją budowę oraz położenie grupy fosforylowej, zostały podzielone na trzy główne grupy, tj. *N*-podstawione *C*-fosforylowane nitrony, gdzie grupa alkoksylfosforylowa jest umiejscowiona przy *C*-końcu, „liniowe” fosforylowane nitrony z grupą fosforylową położoną przy *N*-końcu oraz cykliczne nitrony. Przedstawiono przykłady, metody syntezy, a także zastosowania ww. nitronów.

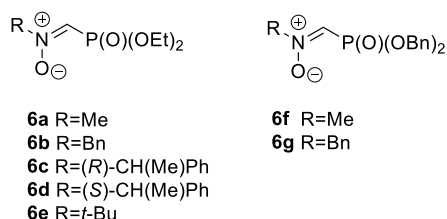
1. Synteza i zastosowanie *N*-podstawionych *C*-fosforylowanych nitronów

N-podstawione *C*-fosforylowane nitrony stanowią klasę nitronów, w których grupa fosforylowa jest przyłączona do *C*-końca (Chiacchio i in., 2005, 2006; Piotrowska, 2006a; Piotrowska i in., 2019). Wśród nich można wyróżnić nitrony, w których grupa fosforylowa jest bezpośrednio przyłączona do reszty nitronowej (Piotrowska, 2006a; Piotrowska i in., 2019) lub jest od niej oddzielona łańcuchem alkilowym (Chiacchio i in., 2005, 2006).

1.1. Synteza *N*-podstawionych *C*-fosforylowanych nitronów

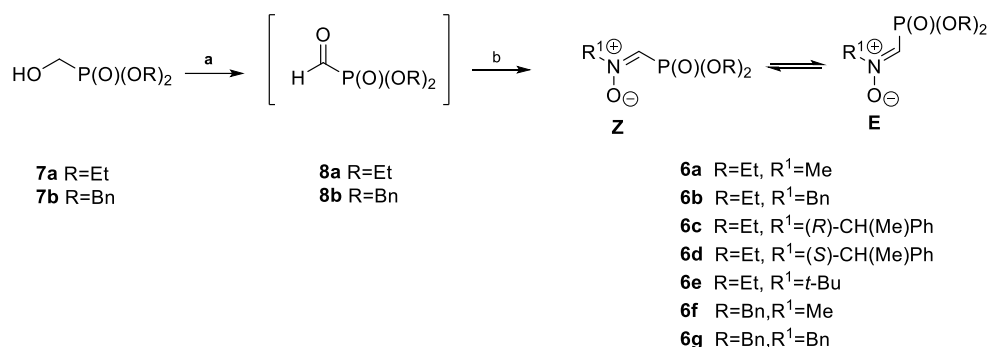
1.1.2. Synteza *N*-podstawionych *C*-(dialkoksylfosforylo)nitronów **6**

Wśród *N*-podstawionych *C*-(dialkoksylfosforylo)nitronów **6** można wyróżnić (dietoksyfosforylo)nitrony (DEOPNs) **6a–e** oraz (dibenzylkoksylfosforylo)nitrony (DBOPNs) **6f–g** (Ryc. 3) (Piotrowska i in., 2019).



Rycina 3. Wzory nitronów **6a–g**.

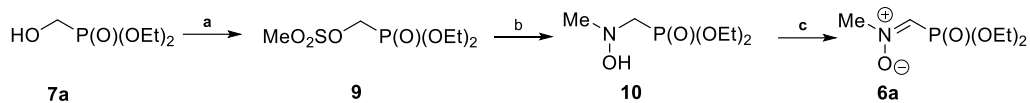
W syntezie nitronów **6a–e** jako substrat wykorzystano hydroksymetylofosfonian dietylu **7a**, który w wyniku utleniania Swerna przekształcono w formylofosfonian dietylu **8a**, a następnie bez oczyszczania poddawano reakcji z odpowiednią hydroksyloaminą (Schemat 1) (Piotrowska, 2006a; Piotrowska i in., 2019; Piotrowska i Glowacka, 2007a). W analogiczny sposób otrzymano nitrony **6f–g** przy wykorzystaniu jako substratu hydroksymetylofosfonianu dibenzylu **7b** (Schemat 1) (Piotrowska i in., 2019). Nitrony **6a–g** otrzymano z wysokimi wydajnościami mieszczącymi się w zakresie od 70% do 87% (Piotrowska, 2006a; Piotrowska i in., 2019; Piotrowska i Glowacka, 2007a), z wyjątkiem nitronu **6e**, dla którego wydajność wynosiła zaledwie 20% (Piotrowska i in., 2019).



Schemat 1. Synteza nitronów **6a–g**. Odczynniki i warunki reakcji: a) (COCl)₂, DMSO, -78°C; b) R¹NHOH, temp.pokojowa, 20–87%.

Nitrony **6a–d** oraz **6f–g** w roztworze deuterowanego chloroformu w temperaturze pokojowej istnieją jako równowagowe mieszaniny izomerów *E/Z*, gdzie dominuje izomer *Z*. Nitron **6e** występuje wyłącznie jako izomer *Z*. Co ciekawe, w roztworze DMSO wszystkie nitrony **6** są izomerami *Z* (Piotrowska, 2006a; Piotrowska i in., 2019; Piotrowska i Glowacka, 2007a).

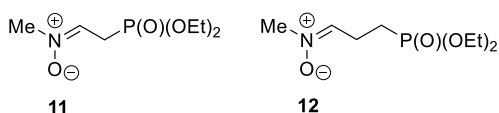
Opracowano również syntezę *N*-metylo-*C*-(dietoksyfosforylo)nitronu **6a** z zastosowaniem łagodniejszych warunków. Jako substrat wykorzystano hydroksymetylofosfonian dietylu **7a**, który w pierwszym etapie przekształcano w mesylan **9**. Reakcja związku **9** z *N*-metylohydroksyloaminą prowadzi do utworzenia fosfonianu **10**, który następnie utleniany tlenkiem manganu(IV) daje nitron **6a** (Schemat 2) (Romeo i in., 2012). Wadą tej metody w przeciwieństwie do wcześniej przedstawionej z zastosowaniem utleniania Swerna jest jej kilkuetapowy przebieg i konieczność oczyszczania każdego z uzyskanych związków pośrednich, co wpływa na obniżenie sumarycznej wydajności.



Schemat 2. Synteza nitronu **6a**. Odczynniki i warunki reakcji: a) MeSO_2Cl , CH_2Cl_2 , Et_3N , -10°C , a następnie temp. pokojowa, 2 godz., 90%; b) MeNHOH , Et_3N , temp. wrzenia, 6 godz., 50%; c) MnO_2 , CH_2Cl_2 , temp. pokojowa, 18 godz., 60%.

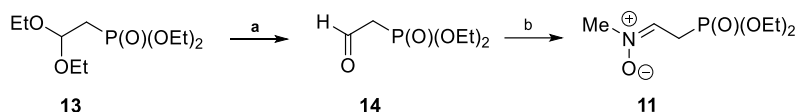
1.1.3. *N*-metylo *C*-(dietoksyfosforyloalkilo)nitrony

W przeciwieństwie do *N*-podstawionych *C*-(dialkoksyo fosforylo)nitronów **6**, *N*-metylo-*C*-(dietoksyfosforylometylo)nitron **11** oraz *N*-metylo-*C*-(dietoksyfosforyloetylo)nitron **12** posiadają grupę dietoksyfosforylową oddaloną od grupy nitronowej o odpowiednio jeden lub dwa atomy węgla (Rycina 4) (Chiacchio i in., 2005, 2006).



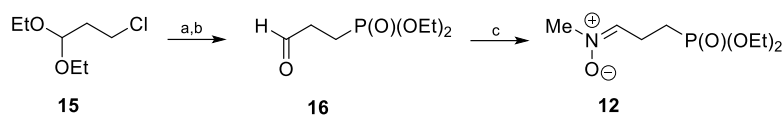
Rycina 4. Wzory *N*-metylo-*C*-(dietoksyfosforylometylo)nitronu **11** i *N*-metylo-*C*-(dietoksyfosforyloetylo)nitronu **12**.

N-metylo-*C*-(dietoksyfosforylometylo)nitron **11** otrzymano w dwuetapowej sekwencji reakcji przy wykorzystaniu jako substratu 2,2-dietoksyetylofosfonianu dietylu **13** (Chiacchio i in., 2005), który w pierwszym etapie pod wpływem żywicy jonowymiennej Amberlist-15 uległ hydrolizie do formylo-metylofosfonianu **14** (Chiacchio i in., 2005; Coppola, 1984). W kolejnym etapie związek **14** poddano reakcji z *N*-metylohydroksyloaminą, w wyniku czego z wydajnością 95% otrzymano nitron **11** (Schemat 3), który występuje w postaci równowagowej mieszaniny dwóch izomerów *Z/E* (5:1) (Chiacchio i in., 2005).



Schemat 3. Synteza *N*-metylonitronu **11**. Odczynniki i warunki reakcji: a) Amberlist-15, aceton, temp. pokojowa, 18 godz., 95%; b) $\text{MeNHOH}\cdot\text{HCl}$, Et_3N , toluen, temp. pokojowa, 3 godz., 95%.

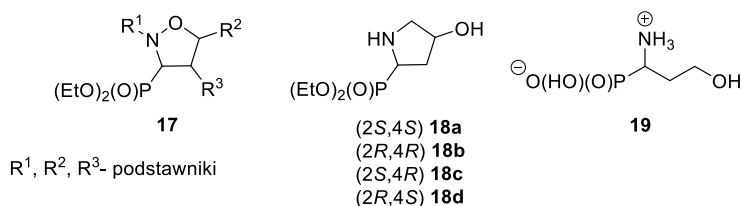
N-metylo-*C*-(dietoksyfosforyloetylo)nitron **12** otrzymano z dietyloacetalu 3-chloropropionoaldehydu **15**, który w reakcji Arbuzowa, a następnie hydrolizy kwasowej przekształcono w aldehyd **16** (Iorga i in., 1998; Chiacchio i in., 2006). W końcowym etapie związek **16** poddano reakcji z *N*-metylohydroksyloaminą otrzymując nitron **12** z wydajnością 85% (Schemat 4) jako równowagową mieszaninę izomerów *Z/E* (6:1). Ponieważ nitron **12** jest nietrwały i po kilku dniach ulega rozkładowi, natychmiast poddawany był następnym przekształceniom (Chiacchio i in., 2006).



Schemat 4. Synteza *N*-metylo-*C*-(dietoksyfosforyloetylo)nitronu **12**. Odczynniki i warunki reakcji: a) $(\text{EtO})_3\text{P}$, temp. wrzenia, 12 godz.; b) 10% HCl, 90°C, 2 godz.; c) $\text{MeNH}_2\cdot\text{HCl}$, Et_3N , CH_2Cl_2 , temp. pokojowa, 5 godz., 85%.

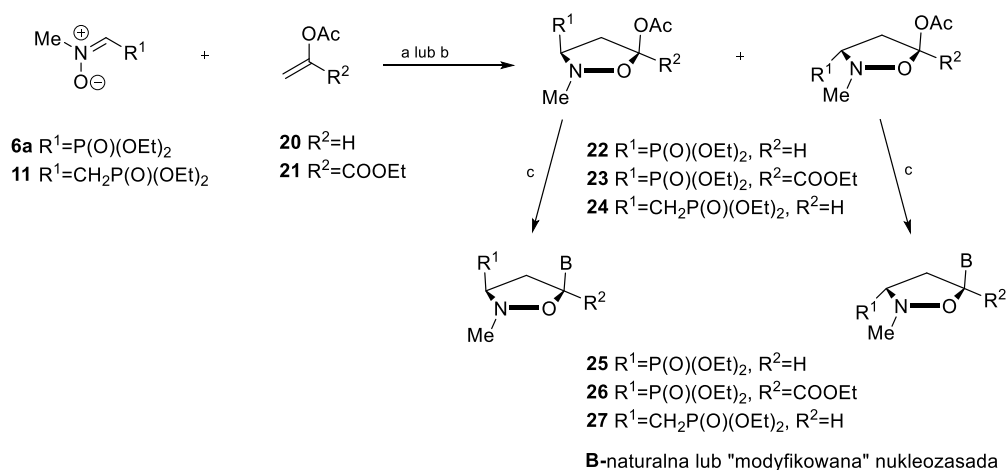
1.2. Zastosowanie *N*-podstawionych *C*-fosforylowanych nitronów

Reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji *N*-podstawionych *C*-fosforylowanych nitronów z podstawionymi alkenami prowadzą do odpowiednich izoksazolidyn **17** sfunkcjonalizowanych ugrupowaniem dialkoksyfosforylowym, w których w zależności od użytego alkeny generowane mogą być nawet trzy nowe centra stereogeniczne (Piotrowska, 2006a; Piotrowska, 2006b; Piotrowska i Glowacka, 2007a; Piotrowska i Glowacka, 2007b). Izoksazolidyny **17** ze względu na obecność wiązania N–O mogą stanowić użyteczne substraty w syntezie innych związków biologicznie ważnych, np. fosfonianowych analogów aminokwasów. Opracowano syntezę wszystkich czterech stereoizomerów fosforylowanych analogów 4-hydroksyproliny **18** (Piotrowska i Glowacka, 2007a) oraz obu enancjomerów analogu homoseryny **19** (Piotrowska i Glowacka, 2007b) (Ryc. 5).



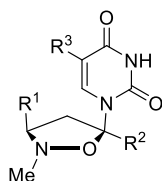
Rycina 5. Wzory fosforylowanych izoksazolidyn **17**, fosforylowanych analogów 4-hydroksyproliny **18** oraz homoseryny **19**.

Nitrony **6a–b** oraz **11** zostały również wykorzystane do syntezy analogów nukleotydów, w których pierścień cukrowy zastąpiono szkieletem izoksazolidynowym. Zaproponowano dwie strategie syntezy modyfikowanych nukleotydów z wykorzystaniem 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronów **6a–b** oraz **11** (Chiacchio i in., 2005; Chiacchio i in., 2006; Chiacchio i in., 2007; Giofre i in., 2015; Lysakowska i in., 2014; Piotrowska i in., 2016; Piotrowska i in., 2017; Romeo i in., 2012). Pierwsze podejście opiera się na reakcji odpowiedniego nitronu **6a** lub **11** z octanem winylu **20** lub z 2-acetoksyakrylanem etylu **21** co pozwoliło uzyskać diastereoizomeryczne izoksazolidyny **22–24**, które w reakcji sprzęgania z odpowiednią sililowaną nukleozasadą przekształcono w analogi nukleotydów **25–27** (Schemat 5) (Chiacchio i in., 2005; Chiacchio i in., 2006; Chiacchio i in., 2007; Romeo i in., 2012).



Schemat 5. Synteza izoksazolidynowych analogów nukleotydów 25–27. Odczynniki i warunki reakcji: a) THF, temp. wrzenia, 24 godz., 80%; b) 60°C, 24 godz., 90%; c) MeCN, TMSOTf, siliowana nukleozasada, 55–70°C, 5–6 godz., 61–90%.

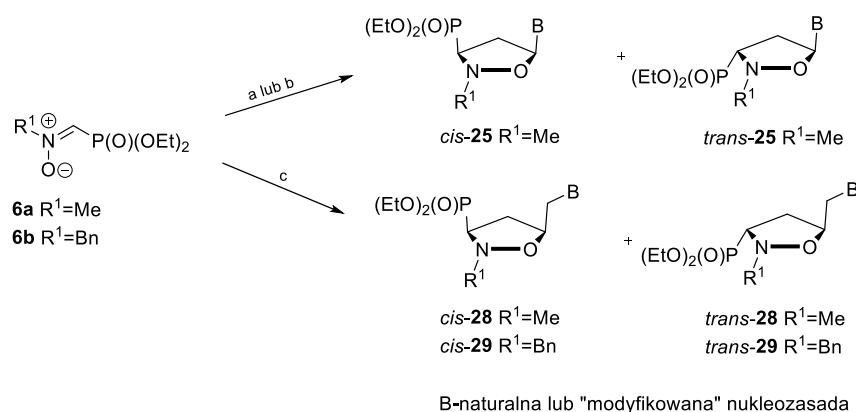
Zaproponowana metoda pozwoliła na otrzymanie szeregu analogów nukleotydów **25–27**, posiadających naturalną bądź „modyfikowaną” nukleozasadę (Chiacchio i in., 2005; Chiacchio i in., 2006; Chiacchio, 2007; Romeo i in., 2012). Analogi nukleotydów **26a–b** (Ryc. 6) wykazywały zdolność do inhibicji wirusa HIV i jednocześnie odznaczały się niską cytotoksycznością w porównaniu z lekiem referencyjnym – 3'-azydo-3'-dideoksytymidyną (AZT) (Romeo i in., 2012). Natomiast związki **27a–b** (Ryc. 6) były inhibitorami odwrotnej transkryptazy, nie wykazując jednocześnie toksyczności w stosunku do użytych linii komórkowych (Chiacchio i in., 2005).



26a $R^1 = P(O)(OEt)_2, R^2 = COOEt, R^3 = F$
26b $R^1 = P(O)(OEt)_2, R^2 = COOEt, R^3 = H$
27a $R^1 = CH_2P(O)(OEt)_2, R^2 = H, R^3 = F$
27b $R^1 = CH_2P(O)(OEt)_2, R^2 = H, R^3 = Me$

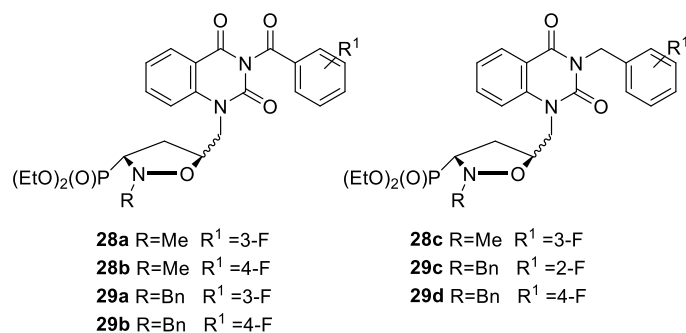
Rycina 6. Przykłady izoksazolidynowych analogów nukleotydów 26a–b i 27a–b o aktywności przeciw-wirusowej.

W alternatywnej metodzie wykorzystano cykloaddycję nitronów **6a–b** z winylowaną lub allilowaną nukleozasadą, która bezpośrednio prowadzi do otrzymania odpowiednich diastereoizomerycznych analogów nukleotydów *cis/trans*-**25**, **28** i **29** (Schemat 6) (Giofre i in., 2015; Lysakowska i in., 2014; Piotrowska i in., 2016; Piotrowska i in., 2017).



