

Pochodne hydroksykumaryn jako struktury wiodące w poszukiwaniu nowych chemoterapeutyków

dr Kinga Ostrowska

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Zakład Chemii Organicznej
ul. Banacha 1
02-097 Warszawa

Autoreferat do wniosku o nadanie stopnia naukowego doktora
habilitowanego

Warszawa, 27.02.2018

1. Imię i nazwisko.

Kinga Ostrowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

Doktor nauk farmaceutycznych, Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie, tytuł pracy doktorskiej: „Synteza nowych pochodnych kwasów 2- i 3-benzo[b]furanokarboksylowych i 7-benzo[b]furanolu o spodziewanym działaniu biologicznym.”, 7 listopad 2007.

Magister chemii, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie, tytuł pracy magisterskiej: „Reakcje elektrodowe dwuwarstw i mieszanin stałych heksacyjanożelazianów manganu (II) i indu (III).” 11 czerwiec 2001.

Podyplomowe studia „Menadżer Projektów Badawczych”, Wyższa Szkoła Ekonomii i Innowacji w Lublinie, 23 luty 2012.

Podyplomowe studia „Chemia Kosmetyczna” na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej, 16 lipiec 2002.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.

od 2010 do teraz	Zakład Chemii Organicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, adiunkt
2003 – 2007	Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny, doktorantka
2001 – 2003	Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny, asystentka

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Pochodne hydroksykumaryn jako struktury wiodące w poszukiwaniu nowych chemoterapeutyków

b) wykaz publikacji naukowych stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego

* - autor korespondencyjny	IF	Liczba cytowań Web of Science	Liczba punktów ministerialnych
H1. Kinga Ostrowska*, Dorota Maciejewska, Aleksandra Drzewiecka-Antonik, Marcin T. Klepka, Anna Wolska, Łukasz Dobrzycki, Alicja Sztokfisz, Agnieszka Czajkowska, Izabela Młynarczuk-Biały, Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray study and <i>in vitro</i> cytotoxicity of 5-hydroxycoumarin derivatives and their copper complexes, Journal of Molecular Structure, 2017, 1145: 292-299. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, sformułowaniu hipotez i celów badawczych, zaplanowaniu i wykonaniu syntez ligandów, analizie i interpretacji części otrzymanych wyników badań fizykochemicznych i biologicznych. Napisałam także główne partie manuskryptu, redagowałam tekst, zrobiłam korektę zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach oraz korespondowałam z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 50%.	1,753	0	20
H2. Kinga Ostrowska*, Wioletta Olejarz, Małgorzata Wrzosek, Alicja Głusko, Grażyna Nowicka, Mirosław Szczepański, Ilona B. Materek, Anna E. Koziół, Marta Struga, Anticancer effects of O-aminoalkyl derivatives of alloxanthoxyetin and seselin, Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017, 95: 1412-1424. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich syntez, udokumentowaniu struktur związków przez analizę widm i analizę SAR oraz na napisaniu i redakcji tekstu, korekcie zgodnie z uwagami recenzentów i korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 52%.	2,759	0	25
H3. Kinga Ostrowska*, Dawid Grzeszczuk, Dorota Maciejewska, Izabela Młynarczuk-Biały, Agnieszka Czajkowska, Alicja Sztokfisz, Łukasz Dobrzycki, Hanna Kruszewska, Synthesis and biological screening of a new series of 5-[4-(4-aryl-1-piperazinyl)butoxy]coumarins, Monatshefte für Chemie, 2016, 147: 1615-1627. Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu wszystkich syntez i wykonaniu znacznej większości z nich, pomocy i nadzorze w wykonaniu pozostałej części syntez, potwierdzeniu struktur związków przez interpretację części widm, zaplanowaniu badań biologicznych oraz interpretacji ich wyników. Napisałam także główne partie manuskryptu, redagowałam tekst, zrobiłam korektę zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach oraz korespondowałam z	1,282	4	20

edytorem. Mój udział procentowy szacuję na **63%**.

H4. Kinga Ostrowska*, Dawid Grzeszczuk, Monika Głuch-Lutwin, Anna Gryboś, Agata Siwek, Łukasz Dobrzycki, Bartosz Trzaskowski, Development of selective agents targeting serotonin 5HT_{1A} receptors with subnanomolar activities based on a coumarin core, Medicinal Chemistry Communications, 2017, 8: 1690-1696.

2,608

0

25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i koordynacji badań, wykonaniu znacznej większości syntez, pomocy i nadzorze w wykonaniu pozostałej części syntez, potwierdzeniu struktur związków przez interpretację widm, zaplanowaniu badań biologicznych oraz interpretacji ich wyników. Napisałam także główną część manuskryptu, redagowałam tekst, zrobiłam korektę zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach oraz korespondowałam z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na **57%**.

H5. Kinga Ostrowska*, Katarzyna Młodzikowska, Monika Głuch-Lutwin, Anna Gryboś, Agata Siwek, Synthesis of a new series of aryl/heteroarylpiperazinyl derivatives of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin with low nanomolar 5-HT_{1A} affinities, European Journal of Medicinal Chemistry, 2017, 137: 108-116.

4,519

1

40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i koordynacji badań, wykonaniu znacznej większości syntez, pomocy i nadzorze w wykonaniu pozostałej części syntez, potwierdzeniu struktur związków przez interpretację widm, zaplanowaniu badań biologicznych oraz interpretacji ich wyników. Napisałam także główne partie manuskryptu, redagowałam tekst, zrobiłam korektę zgodnie z uwagami otrzymanymi w recenzjach oraz korespondowałam z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na **65%**.

H6. Kinga Ostrowska*, Dawid Grzeszczuk, Monika Głuch-Lutwin, Anna Gryboś, Agata Siwek, Anna Leśniak, Mariusz Sacharczuk, Bartosz Trzaskowski, 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors affinity, docking studies and pharmacological evaluation of a series of 8-acetyl-7-hydroxy-4-methylcoumarin derivatives, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2018, 26:527-535.

2,930

0

25

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na zaplanowaniu i koordynacji badań, wykonaniu znacznej większości syntez, pomocy i nadzorze w wykonaniu pozostałej części syntez, potwierdzeniu struktur związków przez interpretację widm, zaplanowaniu badań biologicznych oraz interpretacji ich wyników. Napisałam także główne partie manuskryptu, redagowałam tekst, oraz korespondowałam z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na **57%**.

H1-H6. Sumarycznie dla wybranych publikacji

15,851

155

- c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

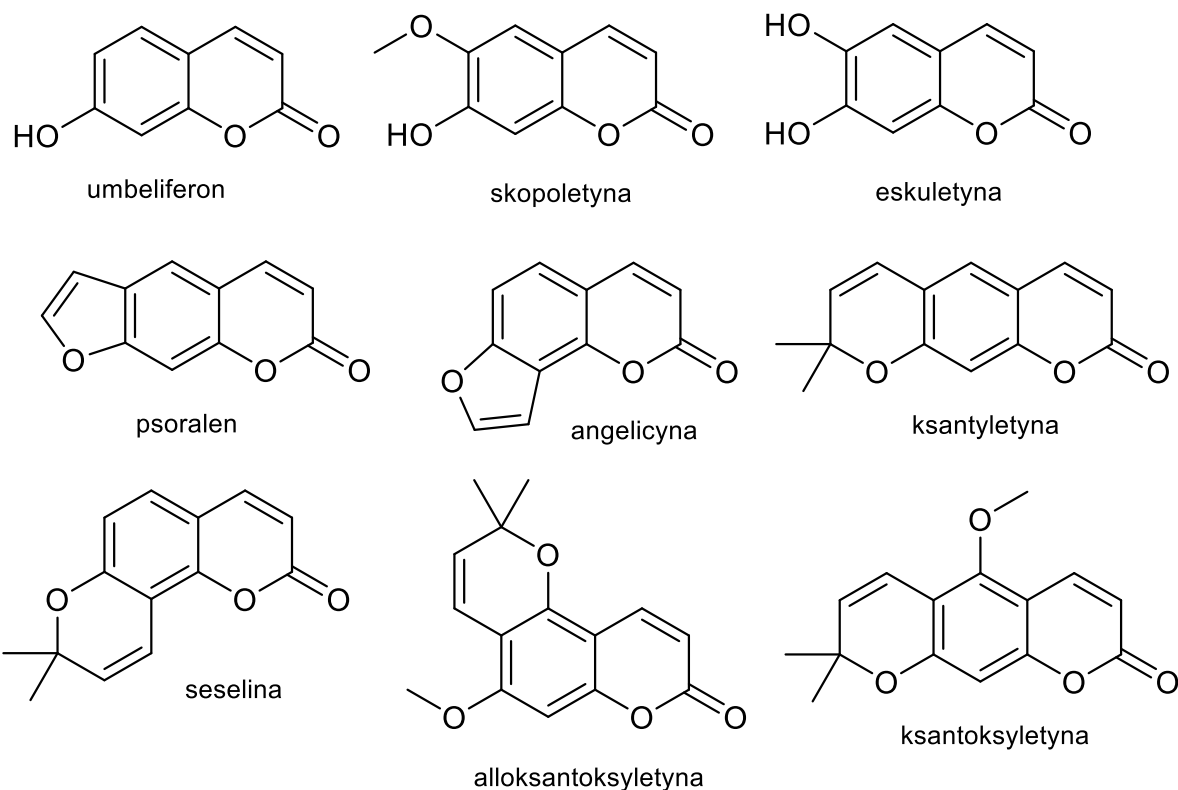
1. Cel naukowy na tle wybranych aspektów badań nad kumarynami

Nadrzędnym celem naukowym mojej pracy była analiza właściwości nowych, syntetycznych pochodnych hydroksykumaryn, ocena ich aktywności biologicznej oraz wyłonienie struktur wiodących umożliwiających poszukiwania nowych chemoterapeutyków. Uzupełnieniem analiz było zdefiniowanie struktury nowo otrzymanych związków i analiza oddziaływań międzycząsteczkowych metodami spektroskopowymi i dyfrakcji rentgenowskiej. Określenie cytotoksyczności *in vitro* w stosunku do ludzkich komórek nowotworowych, ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej i/lub badania powinowactwa do receptorów 5HT_{1A} i 5HT_{2A} było podstawą badania zależności między strukturą i aktywnością oraz procedury definiowania struktur wiodących.

Pochodne kumaryn jako naturalne związki chemiczne (występujące często w postaci glikozydów) są stosowane w lecznictwie. Najbogatszym i najbardziej inspirującym źródłem struktur wiodących zawierających układ kumaryny i jej pochodnych jest więc przyroda (rośliny z rodzin selerowatych (*Apiaceae*), marzanowatych (*Rubiceae*), rutowatych (*Rutaceae*), oliwkowatych (*Oleaceae*), bobowatych (*Fabaceae*), astrowatych (*Asteraceae*), kasztanowatych (*Hippocastanaceae*) i psiankowatych (*Solanaceae*), a także bakterie szczepów *Streptomyces* oraz *Aspergillus*).¹ Medycyna ludowa od dawna wykorzystywała właściwości lecznicze roślin, przypisywane częściowo lub całkowicie występującym w nich kumarynom. Przykładem może być lubczyk ogrodowy (*Levisticum officinale*), który ma zastosowanie w przypadku zaburzeń żołądkowych czy zaburzeń miesiączkowania, ale także kaszlu czy jako środek wczesnoporonny, a zawiera kumarynę, umbeliferon, apertynę i bergapten. Wiele pochodnych kumaryn zawiera także takie rośliny, jak ruta zwyczajna (*Ruta graveolens*), arcydzięgiel litwor (*Angelica archangelica*), gorysz błotny (*Peucedanum palustre*) czy gorysz (*Peucedanum praeruptorum*).²⁻³

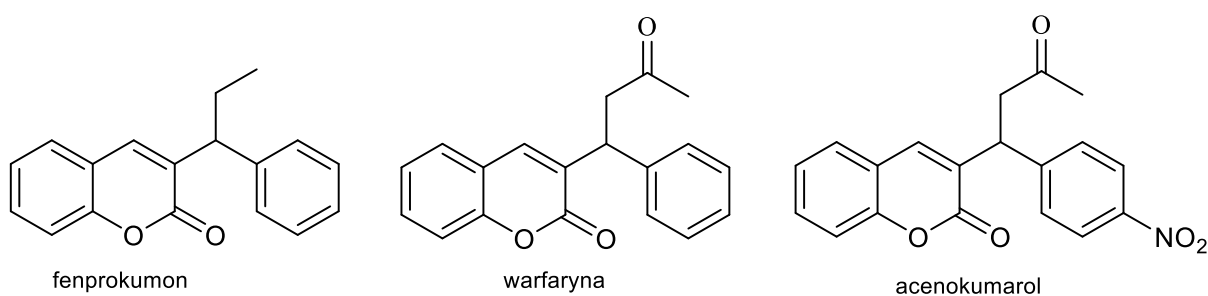
Syntetyczne pochodne kumaryn charakteryzują się także zróżnicowaną aktywnością biologiczną. Wykazują, między innymi, właściwości przeciwutleniające i przeciwzapalne,⁴ przeciwwirusowe,⁵⁻⁶ przeciwmalaryczne,⁷ przeciwzakrzepowe,⁸ przeciwbakteryjne⁹ i przeciwnowotworowe.¹⁰ W literaturze znajdujemy też informacje o wpływie kumaryn na ośrodkowy układ nerwowy, w tym na układy dopaminergiczny, serotoninergericzny, czy na receptory benzodiazepinowe.¹¹

Aktywne farmakologicznie kumaryny są bardzo różnicowane strukturalnie (Rysunek 1). Wyróżniamy trzy zasadnicze podtypy kumaryn: proste (kumaryna, alkoksy-, metoksy-, hydrokso- i metylenodihydroksykumaryny oraz ich glikozydy, np. umbeliferon, eskuletyna, skopoletyna), furanokumaryny (np. psoralen, angelicina i ich pochodna bergapten) i piranokumaryny (np. ksantyletyna, seselina i ich pochodne).