Schemat 6. Synteza izoksazolidynowych analogów nukleotydów **25**, **28** i **29**. Odczynniki i warunki reakcji: a) winylowana nukleozasada, CH₂Cl₂, MW, 100W, 90°C, 2 godz., 93–96%; b) winylowana nukleozasada, toluen, 70°C, 24 godz., 80–88%; c) alilowana nukleozasada, toluen lub toluen–EtOH lub toluen–CHCl₃, 60°C, 24–72 godz., 53–100%.

Uzyskano w ten sposób biologicznie aktywne nukleotydy **28a–c** i **29a–d**, w których naturalną nukleozasadę zastąpiono chinazolino-2,4-dionem sfunkcjonalizowanym przy N3 podstawnikiem benzylovym albo benzoilowym (Ryc. 7) (Piotrowska i in., 2017).



Rycina 7. Przykłady izoksazolidynowych analogów nukleotydów **28a–c** i **29a–d** o aktywności przeciw-wirusowej.

Mając na uwadze zdolności nitronów do wychwytywania wolnych rodników zbadano właściwości przeciwutleniające oraz neuroprotektoryjne *N*-podstawionych C-(dialkoksylfosforylowanych) nitronów **6a–g**. Z przeprowadzonych badań wynika, że każdy z nich wykazuje umiarkowane właściwości neuroprotektoryjne oraz przeciwutleniające, jednakże nitron **6e** okazał się najskuteczniejszym związkiem neuroprotektoryjnym, chroniącym przed nekrozą oraz peroksydacją lipidów, a także wychwytyjącym rodnik ponadtlenkowy. Dzięki tym właściwościom może on stanowić potencjalny lek w chorobach, w których podstawę stanowi stres oksydacyjny (Piotrowska i in., 2019).

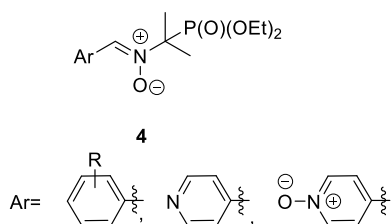
2. Synteza i zastosowanie *N*-alkilofosforylowanych *C*-arylonitronów

W tym rozdziale zostanie omówiona kolejna klasa nitronów, w których grupę alkilofosforylową wprowadzono na atom azotu funkcji nitronowej. Można wśród nich wyróżnić kilka grup, z których najliczniejszą i najlepiej zbadaną są tzw. nitrony typu PPN **4**.

2.1. Synteza *N*-alkilofosforylowanych *C*-arylonitronów

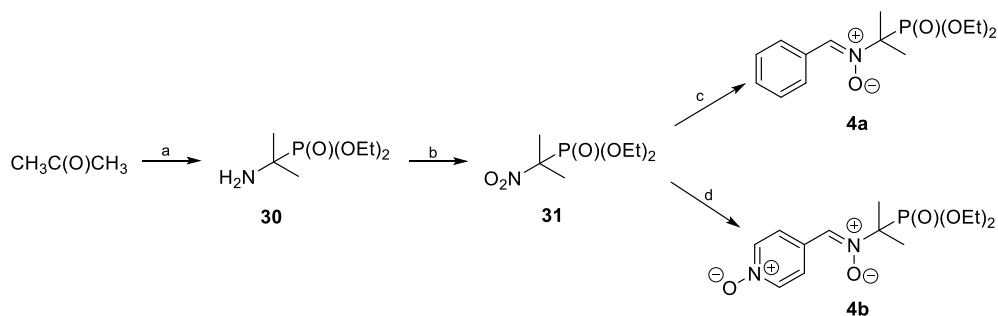
2.1.1. Nitrony typu PPN

Nitrony typu PPN stanowią dużą grupę związków, których strukturę można przedstawić za pomocą ogólnego wzoru **4** (Ryc. 8) (Cassien i in., 2016; Deletraz i in., 2019; Rizzi i in., 1997; Rizzi i in., 2002; Zeghdaoui i in. 1995).



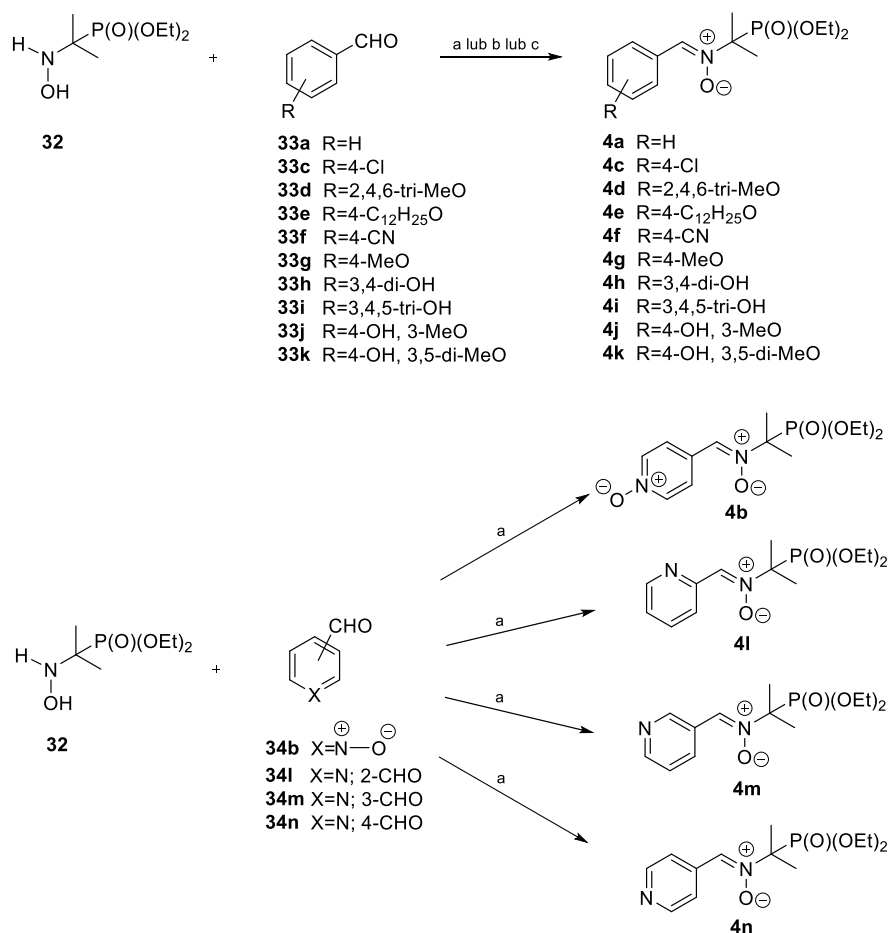
Rycina 8. Wzór ogólny nitronów typu PPN **4**.

Do tej pory opracowano dwie metody pozwalające otrzymać nitrony typu PPN **4** (Cassien i in., 2016; Deletraz i in., 2019; Rizzi i in., 1997; Rizzi i in., 2002; Roubaud i in., 1996; Zeghdaoui i in., 1995). W pierwszej z nich aceton poddano reakcji z fosforynem dietylowym, a otrzymany aminofosfonian **30** utleniono nadmanganianem potasu do (2-nitroprop-2-yl)fosfonianu dietylu **31**. Związek **31** poddano następnie redukcji cynkiem i otrzymano, w zależności od użytego aldehydu i zastosowanych warunków reakcji, nitron **4a** z grupą fenylową albo **4b** z fragmentem *N*-tlenku pirydyny (Schemat 7) (Zeghdaoui i in., 1995).



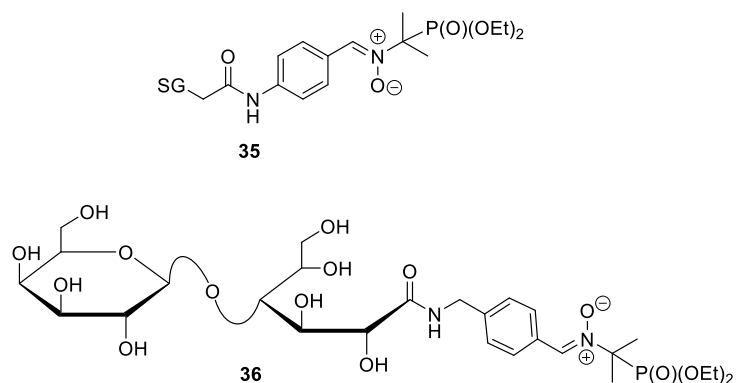
Schemat 7. Synteza nitronu **4a** oraz **4b**. Odczynniki i warunki reakcji: a) HP(O)(OEt)_2 , NH_3 ; b) KMnO_4 ; c) AcOH , EtOH , Zn , benzaldehyd, 30%; d) Zn , NH_4Cl , EtOH , *N*-tlenek 4-formylopirydyny, 27%.

Ze względu na niską wydajność przedstawionej powyżej metody, nie przekraczającej w ostatnim etapie 30%, opracowano alternatywną syntezę pozwalającą otrzymać związki **4a–n** z wydajnościami często sięgającymi 90%. Wykorzystuje ona reakcję [2-(*N*-hydroksyoamino)prop-2-yl]fosfonianu dietylu **32** z odpowiednimi aldehydami **33a**, **33c–k** oraz **34b** i **34l–n** (Schemat 8) (Cassien i in., 2016; Deletraz i in., 2019; Rizzi i in., 1997; Rizzi i in., 2002; Roubaud i in., 1996).



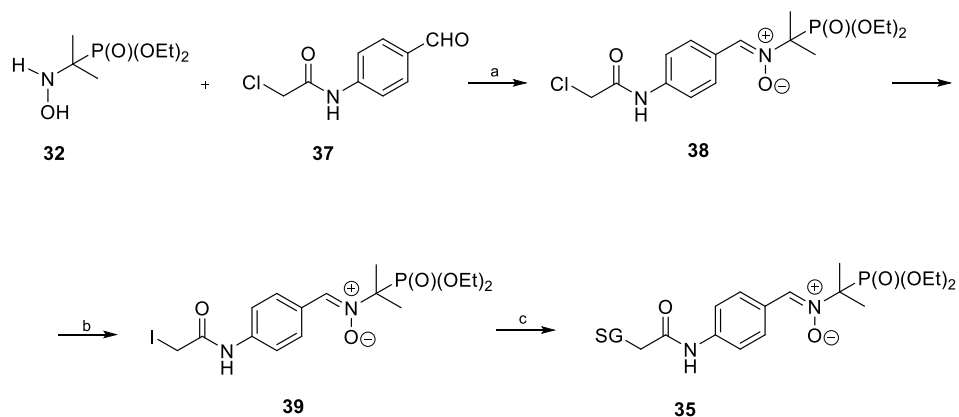
Schemat 8. Synteza nitronów **4a–n**. Odczynniki i warunki reakcji: a) EtOH, 55°C, 3 godz., ~90%; b) EtOH, 60°C, 22 godz., 93%; c) THF lub DCE, MgSO₄, 100°C, 4 godz., 35–70%.

Analogiczną strategię wykorzystano również w syntezie pochodnych PPN zawierających w swojej strukturze fragment związku naturalnego, np. glutationu **35** (Liu i in., 2011) albo cząsteczki cukru **36** (Ouari i in., 1998) (Ryc. 9).



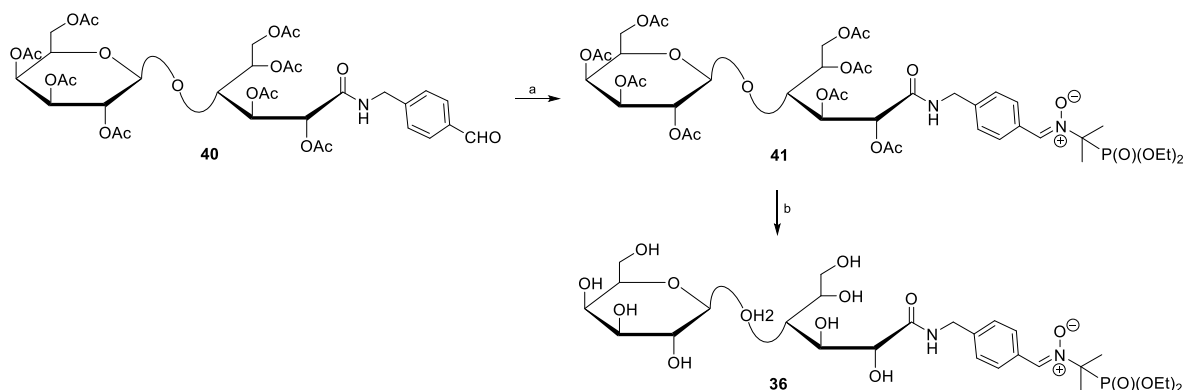
Rycina 9. Wzory nitronów **35** oraz **36**.

Nitron **35** otrzymano w trzypiętowej sekwencji reakcji: kondensacji aldehydu **37** z *N*-hydroksyloaminofosfonianem **32**, wymiany chlorowca w utworzonym związku **38** poprzedzającej nukleofilową substytucję w jodopochodnej **39** glutationem (Schemat 9) (Liu i in., 2011).



Schemat 9. Synteza nitronu **35**. Odczynniki i warunki reakcji: a) CHCl_3 , N_2 , temp. wrzenia, 4 godz., 91%; b) NaI , EtOH , temp. wrzenia, 80 godz., 61%; c) glutation, temp. pokojowa, bufor fosforanowy (0,1 M, $\text{pH} = 7,4$), bez dostępu światła, 25°C , 18 godzin, 100%.

W syntezie glikozydowej pochodnej **36** kluczową reakcją była kondensacja sfunkcjonalizowanego aldehydu **40** z *N*-hydroksyloaminofosfonianem **32**. Wyzdolenie finalnego związku **36** wymagało w końcowym etapie hydrolizy ugrupowań acetylowych (Schemat 10) (Ouari i in., 1998).



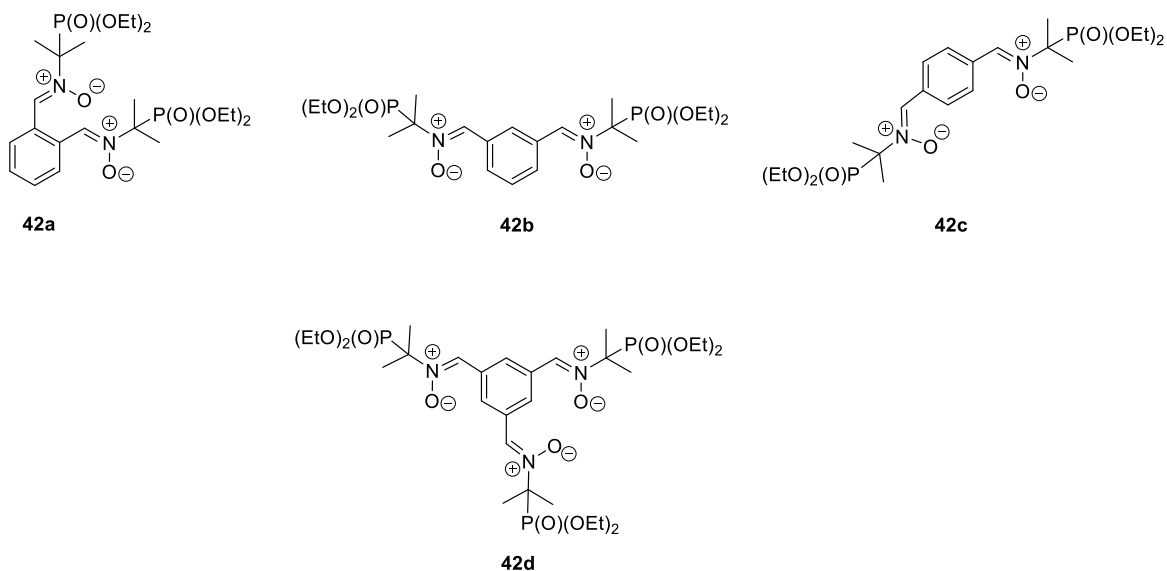
Schemat 10. Synteza nitronu **36**. Odczynniki i warunki reakcji:

a) (*N*-hydroksyloamino)-1-metyloetylofosfonian dietylu **32**, THF, argon, 40°C, 76 godz., 60%;

b) EtONa, EtOH, argon, 20°C, 20 min., 98%.

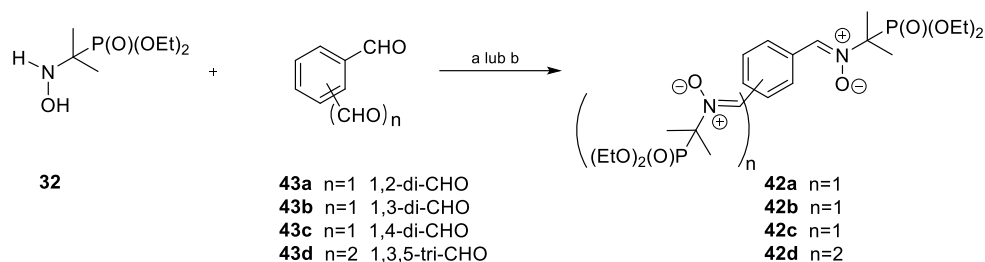
2.1.2. Poli(fosforylowane)nitrony 42

Poli(fosforylowane)nitrony **42** stanowią kolejną grupę nitronów, które zawierają w swojej strukturze dwie, a nawet trzy funkcje nitronowe. Przedstawicielami tej klasy związków są nitrony **42a–d** (Ryc. 10).



Rycina 10. Wzory nitronów **42a–d**.

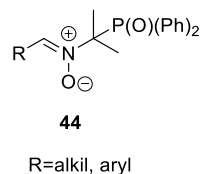
W syntezie nitronów **42a–d** wykorzystano reakcję kondensacji poliformylowych związków arylo-
wych **43a–d** z *N*-hydroksyoaminofosfonianem dietylu **32** (Schemat 11) (Roubaud i in., 2002).



Schemat 11. Synteza nitronów **42a–d**. Odczynniki i warunki reakcji: a) EtOH, 55°C, 3 godz., 64–89%;
b) benzen, 55°C, 3 godz., 65%.

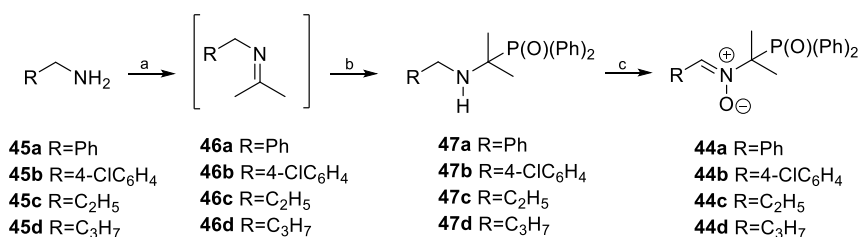
2.1.3. Fosforylowane nitrony, pochodne tlenków difenylofosfiny

Odrębną grupę fosforylowanych nitronów stanowią związki posiadające grupę difenylofosfinyłową
przyłączoną do *N*-końca. Do tej grupy związków należą nitrony o ogólnym wzorze **44** (Ryc. 11).