Rysunek 1. Wzory chemiczne wybranych kumaryn (nazwy zwyczajowe).

Kumaryny są składnikami wielu leków i preparatów ziołowych obecnych na rynku polskim i rynkach światowych. Najważniejszą grupę stanowią tu leki przeciwzakrzepowe – antagoniści witaminy K, jak warfaryna, fenprokumon czy acenokumarol (Rysunek 2).¹²⁻¹³ Związki z tej grupy mają zastosowane głównie w leczeniu i profilaktyce zakrzepicy żyłnej i tętniczej, a także przy udarach niedokrwiennych (pacjenci z migotaniem przedsionków). Nie wpływają bezpośrednio na krzepnięcie krwi lecz modyfikują metabolizm witaminy K, niezbędnej w procesie regulacji biosyntezy czynników krzepnięcia krwi.



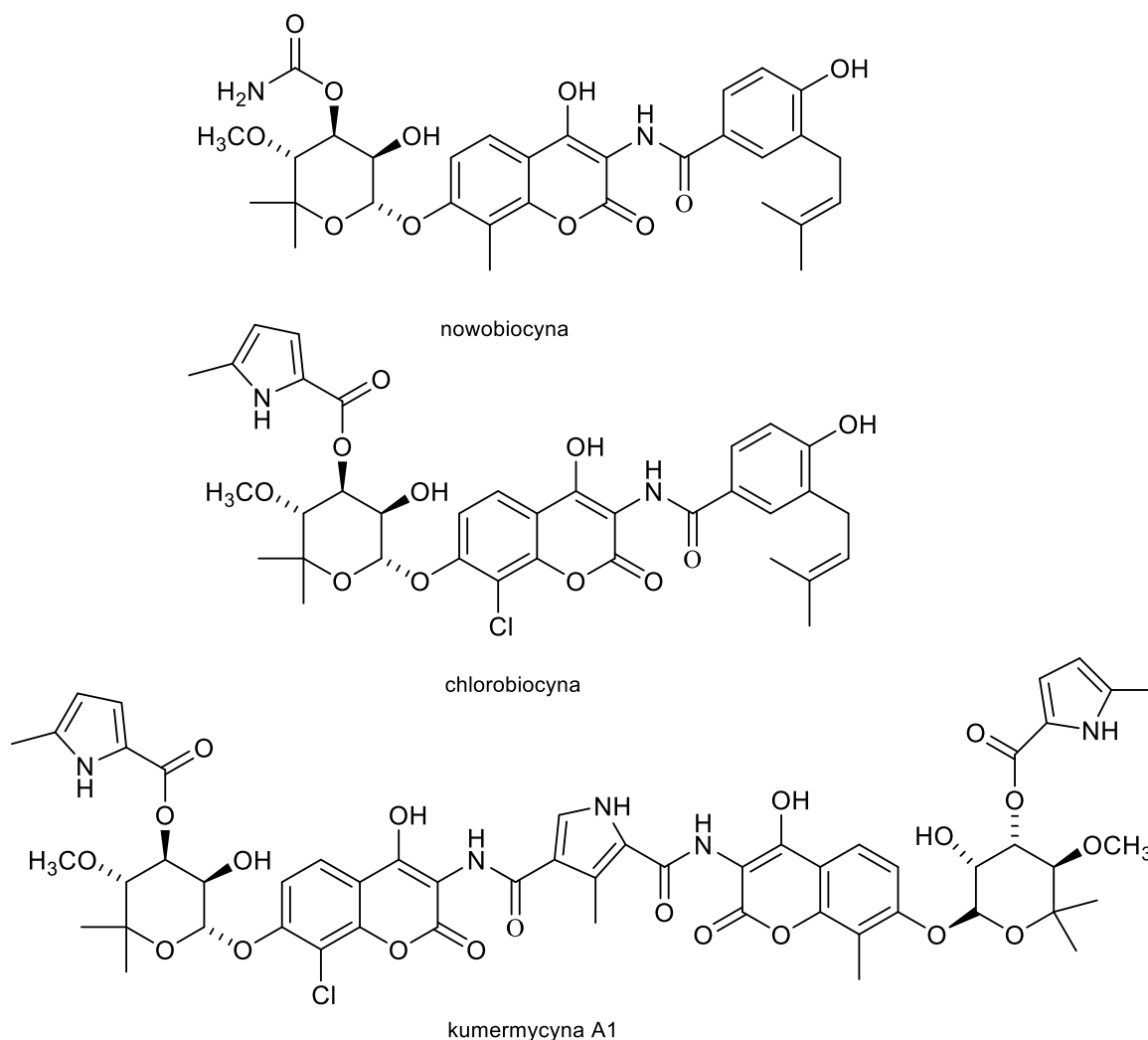
Rysunek 2. Wzory chemiczne fenprokumonu, warfaryny i acenokumarolu (nazwy zwyczajowe).

Klorikromen jest także lekiem przeciwzakrzepowym, należącym do grupy antykoagulantów, który wpływa na procesy krzepnięcia krwi przez utrudnienie agregacji trombocytów (Rysunek 3).¹⁴ Jego analog strukturalny, nieposiadający chloru w pozycji C8 pierścienia kumarynowego - karbokromen, ma natomiast działanie rozszerzające naczynia wieńcowe, zwiększające objętość przepływu wieńcowego krwi, dzięki czemu jest wykorzystywany w leczeniu choroby niedokrwiennej serca (Rysunek 3).¹⁵ Oba związki należą do grupy pochodnych 7-hidroxykumaryny (umbeliferonu).

kumarynymi, których zainspirowały mnie do poszukiwań nowych chemoterapeutyków w tej grupie związków.

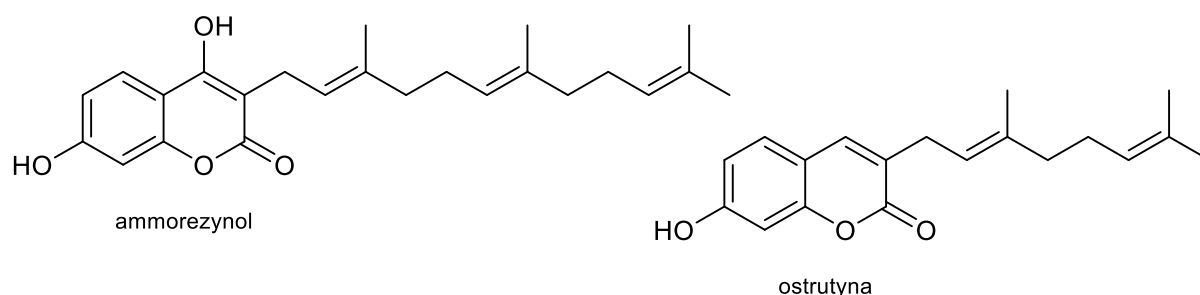
1.1. Pochodne kumaryny jako związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym

W ostatnim czasie coraz więcej mikroorganizmów uodparnia się na działanie powszechnie stosowanych leków, w związku z czym pojawia się potrzeba stosowania nowych terapii i leków. Istnieje wiele związków naturalnych hamujących zakażenia mikroorganizmami i w nich upatruje się wielkie bogactwo substancji potencjalnie użytecznych w walce z tym problemem.¹⁹ Dlatego związki występujące w roślinach są źródłem substancji wiodących dla poszukiwań potencjalnych leków syntetycznych.²⁰ Wśród klas związków naturalnych ważną pozycję zajmują kumaryny. Zainteresowanie kumarynami jest związane z ich aktywnością antybakteryjną w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, które doprowadziło do opracowania antybiotyku kumarynowego – nowobiocyny i jej analogów – chlorobiocyny, kumermycyny A1 itp. (Rysunek 6).²¹⁻²² Związki te są skutecznymi inhibitorami gyrazy B i wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów MRSE (*Staphylococcus epidermidis* oporny na metycylinę) i MRSA (*Staphylococcus aureus* odporny na metycylinę), posiadają jednak ograniczenia związane z toksycznością, rozpuszczalnością i ponownym rozwojem oporności, dlatego wciąż poszukuje się ich skuteczniejszych i bezpieczniejszych w stosowaniu analogów.



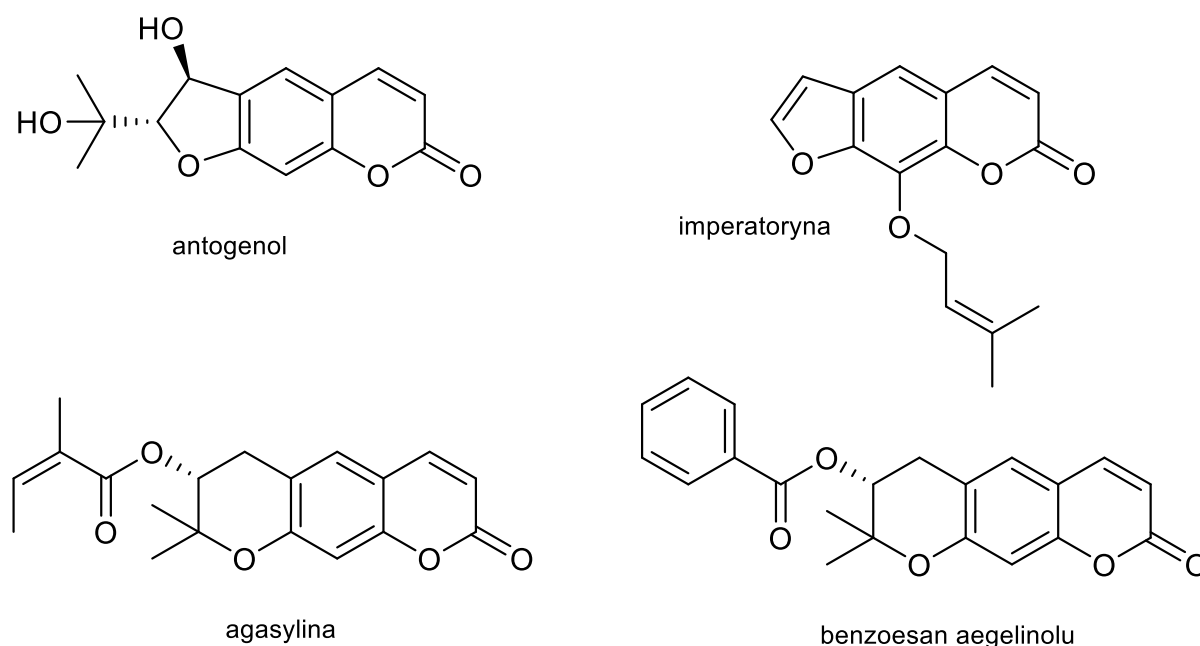
Rysunek 6. Wzory chemiczne nowobiocyny, chlorobiocyny i kumermycyny A1.

Badania pochodnych 4,7-dihydroksy oraz 7-hydroksykumaryn o mniej skomplikowanej budowie, np. związków posiadających długi łańcuch węglowodorowy, jak ostrutyna czy ammorezynol (Rysunek 7), wykazały ich skuteczność przeciwko bakteriom Gram dodatnim, takim jak *Bacillus megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Micrococcus lysodeikticus*, and *Staphylococcus aureus*.²³



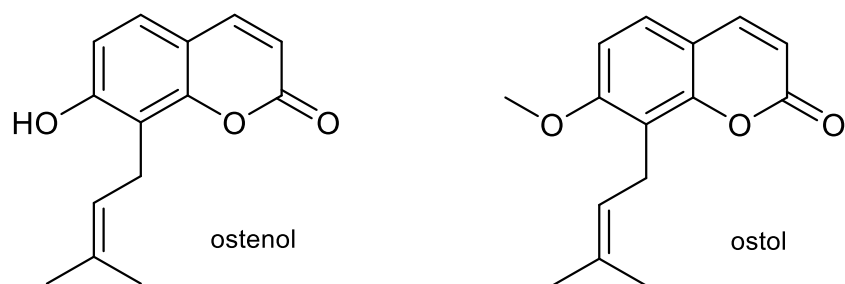
Rysunek 7. Wzory chemiczne ostrutyny i ammorezynolu (nazwy zwyczajowe).

Pochodna furanokumaryny, antogenol działa przeciwko *Enterococcus*, a imperatoryna wykazuje aktywność przeciwko *Shigella dysenteriae*.²³ Inne związki godne uwagi to benzoesan aegelinolu i agasylina, pochodne piranokumaryn o antybakteryjnym działaniu przeciwko klinicznym szczepom *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* oraz *Helicobacter pylori*.²³



Rysunek 8. Wzory chemiczne antogenolu, imperatoryny, aegelinolu i agasyliny (nazwy zwyczajowe).

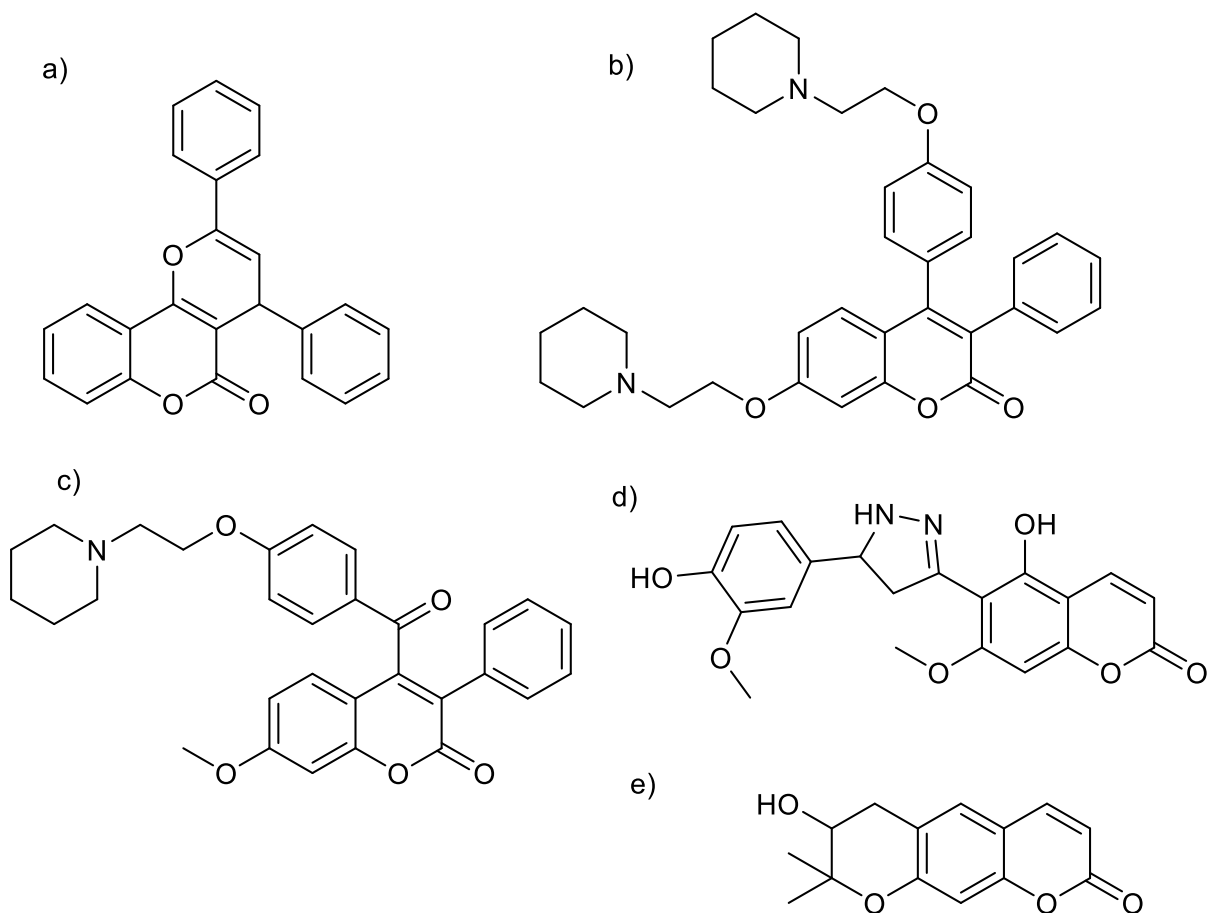
Ostenol wykazał znaczącą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą względem szczepów *Candida albicans*, *Fusarium solani* i *Aspergillus fumigatus* (Rysunek 9).²⁴⁻²⁵ Ostol natomiast, wykazał aktywność przeciwko takim grzybiczym patogenom roślinnym jak *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* oraz *Fusarium graminearum* (Rysunek 9).²³ Inne, ważne pochodne o znaczeniu przeciwgrzybiczym to psoralen (Rysunek 1), imperatoryna (Rysunek 8) i ostrutyna (Rysunek 7).



Rysunek 9. Wzory chemiczne ostenolu i ostolu (nazwy zwyczajowe).

1.2. Pochodne kumaryny jako związki o działaniu przeciwnowotworowym

W piśmiennictwie naukowym można znaleźć wiele dowodów na to, że kumaryna i jej pochodne wykazują właściwości przeciwnowotworowe.²⁶ Sama kumaryna, a także jej aktywny metabolit umbeliferon wykazują aktywność cytostatyczną i proapoptotyczną w stosunku do linii komórkowych raka płuc, niedrobnokomórkowego raka płuc, gruczolaka, czerniaka, raka prostaty itp.



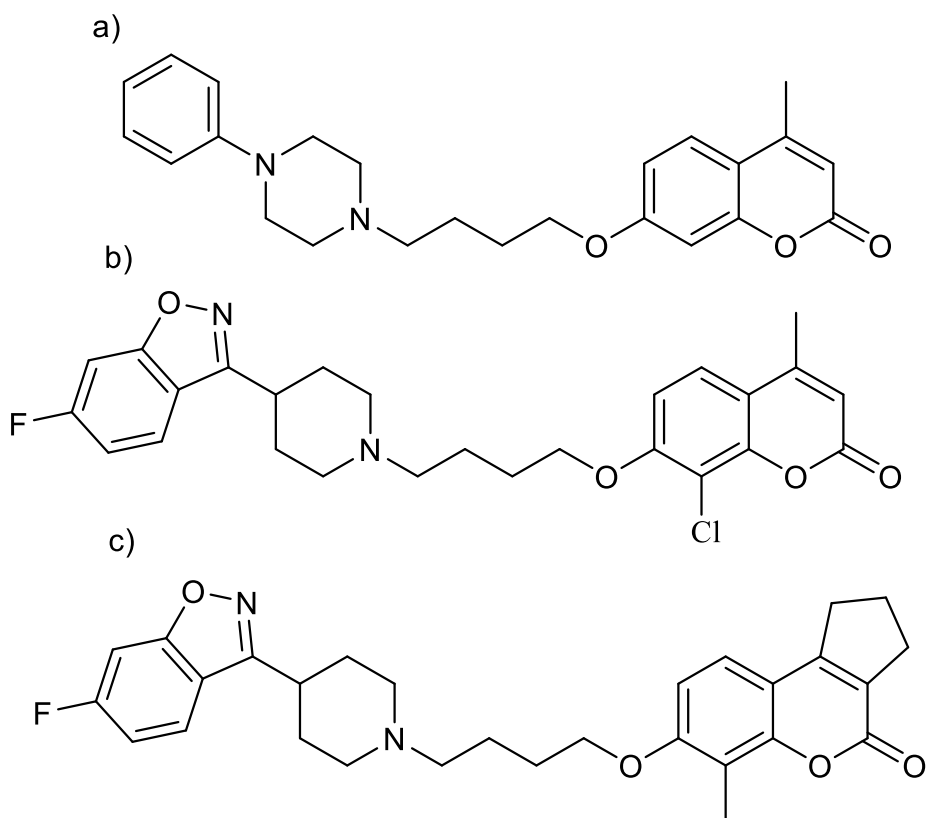
Rysunek 10. Wzory chemiczne pochodnych kumaryny wykazujących działanie przeciwnowotworowe: a) 2,4-difenylo-4H,5H-pirano[3,2-c]chromen-5-on, b) 3-fenyl-7-(2-(piperydylo)etoksy)-4-(4-(2-(piperydylo)etoksy)fenilo)-2H-chromen-2-on, c) 7-metoksy-3-fenyl-4-(4-(2-(piperydylo)etoksy)benzoilo)-2H-chromen-2-on, d) 5-hidroksy-6-(5-(4-hidroksy-3-metoksyfenilo)-4,5-dihydro-1H-pyrazo-3-ilo)-7-metoksy-2H-chromen-2-on, e) decursinol (nazwy chemiczne).

Liczne pochodne syntetyczne wykazują działanie przeciwko różnego typu komórkom nowotworowym, między innymi hybrydy kumarynowo-chalkonowe dają obiecujące rezultaty wobec

linii komórkowych raka okrężnicy HCT 116, raka trzustki MiaPaCa-2 (Rysunek 10a); pochodne 7-hydroksykumaryny wobec raka piersi MCF-7, MDA-MB-231, płuc A-549 czy raka szyjki macicy HeLa (Rysunek 10b,c)); pochodne 4,7-dihydroksykumaryny – wobec linii komórek białaczkowych CCRF-CEM i MOLT-4 (Rysunek 10d)).²⁶ Wysoki potencjał przeciwnowotworowy drzemie także w ostolu (Rysunek 9) i imperatorynie (Rysunek 8). Indukują one apoptozę w komórkach białaczkowych HL-60, dodatkowo imperatoryna działa na linie nowotworowe wątrobowo-komórkowe HepG2, a ostol na komórki raka sutka MCF-7 i raka piersi MDA-MB 231.²³ Agasylina, benzoesan aegelinonu (Rysunek 8) i ostol (Rysunek 9) wykazują działanie na komórki raka płuc A549.²³ Natomiast decursinol daje obiecujące rezultaty w badaniach nad komórkami raka prostaty, płuc czy piersi (Rysunek 10).²⁷

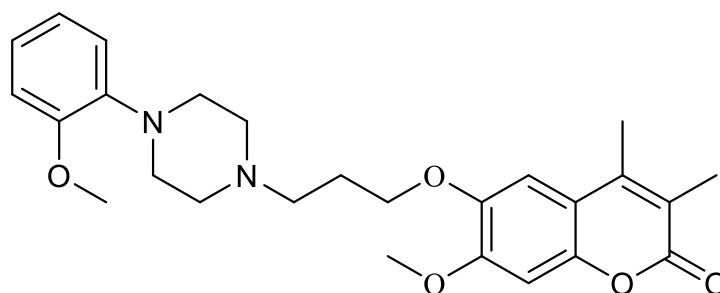
1.3. Pochodne kumaryn jako związki wykazujące powinowactwo do receptorów ośrodkowego układu nerwowego

Syntetyczne i naturalne kumaryny mogą mieć zastosowanie w terapii zaburzeń psychicznych o podłożu neurodegeneracyjnym, takich jak choroby Alzheimera, Parkinsona, schizofrenia, epilepsja czy depresja. Pochodne 7-hydroksykumaryny połączone łańcuchem alkilowym z fragmentem arylopiperazyńlowym wykazują działanie antagonistyczne wobec receptorów serotoninowych.¹¹ W literaturze naukowej można znaleźć kilka przykładów dotyczących modyfikacji pochodnych 7-hydroksykumaryny w celu podwyższenia powinowactwa do tych receptorów (Rysunek 11).²⁸⁻³¹



Rysunek 11. Wzory chemiczne pochodnych kumaryn wykazujących powinowactwo do receptorów serotoninowych: a) 4-metylo-7-(4-(4-fenylopiperazynylo)butoksy)-2H-chromen-2-on, b) 8-chloro-7-(4-(4-(6-fluorobenzo[d]izoksazo-3-ylo)piperydynylo)butoksy)-4-metylo-2H-chromen-2-on, c) 7-(4-(4-(6-fluorobenzo[d]izoksazo-3-ylo)piperydynylo)butoksy)-6-metylo-2,3-dihydrocyklopenta[c]chromen-4(1H)-on (nazwy chemiczne).