Rycina 11. Wzór ogólny nitronów **44**.

Nitrony **44a–d** otrzymano w sekwencji reakcji obejmującej syntezę imin **46a–d**, które bez oczysz-
czania przekształcono w odpowiednie tlenki α -aminodifenylofosfiny **47a–d**, utlenione w końcowym
etapie oksonem do związków **44a–d** (schemat 12) (Shioji i in., 2006).

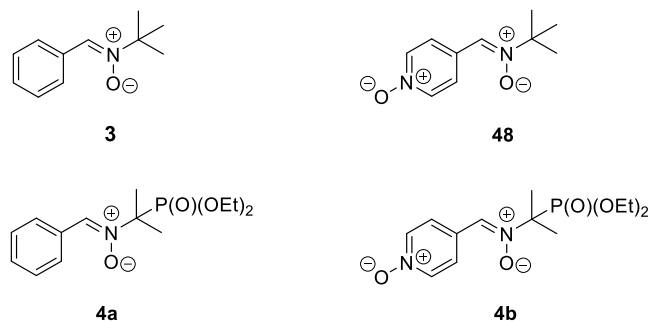


Schemat 12. Synteza nitronów **44a–d**. Odczynniki i warunki reakcji: a) aceton, SiO₂, promieniowanie
mikrofalowe, 1 min.; b) tlenek difenylofosfiny, SiO₂, promieniowanie mikrofalowe, 1 min., całkowita
wydajność po dwóch etapach: 63–69%; c) okson, aceton/NaHCO₃, temp. pokojowa, 1 godz., 34–37%.

2.2. Zastosowanie fosforylowanych nitronów

Wśród fosforylowanych nitronów na szczególną uwagę zasługują nitrony typu PPN **4a**. Najważniejsze
wśród nich – nitrony PPN **4a** oraz 4-PyOPN **4b** – zostały po raz pierwszy zsyntezowane już w latach

90. ubiegłego wieku. Jako fosforylowane analogi związku PBN **3** początkowo znalazły zastosowanie przede wszystkim jako pułapki spinowe w spektroskopii EPR. Wprowadzenie grupy dietoksyfosforylowej w znaczny sposób poprawiło właściwości nitronów w stosunku do ich niefosforylowanych analogów. Pierwsze badania wykazały, że addukty spinowe związków PPN **4a** oraz 4-PyOPN **4b** z wolnymi rodnikami wykazują znacznie dłuższe okresy półtrwania niż odpowiednie addukty nitronów PBN **3** oraz 4-PyOBN **48** (Ryc. 12).



Rycina 12. Wzory nitronów **3** i **48** oraz ich fosforylowanych analogów nitronów **4a** i **4b**.

Stwierdzono również, że addukty spinowe nitronu PPN **4a** oraz 4-PyOPN **4b** utworzone z rodnikami hydroksylowym oraz ponadtlenkowym są rozróżnialne w środowisku wodnym, co jest niemożliwe w przypadku PBN **3** oraz 4-PyOBN **48** (Zeghdaoui i in., 1995). W późniejszych latach badania nad adduktami rozszerzono o inne pochodne nitronów typu PPN **4**, które różniły się między sobą lipofilowością. Zmiana lipofilowości uzyskana poprzez wprowadzenie różnych podstawników w obrębie pierścienia aromatycznego **4a–n** (Cassien i in., 2016; Rizzi i in., 1997), a także przyłączenie dodatkowych cząsteczek, np. glutationu **35** (Liu i in., 2011) lub glikozydu **36** (Ouari i in., 1998), umożliwia wykorzystywanie ich jako pułapek spinowych w różnych środowiskach, zarówno w wodnym, jak również w organicznym lub lipidowym (Ouari i in., 1998; Rizzi i in., 1997). Nitrony mogą zatem znaleźć zastosowanie w badaniach *in vivo* (Rizzi i in., 2002). Dodatkową zaletą jest możliwość identyfikacji ich adduktów z różnymi rodnikami na podstawie widm EPR, co jest spowodowane obecnością sprzężenia pomiędzy niesparowanym elektronem oraz jądrem atomu fosforu (Rizzi i in., 1997). Wykazano, że poli(fosforylo)nitrony posiadające odpowiednio dwie, a nawet trzy grupy nitronowe (**42a–d**) wykazują znaczną lipofilowość, wyższą niż nitron DEPMPO **2a**, co ma wpływ na ich zdolność do przenikania przez błony komórkowe (Roubaud i in., 2002). Rolę pułapek spinowych mogą pełnić również nitrony **44a–d**, w których grupa dietoksyfosforylowa została zastąpiona grupą difenylofosforylową. Ich addukty spinowe utworzone z rodnikami hydroksylowym oraz ponadtlenkowym są wysoce trwałe, a ich widma EPR – łatwe w rozróżnieniu (Shioji i in., 2006). Wysoką trwałość z różnymi wolnymi rodnikami wykazują nitrony połączone z cząsteczką glutationu **35** lub glikozydu **36** (Liu i in., 2011; Ouari i in., 1998). Co więcej, nitrony **35** oraz **36** mogą nie tylko stanowić efektywne pułapki spinowe, ale także określać miejsce wytworzenia wolnych rodników w komórce. Wykazano, że związek **35** ze względu na obecność cząsteczki glutationu w swojej strukturze jest zdolny do wychwytywania anionorodnika w błonie PSII chloroplastów (Liu i in., 2011), natomiast związek **36** jest rozpoznawany przez lektyny (Ouari i in., 1998).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie potencjalnym zastosowaniem nitronów w leczeniu niektórych schorzeń, takich jak choroby neurodegeneracyjne, nowotwory czy urazy niedokrwienno-reperfuzyjne. Początkowo badano aktywność jedynie niefosforylowanych „liniowych” nitronów, wśród których PBN **3** wykazywał działanie hamujące we wstrząsach pourazowych (Novelli i in., 1985; Novelli i in., 1986) oraz działanie neuroprotektoryjne w udarze niedokrwinnym (Carney i in., 1991; Floyd, 1990). Natomiast analog NXY-059 **5** (znany obecnie pod nazwą OKN-007) wpływał na zmniejszanie się glejaka wielopostaciowego (Floyd i in., 2013; Garteiser i in., 2010; He i in., 2011; Towner i in., 2019). Wykazano również właściwości farmakologiczne niektórych nitronów typu PPN **4** będących fosforylowanymi analogami PBN **3**. Udowodniono m.in. właściwości kardioprotekcyjne nitronu PPN

4a oraz 4-PyOPN **4b** podczas urazów niedokrwienno-reperfuzyjnych serca. Przeprowadzono eksperyment na szczurach, w którym indukowano *in vivo* niedokrwienie mięśnia sercowego poprzez podwiązanie tętnicy wieńcowej lewej przedniej zstępującej przez 5 minut, a następnie przywracano przepływ krwi (reperfuzję) w ciągu 15 minut poprzez usunięcie zacisku. W trakcie eksperymentu kontrolowano podstawowe parametry, takie jak przedwczesne pobudzenie komorowe (VPB), częstoskurcz komorowy (VT), a także migotanie komór (VF). Przygotowano pięć grup zwierząt, którym podano odpowiednio: 0,9% NaCl (grupa kontrolna), PBN **3** (120 $\mu\text{mol/kg}$), PPN **4a** (120 $\mu\text{mol/kg}$), 4-PyOPN **4b** (120 $\mu\text{mol/kg}$) oraz lek przeciwarytmiczny amiodaron (14,7 $\mu\text{mol/kg}$). W eksperymencie stwierdzono, że podanie nitronów PPN **4a** oraz 4-PyOPN **4b** podczas reperfuzji początkowo wywoływało spadek, a następnie wzrost średniego ciśnienia tętniczego, co powodowało osiągnięcie odpowiednio 64 ± 16 oraz 54 ± 16 mmHg. Należy również zauważyć, że podanie nitronów **4a** oraz **4b** nie wyeliminowało całkowicie częstoskurczu komorowego (VT), jednak zmniejszyło występowanie migotania komór (VF), a także zmniejszyło śmiertelność do 33% w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 1) (Vergely i in., 2003).

Tabela 1. Całkowity czas trwania rytmu zatokowego podczas niedokrwienia i reperfuzji, całkowita liczba VPB, całkowity czas trwania VT, całkowity czas trwania VF oraz śmiertelność u szczurów.

Związek	Liczba- ność ba- danej grupy	Całkowity rytm zato- kowy (s)	Całkowity VPB (n)	Całkowity VT (s)	Całkowity VF (s)	Śmiertelność
0,9% NaCl	n=10	367 \pm 40	39,2 \pm 10,2	156 \pm 39	378 \pm 104	6/10
PBN	n=9	692 \pm 28	66,3 \pm 18,1	157 \pm 53	161 \pm 82	3/9
PPN	n=9	590 \pm 43	56,0 \pm 8,7	165 \pm 57	145 \pm 72	3/9
4-PyOPN	n=9	523 \pm 47	56,4 \pm 6,3	134 \pm 54	165 \pm 89	3/9
amiodaron	n=9	900 \pm 0	0	0	0	0/9

Wspomniane nitrony charakteryzowały się również słabym działaniem przeciwutleniającym, które wykazano poprzez badanie ich zdolności do ochrony β -allofikocyaniny przed utleniającym wpływem rodnika hydroksylowego (Vergely i in., 2003). Analizowano także właściwości przeciwutleniające nitronów typu PPN, związki **4h–k**, w których pierścień aromatyczny był sfunkcjonalizowany grupami hydroksylowymi lub metoksyłowymi. Użyto trzech metod: DPPH (z zastosowaniem rodnika 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylowego), TRAP (ang. *Total Reactive Antioxidant Potential*), a także badania zdolności do wychwytywania anionorodnika ponadtlenkowego w porównaniu z kwercetyną i TROLOX-em (Tab. 2) (Cassien i in., 2016).

Tabela 2. Właściwości przeciwutleniające nitronów **4h–k**.

Związek	DPPH EC ₅₀ [μM]	TRAP [TE] ^a	Wychwytywanie anionorodnika ^b IC ₅₀ [μM]
4h	22 \pm 1	2,22 \pm 0,16	0,2 \pm 0,1
4i	19 \pm 1	1,46 \pm 0,09	0,9 \pm 0,1
4j	254 \pm 9	1,91 \pm 0,1	28,6 \pm 1,1
4k	190 \pm 11	1,44 \pm 0,13	72,1 \pm 3,9
TROLOX	20 \pm 1	1,00	13,3 \pm 1,1
kwercetyna	13 \pm 2	6,28 \pm 0,06	0,5 \pm 0,1

^a TE– ekwiwalent TROLOX-u; ^b aktywność wychwytywania anionorodnika ponadtlenkowego określono poprzez oznaczenie chemiluminescencji lucygeniny

Ze względu na właściwości przeciwutleniające omawiane nitrony **4h–k** przebadano pod względem ich cytotoksyczności na linii komórkowej A549 (linia komórkowa gruczolakoraka płuc) poprzez oznaczenie wewnątrzkomórkowego ATP oraz z zastosowaniem testu FMCA i MTT. Zbadano również

ich cytotoksyczność w stosunku do bydłych komórek śródbłonka aorty (BAEC) poprzez pomiar LDH oraz z wykorzystaniem testu MTT (Tab. 3) (Cassien i in., 2016).

Tabela 3. Cytotoksyczność nitronów **4h-k** względem linii komórkowych A549 i BAEC.

Związek	A549			BAEC	
	FMCA	ATP	MTT	MTT	LDH
	IC ₅₀ (mM)			IC ₁₀ (mM)	Δ (%) ^a
4h	1,9±0,1	1,9±0,2	1,3±0,3	0,5±0,1	28±3
4i	0,6±0,1	0,6±0,1	0,7±0,2	0,2±0,1	29±1
4j	6,4±0,6	4,3±0,3	3,9±0,2	0,7±0,0	23±3
4k	12,0±0,5	14,8±0,6	15,3±0,2	2,6±0,1	8±4

^a Procent spadku całkowitej wewnątrzkomórkowej zawartości LDH w komórkach poddanych działaniu związków 4h–4k w stężeniu 15 mM przez 3 godziny.

Z danych przedstawionych w Tabeli 3 wynika, że związki **4h–k** wykazywały niską cytotoksyczność zarówno względem komórek nowotworowych, jak również komórek śródbłonka aorty. Można również zauważyć, że im więcej grup metoksylowych w cząsteczce, tym cytotoksyczność związku była niższa. Dodatkowo wykonano testy z wykorzystaniem SNP oraz Ach, które dowiodły, że nitrony **4h–k** powodują obniżenie napięcia naczyń krwionośnych (Tab. 4) (Cassien i in., 2016).

Tabela 4. Wpływ nitronów **4h–k** na relaksację pierścieni aorty śródbłonka (test SNP) oraz na relaksację pierścieni aorty śródbłonka wystawionych na działanie anionorodnika (Ach).

Związek	SNP		Ach	
	Pierścienie śródbłonka aorty		pEC ₅₀	R _{max} (%)
	czułość pEC ₅₀	relaksacja R _{max} (%)		
4h	9,01±0,06	103±3	7,39±0,05	93±1
4i	8,98±0,11	104±3	7,55±0,05	93±1
4j	8,99±0,03	100±3	7,27±0,04	86±1
4k	8,66±0,04	100±3	7,17±0,08	72±2

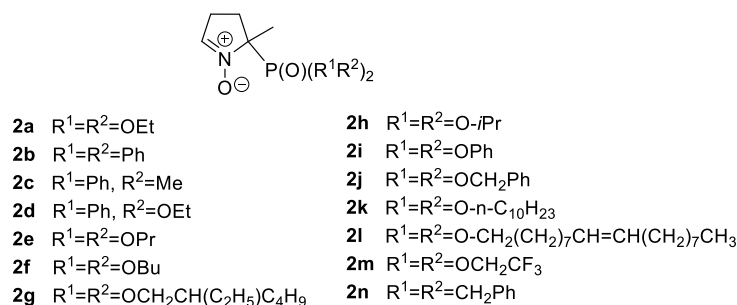
3. Synteza i zastosowanie cyklicznych fosforylowanych nitronów

W ostatnim rozdziale zostanie omówiona grupa fosforylowanych pochodnych nitronu DMPO **1** (Ryc. 1, str. 10), które ogólnie można zaklasyfikować jako cykliczne fosforylowane nitrony. Podstawę ich struktury stanowi pierścień pirolidyny, który jest sfunkcjonalizowany różnymi grupami funkcyjnymi. Pierwszym przedstawicielem tej grupy jest DEPMPO **2a** (Ryc. 1, str. 10), zsyntezowany w połowie lat 90. ubiegłego stulecia. W późniejszych latach otrzymano jego liczne analogi, różniące się grupą fosforylową (Chalier i Tordo, 2002; Clement i in., 2002; Frejaville i in., 1995; Nishizawa i in., 2007; Shioji i in., 2003; Shioji i in., 2007a; Shioji i in., 2007b; Stolze i in., 2000) oraz sfunkcjonalizowane w pozycji C3 (Chalier i in., 2014; Nsanzumuhire i in., 2004) lub C4 (Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2005a; Hardy i in., 2014), a także pochodne DEPMPO **2a**, w których grupa metylowa przy C5 została zastąpiona inną grupą funkcyjną (Huang i in., 2015; Karoui i in., 1999; Xu i in., 2002).

3.1. Synteza cyklicznych fosforylowanych nitronów

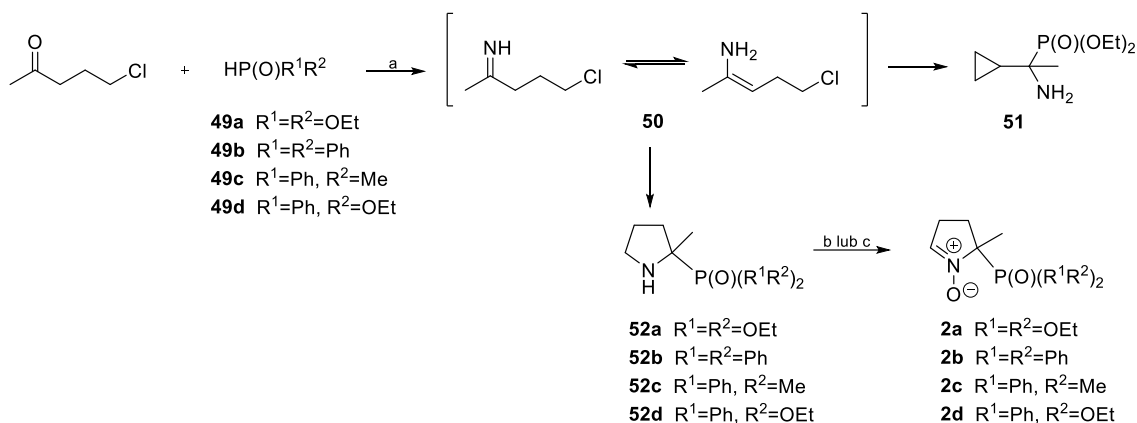
3.1.1. DEPMPO 2a oraz jego alkoksy-, alkilo- oraz arylofosforylowane pochodne

Do tej pory opracowano trzy metody pozwalające otrzymać nitron DEPMPO **2a** oraz jego pochodne **2b–n** różniące się resztą fosforylową (Ryc. 13) (Barbati i in., 1999; Chalier i Tordo, 2002; Clement i in., 2002; Frejaville i in., 1995; Nishizawa i in., 2007; Shioji i in., 2003; Shioji i in., 2007b; Stolze i in., 2000; Tuccio i in., 1995).



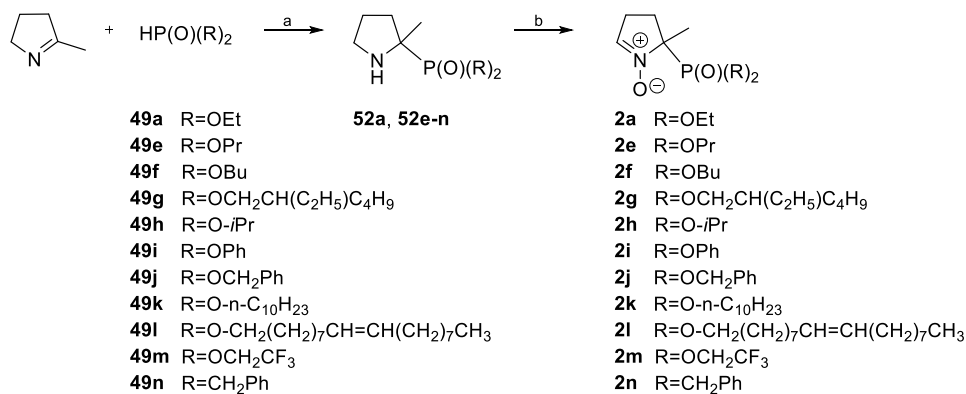
Rycina 13. Wzór ogólny nitronów **2a–n**.

Jedną z pierwszych metod syntezy nitronów **2a–d** wykorzystuje reakcję Kabachnika–Fieldsa 5-chloropentan-2-onu z fosforynem dietylowym **49a** lub odpowiednim tlenkiem fosfiny **49b–d** w obecności amoniaku. Uzyskane w ten sposób pochodne pirolidynowe **52a–d** utleniono do nitronów **2a–d** (Schemat 13) (Barbati i in., 1999; Frejaville i in., 1995; Nishizawa i in., 2007; Shioji i in., 2003; Shioji i in., 2007b). Ponadto udowodniono, że podczas syntezy nitronu **2a** jako produkt uboczny powstaje pochodna cyklopropanu **51**. Jej powstanie wynika z tautometrii iminowo-enaminowej związku **50** utworzonego w pierwszym etapie z 5-chloropentan-2-onu (Schemat 13) (Barbati i in., 1999).



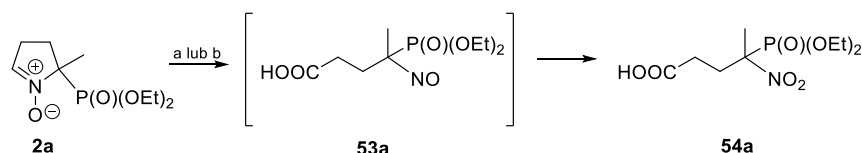
Schemat 13. Synteza nitronów **2a–d**. Odczynniki i warunki reakcji: a) NH₃, EtOH, 50–60°C, 4 godz., 62–63%; b) 70% *m*-CPBA, CHCl₃, -10°C, 1 godz., 30–49%; c) okson, NaHCO₃, aceton, temp. pokojowa, 1 godz., 47%.

Inna strategia wykorzystuje jako substrat 2-metylo-1-pirolinę, którą przekształcono w odpowiednie 2-metylopirolidyn-2-ylofosfoniany **52a**, **52e–m** lub fosfinian **52n**, a następnie utleniono do odpowiednich nitronów **2a** i **2e–n** (Schemat 14) (Barbati i in., 1999; Chalier i Tordo, 2002; Clement i in., 2002; Stolze i in., 2000).



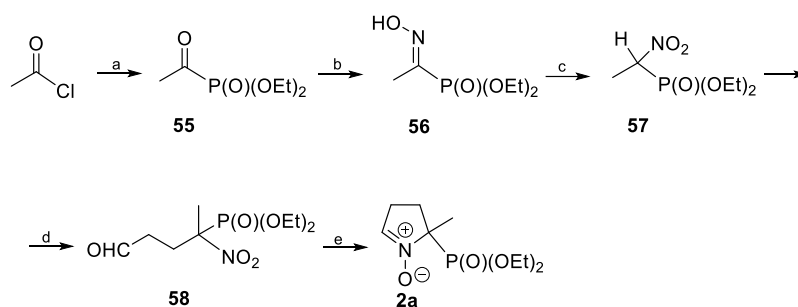
Schemat 14. Synteza nitronów **2a** i **2e–n**. Odczynniki i warunki reakcji: a) temp. pokojowa, 7–12 dni (4 godz. dla **52m**), 84–98%; b) 1 eq. okson, 23% lub 2 eq. PSPO, CHCl₃, 0°C, 83%; lub 2 eq. DMD, aceton, 0°C, 20 min., 81% lub H₂O₂/Na₂WO₄, 0°C, 48 godz., 60% lub *m*-CPBA, CHCl₃, -10°C, 1 godz., 58%.

Zaobserwowano, że w ostatnim etapie DEPMPO **2a** utleniał się w obecności kwasu *m*-chloronadbenzoesowego (*m*-CPBA) lub oksonu do związku **53a** oraz **54a** (Schemat 15). Jeżeli jako utleniacz wykorzystano okson, utworzyły się związki **53a** oraz **54a** z wydajnościami odpowiednio 22% oraz 9%. Natomiast jeżeli utleniaczem był *m*-CPBA, otrzymano jako produkty uboczne związek **53a** z wydajnością 14% oraz **54a** z wydajnością 8% (Barbati i in., 1999).



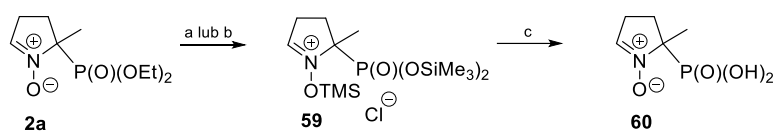
Schemat 15. Utlenianie DEPMPO **2a**. Odczynniki i warunki reakcji: a) 1 eq. okson, **53a**: 22% oraz **54a**: 9%; b) *m*-CPBA, CHCl₃, **53a**: 14% oraz **54a**: 8%.

Z tego powodu opracowano alternatywną metodę syntezy nitronu **2a** polegającą na odbywającej się w obecności Zn redukcyjnej cyklizacji γ -nitroaldehydu **58** otrzymanego z chlorku acetylu, w sekwencji reakcji obejmującej addycję fosforanu trietylowego, kondensację z hydroksyloaminą, a następnie utlenianie i addycję do akroleiny (Schemat 16) (Clement i in., 2002).



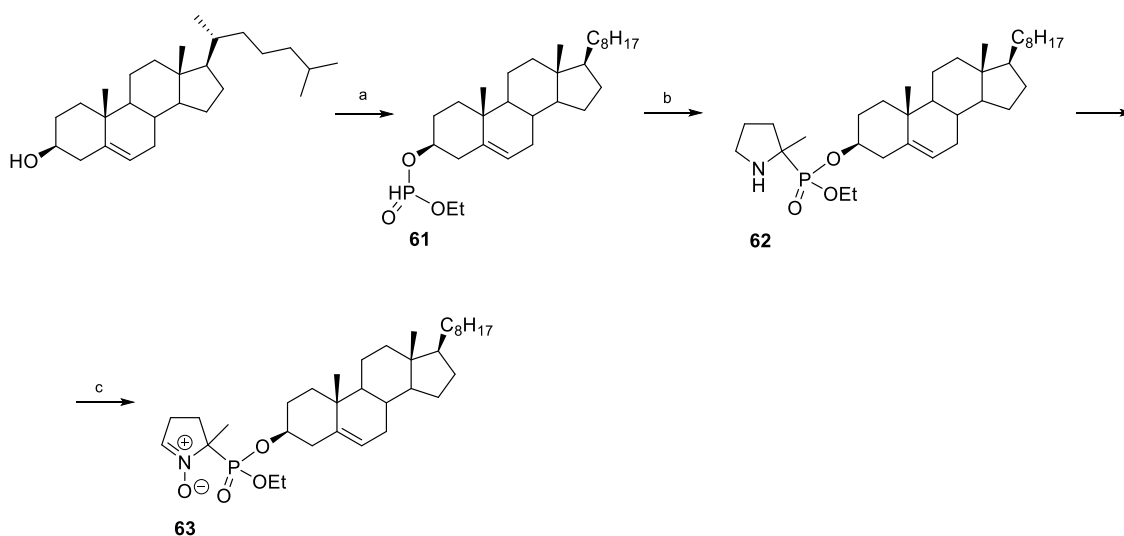
Schemat 16. Synteza nitronu **2a**. Odczynniki i warunki reakcji: a) $\text{P}(\text{OEt})_3$, 25°C , 24 godz., 99%; b) NH_3OHCl , pirydyna, EtOH, 25°C , 12 godz., 78%; c) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , 25°C , 5 dni, 76%; d) akroleina, Et_3N , MeCN, 25°C , 2 godz., 99%; e) Zn, CH_3COOH , EtOH/ H_2O , 10°C , 3 godz., 82%.

Nitron DEPMPPO **2a** przeprowadzono w wolny kwas fosfonowy **60** w dwuetapowej reakcji obejmującej przekształcenie związku **2a** w ester bistrimetylosililowy **59**, a następnie hydrolizę estru **59** do kwasu **60** (Schemat 17) (Clement i in., 2001).



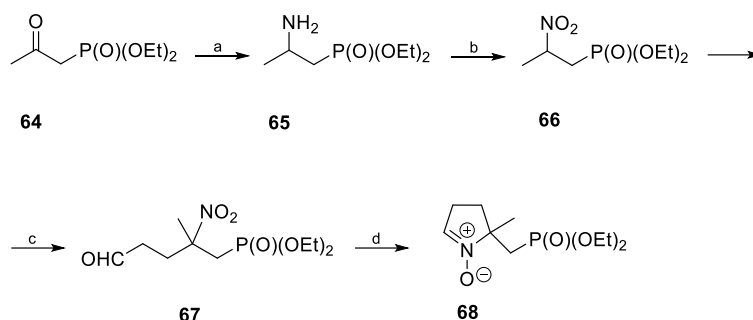
Schemat 17. Synteza nitronu **60**. Odczynniki i warunki reakcji: a) jodotrimetylosilan, CH_2Cl_2 , temp. pokojowa, 4,5 godz.; b) bromotrimetylosilan, CH_2Cl_2 , 30°C , 20 godz.; c) aceton, H_2O , całkowita wydajność syntezy: 76%.

Otrzymano również nitron **63**, w którym jedna grupa etoksylova została zastąpiona fragmentem cholesterolu. Strategię syntezy przedstawiono na Schemacie 18. W kluczowym etapie wykorzystuje się addycję fosforynu **61**, pochodnej cholesterolu, do cyklicznej iminy, a następnie utlenianie otrzymanej pirolidyny **62** do nitronu **63** (Hardy i in., 2005b).



Schemat 18. Synteza nitronu **63**. Odczynniki i warunki reakcji: a) PCl_3 , EtOH, CH_2Cl_2 , 10°C , 1 godz., 75%; b) 2-metylo-1-pirolina, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, temp. pokojowa, 5 dni, 66%; c) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{WO}_4$, EtOH, H_2O , 0°C , 2 dni, 45%.

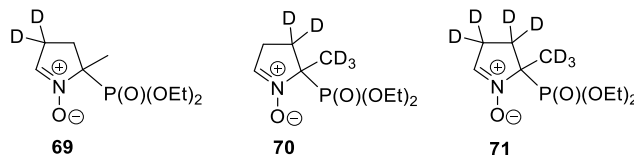
Z kolei nitron **68**, będący homologiem związku **2a**, otrzymano w sekwencji reakcji przedstawionej na Schemacie 19. Jako substratu użyto (2-oksopropyl)fosfonian dietylu **64**, który poddano aminowaniu redukcyjnemu, a powstałą aminę **65** utleniono do nitrozwiązku **66**, przekształconego następnie w γ -nitroaldehid **67** poddany w końcowym etapie redukcyjnej cyklizacji (Roubaud i in., 1997).



Schemat 19. Synteza nitronu **68**. Odczynniki i warunki reakcji: a) AcONH_4 , NaBH_3CN , MeOH, temp. pokojowa, 72 godz., 86%; b) 75% *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , temp. wrzenia, 16 godz., 69%; c) akroleina, Triton B, MeCN, 0°C , 2 godz., a następnie 10°C , 20 godz., 64%; d) Zn, AcOH, EtOH, 2°C , 15 godz., 30%.

3.1.2. Deuterowane pochodne DEPMPO

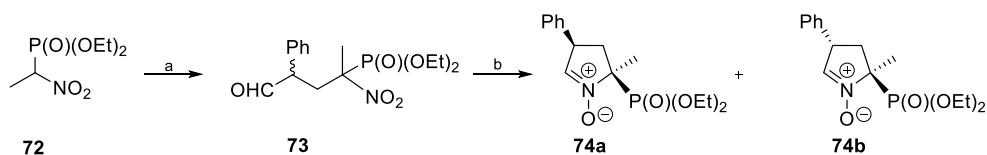
Kolejną grupę nitronów stanowią pochodne DEPMPO **2a**, w których niektóre atomy wodoru zostały zastąpione przez ich izotop ^2D . Do tej pory zsyntezowano trzy deuterowane pochodne, tj. DEPMPO- d_2 **69**, DEPMPO- d_5 **70**, a także DEPMPO- d_7 **71** (Ryc. 14). W ich syntezie wykorzystano metody analogiczne do opisanych w rozdziale 3.1.1, przy czym zastosowano deuterowane pochodne analogicznych substratów, jak i deuterowane odczynniki (Clement i in., 2003).



Rycina 14. Struktury deuterowanych nitronów DEPMPO- d_2 **69**, DEPMPO- d_5 **70**, a także DEPMPO- d_7 **71**.

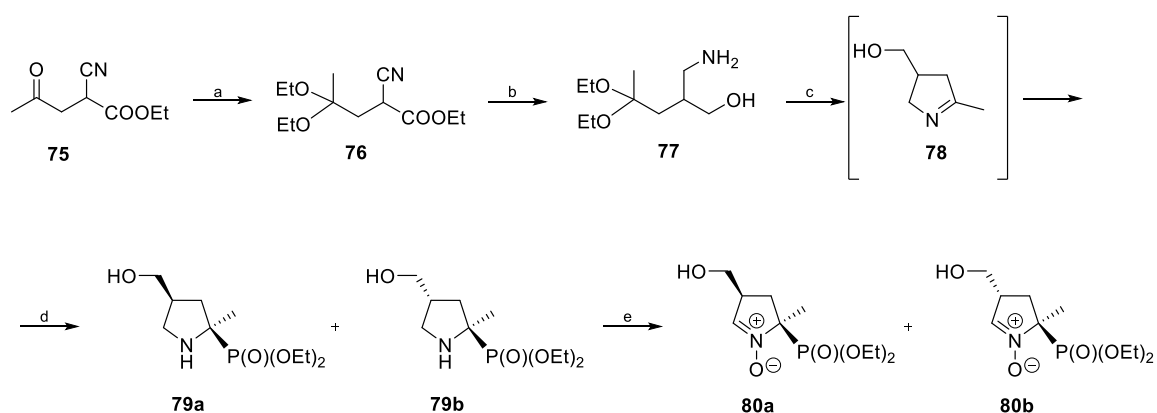
3.1.3. Pochodne DEPMPO 2a sfunkcjonalizowane przy C3

Modyfikowano również podstawową strukturę cyklicznych fosforylowanych nitronów **2** poprzez wprowadzanie dodatkowych grup funkcyjnych w pozycji C3. Otrzymano diastereoizomeryczne nitrony 3-PhDEPMPO **74a** oraz 3-PhDEPMPO **74b**, zawierające grupę fenyłową przy C3 w pierścieniu pirolidyny. Strategia syntezy tego typu układów w kluczowym etapie wykorzystuje reakcję redukcyjnej cyklizacji diastereoizomerycznych γ -nitroaldehidów **73**, w wyniku której otrzymano mieszaninę diastereoizomerycznych nitronów 3-PhDEPMPO **74a** oraz 3-PhDEPMPO **74b**. Uzyskane diastereoizomery rozdzielono chromatograficznie, a następnie poprzez krystalizację wydzielono je z wydajnościami odpowiednio 25% i 27% (Schemat 20). Wprowadzenie dużego podstawnika, jakim jest grupa fenyłowa, w pozycję C3 w izomerze **74a** wpłynęło w znaczący sposób na ograniczenie pseudorotacji pierścienia (Nsanzumuhire i in., 2004).



Schemat 20. Synteza nitronu **74**. Odczynniki i warunki reakcji: a) 2-fenylopropenal, Et₃N, MeCN, 25°C, 2 godz., 99%; b) Zn, NH₄Cl, THF/H₂O, 0°C, 1 godz., a następnie 25°C, 6 godz., **74a**: 25%, **74b**: 27%.

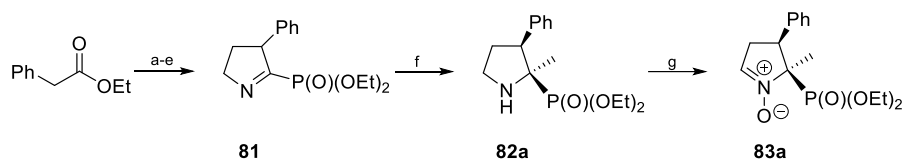
Przeprowadzono syntezę nitronów 3-HMDEPMPO **80** sfunkcjonalizowanych w pozycji C3 grupą hydroksymetylową. Jako substrat wykorzystano 2-cyano-4-oksopentanian etylu **75**, który przekształcono w acetal **76**, aby bezpośrednio wykonać redukcję funkcji nitrylowej, a następnie cyklizację otrzymanego aminoalkoholu **77** do podstawionej 2-metylo-1-piroliny **78**. W reakcji związku **78** z fosforem dietylowym powstaje mieszanina dwóch diastereoizomerów **79a** oraz **79b**, którą w warunkach utleniających przekształcono w nitrony **80a** oraz **80b** (Schemat 21) (Chalier i in., 2014).



Schemat 21. Synteza nitronu **80**. Odczynniki i warunki reakcji: a) HC(OEt)₃, Amberlist 15, CH₂Cl₂, 0-5°C, 20 godz., 99%; b) LiAlH₄, THF, 25°C, 3 godz., następnie 57°C, 1 godz., 36%; c) 1. 5% HCl, THF/H₂O (5:1), temp. pokojowa, 3 godz.; 2. K₂CO₃, THF/H₂O (5:1), temp. pokojowa, 2 godz.; d) HP(O)(OEt)₂, temp. pokojowa, 7 dni, 40%; e) H₂O₂/Na₂WO₄, MeOH/H₂O (2:1), 4°C, 48 godz., 32% (**80a**: 3%, **80b**: 97%).

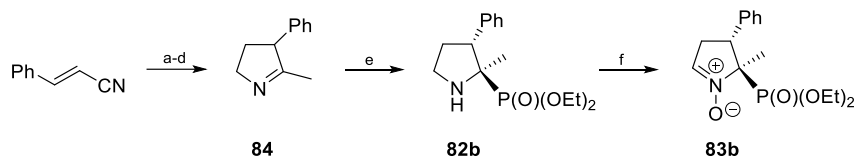
3.1.4. Pochodne DEPMPO 2a sfunkcjonalizowane w pozycji C4 pierścienia pirolidyny

Liczną grupę cyklicznych nitronów stanowią pochodne DEPMPO **2a** sfunkcjonalizowane w pozycji C4. Pierwszym przedstawicielem tej grupy był nitron 4-PhDEPMPO **83**, przy czym znane są oba diastereoizomery, odpowiednio **83a** oraz **83b** (Hardy i in., 2005a). Opracowano diastereospecyficzne metody otrzymywania związków **83**. W przypadku syntezy diastereoizomeru **83a** jako substrat wykorzystano fenylloctan etylu, który w sekwencji reakcji przekształcono w 3-fenyl-2-dietoksyfosforylo-1-pirolinę **81**. Następnie reakcja związku **81** z bromkiem fenylomagnezowym w obecności eteratu trójfluorku boru prowadziła do utworzenia pirolidyny **82a**, którą w końcowym etapie utleniono do nitronu **83a** (Schemat 22) (Hardy i in., 2005a).