Dodatkowo skopoletyna i psoralen (Rysunek 1) wykazały działanie antydepresyjne w badaniach *in vivo*.¹¹ Ensakulina natomiast wykazała wysokie powinowactwo do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT₇, adrenergicznych α 1 i dopaminergicznych D2, D3 (Rysunek 12).¹¹



ensakulina

Rysunek 12. Wzór chemiczny ensakuliny (nazwa zwyczajowa).

2. Wyniki

Chociaż kumaryny przedstawione w sekcjach 1.1-1.3 mają zróżnicowaną budowę, można zaobserwować, że obecność grupy hydroksylowej i ugrupowań aminowych jest kluczowa dla wielu związków aktywnych biologicznie. Uderzający jest jednak brak danych na temat pochodnych zawierających grupę hydroksylową w położeniu C5 pierścienia kumaryny. Dlatego moje badania oparłam na hydroksykumarynach zawierających to ugrupowanie w pozycjach C5 lub C7 pierścienia kumarynowego. Przedstawiona rozprawa habilitacyjna pt. „Pochodne hydroksykumaryn jako struktury wiodące w poszukiwaniu nowych chemoterapeutyków” obejmuje cykl sześciu prac (**H-1 – H-6**). Poszczególne publikacje opisują procedury syntetyczne dotyczące nowych pochodnych hydroksykumaryn, dokumentują ich tożsamość za pomocą widm NMR, MS (**H-1 – H-6**), strukturę w cieple stałym za pomocą analizy rentgenostrukturalnej dla wybranych pochodnych (**H-1 – H-4**) oraz opisują badania cytotoksyczności w stosunku do komórek niedrobnokomórkowego raka płuc A549, czerniaka HTB140 i ludzkiego raka prostaty DU145 (**H-1 – H-3**), badania mikrobiologiczne w stosunku do szeregu szczepów bakteryjnych (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Bacillus cereus* ATCC 11178, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) i grzybiczych (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 2091, *Candida parapsilosis* ATCC 22019) (**H-3**) i/lub powinowactwa do receptorów serotoninowych (**H-4 – H-6**).

Zamieszczony komentarz zawiera zwięzłe omówienie uzyskanych wyników z podkreśleniem ich istotności. Wszystkie szczegóły takie jak, przepisy preparatywne, dokumentacja spektralna, dodatkowe tabele wyników, metodyka badań są zawarte w wymienionych publikacjach i ich suplementach.

Moje poszukiwania nowych chemoterapeutyków obejmowały:

1. Wybór struktur wiodących i projektowanie nowych struktur (**H-1 – H-6**).
2. Optymalizację procesów syntezy i oczyszczania (**H-1 – H-5**).
3. Syntezę nowych pochodnych kumaryn (**H-1 – H-6**).
4. Identyfikację struktur nowych pochodnych za pomocą widm ¹H NMR, ¹³C NMR i MS (**H-1 – H-6**)

5. Analizę rentgenostrukturalną wybranych pochodnych (**H-1 – H-4**).
6. Określenie aktywności biologicznej w oparciu o testy cytotoksyczności, badania mikrobiologiczne i powinowactwa do receptorów serotoninowych (**H-1 – H-6**).
7. Analizę zależności struktura-aktywność i sprecyzowanie najbardziej obiecujących kierunków poszukiwań (**H-1 – H-6**).
8. Zdefiniowanie nowych struktur wiodących (**H-1 – H-6**).

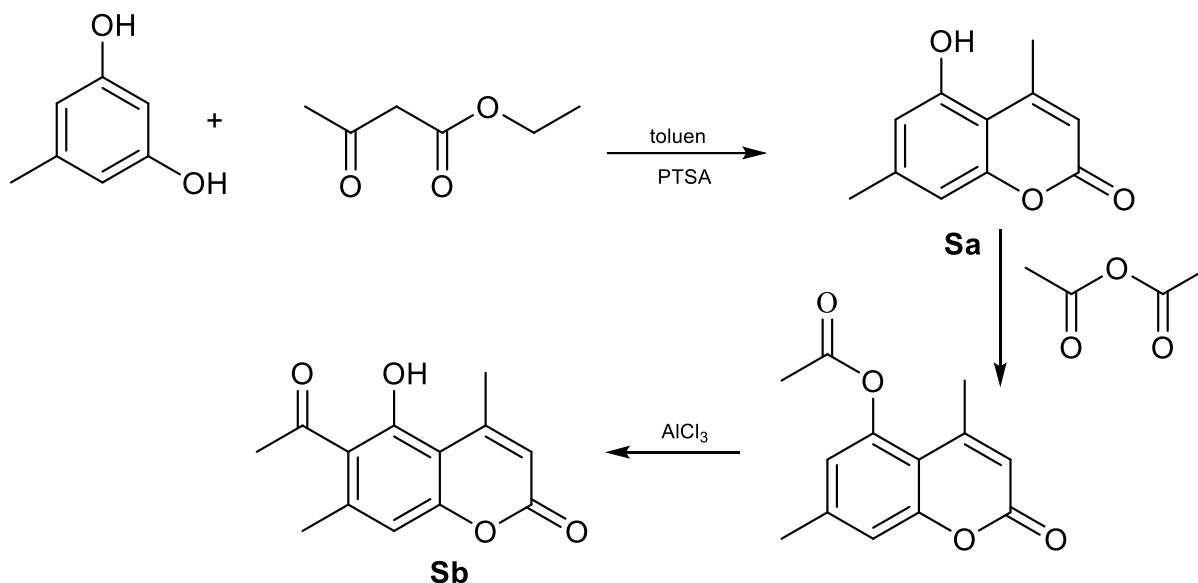
Jak wykazałam w części pierwszej, kumaryny są ważną grupą związków o szerokim zakresie działania biologicznego. Tematem moich zainteresowań były pochodne 7- i 5-hydroksykumaryn. Przykładowe związki zaprezentowane na podstawie doniesień literaturowych, należą głównie do grupy 7-hydroksykumaryn. Układy te są najszerzej opisaną grupą pochodnych kumarynowych, obok 4 i 6-hydroksykumaryn. Literatura naukowa dotycząca 5-hydroksykumaryn stanowi niewielki odsetek wszystkich prac, prawdopodobnie ze względu na niskie rozpowszechnienie wśród naturalnych kumaryn, izolowanych z roślin. W związku z tym 5-hydroksykumaryny są niewykorzystaną bazą w poszukiwaniach nowych związków posiadających potencjał terapeutyczny.

W piśmiennictwie naukowym powszechnie używa się nazw zwyczajowych kumaryny i jej pochodnych. Nazwy systematyczne tworzy się dwójako – przez dodanie nazw podstawników i ich lokantów do nazwy zwyczajowej (benzo- α -piron lub kumaryna) lub z użyciem nazwy układu 2H-chromen-2-on. W moich pracach także zastosowałam dwójakie nazewnictwo, w zależności od wymagań czasopisma i wskazówek edytora i recenzentów.

Trzema pierwszymi strukturami wiodącymi w moich badaniach były 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sa**), 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sb**) oraz 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryna (**Sc**). Wszystkie wymienione związki zawierają szkielet kumaryny z grupą hydroksylową w pozycji C5 lub C7 pierścienia kumarynowego, o czym wspominałam w poprzednim paragrafie. Dodatkowo zaplanowałam wprowadzenie do struktur wiodących grup metylowych w pozycji C4 pierścienia kumaryny, które według wielu autorów, poprawiają właściwości farmakoforowe hydroksykumaryn, szczególnie w odniesieniu do opisanego wcześniej powinowactwa do receptorów serotoninowych.²⁸⁻³¹ Dla pochodnych 7-hydroksykumaryny, grupa acetylowa w pozycji C8 pierścienia kumaryny była natomiast wskazywana w literaturze, jako element zwiększający aktywność mikrobiologiczną i cytotoksyczną. Dlatego postanowiłam wprowadzić ugrupowanie acetylowe również do zaplanowanych pochodnych 5-hydroksykumaryny.³²

W pierwszym etapie badań zsyntetyzowałam struktury wiodące z zastosowaniem ogrzewania konwencjonalnego (czasza grzejna lub łaźnia wodna). Były to 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sa**), 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sb**) oraz 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryna (**Sc**). W związku z tym, że przepisy literaturowe nie zawsze pozwalały na uzyskanie wymienionych związków o odpowiedniej czystości i z dostateczną wydajnością, modyfikowałam i wprowadzałam zmiany (temperatura, rozpuszczalnik, długość ogrzewania) do istniejących procedur. 5-Hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sa**) powstała w wyniku kondensacji Pechmanna z orcynolu (1,3-dihydroksy-5-metylobenzenu) i acetylooctanu etylu. Związki ogrzewałam w toluenie (temperatura wrzenia) z zastosowaniem kwasu *p*-toluenosulfonowego (PTSA) jako katalizatora, wodę powstającą w czasie procesu, odprowadzałam za pomocą nasadki azeotropowej. Produkt oczyszczałam za pomocą krystalizacji z etanolu (Schemat 1).³³ Następnie otrzymałam produkt pośredni, 5-acetoksy-4,7-dimetylokumarynę w reakcji 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny z bezwodnikiem octowym. Mieszanina reagentów była ogrzewana przez godzinę w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika, następnie wylana na wodę z lodem, produkt pośredni został odsączony i po wysuszeniu oczyszczony przez krystalizację z etanolu (Schemat 1).³³ W kolejnym etapie 5-acetoksy-4,7-dimetylokumarynę

poddałam przegrupowaniu Friesa przez ogrzewanie z chlorkiem glinu. 6-Acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumarynę (**Sb**) wyodrębniłam przez dodanie do mieszaniny poreakcyjnej wody z lodem, zakwaszenie kwasem solnym i wytrącenie osadu w czasie ogrzewania na łaźni wodnej (Schemat1).³³



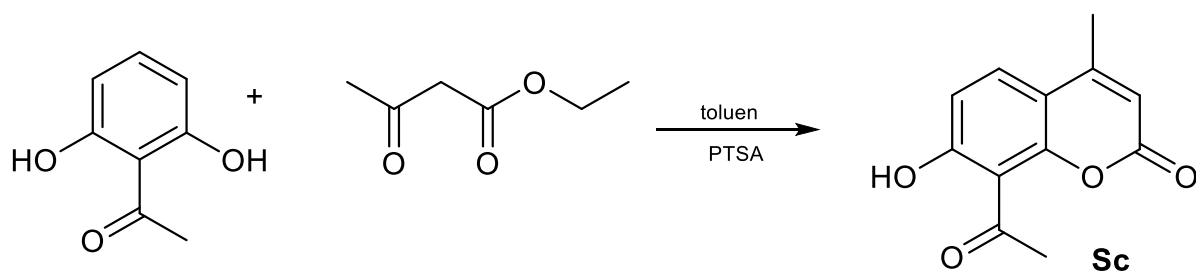
Schemat 1. Schemat syntezy 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sa**) i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**).

8-Acetylo-7-hydroksy-4-metylokumarynę (**Sc**) otrzymałam metodą kondensacji Pechmana przez ogrzewanie pod nasadką azeotropową dihydroksyacetonu i 3-oksobutanianu etylu w toluenie w obecności kwasu *p*-toluenosulfonowego. Osad produktu wytrąciłam przez wylanie mieszaniny reakcyjnej do wody z lodem, odsączenie i krystalizację z etanolu (Schemat 2).³⁴ 5-Hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sa**) i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sb**) zostały wykorzystane jako struktury wiodące w pracach **H-1**, **H-3** i **H-4**. 8-Acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryna (**Sc**) została wykorzystana jako substrat w pracy **H-5** i **H-6**.