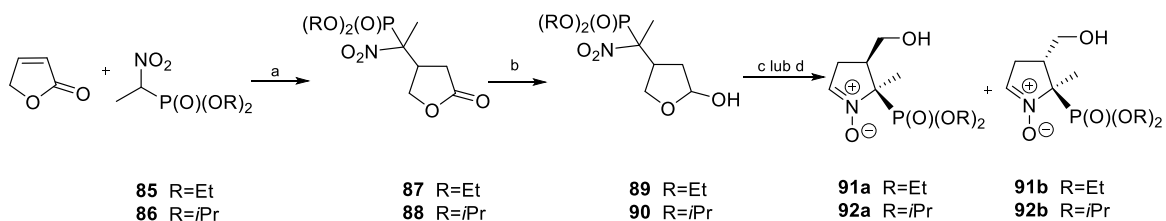
Schemat 22. Synteza nitronu 4-PhDEPMPO **83a**. Odczynniki i warunki reakcji: a) LDA, THF, -78°C , 1 godz., następnie 1-azydo-2-jodoetan, temp. pokojowa, 12 godz., 59%; b) 1M NaOH, MeOH, temp. pokojowa, 3 godz., 100%; c) $(\text{COCl})_2$, CH_2Cl_2 , temp. pokojowa, 1 godz., a następnie temp. wrzenia, 2 godz.; d) $\text{P}(\text{OEt})_3$, CH_2Cl_2 , temp. pokojowa, 15 godz., 100%; e) PPh_3 , Et_2O , temp. pokojowa, 16 godz., 95%; f) MeMgBr , $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, -78°C , 4 godz., 76%; g) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{WO}_4$, $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 0°C , 50 godz., 64%.

Natomiast w syntezie diastereoizomeru **83b** jako substrat wykorzystano *trans*-cynamonitryl, który w sekwencji reakcji przekształcono w 3-fenyl-2-metylo-1-pirolinę **84**. W kolejnym etapie reakcja piroliny **84** z fosforem dietylu prowadziła do utworzenia pirolidyny **82b**, którą następnie utleniono do nitronu **83b** (Schemat 23) (Hardy i in., 2005a).



Schemat 23. Synteza nitronu 4-PhDEPMPO **83b**. Odczynniki i warunki reakcji: a) Mg, $\text{Ac}_2\text{O-TMSCl}$, DMF, 70%; b) CSA, glikol etylenowy, toluen, temp. wrzenia, 8 godz., 91%; c) LiAlH_4 , THF, 0°C , 2 godz., a następnie temp. pokojowa, 7 godz., 85%; d) 3M HCl, THF/ H_2O , temp. pokojowa, 4 godz., następnie K_2CO_3 , temp. pokojowa, 1 godz., 93%; e) $\text{HP}(\text{O})(\text{OEt})_2$, $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, temp. pokojowa, 7 dni, 54%; f) $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{WO}_4$, $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 0°C , 48 godz., 80%.

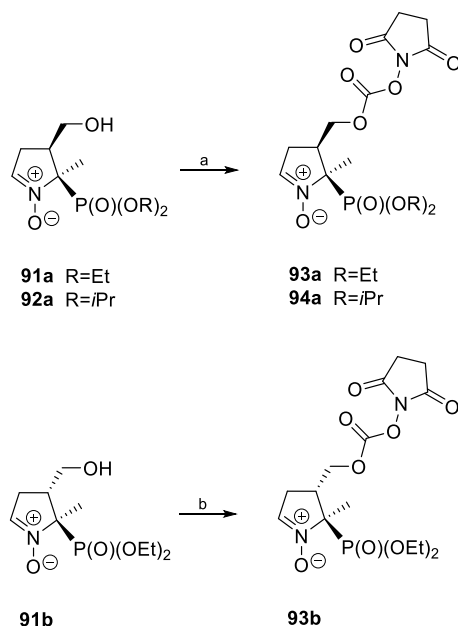
Zaprojektowano również cykliczne fosforylowane nitrony **91a** i **91b** sfunkcjonalizowane w pozycji C4 grupą hydroksymetylową, a także ich analogi **92a** oraz **92b**, posiadające grupę diizopropoksyfosforylową. Substratem w syntezie omawianych nitronów był 2(5*H*)-furanon, który w reakcji z odpowiednimi fosfonianami **85** i **86** przekształcono w podstawione tetrahydrofuran-2-ony **87** i **88**. Redukcja grupy karbonylowej w związkach **87** i **88** prowadziła do odpowiednich hemiacetalowych pochodnych **89** i **90**, które w wyniku redukcji przekształcono w finalne nitrony **91** i **92** powstające jako odpowiednie mieszaniny diastereoizomerów (Schemat 24) (Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2014).



Schemat 24. Synteza nitronów **91a** i **91b** oraz **92a** i **92b**. Odczynniki i warunki reakcji: a) PBU_3 , cykloheksan/ CH_2Cl_2 (10:1), temp. pokojowa, 66 godz., 75–80%; b) DIBAL-H, CH_2Cl_2 , -78°C , 3 godz., 50–75%; c) Zn, NH_4Cl , THF/ H_2O , -5°C , 2 godz., a następnie temp. pokojowa, 6 godz., 64%; d) Zn, NH_4Cl , THF/ H_2O , -5°C , 2 godz., a następnie temp. pokojowa, 6 godz., 60%.

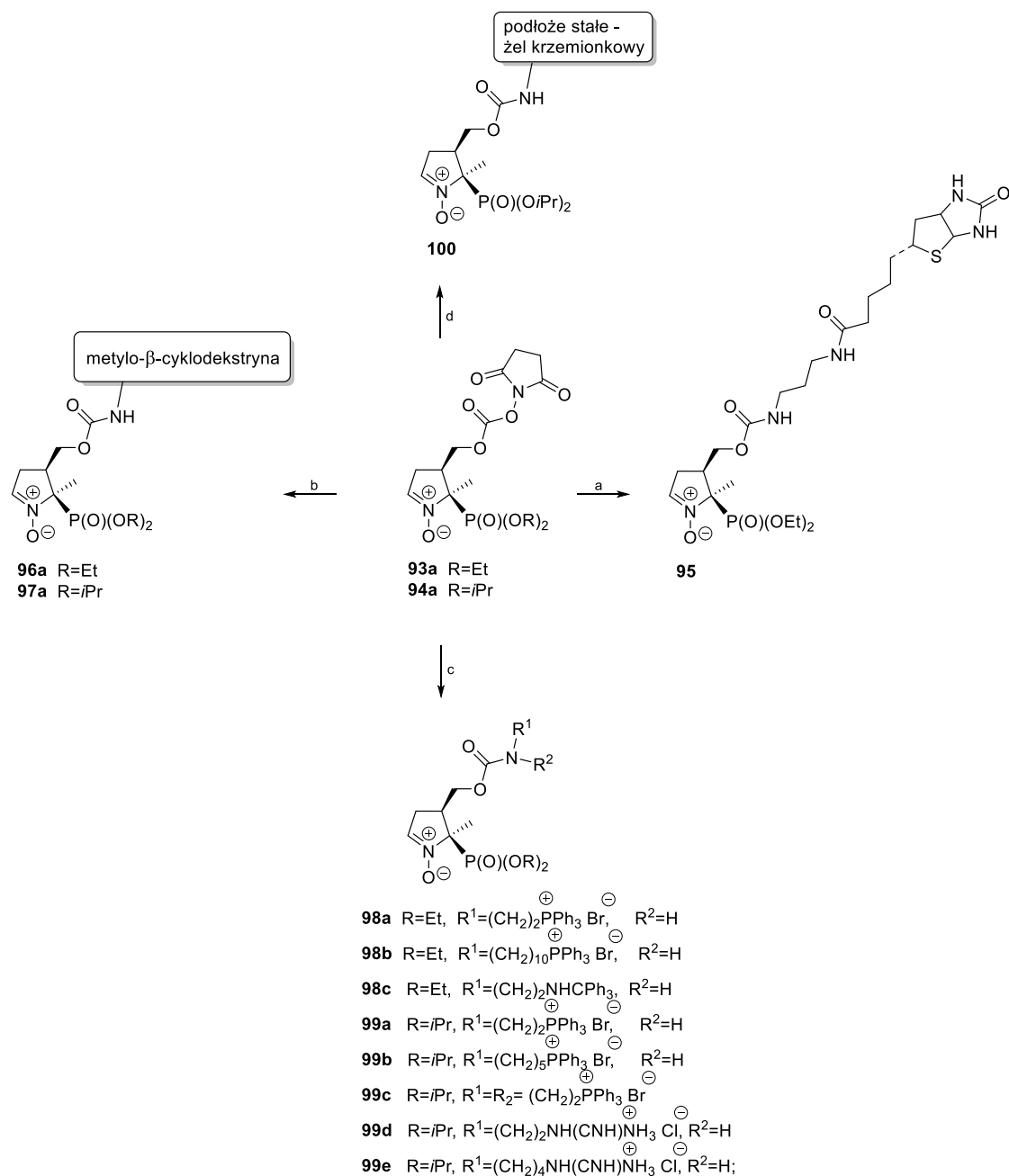
W reakcji izomerów **91a** i **92a** z węglanem disukcynoimidylu w obecności trójetyloaminy otrzymano odpowiednie nitrony **93a** oraz **94a** z wysokimi wydajnościami sięgającymi 95%. Podczas gdy

analogiczna reakcja diastereoizomerycznego związku **91b** w obecności imidazolu prowadziła do utworzenia nitronu **93b** z niską wydajnością (20%) (Schemat 25) (Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2014).



Schemat 25. Synteza nitronów **93a** i **94a** oraz **93b**. Odczynniki i warunki reakcji: a) węgiel disukcynoimidylu, NEt₃, MeCN, temp. pokojowa, 36 godz., 95%; b) węgiel disukcynoimidylu, imidazol, MeCN, temp. pokojowa, 36 godz., 20%.

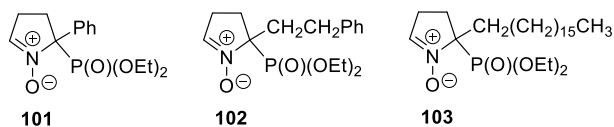
Zaletą nitronów **93a** oraz **94a** jest obecność dobrej grupy opuszczającej, która umożliwia ich dalszą funkcjonalizację. Z tego względu nitrony **93** i **94** stanowią ważne prekursory w syntezie innych pochodnych sfunkcjonalizowanych przy C4 (Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2014). Otrzymano serie nowych nitronów (Schemat 26), wśród których na uwagę zasługują: związek **95** zawierający cząsteczkę biotyny (Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2007a), pochodne **96a** (Hardy i in., 2009) oraz **97a** zawierające cząsteczkę β-cyklodekstryny (Abbas i in., 2014), pochodne **98a–c**, **99a–c** zawierające grupę trifenylofosfoniową (Abbas i in., 2014; Beziere i in., 2014; Hardy i in., 2007a; Hardy i in., 2007b; Hardy i in., 2014) oraz guanidynowe pochodne **99d** i **99e** (Hardy i in., 2014), a także nitron **100** osadzony na żelu krzemionkowym (Besson i in., 2019).



Schemat 26. Synteza nitronów **95**, **96a**, **97a**, **98a–c**, **99a–e** oraz **100**. Odczynniki i warunki reakcji:
 a) trifluoroocetan biotyloamidopropylamoniowy, Et₃N, DMSO, temp. pokojowa, 24 godz., 39%;
 b) TRIMEB-NH₂×HCl, Et₃N, CH₂Cl₂, temp. pokojowa, 80%; c) R¹R²NH, Et₃N, CH₂Cl₂, temp. pokojowa, 3–18 godz., 50–91% ; d) SBA₁₅-NH₂, Et₃N, MeCN, temp. pokojowa, 12 godz.

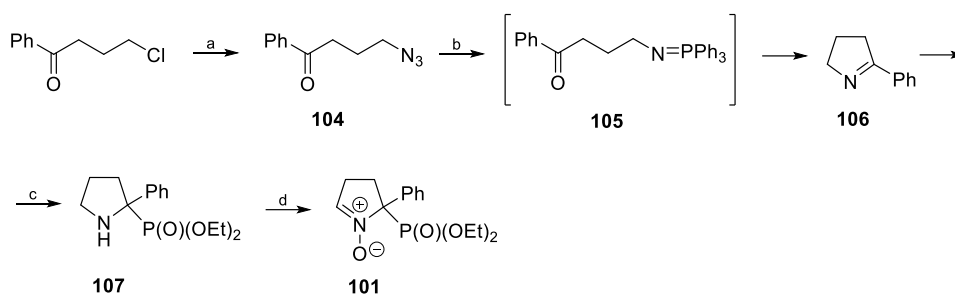
3.1.5. Pochodne DEPMPO 2a sfunkcjonalizowane w pozycji C5 pierścienia pirolidyny

Kolejną grupę fosforylowanych cyklicznych nitronów stanowią pochodne DEPMPO **2a**, w których grupę metylową w pozycji C5 zastąpiono innym podstawnikiem. Wśród nich można wyróżnić nitrony **101** (Karoui i in., 1999), **102** (Xu i in., 2002) oraz **103** (Huang i in., 2015) (Ryc. 15).



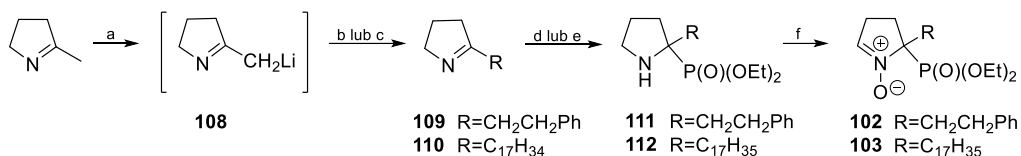
Rycina 15. Wzory nitronów **101**, **102** oraz **103**.

W syntezie nitronu **101** jako substrat wykorzystano 4-chloro-1-fenylobutan-1-on, który w sekwencji reakcji obejmującej substytucję nukleofilową (S_N2) anionem azydowym, redukcję, cyklizację oraz addycję fosforynu dietylowego przekształcono do pirolidynofosfonianu **107**, który utleniono w końcowym etapie kwasem *m*-chloronadbenzoesowym (*m*-CPBA) do nitronu **101** (Schemat 27) (Karoui i in., 1999).



Schemat 27. Synteza nitronu **101**. Odczynniki i warunki reakcji: a) NaN_3 , DME, 75°C , 16 godz., 86% (surowa mieszanina); b) PPh_3 , Et_2O , temp. pokojowa, 12 godz., 70%; c) HP(O)(OEt)_2 , $\text{Et}_2\text{O} \times \text{BF}_3$, temp. pokojowa, 24 godz., 60%; d) *m*-CPBA, CHCl_3 , -5°C , 1 godz., 30%.

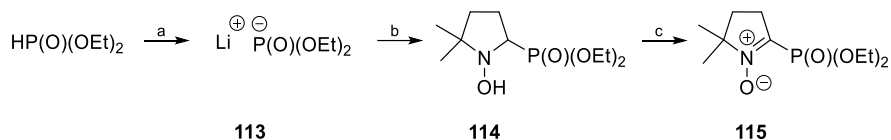
Natomiast do syntezy nitronów **102** i **103** jako substrat wykorzystano 2-metylo-1-pirolinę, którą w pierwszym etapie przekształcono w reaktywny związek litoorganiczny **108** (Huang i in., 2015; Xu i in., 2002), a następnie poddano reakcji z bromkiem benzylu prowadzącej do piroliny **109** (Xu i in., 2002) lub poddano reakcji z 1-jodoheksadekanem dającej pirolinę **110** (Huang i in., 2015). W wyniku addycji fosforynu dietylowego do odpowiednich pirolin **109** i **110**, a następnie reakcji utleniania otrzymano nitrony **102** i **103** z wydajnościami odpowiednio 34,7% i 14,7% (Schemat 28) (Huang i in., 2015; Xu i in., 2002).



Schemat 28. Synteza nitronów **102** oraz **103**. Odczynniki i warunki reakcji: a) *n*-BuLi, THF, -78°C , 30 min.; b) bromek benzylu, THF, -78°C , 1 godz., 68%; c) 1-jodoheksadekan, THF, -78°C , 3 godz., 60%; d) HP(O)(OEt)_2 , temp. pokojowa, 7 dni, 90%; e) HP(O)(OEt)_2 , THF, temp. wrzenia, 12 godz., 80%; f) *m*-CPBA, CHCl_3 , -10°C , 1–3 godz., 14,7–34,7%.

3.1.6. Pochodne DEPMPO 2a z grupą dietoksyfosforylową w pozycji C2 pierścienia pirolidyny

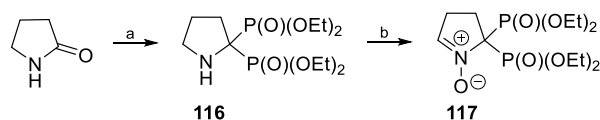
Do tej pory opisano jeden nitron posiadający grupę dietoksyfosforylową w pozycji C2, tj. nitron **115**, którego syntezę przedstawiono na schemacie 29. Addycja soli litowej fosforynu dietylowego **113** do nitronu DMPO **1** prowadzi do utworzenia hydroksyloaminy **114**, którą następnie przekształcono w pochodną **115** (Janzen i Zhang, 1995).



Schemat 29. Synteza nitronu **115**. Odczynniki i warunki reakcji: a) LDA, CH₂Cl₂, -20°C, 15 min.; b) DMPO **1**, CH₂Cl₂, -60°C do -20°C, 3,5 godz., a następnie H₂O, 55%; c) Cu(OAc)₂·xH₂O, NH₄OH, EtOH, ok. 10 min., 29%.

3.1.7. Polifosforylowane pochodne DEPMPO 2a

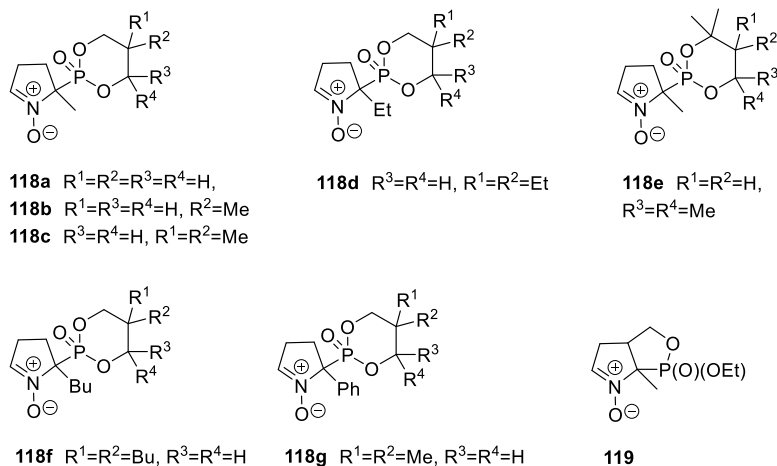
Kolekcje fosforylowanych nitronów uzupełnia difosforylowa pochodna **117** otrzymana z 2-pirolidonu w dwuetapowej reakcji addycji fosforanu trietylowego, a następnie utlenienia powstałego bisfosfonianu **116** do nitronu **117** (Olive i in., 1998).



Schemat 30. Synteza nitronu **117**. Odczynniki i warunki reakcji: a) P(O)(OEt)₃, POCl₃, temp. pokojowa, 5 godz., następnie NH₄OH, 47%; b) okson, aceton, CH₂Cl₂, nBu₄N⁺HSO₄⁻, 0,1 M Na₂HPO₄ bufor pH=7,5–8,0°C, 1 godz., 11%.

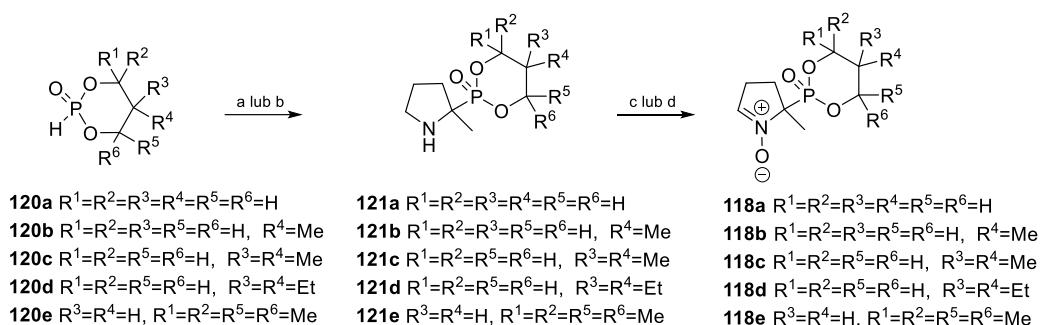
3.1.8 Cykliczne analogi DEPMPO 2a

Na szczególną uwagę zasługują nitrony **118a–g** (Gosset i in., 2011; Kamibayashi i in., 2006; Sueishi i in., 2015) oraz **119** (Ryc. 16) (Chalier i in., 2014) pochodne DEPMPO **2a**.



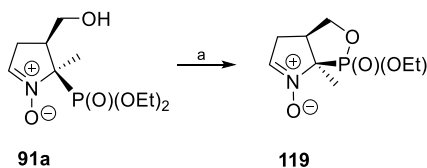
Rycina 16. Wzór ogólny nitronów **118a–g** oraz nitronu **119**.

Synteza nitronów **118a–e** przebiegała analogicznie jak nitronu **2a** (Schemat 14, str. 24). Jako substraty wykorzystano 2-metylo-1-pirolinę i odpowiednie cykliczne fosforyny **120a–e** (Schemat 31) (Gosset i in., 2011; Kamibayashi i in., 2006).



Schemat 31. Synteza nitronu **118a–e**. Odczynniki i warunki reakcji: a) 2-metylo-1-pirolina, toluen, temp. pokojowa, 4–6 godz., 16–80%; b) 2-metylo-1-pirolina, CH₂Cl₂, temp. pokojowa, 48,2%; c) H₂O₂, 5% Na₂WO₄, H₂O, 0°C, 48 godz., 50–90%; d) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, 49%.

Natomiast bicykliczny nitron **119** otrzymano w reakcji cyklizacji **91a** (Schemat 32). Niestety okazał się on nietrwały i ulegał rozkładowi po kilku tygodniach pomimo przechowywania w -18°C oraz w atmosferze gazu obojętnego (Chalier i in., 2014).



Schemat 32. Synteza nitronu **119**. Odczynniki i warunki reakcji: a) NaH, DME, temp. pokojowa, 16 godz., 45%.

3.2 Zastosowanie cyklicznych fosforylowanych nitronów

Jednym z ważniejszych związków należących do cyklicznych fosforylowanych nitronów jest DEPMPO **2a**, który charakteryzuje się znacznie większą trwałością po utworzeniu adduktu spinowego z anionorodnikiem ponadtlenkowym w warunkach fizjologicznych niż DMPO **1**, co w znaczny sposób ułatwia detekcję wolnych rodników (Tuccio i in., 1995). Wykazano również, że produkty rozkładu adduktu spinowego DEPMPO **2a** w przeciwieństwie do DMPO **1** nie wykazują właściwości paramagnetycznych, w związku z czym ich obecność nie zakłóca widm EPR (Tuccio i in., 1995). Dodatkowo obecność fosforowej stałej sprzężenia, która jest uzależniona od konformacji 5-członowego pierścienia, pozwala na łatwe przyporządkowanie widm EPR (Frejaville i in., 1995). Te liczne zalety spowodowały, że z czasem DEPMPO **2a** wyparł nitron DMPO **1** w detekcji wolnych rodników i już w połowie lat 90. ubiegłego wieku był z powodzeniem stosowany do wykrywania wolnych rodników wytwarzanych podczas urazów niedokrwienno-reperfuzyjnych (Frejaville i in., 1995) oraz w siatkówce oka królików podczas nadciśnienia ocznego (Muller i in., 1997). Jednak DEPMPO **2a** ma pewne ograniczenia, ponieważ ze względu na swój hydrofilowy charakter nie może być stosowany do wykrywania wolnych rodników w innym środowisku (Stolze i in., 2000). W związku z tym na przestrzeni lat powstało wiele cyklicznych fosforylowanych nitronów, różniących się między sobą budową. Jedne z pierwszych modyfikacji polegały na wprowadzeniu innych grup fosforylowych w celu otrzymania bardziej lipofilowych pułapek spinowych. Pierwszymi pochodnymi DEPMPO **2a** były nitrony **2e–n**, których addukty spinowe mają zbliżone okresy półtrwania w porównaniu z adduktami spinowymi DEPMPO **2a**, ale wykazują już znacznie większą lipofilowość niż DEPMPO **2a**. W związku z tym mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako pułapki spinowe w lipidowym środowisku (Chalier i Tordo, 2002; Clement i in., 2002;

Stolze i in., 2000). Jednak znacznie wyższą lipofilowość uzyskano poprzez zastąpienie w strukturze nitronów **2c–d** jednej grupy alkoksylowej grupą fenylową. Okazało się również, że trwałość ich adduktów jest zbliżona do DEPMPPO **2a**, co stanowi dużą zaletę (Nishizawa i in., 2007; Shioji i in., 2003). Niestety wadą nitronu **2c** jest powstawanie podczas syntezy dwóch diastereoizomerów o zbliżonej polarności (Nishizawa i in., 2007; Shioji i in., 2003). Dlatego otrzymano nowy nitron **2b**, w którym grupę dietoksyfosforylową zastąpiono difenylofosforylową. Związek **2b** okazał się niezwykle trwały, ponieważ nie rozkłada się nawet przez kilka miesięcy w środowisku wodnym, a także charakteryzuje się wyższą stałą szybkości wychwytywania rodnika hydroksyloвого oraz anionorodnika ponadtlenkowego (Nishizawa i in., 2007). Potwierdzono również, że nitron **2b** łatwiej przechodzi przez błony erytrocytów niż DMPO **1** (Shioji i in., 2007a). Przyłączenie do atomu fosforu cząsteczki cholesterolu nie wpłynęło na zmianę zdolności nitronu **63** do wychwytywania wolnych rodników nadtlentkowych, alkoksylowych czy nadtlentku linoleilu w porównaniu z DEPMPPO **2a**. Jednak diametralnie zmieniła się jego lipofilowość, dzięki czemu może on być stosowany z powodzeniem w lipofilowym środowisku (Hardy i in., 2005b). Natomiast przekształcenie grupy dietoksyfosforylowej w odpowiedni kwas fosfonowy pozwoliło uzyskać nitron **60**, który również wykazuje zdolności do wychwytywania wolnych rodników w pirydynie oraz charakteryzuje się dużą wrażliwością na zmiany pH (Clement i in., 2001). Kolejną grupę pułapek spinowych stanowią deuterowane analogi DEPMPPO **69–71**, w których zastąpienie niektórych atomów wodoru ich izotopem ^2D poprawiło zdolność detekcji wolnych rodników (tj. nitron **69** oraz **71**). Przede wszystkim znacznie uproszczone zostały widma EPR ich adduktów z rodnikiem *tert*-butylo-nadtlenowym, a w przypadku nitronu **71** zaobserwowano również wzrost intensywności sygnału EPR adduktu z rodnikiem nadtlentkowym. Nitron **71** może zatem znaleźć zastosowanie w badaniach *in vivo* (Clement i in., 2003). Związki **101** (Karoui i in., 1999) oraz **102** (Xu i in., 2002), analogi DEPMPPO **2a**, w których podstawnik metylowy na węglu C5 zastąpiono odpowiednio grupą fenylową albo 2-feniloetylową, również charakteryzują się wysoką lipofilowością oraz trwałością adduktów spinowych rodnika hydroksyloвого oraz anionorodnika ponadtlenkowego (Karoui i in., 1999; Xu i in., 2002). Natomiast wprowadzenie na atom węgla C5 długiego łańcucha alkilowego spowodowało, że nitron **103** wykazuje amfifilowy charakter. Można go z powodzeniem wykorzystywać jako pułapkę spinową na powierzchni błon komórkowych (Huang i in., 2015). Powstały również inne pułapki spinowe, które są ukierunkowane na konkretne miejsca w komórce. Do najważniejszych należą nitrony zawierające cząsteczkę biotyny **95** (Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2007a) lub kation tryfenylofosfoniowy **98a–b** i **99a–c** (Abbas i in., 2014; Beziere i in., 2014; Chalier i in., 2007; Hardy i in., 2007a; Hardy i in., 2007b; Hardy i in., 2014). Związek **95** może stanowić ukierunkowaną pułapkę spinową ze względu na zdolność biotyny do tworzenia kompleksów z awidyną (Chalier i in., 2007; Wilchek i Bayer, 1988), natomiast nitrony **98a–b** oraz **99a–c** były z powodzeniem stosowane do wychwytywania anionorodnika powstałego w mitochondriach, przy czym najlepsze efekty uzyskano dla **98b** oraz **99a** (Hardy i in., 2014). Udowodniono, że addukty spinowe anionorodnika i nitronów posiadających cząsteczkę β -cyklodekstryny **96a** oraz **97a** są znacznie bardziej odporne na procesy bioredukcji w porównaniu z DEPMPPO **2a** (Abbas i in., 2014; Beziere i in., 2014; Hardy i in., 2009). Natomiast jeszcze lepsze efekty uzyskano dla nitronu **100**, który wykazuje zdolność do pułapkowania wielu wolnych rodników zarówno w środowisku organicznym, jak i wodnym. Powstałe addukty odznaczają się wysoką trwałością (okres półtrwania wynosi 3,5 godziny), a także odpornością na czynniki redukujące. Dodatkowym atutem jest możliwość wykorzystania nitronu **100** w warunkach *in vitro* (Besson i in., 2019). Na szczególną uwagę zasługuje całkiem nowa klasa analogów DEPMPPO **2a**, w których atom fosforu tworzy cykliczny sześcioczłonowy pierścień **118a–g** (Gosset i in., 2011; Sueishi i in., 2015). Nitrony **118a–e** wykazują różną lipofilowość oraz tworzą trwałe addukty z różnymi rodnikami, w szczególności z anionorodnikiem, a także charakteryzują się niską toksycznością. Te cechy powodują, że mogą być one z powodzeniem stosowane w badaniach *in vivo* (Gosset i in., 2011). Zaletą nitronów **118a–g** jest możliwość stosowania ich do detekcji wolnych rodników zarówno w środowisku wodnym, jak i w olejach mineralnych i roślinnych (Sueishi i in., 2015).

Jak wskazano powyżej, fosforylowane cykliczne nitrony wykorzystywane są głównie do detekcji RFT oraz RFA ze względu na swoje zdolności do wychwytywania wolnych rodników. Jednak pojawiło się kilka prac dotyczących potencjalnych właściwości farmakologicznych DEPMPPO **2a** (La Fontaine

i in., 2000b; Pietri i in., 1998; Willis i Ray, 2007). Badania przeprowadzone na sercach szczurów wykazały kardioprotekcyjne właściwości DEPMPPO **2a** podczas urazów niedokrwienno-reperfuzyjnych serca. Udowodniono, że na zwiększoną skuteczność kardioprotekcyjną DEPMPPO **2a** wpływa grupa dietoksyfosforylowa, a nie jego zdolności do wychwytywania wolnych rodników (Pietri i in., 1998). Sprawdzono również właściwości przeciwutleniające DEPMPPO **2a** w leczeniu choroby Huntingtona. Do badań zastosowano model z użyciem kwasu 3-nitropropionowego (La Fontaine i in., 2000b), który u zwierząt powoduje uszkodzenie prążkowiec, co prowadzi do wystąpienia objawów podobnych jak w przypadku choroby Huntingtona, czyli w pierwszym etapie nadpobudliwość, a następnie hipoaktywność (Borlongan i in., 1997). W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach, którym podawano kwas 3-nitropropionowy, potwierdzono właściwości przeciwutleniające oraz neuroprotektoryjne DEPMPPO **2a** (30 mg/kg rozpuszczone w soli fizjologicznej, 2 godziny przed podaniem kwasu 3-nitropropionowego), ponieważ jego podanie znacznie obniżyło stres oksydacyjny oraz zmniejszyło uszkodzenia prążkowiec (La Fontaine i in., 2000). W późniejszych latach wykazano również, że DEPMPPO **2a** znacznie obniża uszkodzenia neuronów w tylnym zakręcie obręczy oraz RSC. Przeprowadzono eksperyment na zwierzętach, u których indukowano martwicę neuronów poprzez wstrzyknięcie MK-801 (5 mg/kg). Następnie podawano DEPMPPO **2a** w dawce równej 30 mg/kg godzinę przed eksperymentem oraz 6 godzin po podaniu MK-801. Okazało się, że podanie przeciwutleniacza jakim jest DEPMPPO **2a** zmniejszyło martwicę neuronów z $47,3 \pm 4,7$ na $35,9 \pm 4$ w porównaniu z próbą kontrolną w tylnym zakręcie obręczy oraz z $104,9 \pm 8,0$ na $63,4 \pm 9,7$ w porównaniu z próbą kontrolną w RSC (Willis i Ray, 2007).

Wnioski

W niniejszym przeglądzie omówiona została liczna grupa związków – fosforylowanych nitronów, które podzielono na trzy klasy w zależności od budowy, tj. N-podstawione C-fosforylowane nitrony, N-alkilofosforylowane C-arylonitrony oraz fosforylowane cykliczne nitrony. W przypadku N-podstawionych C-fosforylowanych nitronów grupa fosforylowa znajduje się na C-końcu, przy czym jest ona bezpośrednio przyłączona do grupy nitronowej albo oddalona od niej o odpowiednio jeden i dwa atomy węgla. W N-alkilofosforylowanych C-arylonitronach funkcja fosforylowa znajduje się na N-końcu i oddalona jest od atomu azotu grupy nitronowej o jeden atom węgla. Natomiast ostatnią grupę stanowią nitrony, których głównym elementem strukturalnym jest pierścień pirolidynowy. N-podstawione C-fosforylowane nitrony początkowo były wykorzystywane jedynie w syntezie organicznej. Tworzą one w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji z alkenami sfunkcjonalizowane izoksazolidyny, stanowiące dogodne substraty w syntezie analogów naturalnych aminokwasów, mogą także zastępować pierścień cukrowy w modyfikowanych nukleotydach o potencjalnej aktywności przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej. Wykazano również właściwości antyoksydacyjne oraz neuroprotektoryjne N-podstawionych C-(dialkoksyforylo)nitronów. Z drugiej strony N-alkilofosforylowane C-arylonitrony oraz cykliczne fosforylowane nitrony są wykorzystywane przede wszystkim w detekcji wolnych rodników w układach biologicznych zarówno w procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Co więcej, nitrony zawierające grupę fosforylową wykazują większą trwałość w porównaniu z ich niefosforylowymi odpowiednikami, łatwiejsza jest również detekcja ich adduktów spinowych z wolnymi rodnikami w spektroskopii EPR.

Finansowanie: Praca była finansowana przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2015/17/B/ST5/00076).