Trzema kolejnymi strukturami wiodącymi były, wykorzystane w pracy **H-2** analogi seseliny i alloxantoksyletyny– 5-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Sd**), 7-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Se**) i 7-hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Sf**). Związki o analogicznej budowie były wielokrotnie opisywane w literaturze jako układy posiadające potencjał przeciwnowotworowy.³⁵⁻⁴⁰ Struktury wiodące **Sd**, **Se** i **Sf** zaplanowałam z uwzględnieniem tych samych przesłanek co struktury **Sa**, **Sb** i **Sc**. Uwzględniłam więc wprowadzenie grupy metylowej w pozycję C4 pierścienia kumaryny (**Sd** i **Se**) oraz zaplanowałam porównanie działania biologicznego otrzymanych związków do analogów bez grupy metylowej w tym miejscu (**Sf**). Ponadto zaplanowałam syntezę tak, żeby struktury wiodące posiadały grupę hydroksylową w pozycji C5 (**Sd**) lub C7 (**Se** i **Sf**) pierścienia kumaryny. Dodatkowy pierścień piranowy w tego typu układach może się tworzyć po tej samej lub po przeciwnej stronie w stosunku do grupy laktonowej kumaryny, w zależności od tego, czy w zamknięciu pierścienia uczestniczy grupa hydroksylowa C5 czy C7.

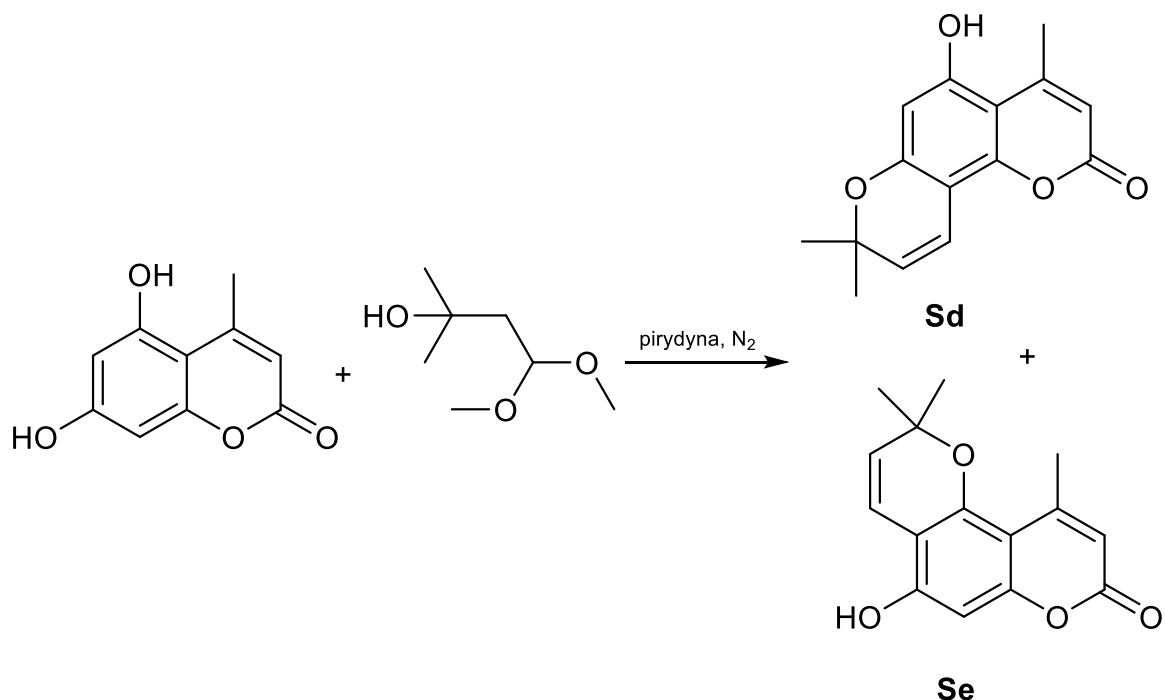
Związki **Sd** i **Se** zostały otrzymane przez ogrzewanie konwencjonalne 5,7-dihydroksy-4-metylokumaryny, pirydyny i 4,4-dimetoksy-2-metylobutan-2-olu w atmosferze azotu, w temperaturze 148-152 °C. Po kilkustopniowym oczyszczaniu otrzymałam 5-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-

f]-(8H)-chromen-2-on (**Sd**) i 7-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Se**) (Schemat 3).



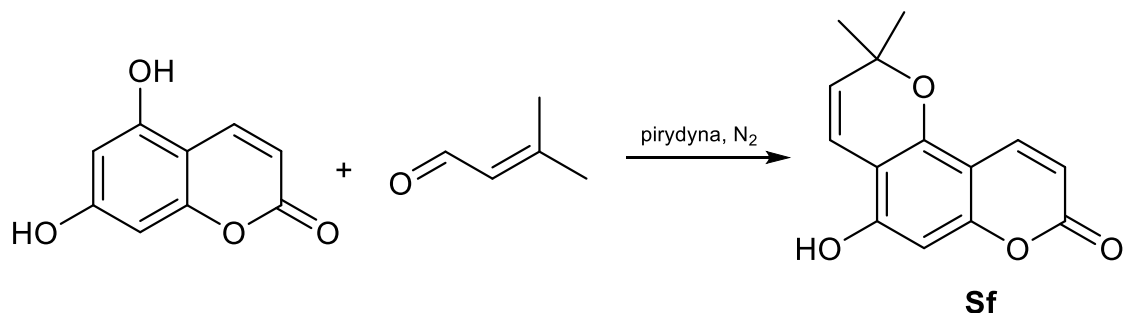
Schemat 2. Schemat syntezy 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny (**Sc**).

Opisana metoda była czasochłonna (8h grzania), wymagała także wielogodzinnego, kłopotliwego oczyszczania z użyciem benzenu. Jej wydajność natomiast była dość słaba (15,5%). Dlatego postanowiłam zastosować inną metodę ogrzewania by zoptymalizować wydajność reakcji i ograniczyć czas oraz zużycie odczynników w czasie oczyszczania produktów. Dlatego te same związki otrzymałam z zastosowaniem ogrzewania mikrofalowego. Promieniowanie mikrofalowe stosowane w syntezach organicznych umożliwia skrócenie czasu trwania reakcji w porównaniu do procesów prowadzonych z zastosowaniem ogrzewania konwencjonalnego. Dodatkowo metoda ta pozwala na zminimalizowanie kosztów procesów, często także na zwiększenie ich wydajności oraz zmniejszenie ilości lub całkowite wyeliminowanie rozpuszczalników, które są niezbędne do prowadzenia syntez w sposób tradycyjny. W przypadku syntezy związków **Sd** i **Se** zastosowanie promieniowania mikrofalowego pozwoliło zdecydowanie skrócić czas syntezy, ograniczyć zużycie octanu etylu, metanolu i benzenu, natomiast wymusiło zastosowanie kolumny chromatograficznej, z chloroformem jako eluentem, do rozdzielania mieszaniny poreakcyjnej. W rezultacie wydajności obu procesów były także porównywalne (15,5-15%).



Schemat 3. Schemat syntezy 5-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-onu (**Sd**) i 7-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-onu (**Se**).

Zastosowanie 5,7-dihydroksykumaryny, 3-metylo-2-buten-1-alu, pirydyny i temperatury ogrzewania 115 °C pozwoliło otrzymać, po kilkietapowym oczyszczaniu, 7-hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Sf**), będący ostatnią substancją wiodącą zastosowaną w opisywanych pracach (Schemat 4).

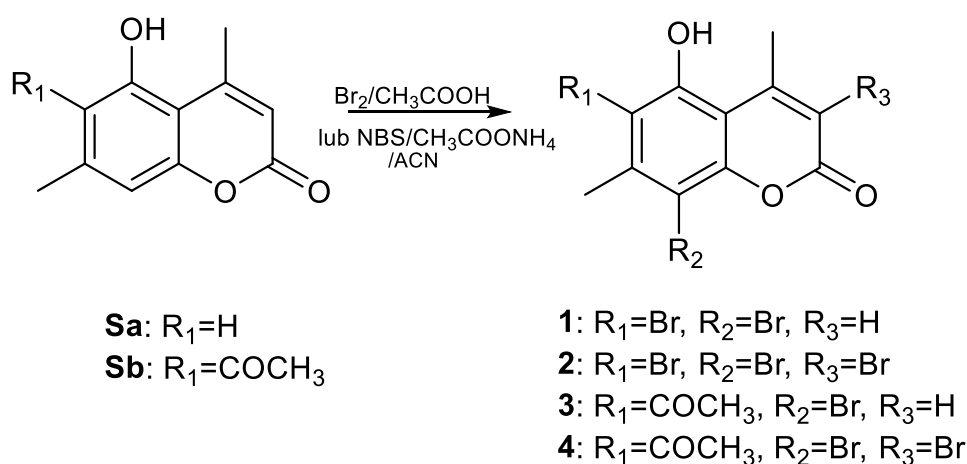


Schemat 4. Schemat syntezy 7-Hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Sf**).

Szereg doniesień literaturowych wskazuje na aktywność biologiczną bromowanych pochodnych kumaryn. Związki te wykazują działanie cytotoksyczne, mikrobiologiczne, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i przeciwwirusowe.⁴¹⁻⁴⁶ Również kompleksy metali z różnymi związkami okazały się biologicznie aktywne, a badania nad nimi rozwijają się intensywnie. Odkrycie, że kompleksy kumaryn z jonami metali mogą być bardziej skuteczne, niż wyjściowe kumaryny wytyczyło nowe kierunki badań.⁴⁷ Liczne doświadczenia wykazały, że takie kompleksy mogą być z powodzeniem stosowane w leczeniu różnych chorób o podłożu bakteryjnym czy grzybiczym. Kompleksy kumaryn z metalami często mają silniejsze działanie farmakologiczne i w wielu przypadkach są mniej toksyczne niż wyjściowy liganda. Wykazują one właściwości przeciwrzybcze, antybakteryjne i przeciwnowotworowe. Na przykład, kompleksy Cu(II) z kumarynami wykazały aktywność przeciwbakteryjną wobec *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Bacillus subtilis*, przeciwrzybiczą wobec *Candida albicans*, *Aspergillus clavatus* i *Aspergillus Niger* oraz przeciwgruźliczą wobec *Mycobacterium tuberculosis*.⁴⁸ Miedź jest endogennym pierwiastkiem, niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka, więc sugeruje się mniejszy wpływ toksyczny tego pierwiastka niż np. cis-platyny i pochodnych. Nieprawidłowy poziom tego mikroelementu skutkuje chorobami układu krążenia i ośrodkowego układu nerwowego.⁴⁹⁻⁵¹ Jednocześnie miedź pełni ważną rolę w procesie angiogenezy (wzrostu nowotworu), a wiele typów nowotworów wiąże się z jej podwyższonym poziomem.⁵² Terapie oparte na usuwaniu nadmiaru bądź wyrównywaniu niedoborów miedzi w organizmie bazują na związkach chelatujących ten pierwiastek.

W pracy **H-1** postawiłam sobie pytanie, czy bromowane pochodne 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sa**) i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**) będą wykazywały lepsze działanie biologiczne niż związki wyjściowe. Poza tym, postanowiłam sprawdzić, czy kompleksowanie za pomocą miedzi(II) - 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**) oraz jej mono i dibromopochodnej pozwoli otrzymać aktywniejsze substancje w badaniach *in vitro*. W tym celu zsyntetyzowałam bromopochodne wyjściowych kumaryn. Bromowania kumaryn to procesy skomplikowane ze względu na specyficzną budowę cząsteczki kumaryny, zawierającą jednocześnie pierścień aromatyczny i fragment α , β nienasyconego związku karbonyłowego. Z tego względu trudno przewidzieć miejsce podstawienia bromu w cząsteczce, nawet poprzez analizę potencjalnych miejsc przyłączenia bromu charakterystycznych dla danej metody bromowania. W pracy zastosowałam dwie różne metody w celu porównania wydajności, czasu trwania reakcji oraz miejsca podstawienia bromu w cząsteczce kumaryny w zależności od zastosowanej metody. Obie struktury wiodące **Sa** i **Sb**

poddawałam bromowaniu bromem w kwasie octowym (różne stosunki molowe) oraz bromowaniu za pomocą N-bromoimidu kwasu bursztynowego (NBS) z zastosowaniem octanu amonu i acetonitrylu jako rozpuszczalnika. Spodziewałam się, że bromowanie bromem w kwasie octowym umożliwi otrzymanie pochodnych podstawionych bromem w pierścieniu kumaryny zawierającym grupę hydroksylową (możliwe pozycje C6 i C8 pierścienia kumaryny- aromatyczna substytucja elektrofilowa), natomiast bromowanie NBS powinno preferować podstawienie bromem w pozycji C3 pierścienia kumaryny. Zastosowane przepisy literaturowe optymalizowałam stosując różne stosunki molowe reagentów, dzięki czemu okazało się, że metoda bromowania bromem w kwasie octowym, przy odpowiednim nadmiarze bromu w stosunku do kumaryny (6:1), także prowadzi do podstawienia pozycji C3 w kumarynie, ale tylko dla kumaryny zawierającej grupę acetylową (**Sb**). Dla struktury wiodącej **Sa** podstawienie pozycji C3 bromem uzyskałam przez zastosowanie bromowania za pomocą NBS. Związek **1** otrzymałam przez bromowanie bromem (1:1) w kwasie octowym. Do mieszaniny poreakcyjnej dodałam tiosiarczanu sodowego w celu usunięcia nadmiaru bromu, a następnie ekstrahowałam produkt za pomocą chloroformu. Po wysuszeniu i odparowaniu rozpuszczalnika, suchą pozostałość krystalizowałam z kwasu octowego, a następnie oczyszczałam na kolumnie chromatograficznej z użyciem mieszaniny chloroform-heksan (7:5) jako eluentu. Otrzymałam dibromopochodną 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny - 6,8-dibromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumarynę (**1**). Tribromopochodną 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny otrzymałam przez bromowanie związku wyjściowego za pomocą NBS (N-bromoimid kwasu bursztynowego) (stosunek molowy reagentów 1:3) w obecności octanu amonowego, z zastosowaniem acetonitrylu jako rozpuszczalnika. Produkt – 3,6,8-tribromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumarynę (**2**) oczyszczałam przez krystalizację z kwasu octowego. Bromopochodne 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**) otrzymałam w sposób analogiczny do syntezy związku **2**: 6-acetylo-8-bromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumarynę (**3**) przez bromowanie bromem w kwasie octowym (1:1), dibromopochodną 6-acetylo-3,8-dibromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumarynę (**4**) przez bromowanie nadmiarem bromu w kwasie octowym (1:6), a następnie oczyszczanie za pomocą krystalizacji i kolumny chromatograficznej (Schemat 5).



Schemat 5. Schemat syntezy bromopochodnych 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sa**) i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**).

Nowe związki zostały scharakteryzowane za pomocą widm ¹H NMR, ¹³C NMR i MS. W celu dodatkowego potwierdzenia struktury i konformacji w cieple stałym, dla 3,6,8-tribromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**2**) wykonana została rentgenowska analiza strukturalna (szczegóły w pracy **H-1**). Dla pozostałych związków nie udało się uzyskać monokryształów odpowiedniej jakości.

Następnie otrzymaliśmy kompleksy miedzi(II) z uzyskanymi wcześniej pochodnymi **Sb**, **3** i **4**. Synteza była prowadzona metodą elektrochemiczną. Anodę stanowiła blaszka miedziana, funkcję katody pełnił platynowy drut. Do etanolowego roztworu odpowiedniego ligandu (**Sb**, **3** lub **4**) dodawano nadchloran tetrabutylamonowy, który pełnił funkcję elektrolitu i rozpoczynano elektrolizę, trwającą ok 2-3 h. Po zakończeniu procesu przesączało mieszaninę poreakcyjną, a stałe produkty były trzykrotnie przemylane wodą. Postęp reakcji kompleksowania monitorowano metodami spektroskopii w podczerwieni porównując widma zarejestrowane dla substratów i produktów. Do identyfikacji uzyskanych kompleksów użyto analizy rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej (XAS), która daje opis lokalnego otoczenia danego pierwiastka w skali atomowej. Informacje, uzyskane dla nowych kompleksów, pozwoliły ustalić występowanie miedzi na +2 stopniu utlenienia. Badania EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure) potwierdziły obecność czterech atomów tlenu w pierwszej strefie koordynacyjnej kompleksów. Za pomocą analizy elementarnej ustalono skład pierwiastkowy kompleksów: $\text{Cu}(\text{Sb})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{3})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Cu}(\text{4})(\text{ClO}_4) \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$.

Otrzymane związki – ligandy i kompleksy zbadano *in vitro* (szczegóły w pracy **H-1**) w celu sprawdzenia cytotoksyczności względem zdrowych komórek mysich fibroblastów (NIH3T3) i komórek ludzkiego raka prostaty (DU145) (Tabela 1). 5-Hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sa**) i miedziowy kompleks 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny ($\text{Cu}(\text{Sb})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) były nieselektywne względem komórek nowotworowych, podczas gdy 3,6,8-tribromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**2**), 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**Sb**) i miedziowy kompleks 6-acetylo-3,8-dibromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny ($\text{Cu}(\text{3})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) były porównywalnie aktywne względem obu badanych linii komórkowych.

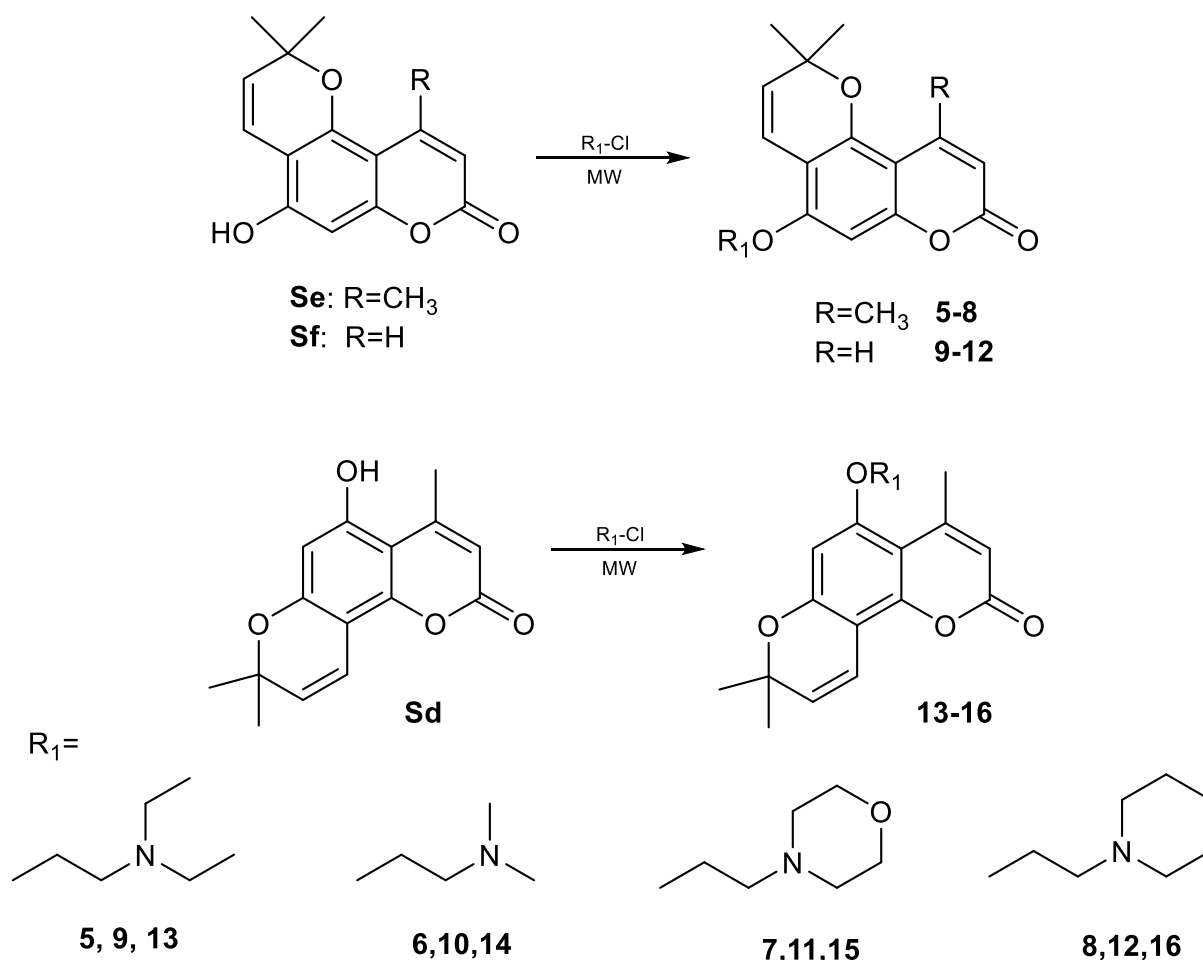
Tabela 1. Przeżywalność komórek [%] po 48h inkubacji z 10 μM roztworami badanych związków.

	Sa	Sb	1	2	3	4	$\text{Cu}(\text{Sb})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{Cu}(\text{3})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{Cu}(\text{4})(\text{ClO}_4) \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$
NIH3T3	71 $\pm$ 6	62 $\pm$ 5	44 $\pm$ 4	33 $\pm$ 7	64 $\pm$ 2	73 $\pm$ 5	83 $\pm$ 9	71 $\pm$ 6	88 $\pm$ 2
DU145	106 $\pm$ 9	64 $\pm$ 3	32 $\pm$ 3	38 $\pm$ 5	50 $\pm$ 6	71 $\pm$ 5	119 $\pm$ 1	75 $\pm$ 1	19 $\pm$ 3

Najbardziej selektywny okazał się miedziowy kompleks 6-acetylo-3,8-dibromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**4**). 6,8-Dibromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**1**) i 3,6,8-tribromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryna (**2**) obniżały żywotność komórek, a efekt ten zależał od dawki. Ligand **3** i jego kompleks wykazały słabe działanie przeciwnowotworowe, jednak sam ligand był bardziej selektywny w stosunku do komórek nowotworowych niż jego miedziowy kompleks. Związek **4** i jego miedziowy kompleks wykazały aktywność biologiczną, przy czym kompleks był znacznie bardziej aktywny i selektywny niż ligand. Podsumowując można powiedzieć, że obecność grupy acetylowej w strukturze kumaryny, podwyższała aktywność, podobnie jak wprowadzenie atomów bromu. Kompleksowanie bromowanych ligandów za pomocą Cu(II) zwiększało aktywność pochodnych, prawdopodobnie dzięki jednoczesnej obecności atomów bromu i miedzi(II) w cząsteczce.

W kolejnej publikacji **H-2** zajęłam się badaniami nad pochodnymi piranokumaryn jako związkami wykazującymi działanie przeciwnowotworowe. Sprawdziłam wpływ grupy metylowej w pozycji C4 pierścienia kumaryny oraz znaczenie położenia pierścienia piranowego względem grupy lakonowej w kumarynie. Naturalne piranokumaryny – seselina i ksantyletyna (Rysunek 1), wykazały działanie cytotoksyczne względem linii białaczki mysiej L1210 i komórek raka płuc SW1573, a ich pochodne względem linii białaczkowej P-388.⁵³⁻⁵⁵ 7-Hydroksyalloxantoksyletyna działała natomiast przeciwko komórkom raka piersi MCF-7, komórkom raka naskórka KB i drobnokomórkowego raka płuc NCI-H187.⁵⁶

W pracy **H-2** rozpatrzono łącznie dwanaście pochodnych seseliny i alloksantoksyletyny. Wszystkie związki były syntetyzowane z zastosowaniem reaktora mikrofalowego. Zoptymalizowałam przepisy literaturowe przez dobór odpowiednich stosunków molowych reagentów oraz próby w różnych rozpuszczalnikach. Ostatecznie 5-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Sd**), 7-hydroksy-2',2',4-trimetylo pirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Se**) lub 7-hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-on (**Sf**) były wprowadzane do kolby reakcyjnej łącznie z trzykrotnym nadmiarem odpowiedniego odczynnika alkilującego i węglanem potasu. Jako rozpuszczalnika używałam acetonu. Czynniki alkilującymi grupę hydroksylową (reakcja według mechanizmu S_N2) były chlorowodorki : N-(2-chloroetylo)-N,N-dietyloaminy, N-2-(chloroetylo)-N,N-dimetyloaminy, N-(2-chloroetylo)morfoliny i N-(2-chloroetylo)piperydyny (Schemat 6). Dzięki alkilowaniu za pomocą tak dobranego zestawu amin alifatycznych, miałam nadzieję uzyskać związki o zwiększonym działaniu cytotoksycznym.³¹ Mieszaninę reakcyjną ogrzewałam w czterech cyklach grzania po 3 minuty, łączny czas ogrzewania wynosił 12 minut. Postęp reakcji monitorowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, po jej zakończeniu odsączyłam sole nieorganiczne i odparowałam rozpuszczalnik. Pozostałość oczyszczałam na kolumnie chromatograficznej z użyciem chloroformu jako eluenta. Struktury otrzymanych związków potwierdziłam za pomocą widm 1H NMR, ^{13}C NMR i MS.