Bibliografia

- Abbas K., Hardy M., Poulhes F., Karoui H., Tordo P., Ouari O., Peyrot F. 2014. Detection of superoxide production in stimulated and unstimulated living cells using new cyclic nitron spin traps. *Free Radical Biology and Medicine* 71, str. 281–290. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.019](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.019).
- Adachi T., Weisbrod R.M., Pimentel D.R., Ying J., Sharov V.S., Schoneich C., Cohen R.A. 2004. S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide. *Nature Medicine* 10(11), str. 1200–1207. DOI: [10.1038/nm1119](https://doi.org/10.1038/nm1119).
- Antonic A., Dottori M., Macleod M.R., Donnan G.A., Howells D.W. 2018. NXY-059, a failed stroke neuroprotectant, offers no protection to stem cell-derived human neurons. *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases* 27(8), str. 2158–2165. DOI: [10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.03.015](https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.03.015).
- Arroyo C.M., Kramer J.H., Dickens B.F., Weglicki W.B. 1987. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *Febs Letters* 221(1), str. 101–104. DOI: [10.1016/0014-5793\(87\)80360-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80360-5).
- Babior B.M. 1984. Oxidants from phagocytes: Agents of defense and destruction. *Blood* 64(5), str. 959–966. DOI: [10.1182/blood.V64.5.959.959](https://doi.org/10.1182/blood.V64.5.959.959).
- Bahorun T., Soobrattee M.A., Luximon-Ramma V., Aruoma O.I. 2006. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. *Internet Journal of Medical Update* 1(2), str. 25–41. DOI: [10.4314/ijmu.v1i2.39839](https://doi.org/10.4314/ijmu.v1i2.39839).
- Barbati S., Clement J.L., Frejaville C., Bouteiller J.C., Tordo P., Michel J.C., Yadan J.C. 1999. ³¹P-labeled pyrroline N-oxides: Synthesis of 5-diethylphosphono-5-methyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPO) by oxidation of diethyl (2-methylpyrrolidin-2-yl)phosphonate. *Synthesis-Stuttgart* (12), str. 2036–2040. DOI: [10.1055/s-1999-3626](https://doi.org/10.1055/s-1999-3626).
- Bartosz G. 2008. Druga twarz tenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wyd. 2. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str. 234–239, 242–262.
- Besson E., Gastaldi S., Bloch E., Zielonka J., Zielonka M., Kalyanaraman B., Aslan S., Karoui H., Rockenbauer A., Ouari O. i Hardy M. 2019. Embedding cyclic nitron in mesoporous silica particles for EPR spin trapping of superoxide and other radicals. *Analyst* 144(14), str. 4194–420. DOI: [10.1039/c9an00468h](https://doi.org/10.1039/c9an00468h).
- Beziere N., Hardy M., Poulhes F., Karoui H., Tordo P., Ouari O., Frapart Y.M., Rockenbauer A., Boucher J.L., Mansuy D., Peyrot F. 2014. Metabolic stability of superoxide adducts derived from newly developed cyclic nitron spin traps. *Free Radical Biology and Medicine* 67, str. 150–158. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.812](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.812).
- Borlongan C.V., Koutouzis T.K., Freeman T.B., Hauser R.A., Cahill D.W., Sanberg P.R. 1997. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain Research Protocols* 1(3), str. 253–257. DOI: [10.1016/s1385-299x\(96\)00037-2](https://doi.org/10.1016/s1385-299x(96)00037-2).
- Brown G.C., Borutaite V. 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *Iubmb Life* 52(3–5), str. 189–195. DOI: [10.1080/15216540152845993](https://doi.org/10.1080/15216540152845993).
- Buetler T.M., Krauskopf A., Ruegg U.T. 2004. Role of superoxide as a signaling molecule. *News in Physiological Sciences* 19, str. 120–123. DOI: [10.1152/nips.01514.2003](https://doi.org/10.1152/nips.01514.2003).
- Cao W., Carney J.M., Duchon A., Floyd R.A., Chevion M. 1988. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neuroscience Letters* 88(2), str. 233–238. DOI: [10.1016/0304-3940\(88\)90132-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90132-2).
- Cao Y.Y., Peng Q.Y., Li S.N., Deng Z.X., Gao J.T. 2019. The intriguing biology and chemistry of fosfomycin: the only marketed phosphonate antibiotic. *Rsc Advances* 9(72), str. 42204–42218. DOI: [10.1039/c9ra08299a](https://doi.org/10.1039/c9ra08299a).
- Carney J.M., Starkereed P.E., Oliver C.N., Landum R.W., Cheng M.S., Wu J.F., Floyd R.A. 1991. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl- α -phenylnitron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(9), str. 3633–3636. DOI: [10.1073/pnas.88.9.3633](https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3633).
- Cassien M., Petrocchi C., Thetiot-Laurent S., Robin M., Ricquebourg E., Kandouli C., Asteian A., Rockenbauer A., Mercier A., Culcasi M., Pietri S. 2016. On the vasoprotective mechanisms underlying novel β -phosphorylated nitrones: Focus on free radical characterization, scavenging and NO-donation in a biological model

- of oxidative stress. *European Journal of Medicinal Chemistry* 119, str. 197–217.
DOI: [10.1016/j.ejmech.2016.04.067](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.04.067).
- Chalier F., Clement J.L., Hardy M., Tordo P., Rockenbauer A. 2014. ESR study of the spin adducts of three analogues of DEPMPO substituted at C₄ or C₃. *Rsc Advances* 4(23), str. 11610–11623.
DOI: [10.1039/c3ra46913a](https://doi.org/10.1039/c3ra46913a).
- Chalier F., Hardy M., Ouari O., Rockenbauer A., Tordo P. 2007. Design of new derivatives of nitron DEPMPO functionalized at C-4 for further specific applications in superoxide radical detection. *Journal of Organic Chemistry* 72(21), str. 7886–7892. DOI: <http://doi.org/10.1021/jo071070s>.
- Chalier F., Tordo P. 2002. 5-Diisopropoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide, DIPPMPO, a crystalline analog of the nitron DEPMPO: synthesis and spin trapping properties. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (12), str. 2110–2117. DOI: [10.1039/b206909c](https://doi.org/10.1039/b206909c).
- Chen S.Q., Guttridge D.C., You Z.B., Zhang Z.C., Fribley A., Mayo M.W., Kitajewski J., Wang C.Y. 2001. Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -catenin/T cell factor-mediated transcription. *Journal of Cell Biology* 152(1), str. 87–96. DOI: [10.1083/jcb.152.1.87](https://doi.org/10.1083/jcb.152.1.87).
- Chiacchio U., Balestrieri E., Macchi B., Iannazzo D., Piperno A., Rescifina A., Romeo R., Saglimbeni M., Sciortino M.T., Valveri V., Mastino A., Romeo G. 2005. Synthesis of phosphonated carbocyclic 2'-oxa-3'-aza-nucleosides: Novel inhibitors of reverse transcriptase. *Journal of Medicinal Chemistry* 48(5), str. 1389–1394. DOI: [10.1021/jm049399i](https://doi.org/10.1021/jm049399i).
- Chiacchio U., Iannazzo D., Piperno A., Romeo R., Romeo G., Rescifina A., Saglimbeni M. 2006. Synthesis and biological evaluation of phosphonated carbocyclic 2'-oxa-3'-aza-nucleosides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(4), str. 955–959. DOI: [10.1016/j.bmc.2005.09.024](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.024).
- Chiacchio U., Rescifina A., Iannazzo D., Piperno A., Romeo R., Borrello L., Sciortino M.T., Balestrieri E., Macchi B., Mastino A., Romeo G. 2007. Phosphonated carbocyclic 2'-Oxa-3'-azanucleosides as new antiretroviral agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 50(15), str. 3747–3750. DOI: [10.1021/jm070285r](https://doi.org/10.1021/jm070285r).
- Clement J.L., Barbati S., Frejaville C., Rockenbauer A., Tordo P. 2001. Synthesis and use as spin-trap of 5-methyl-5-phosphono-1-pyrroline N-oxide (DHPMPO). pH dependence of the EPR parameters of the spin adducts. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (9), str. 1471–1475.
DOI: [10.1039/b103830n](https://doi.org/10.1039/b103830n).
- Clement J.L., Finet J.P., Frejaville C., Tordo P. 2003. Deuterated analogues of the free radical trap DEPMPO: synthesis and, EPR studies. *Organic and Biomolecular Chemistry* 1(9), str. 1591–1597.
DOI: [10.1039/b300870c](https://doi.org/10.1039/b300870c).
- Clement J.L., Frejaville C., Tordo P. 2002. DEPMPO and lipophilic analogues: synthesis and EPR studies. *Research on Chemical Intermediates* 28(2–3), str. 175–190.
DOI: [10.1163/156856702320267091](https://doi.org/10.1163/156856702320267091).
- Commoner B., Townsend J., Pake G.E. 1954. Free radicals in biological materials. *Nature* 174(4432), str. 689–691. DOI: [10.1038/174689a0](https://doi.org/10.1038/174689a0).
- Comporti M. 1989. Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions* 72(1–2), str. 1–56. DOI: [10.1016/0009-2797\(89\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(89)90016-1).
- Copolla G.M. 1984. Amberlyst-15, a superior acid catalyst for the cleavage of acetals. *Synthesis Communications* 12, str. 1021–1023. DOI: [10.1055/s-1984-31059](https://doi.org/10.1055/s-1984-31059).
- Damodiran M., Sivakumar P.M., SenthilKumar R., Muralidharan D., Kumar B., Doble M., Perumal P.T. 2009. Antibacterial activity, quantitative structure-activity relationship and diastereoselective synthesis of isoxazolidine derivatives via 1,3-dipolar cycloaddition of D-glucose derived nitron with olefin. *Chemical Biology & Drug Design* 74(5), str. 494–506. DOI: [10.1111/j.1747-0285.2009.00887.x](https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2009.00887.x).
- Deletraz A., Zeamari K., Di Meo F., Fabre P.L., Reybier K., Trouillas P., Tuccio B., Durand G. 2019. Reactivities of MeO-substituted PBN-type nitrones. *New Journal of Chemistry* 43(39), str. 15754–15762.
DOI: [10.1039/c9nj03805a](https://doi.org/10.1039/c9nj03805a).
- Deshmukh A.S., Long Y.C., Barbosa T.D., Karlsson H.K.R., Glund S., Zavadski W.J., Gibbs E.M., Koistinen H.A., Wallberg-Henriksson H., Zierath J.R. 2010. Nitric oxide increases cyclic GMP levels, AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1-specific activity and glucose transport in human skeletal muscle. *Diabetologia* 53(6), str. 1142–1150. DOI: [10.1007/s00125-010-1716-x](https://doi.org/10.1007/s00125-010-1716-x).
- Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T. 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of Hypertension* 18(6), str. 655–673. DOI: [10.1097/00004872-200018060-00002](https://doi.org/10.1097/00004872-200018060-00002).

- Di Meo S., Reed T.T., Venditti P., Victor V.M. 2016. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, str. 1–45. DOI: [10.1155/2016/1245049](https://doi.org/10.1155/2016/1245049).
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 32(11), str. 1102–1115. DOI: [10.1016/s0891-5849\(02\)00826-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00826-2).
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11(1), str. 81–128. DOI: [10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6).
- Finkelstein E., Rosen G.M., Rauckman E.J. 1980. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 200(1), str. 1–16. DOI: [10.1016/0003-9861\(80\)90323-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90323-9).
- Floyd R.A. 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB Journal* 4(9), str. 2587–2597. DOI: [10.1096/fasebj.4.9.2189775](https://doi.org/10.1096/fasebj.4.9.2189775).
- Floyd R.A., Neto H., Zimmerman G.A., Hensley K., Towner R.A. 2013. Nitron-based therapeutics for neurodegenerative diseases: Their use alone or in combination with lanthionines. *Free Radical Biology and Medicine* 62, str. 145–156. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.033](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.033).
- Fong J.J., Rhoney D.H. 2006. NXY-059: Review of neuroprotective potential for acute stroke. *Annals of Pharmacotherapy* 40(3), str. 461–471. DOI: [10.1345/aph.1E636](https://doi.org/10.1345/aph.1E636).
- Frejaville C., Karoui H., Tuccio B., Lemoigne F., Culcasi M., Pietri S., Lauricella R., Tordo P. 1995. 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide: A new efficient phosphorylated nitron for the *in vitro* and *in vivo* spin trapping of oxygen-centered radicals. *Journal of Medicinal Chemistry* 38(2), str. 258–265. DOI: [10.1021/jm00002a007](https://doi.org/10.1021/jm00002a007).
- Funato Y., Miki H., Holmgren A., Nakamura H., Ruddock L., Sadoshima J. 2007. Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxidants & Redox Signaling* 9(8), str. 1035–1057. DOI: [10.1089/ars.2007.1550](https://doi.org/10.1089/ars.2007.1550).
- Garteiser P., Doblas S., Watanabe Y., Saunders D., Hoyle J., Lerner M., He T., Floyd R.A., Towner R.A. 2010. Multiparametric Assessment of the Anti-glioma Properties of OKN007 by Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 31(4), str. 796–806. DOI: [10.1002/jmri.22106](https://doi.org/10.1002/jmri.22106).
- Giofre S.V., Romeo R., Garozzo A., Cicero N., Campisi A., Lanza G., Chiacchio M.A. 2015. 5-(3-Phosphonated 1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)isoxazolidines: synthesis, DFT studies and biological properties. *Arkivoc*, str. 253–269. DOI: [10.3998/ark.5550190.p009.353](https://doi.org/10.3998/ark.5550190.p009.353).
- Gosset G., Clement J.L., Culcasi M., Rockenbauer A., Pietri S. 2011. CyDEPMPOs: A class of stable cyclic DEPMPO derivatives with improved properties as mechanistic markers of stereoselective hydroxyl radical adduct formation in biological systems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19(7), str. 2218–2230. DOI: [10.1016/j.bmc.2011.02.040](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.02.040).
- Gothelf K.V. i Jorgensen K.A. 1998. Asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Chemical Reviews* 98(2), str. 863–909. DOI: [10.1021/cr970324e](https://doi.org/10.1021/cr970324e).
- Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. 2000. NAD(P)H oxidase - Role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 86(5), str. 494–501. DOI: [10.1161/01.res.86.5.494](https://doi.org/10.1161/01.res.86.5.494).
- Hardy M., Bardelang D., Karoui H., Rockenbauer A., Finet J.P., Jicsinszky L., Rosas R., Ouari O. i Tordo P. 2009. Improving the Trapping of Superoxide Radical with a β -Cyclodextrin-5-Diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DEPMPO) Conjugate. *Chemistry-a European Journal* 15(42), str. 11114–11118. DOI: [10.1002/chem.200901342](https://doi.org/10.1002/chem.200901342).
- Hardy M., Chaliel F., Finet J.P., Rockenbauer A., Tordo P. 2005a. Diastereoselective synthesis and ESR study of 4-PhenylDEPMPO spin traps. *Journal of Organic Chemistry* 70(6), str. 2135–2142. DOI: [10.1021/jo0479516](https://doi.org/10.1021/jo0479516).
- Hardy M., Chaliel F., Ouari O., Finet J.P., Rockenbauer A., Kalyanaraman B. i Tordo P. 2007a. Mito-DEPMPO synthesized from a novel NH₂-reactive DEPMPO spin trap: a new and improved trap for the detection of superoxide. *Chemical Communications* 10, str. 1083–1085. DOI: [10.1039/b616076j](https://doi.org/10.1039/b616076j).
- Hardy M., Ouari O., Charles L., Finet J.P., Iacazio G., Monnier V., Rockenbauer A., Tordo P. 2005b. Synthesis and spin-trapping behavior of 5-ChEPMPPO, a cholesteryl ester analogue of the spin trap DEPMPO. *Journal of Organic Chemistry* 70(25), str. 10426–10433. DOI: [10.1021/jo0517390](https://doi.org/10.1021/jo0517390).

- Hardy M., Poulhes F., Rizzato E., Rockenbauer A., Banaszak K., Karoui H., Lopez M., Zielonka J., Vasquez-Vivar J., Sethumadhavan S., Kalyanaraman B., Tordo P., Ouari O. 2014. Mitochondria-targeted spin traps: synthesis, superoxide spin trapping, and mitochondrial uptake. *Chemical Research in Toxicology* 27(7), str. 1155–1165. DOI: [10.1021/tx500032e](https://doi.org/10.1021/tx500032e).
- Hardy M., Rockenbauer A., Vasquez-Vivar J., Felix C., Lopez M., Srinivasan S., Avadhani N., Tordo P., Kalyanaraman B. 2007b. Detection, characterization, and decay kinetics of ROS and thyl adducts of Mito-DEPMPO spin trap. *Chemical Research in Toxicology* 20(7), str. 1053–1060. DOI: [10.1021/tx700101d](https://doi.org/10.1021/tx700101d).
- Harman D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology* 11(3), str. 298–300. DOI: [10.1093/geronj/11.3.298](https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298).
- Harrison D.G., Gongora M.C., Guzik T.J., Widder J. 2007. Oxidative stress and hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension* 1(1), str. 30–44. DOI: [10.1016/j.jash.2006.11.006](https://doi.org/10.1016/j.jash.2006.11.006).
- He T., Doblaz S., Saunders D., Casteel R., Lerner M., Ritchey J.W., Snider T., Floyd R.A., Towner R.A. 2011. Effects of PBN and OKN007 in rodent glioma models assessed by ¹H MR spectroscopy. *Free Radical Biology and Medicine* 51(2), str. 490–502. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.037](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.037).
- Hensley K., Robinson K.A., Gabbita S.P., Salsman S., Floyd R.A. 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine* 28(10), str. 1456–1462. DOI: [10.1016/s0891-5849\(00\)00252-5](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00252-5).
- Hool L.C., Corry B. 2007. Redox control of calcium channels: From mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* 9(4), str. 409–435. DOI: [10.1089/ars.2006.1446](https://doi.org/10.1089/ars.2006.1446).
- Huang S.P., Chen Z., Du L.B., Tian Q., Liu Y.P., Zheng Y.S., Liu Y. 2015. Site-specific detection of free radicals in membranes using an amphiphilic spin trap. *Applied Magnetic Resonance* 46(5), str. 489–504. DOI: [10.1007/s00723-015-0646-7](https://doi.org/10.1007/s00723-015-0646-7).
- Huang W.J., Zhang X., Chen W.W. 2016. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports* 4(5), str. 519–522. DOI: [10.3892/br.2016.630](https://doi.org/10.3892/br.2016.630).
- Iorga B., Eymery F., Mouriès V., Savignac P. 1998. Phosphorylated aldehydes: Preparation and synthetic uses. *Tetrahedron* 54, str. 14637–14677. DOI: [10.1016/S0040-4020\(98\)00896-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00896-5).
- Janzen E.G., Hinton R.D., Kotake Y. 1992. Substituent effect on the stability of the hydroxyl radical adduct of α -phenyl *N*-*tert*-butyl nitron (PBN). *Tetrahedron Letters* 33(10), str. 1257–1260. DOI: [10.1016/s0040-4039\(00\)91595-8](https://doi.org/10.1016/s0040-4039(00)91595-8).
- Janzen E.G. i Zhang Y.K. 1995. Identification of reactive free radicals with a new ³¹P-labeled DMPO spin trap. *Journal of Organic Chemistry* 60(17), str. 5441–5445. DOI: [10.1021/jo00122a022](https://doi.org/10.1021/jo00122a022).
- Kaludercic N., Di Lisa F. 2020. Mitochondrial ROS Formation in the Pathogenesis of Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 7. DOI: [10.3389/fcvm.2020.00012](https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00012).
- Kalyanaraman B., Joseph J., Parthasarathy S. 1993. The use of spin traps to investigate site-specific formation of free radicals in low-density lipoprotein oxidation. *Biochemical Society Transactions* 21(2), str. 318–321. DOI: [10.1042/bst0210318](https://doi.org/10.1042/bst0210318)
- Kamibayashi M., Oowada S., Kameda H., Okada T., Inanami O., Ohta S., Ozawa T., Makino K., Kotake Y. 2006. Synthesis and characterization of a practically better DEPMPO-type spin trap, 5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (CYPMPO). *Free Radical Research* 40(11), str. 1166–1172. DOI: [10.1080/10715760600883254](https://doi.org/10.1080/10715760600883254).
- Karoui H., Nsanzumuhire C., Le Moigne F., Tordo P. 1999. Synthesis of a new spin trap: 2-(diethoxyphosphoryl)-2-phenyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide. *Journal of Organic Chemistry* 64(5), str. 1471–1477. DOI: [10.1021/jo981875n](https://doi.org/10.1021/jo981875n).
- Kumar K.R.R., Mallesha H. i Rangappa K.S. 2003. Synthesis of novel isoxazolidine derivatives and their antifungal and antibacterial properties. *Archiv Der Pharmazie* 336(3), str. 159–164. DOI: [10.1002/ardp.200390015](https://doi.org/10.1002/ardp.200390015).
- La Fontaine M.A., Geddes J.W., Banks A., Butterfield D.A. 2000. Effect of exogenous and endogenous antioxidants on 3-nitropropionic acid-induced in vivo oxidative stress and striatal lesions: Insights into Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry* 75(4), str. 1709–1715. DOI: [10.1046/j.1471-4159.2000.0751709.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0751709.x).
- Liu K.J., Miyake M., Panz T., Swartz H. 1999. Evaluation of DEPMPO as a spin trapping agent in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* 26(5-6), str. 714–721. DOI: [10.1016/s0891-5849\(98\)00251-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00251-2).