Schemat 6. Schemat syntezy pochodnych seseliny i alloksantoksyletyny.

Następnie wszystkie otrzymane pochodne przeprowadziłam w chlorowodorki z zastosowaniem metanolu wysyconego chlorowodem. Dla dwóch substratów: 7-hydroksy-2',2',4-

trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-onu (**Se**) i 7-hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-onu (**Sf**) oraz dla jednej pochodnej O-alkilowanej 5-(2-dietyloamino)etoksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)-chromen-2-onu (**13**) uzyskałam kryształy bardzo dobrej jakości. Struktury tych związków zbadano dodatkowo metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej (szczegóły w pracy **H-2**).

Tabela 2. Aktywność antyproliferacyjna testowanych związków **5-16** (72h). Wyniki podano w postaci IC₅₀ [μM] i SI (Indeksu selektywności).

Związek	Komórki nowotworowe				Komórki zdrowe
	A549		HTB-140		HaCaT
	IC ₅₀	SI	IC ₅₀	SI	IC ₅₀
Sd	56,83 ± 3,02	1,16	44,95 ± 2,33	1,47	65,87 ± 7,66
Se	57,82 ± 3,7	1,14	43,97 ± 3,9	1,50	66,13 ± 5,96
Sf	56,27 ± 4,4	1,17	47,07 ± 1,2	1,4	66,05 ± 7,09
5	7,3 ± 1,17	1,31	4,6 ± 0,70	1,87	8,59 ± 1,55
6	7,31 ± 0,41	1,2	4,3 ± 0,72	2,04	8,79 ± 0,67
7	48,02 ± 5,32	1,16	45,52 ± 0,91	1,23	55,81 ± 5,77
8	6,87 ± 1,05	1,36	4,25 ± 0,91	1,96	8,35 ± 1,08
9	6,43 ± 0,85	1,5	2,48 ± 1,38	2,85	7,08 ± 1,17
10	6,54 ± 1,27	1,14	2,8 ± 0,62	2,65	7,43 ± 1,89
11	8,07 ± 0,36	1,09	6,15 ± 1,64	1,68	10,34 ± 2,28
12	5,86 ± 0,48	1,5	2,98 ± 0,85	1,65	7,32 ± 1,3
13	11,31 ± 2,68	1,82	8,35 ± 1,85	2,47	20,61 ± 2,01
14	11,03 ± 3,63	1,67	8,08 ± 1,15	2,29	18,47 ± 0,72
15	47,84 ± 5,42	1,22	48,03 ± 6,5	1,22	58,54 ± 0,85
16	10,86 ± 1,86	1,62	7,07 ± 1,7	2,48	17,62 ± 2,51
cisplatyna	1,95 ± 0,83	1,46	1,13 ± 0,19	2,51	2,84 ± 1,06
doksorubicyna	0,63 ± 0,21	1,73	0,47 ± 0,18	2,32	1,09 ± 0,23

Wartość IC₅₀ definiowana jako stężenie związku odpowiadające 50% hamowaniu wzrostu komórek. Dane wyrażono jako średnią ± SD. SI (indeks selektywności) obliczono dla każdego związku przy użyciu wzoru: SI = IC₅₀ dla prawidłowej linii komórkowej / IC₅₀ nowotworowej linii komórkowej.

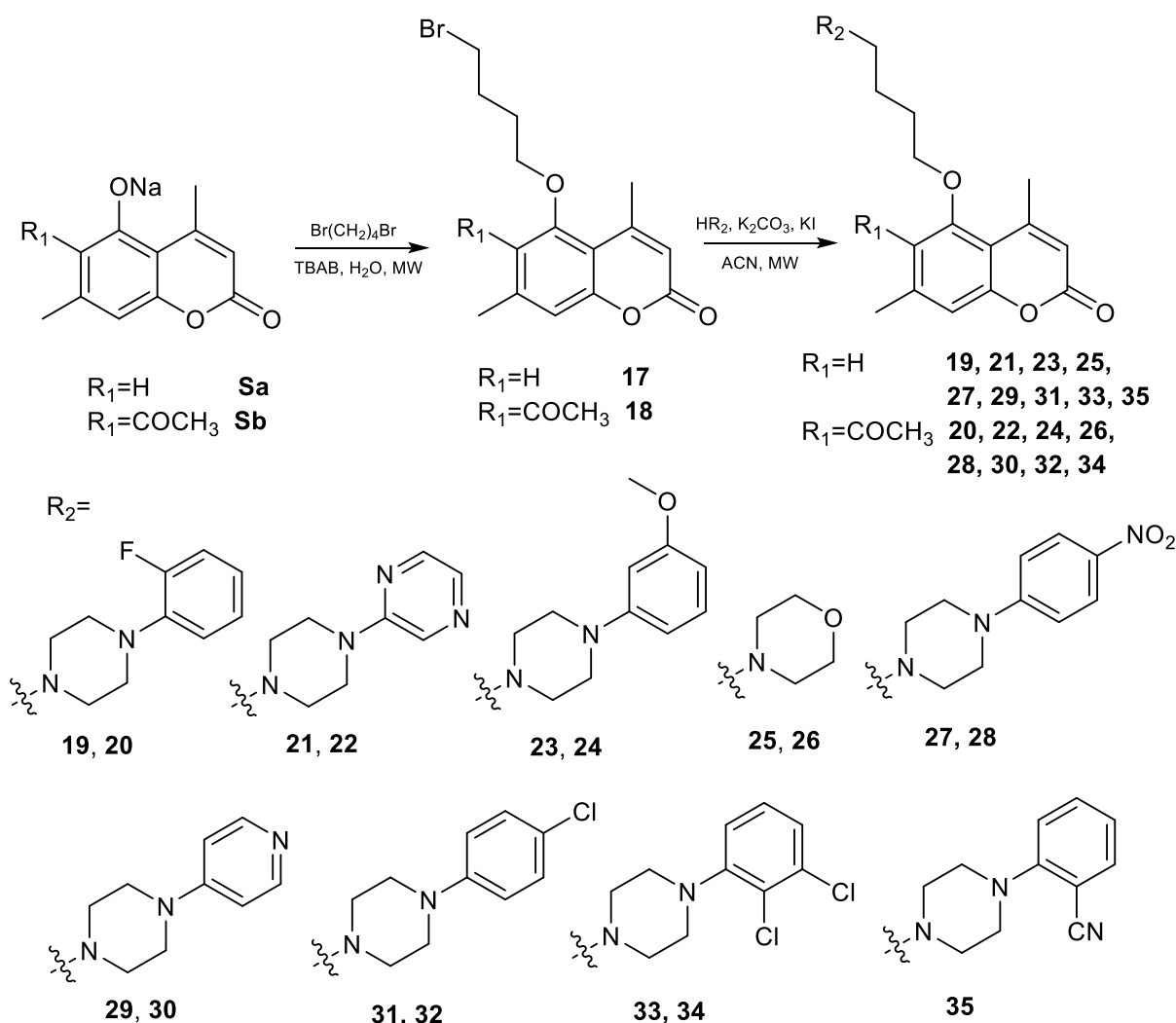
W kolejnym etapie pracy **H-2** oceniliśmy działanie cytostatyczne otrzymanych pochodnych (szczegóły i metodyka przeprowadzonych testów MTT, LDH, testów czułości na leki, migracji i wiązania z aneksyną V, w pracy **H-2**). Testy przeprowadzono z użyciem komórek ludzkich keratynocytów HaCaT, niedrobnokomórkowego raka płuc A-549 i komórek czerniaka HTB-140. Jako substancje referencyjne zostały zastosowane cisplatyna i doksorubicyna. Wszystkie badane związki były mniej toksyczne dla zdrowych komórek HaCaT niż substancje porównawcze (Tabela 2). Generalnie, nowe pochodne (**5-8** i **13-16**) posiadały wyższą aktywność niż struktury wiodące (**Sd-Sf**). Komórki czerniaka były zdecydowanie bardziej wrażliwe na testowane związki niż komórki raka płuc. Pięć związków (**Sd**, **Se**, **Sf**, **7**, **15**) wykazało niską cytotoksyczność w stosunku do testowanych komórek nowotworowych (IC₅₀ > 40 μM (43-66 μM)). Wartości IC₅₀ innych pochodnych wynosiły < 12 μM: 7-8 μM (HTB-140) i około 11 μM (A549) dla związków **13** i **16** oraz 6-8 μM (A549) i 2-6 μM (HTB-140) dla związków **5-6**, **8-12** i **14**. Najwyższy potencjał cytotoksyczny względem komórek HTB-140 posiadały związki **9**, **10** i **12**, dla których wartości IC₅₀ wahały się w granicach 2-3 μM, podczas gdy dla cisplatyny i doksorubicyny wynosiły 0,5-1,3 μM.

Powyższe rezultaty pokazały, że podstawniki dietyloaminowe, dimetyloaminowe i piperydynowe połączone z piranokumarynami za pomocą łącznika etoksyłowego zdecydowanie podwyższały aktywność cytotoksyczną badanych związków. Obniżenie aktywności powodowała obecność morfoliny, jako podstawnika strukturalnie odbiegającego od pozostałych amin (dodatkowy atom tlenu w pierścieniu). Związki wykazujące najwyższą cytotoksyczność (**9**, **10** i **12**) należały do grupy pochodnych alloksantoksyletyny, pochodne seseliny były mniej aktywne, co wskazuje na duże znaczenie usytuowania pierścienia piranowego w cząsteczce. Przyłączenie dodatkowej grupy metylowej w pozycję 4 pierścienia piranokumaryny obniżało aktywność względem komórek czerniaka (HTB-140), ale nie wpływało na aktywność względem komórek niedrobnokomórkowego raka płuc (A549) (związki **5-8**). Obecność podstawnika aminoetoksyłowego po przeciwnej stronie do grupy laktonowej w związku obniżała potencjał cytotoksyczny badanych pochodnych, natomiast jego obecność po tej samej stronie podwyższała. Większość badanych związków powodowała również wzrost czułości komórek nowotworowych na indukowaną przez cisplatynę i doksorubicynę (powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe) śmierć komórek. Wpływ badanych związków na indukowaną lekami śmierć komórek był wyższy dla komórek nowotworowych niż prawidłowych. Zaobserwowano wpływ związków **9**, **10** i **12** na efekty działania cisplatyny i doksorubicyny. W każdym przypadku efekt działania badanych związków zależał od czasu ich pre-inkubacji z badanymi komórkami. Po 1-godzinnej pre-inkubacji komórek zdrowych HaCaT z badanymi związkami, a następnie inkubacji z cisplatyną lub doksorubicyną, zaobserwowaliśmy minimalny wpływ związków na żywotność w stosunku do komórek inkubowanych jedynie z wymienionymi lekami. W tym przypadku widoczny był już jednak wpływ na komórki nowotworowe. Efekt ten rósł ze wzrostem czasu pre-inkubacji i był najwyraźniejszy dla czasu równego 6h (największa różnica między przeżywalnością komórek zdrowych i nowotworowych). Związki **9**, **10** i **12** indukowały apoptozę w komórkach nowotworowych i zdrowych, jednak pochodne **9** i **10** były bardziej aktywne w stosunku do komórek czerniaka HTB-140 niż komórek niedrobnokomórkowego raka płuc A549 i ludzkich keratynocytów HaCaT.