- Liu Y.P., Song Y.G., Du L.B., Villamena F.A., Ji Y.Q., Tian Q., Liu K.J., Liu Y. 2011. Novel glutathione-linked nitrones as dual free radical probes. *New Journal of Chemistry* 35(7), str. 1485–1490. DOI: [10.1039/c1nj20033j](https://doi.org/10.1039/c1nj20033j).
- Longo K.A., Kennell J.A., Ochocinska M.J., Ross S.E., Wright W.S., MacDougald O.A. 2002. Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors. *Journal of Biological Chemistry* 277(41), str. 38239–38244. DOI: [10.1074/jbc.M206402200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206402200).
- Lysakowska M., Balzarini J., Piotrowska D.G. 2014. Design, synthesis, antiviral, and cytostatic evaluation of novel isoxazolidine analogs of homonucleotides. *Archiv Der Pharmazie* 347(5), str. 341–353. DOI: [10.1002/ardp.201300382](https://doi.org/10.1002/ardp.201300382).
- Marnett L.J. 1999. Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424(1-2), str. 83-95. DOI: [10.1016/s0027-5107\(99\)00010-x](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00010-x).
- McCord J.M., Fridovic I. 1969. Superoxide Dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* 244(22), str. 6049–6055. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- McCracken E., Valeriani V., Simpson C., Jover T., McCulloch J., Dewar D. 2000. The lipid peroxidation by-product 4-hydroxynonenal is toxic to axons and oligodendrocytes. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20(11), str. 1529–1536. DOI: [10.1097/00004647-200011000-00002](https://doi.org/10.1097/00004647-200011000-00002).
- Michaels H.B., Hunt J.W. 1973. Reactions of Hydroxyl Radical with Polynucleotides. *Radiation Research* 56(1), str. 57–70. DOI: [10.2307/3573791](https://doi.org/10.2307/3573791)
- Muller A., Pietri S., Villain M., Frejaville C., Bonne C., Culcasi M. 1997. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Experimental Eye Research* 64(4), str. 637–643. DOI: [10.1006/exer.1996.0277](https://doi.org/10.1006/exer.1996.0277).
- Nakken K.F., Pihl A. 1965. On the Ability of Nitrous Oxide to Convert Hydrated Electrons into Hydroxyl Radical. *Radiation Research* 26(4), str. 519–526. DOI: [10.2307/3571862](https://doi.org/10.2307/3571862).
- Nishizawa M., Shioji K., Kurauchi Y., Okuma K., Kohno M. 2007. Spin-trapping properties of 5-(diphenylphosphinoyl)-5-methyl-4,5-dihydro-3H-pyrrole N-oxide (DPPMDPO). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 80(3), str. 495–497. DOI: [10.1246/bcsj.80.495](https://doi.org/10.1246/bcsj.80.495).
- Novelli G.P., Angiolini P., Consales G., Lippi R., Tani R. 1986. Anti-Shock Action of phenyl-*t*-butyl-nitron, a spin trapper. W: Novelli G.P. i Ursini F. (red.), *Oxygen Free Radicals in Shock. International Workshop*. Karger, Basel, str. 119–124. DOI: [0.1159/000412495](https://doi.org/0.1159/000412495)
- Novelli G.P., Angiolini P., Tani R., Consales G., Bordi L. 1985. Phenyl *t*-butyl nitron is active against traumatic shock in rats. *Free Radical Research Communications* 1, str. 321–327. DOI: [10.3109/10715768609080971](https://doi.org/10.3109/10715768609080971).
- Nsanzumuhire C., Clement J.L., Ouari O., Karoui H., Finet J.P., Tordo P. 2004. Synthesis of the *cis* diastereoisomer of 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-3-phenyl-1-pyrroline N-oxide (DEPMPPOc) and ESR study of its superoxide spin adduct. *Tetrahedron Letters* 45(34), str. 6385–6389. DOI: [10.1016/j.tetlet.2004.07.016](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.07.016).
- Olive G., Le Moigne F., Mercier A., Rockenbauer A., Tordo P. 1998. Synthesis of tetraalkyl(pyrrolidine-2,2-diyl)bisphosphonates and 2,2-bis(diethoxyphosphoryl)-3,4-dihydro-2H-pyrrole 1-oxide; ESR study of derived nitroxides. *Journal of Organic Chemistry* 63(24), str. 9095–9099. DOI: [10.1021/jo980092z](https://doi.org/10.1021/jo980092z).
- Ouari O., Chalier F., Bonaly R., Pucci B., Tordo P. 1998. Synthesis and spin-trapping behaviour of glycosylated nitrones. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (10), str. 2299–2307. DOI: [10.1039/a802785d](https://doi.org/10.1039/a802785d).
- Padwa A., Fisera L., Koehler K.F., Rodriguez A., Wong G.S.K. 1984. Regioselectivity associated with the 1,3-dipolar cycloaddition of nitrones with electron-deficient dipolarophiles. *Journal of Organic Chemistry* 49(2), str. 276–281. DOI: [10.1021/jo00176a012](https://doi.org/10.1021/jo00176a012).
- Pellissier H. 2007. Asymmetric 1,3-dipolar cycloadditions. *Tetrahedron* 63(16), str. 3235–3285. DOI: [10.1016/j.tet.2007.01.009](https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.01.009).
- Perkins M.J. 1980. Spin Trapping. W: Gold V. i Bethell D. (red.), *Advances in Physical Organic Chemistry* 17. Academic Press, str. 1–64.
- Perrelli M.G., Pagliaro P., Penna C. 2011. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World Journal of Cardiology* 3(6), str. 186–200. DOI: [10.4330/wjc.v3.i6.186](https://doi.org/10.4330/wjc.v3.i6.186).

- Pervaiz S., Clement M.V. 2007. Superoxide anion: Oncogenic reactive oxygen species?. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(7-8), str. 1297–1304. DOI: [10.1016/j.biocel.2007.04.007](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.04.007).
- Piantadosi C.A., Zhang J. 1996. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. *Stroke* 27(2), str. 327–331. DOI: [10.1161/01.str.27.2.327](https://doi.org/10.1161/01.str.27.2.327).
- Pietri S., Liebgott T., Frejaville C., Tordo P., Culcasi M. 1998. Nitron spin traps and their pyrrolidine analogs in myocardial reperfusion injury: hemodynamic and ESR implications - Evidence for a cardioprotective phosphonate effect for 5-(diethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide in rat hearts. *European Journal of Biochemistry* 254(2), str. 256–265. DOI: [10.1046/j.1432-1327.1998.2540256.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540256.x).
- Piotrowska D.G. 2006a. *N*-substituted *C*-diethoxyphosphorylated nitrones as useful synthons for the synthesis of α -aminophosphonates. *Tetrahedron Letters* 47(30), str. 5363–5366. DOI: [10.1016/j.tetlet.2006.05.104](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.05.104).
- Piotrowska D.G. 2006b. Stereochemistry of substituted isoxazolidines derived from *N*-methyl *C*-diethoxyphosphorylated nitron. *Tetrahedron* 62(52), str. 12306–12317. DOI: [10.1016/j.tet.2006.10.011](https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.10.011).
- Piotrowska D.G., Andrei G., Schols D., Snoeck R., Grabkowska-Druzyc M. 2016. New Isoxazolidine-Conjugates of Quinazolinones-Synthesis, Antiviral and Cytostatic Activity. *Molecules* 21(7). DOI: [10.3390/molecules21070959](https://doi.org/10.3390/molecules21070959).
- Piotrowska D.G., Andrei G., Schols D., Snoeck R., Lysakowska M. 2017. Synthesis, anti-varicella-zoster virus and anti-cytomegalovirus activity of quinazoline-2,4-diones containing isoxazolidine and phosphonate substructures. *European Journal of Medicinal Chemistry* 126, str. 84–100. DOI: [10.1016/j.ejmech.2016.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.002).
- Piotrowska D.G., Glowacka I.E. 2007a. Enantiomerically pure phosphonate analogues of *cis*- and *trans*-4-hydroxyprolines. *Tetrahedron-Asymmetry* 18(11), str. 1351–1363. DOI: [10.1016/j.tetasy.2007.06.006](https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.06.006).
- Piotrowska D.G. i Glowacka I.E. 2007b. Enantioselective synthesis of phosphonate analogues of (*R*)- and (*S*)-homoserine. *Tetrahedron-Asymmetry* 18(23), str. 2787–2790. DOI: [10.1016/j.tetasy.2007.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.11.007).
- Piotrowska D.G., Mediavilla L., Cuarental L., Glowacka I.E., Marco-Contelles J., Hadjipavlou-Litina D., Lopez-Munoz F., Oset-Gasque M.J. 2019. Synthesis and Neuroprotective Properties of *N*-Substituted *C*-Dialkoxyphosphorylated Nitrones. *Acs Omega* 4(5), str. 8581–8587. DOI: [10.1021/acsomega.9b00189](https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00189).
- Popa-Wagner A., Mitran S., Sivanesan S., Chang E., Buga A.M. 2013. ROS and Brain Diseases: The Good, the Bad, and the Ugly. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013. DOI: [10.1155/2013/963520](https://doi.org/10.1155/2013/963520).
- Pryor W.A., Jin X., Squadrito G.L. 1994. One- and two- electron oxidations of methionine by peroxyxynitrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(23), str. 11173–11177. DOI: [10.1073/pnas.91.23.11173](https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11173).
- Rizzi C., Lauricella R., Bouteiller J.C., Roubaud V., Tuccio A. 2002. Distribution of the methyl radical adduct of *N*-benzylidene-1-diethoxyphosphoryl-1-methylethylamine *N*-oxide-type nitrones in water-sodium dodecyl sulfate micelles: an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Magnetic Resonance in Chemistry* 40(4), str. 273–278. DOI: [10.1002/mrc.1010](https://doi.org/10.1002/mrc.1010).
- Rizzi C., Marque S., Belin F., Bouteiller J.C., Lauricella R., Tuccio B., Cerri V., Tordo P. 1997. PPN-type nitrones: preparation and use of a new series of β -phosphorylated spin-trapping agents. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (12), str. 2513–2518. DOI: [10.1039/a702469j](https://doi.org/10.1039/a702469j).
- Romeo R., Carnovale C., Giofre S.V., Romeo G., Macchi B., Frezza C., Marino-Merlo F., Pistara V., Chiacchio U. 2012. Truncated phosphonated *C*-1'-branched *N,O*-nucleosides: A new class of antiviral agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20(11), str. 3652–3657. DOI: [10.1016/j.bmc.2012.03.047](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.047).
- Roubaud V., Dozol H., Rizzi C., Lauricella R., Bouteiller J.C., Tuccio B. 2002. Poly(β -phosphorylated nitrones): preparation and characterisation of a new class of spin trap. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (5), str. 958–964. DOI: [10.1039/b111691f](https://doi.org/10.1039/b111691f).
- Roubaud V., Lauricella R., Tuccio B., Bouteiller J.C., Tordo P. 1996. Decay of superoxide spin adducts of new PBN-type phosphorylated nitrones. *Research on Chemical Intermediates* 22(4), str. 405–416. DOI: [10.1163/156856796x00098](https://doi.org/10.1163/156856796x00098).
- Roubaud V., Mercier A., Olive G., LeMoigne F., Tordo P. 1997. 5-(Diethoxyphosphorylmethyl)-5-methyl-4,5-dihydro-3*H*-pyrrole *N*-oxide: synthesis and evaluation of spin trapping properties. *Journal of the Chemical*

- Society-Perkin Transactions 2* (9), str. 1827–1830.
DOI: [10.1039/a608510e](https://doi.org/10.1039/a608510e).
- Sandstrom M.E., Zhang S.J., Bruton J., Silva J.P., Reid M.B., Westerblad H. i Katz A. 2006. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *Journal of Physiology-London* 575(1), str. 251–262. DOI: [10.1113/jphysiol.2006.110601](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.110601).
- Shioji K., Iwashita H., Shimomura T., Yamaguchi T., Okuma K. 2007a. ESR measurement using 2-diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DPhPMPO) in human erythrocyte ghosts. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 80(4), str. 758–762.
DOI: [10.1246/bcsj.80.758](https://doi.org/10.1246/bcsj.80.758).
- Shioji K., Matsumoto A., Takao M., Kurauchi Y., Shigetomi T., Yokomori Y., Okuma K. 2007b. Cycloadditions of 3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide with thioketones and a selenoketone. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 80(4), str. 743–746. DOI: [10.1246/bcsj.80.743](https://doi.org/10.1246/bcsj.80.743).
- Shioji K., Takao M., Okuma K. 2006. Convenient synthesis of linear spin traps containing diphenylphosphoryl groups. *Chemistry Letters* 35(12), str. 1332–1333. DOI: [10.1246/cl.2006.1332](https://doi.org/10.1246/cl.2006.1332).
- Shioji K., Tsukimoto S., Tanaka H., Okuma K. 2003. Synthesis of 5-(alkylphenylphosphoryl)-5-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline N-oxide as a new spin trapping reagent. *Chemistry Letters* 32(7), str. 604–605. DOI: [10.1246/cl.2003.604](https://doi.org/10.1246/cl.2003.604).
- Shuaib A., Lees K.R., Lyden P., Grotta J., Davalos A., Davis S.M., Diener H., Ashwood T., Wasiewski W.W., Emeribe U., Investigators S.I.T. 2007. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine* 357(6), str. 562–571. DOI: [10.1056/NEJMoa070240](https://doi.org/10.1056/NEJMoa070240).
- Stadtman E.R. 2004. Role of oxidant species in aging. *Current Medicinal Chemistry* 11(9), str. 1105–1112.
DOI: [10.2174/0929867043365341](https://doi.org/10.2174/0929867043365341).
- Stolze K., Udilova N., Nohl H. 2000. Spin trapping of lipid radicals with DEPMPO-derived spin traps: Detection of superoxide, alkyl and alkoxy radicals in aqueous and lipid phase. *Free Radical Biology and Medicine* 29(10), str. 1005–1014. DOI: [10.1016/s0891-5849\(00\)00401-9](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00401-9).
- Sueishi Y., Kamogawa E., Nakamura H., Ukai M., Kunieda M., Okada T., Shimmei M., Kotake Y. 2015. Kinetic Evaluation of Spin Trapping Rate Constants of New CYPMPO-type Spin Traps for Superoxide and Other Free Radicals. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-International Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics* 229(3), str. 317–326. DOI: <http://doi.org/10.1515/zpch-2014-0610>.
- Sundaresan M., Yu Z.X., Ferrans V.J., Irani K. i Finkel T. 1995. Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270(5234), str. 296–299.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.270.5234.296>.
- Towner R.A., Smith N., Saunders D., Browns C.A., Cai X., Ziegler J., Mallory S., Dozmorov M.G., De Souza P.C., Wiley G., Kim K., Kang S., Kong D.S., Kim Y.T., Fung K.M., Wren J.D., Battiste J. 2019. OKN-007 Increases temozolomide (TMZ) Sensitivity and Suppresses TMZ-Resistant Glioblastoma (GBM) Tumor Growth. *Translational Oncology* 12(2), str. 320–335. DOI: [10.1016/j.tranon.2018.10.002](https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.10.002).
- Tuccio B., Lauricella R., Frejaville C., Bouteiller J.C., Tordo P. 1995. Decay of the hydroperoxyl spin adduct of 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide: An EPR kinetic study. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (2), str. 295–298. DOI: [10.1039/p29950000295](https://doi.org/10.1039/p29950000295).
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(1), str. 44–84. DOI: [10.1016/j.biocel.2006.07.001](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001).
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160(1), str. 1–40.
DOI: [10.1016/j.cbi.2005.12.009](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009).
- Van Horsen J., Witte M.E., Schreibelt G., de Vries H.E. 2011. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1812(2), str. 141–150.
DOI: [10.1016/j.bbadis.2010.06.011](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.011).
- Vergely C., Renard C., Moreau D., Perrin-Sarrado C., Roubaud V., Tuccio B., Rochette L. 2003. Effect of two new PBN-derived phosphorylated nitrones against postischemic ventricular dysrhythmias. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17(4), str. 433–442. DOI: [10.1046/j.1472-8206.2003.00158.x](https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2003.00158.x).
- Villamena F.A., Zweier J.L. 2004. Detection of reactive oxygen and nitrogen species by EPR spin trapping. *Antioxidants & Redox Signaling* 6(3), str. 619–629. DOI: [10.1089/152308604773934387](https://doi.org/10.1089/152308604773934387).
- Vogiatzi G., Tousoulis D. i Stefanadis C. 2009. The Role of Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Hellenic Journal of Cardiology* 50(5), str. 402–409.

- Wilchek M., Bayer E.A. 1988. The Avidin-biotin complex in bioanalytical applications. *Analytical Biochemistry* 171(1), str. 1–32. DOI: [10.1016/0003-2697\(88\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90120-0).
- Willis C.L., Ray D.E. 2007. Antioxidants attenuate MK-801-induced cortical neurotoxicity in the rat. *Neurotoxicology* 28(1), str. 161–167. DOI: [10.1016/j.neuro.2006.10.007](https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.10.007).
- Xu Y.K., Chen Z.W., Sun J., Liu K., Chen W., Shi W., Wang H.M., Liu Y. 2002. Synthesis, crystal structure, and ESR study of a novel phosphorylated lipophilic spin trap. *Journal of Organic Chemistry* 67(22), str. 7624–7630. DOI: [10.1021/jo020126](https://doi.org/10.1021/jo020126).
- Zeghdaoui A., Tuccio B., Finet J.P., Cerri V., Tordo P. 1995. β -phosphorylated α -phenyl-*N*-*tert*-butylnitrone (PBN) analogues: A new series of spin traps for oxyl radicals. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* (12), str. 2087–2089. DOI: [10.1039/p29950002087](https://doi.org/10.1039/p29950002087).
- Zuo L., Motherwell M.S. 2013. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene* 532(1), str. 18–23. DOI: [10.1016/j.gene.2013.07.085](https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.085).