W kolejnej pracy **H-3** poświęciłam uwagę grupie arylo- i heteroarylopiperazynyłowych pochodnych kumaryn. W części wstępnej autoreferatu wskazałam kilka przykładów pochodnych 7-hydroksykumaryny połączonych łańcuchem alkilowym z fragmentem arylopiperazynyłowym, które wykazują działanie antagonistyczne wobec receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} bądź jednoczesną aktywność wobec receptorów 5-HT_{1A}/D₂ lub wyłącznie wobec receptorów D_{2A}.²⁸⁻³¹ Istnieją również doniesienia, że analogiczne pochodne tego typu mogą wykazywać także bioaktywność w innego typu kierunkach.⁵⁷⁻⁵⁸ Piperazynyłowe analogi kumaryn wykazały działanie antyproliferacyjne między innymi przeciwko komórkom raka płuc, piersi, prostaty czy przeciwko białaczce oraz znaczące działanie antybakteryjne i przeciwgrzybicze.⁵⁹⁻⁶⁰ *N*-arylopiperazynyłowe pochodne 4-hydroksykumaryny wykazały działanie jako inhibitory acetylocholinoesterazy.⁶¹ W literaturze naukowej nie było dotychczas żadnych doniesień na temat syntezy arylo/heteroarylopiperazynyłowych pochodnych 5-hydroksykumaryny i na temat potencjalnego działania biologicznego tego typu związków.

Na początku, postawiłam sobie zatem pytanie, czy *N*-arylopiperazynyłowe pochodne 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sa**) i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**) także wykażą działanie cytostatyczne/cytotoksyczne/mikrobiologiczne, oraz jaki będzie wpływ grupy acetylowej na tego typu działanie. Żeby odpowiedzieć na zadane pytanie zsyntetyzowałam serię zaplanowanych pochodnych (Schemat 7). Otrzymałam dwadzieścia nowych, nieopisanych w literaturze związków zawierających łącznik butylowy oraz szereg amin: 1-(2-fluorofenylo)piperazyny, 1-(2-pirazylo)piperazyny, 1-(3-metoksyfenylo)piperazyny, mofroliny, 1-(4-nitrofenylo)piperazyny, 1-(4-pirydylo)piperazyny, 1-(4-

chlorofenylo)piperazyny, 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazyny i 1-(2-cyjanofenylo)piperazyny. Zoptymalizowałam przepisy syntetyczne, stosowane wcześniej do syntezy pochodnych 5-hydroksykumaryny z aminami alifatycznymi przez liczne próby z zastosowaniem różnych rozpuszczalników i temperatur ogrzewania, dodatku katalizatorów oraz metod ogrzewania.⁶²⁻⁶³ Po ustaleniu optymalnych warunków prowadzenia syntezy, w pierwszym etapie syntetyzowałam sole sodowe 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny przez ogrzewanie z równomolową ilością wodorotlenku sodu zawieszoną w toluenie. Następnie do mieszaniny dodawałam odczynnik alkilujący, którym był 1,4-dibromobutan, bromek tetrabutylamonowy i wodę. Oba etapy były prowadzone w reaktorze mikrofalowym w zakresie temperatur 70-80 °C. Po dziesięciominutowym ogrzewaniu otrzymałam związki pośrednie 5-(4-bromobutoksy)-4,7-dimetylokumarynę (**17**) i 6-acetylo-5-(4-bromobutoksy)-4,7-dimetylokumarynę (**18**) (Schemat 7). Po odsączeniu soli nieorganicznych i odparowaniu rozpuszczalnika, pochodne oczyszczałam metodą chromatografii kolumnowej z zastosowaniem żelu krzemionkowego i układu chloroform:heksan (5:2) jako eluenta.



Schemat 7. Schemat syntezy nowych pochodnych 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny zawierających łącznik czterowęglowy.

Wszystkie etapy pracy monitorowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (eluent: chloroform:metanol, 10: 0,25). Otrzymane bromoalkilowe pochodne (**17** i **18**) poddałam następnie

reakcjom z odpowiednimi N-podstawionymi piperazynami. Ten etap również prowadziłam z zastosowaniem reaktora mikrofalowego, w acetonitrylu jako rozpuszczalniku, w obecności bezwodnego węgla potasu i katalitycznych ilości jodku potasu, w zakresie temperatur 70-80 °C. Podobnie jak poprzednio, reakcje monitorowałam z zastosowaniem chromatografii cienkowarstwowej w tym samym układzie. Po zakończeniu procesu reakcyjnego, wszystkie nowo otrzymane związki oczyściłam przez odsączenie soli nieorganicznych, odparowanie rozpuszczalnika i następnie zastosowałam chromatografię kolumnową (eluent: chloroform, heksan 5:2). Wydajności wahały się od 23 do 85%. Tożsamość nowych pochodnych potwierdziłam przez interpretację odpowiednich widm ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS. Monokryształy otrzymane dla 4,7-dimetylo-5-[4-[4-(1-fluorofenyl)piperazylo]butoksy]kumaryny (**19**) zbadano metodami rentgenostrukturalnymi. Wyniki i szczegóły przeprowadzonych w tym kierunku badań znajdują się w pracy **H-3**.

Aktywność przeciwbakteryjną nowych związków oceniono w testach *in vitro* z zastosowaniem siedmiu Gram-dodatnich szczepów bakteryjnych (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Bacillus cereus* ATCC 11178, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 i *Enterococcus hirae* ATCC 10541) i trzech Gram-ujemnych szczepów bakteryjnych (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442). Aktywność przeciwgrzybiczą oceniono z zastosowaniem trzech szczepów (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 2091 i *Candida parapsilosis* ATCC 22019).

Tabela 3. Aktywność przeciwbakteryjna dla pochodnych **29** i **30** [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$].

	Związek	
	29	30
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	15	250
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11178	250	500
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	500	500
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	500	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	500	1000
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	500	1000
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	1000	1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	>1000	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	>1000	1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	>1000	1000

Pełny opis metodyki badań mikrobiologicznych znajduje się w pracy **H-3**. Testy wykonano z zastosowaniem modyfikowanej metody cylindrowo-płytkowej, a wyniki podano jako wartości minimalnego stężenia hamującego. Dwie pochodne, zawierające w strukturze fragment 4-pirydylopiperazynowy (**29** i **30**) wykazały aktywność przeciwbakteryjną względem niektórych badanych szczepów. Generalnie oba związki były bardziej aktywne względem bakterii Gram-dodatnich niż Gram-ujemnych. Najlepszą wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii ($15 \mu\text{g}/\text{cm}^3$) otrzymano dla 4,7-dimetylo-5-[4-[4-(1-(4-pirydylo)piperazylo)]butoksy]kumaryny (**29**) względem szczepu *Micrococcus luteus*. Związek **30**, zawierający w strukturze dodatkowo grupę acetylową w pozycji 6, był zdecydowanie mniej aktywny. Pozostałe związki nie były aktywne. Ciekawym jednak spostrzeżeniem był fakt, że związki zawierające grupę halogenową w strukturze, w pozycjach 2, 3 lub 4 pierścienia fenyłowego przy piperazynie (**31-34**) nie wykazały aktywności. Halogeny zwykle podwyższają działanie przeciwmikrobowe względem związków, które ich nie posiadają. Jednak w przypadku grupy arylopiperazyloowych pochodnych 5-hidroksykumaryny taka zależność nie miała miejsca.

Wyniki zaprezentowane w Tabeli 4 pokazują, że analogicznie do działania przeciwbakteryjnego, aktywność przeciwgrzybiczą także wykazały tylko związki zawierające w strukturze fragment 4-pirydylopiperazynowy (**29** i **30**). Także w tym przypadku lepszy okazał się układ **29**, który nie zawierał grupy acetylowej w strukturze.

Tabela 4. Aktywność przeciwgrzybicza dla pochodnych **29** i **30** [$\mu\text{g}/\text{cm}^3$].

	Związek	
	29	30
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	62,5	125
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	62,5	125
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	62,5	500

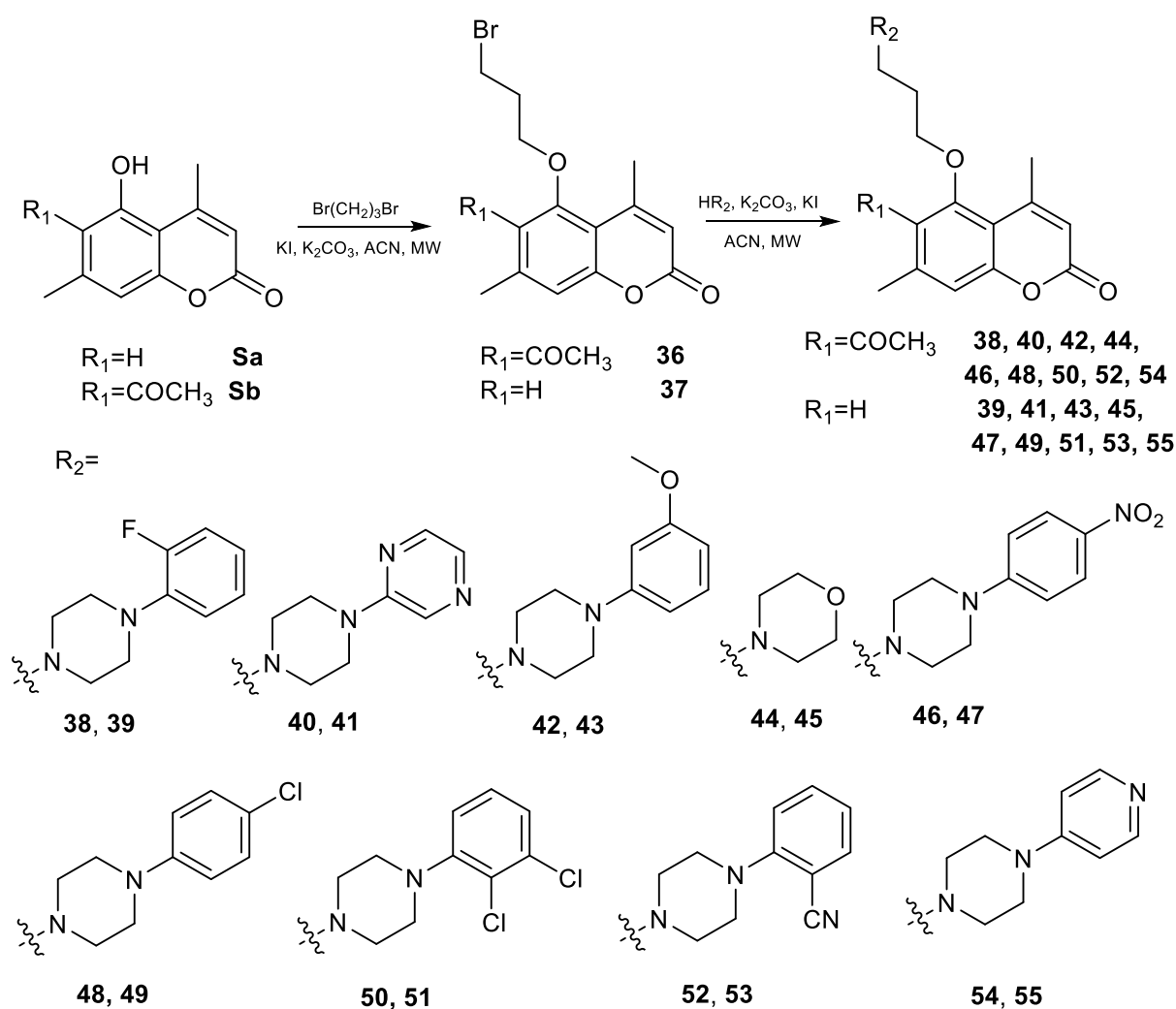
Aktywność przeciwnowotworową nowych związków **19-35** oceniono z wykorzystaniem komórek raka szyjki macicy HeLa względem zdrowych komórek fibroblastów mysich NIH3T3. Wyniki pokazuje Tabela 5. Niektóre badane pochodne wykazały aktywność cytostatyczną/cytotoksyczną przeciwko komórkom nowotworowym. Efekt ten był najlepiej widoczny dla pochodnych zawierających grupę acetylową w strukturze - 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(2-fluorofenilo)piperazynylo]butoksy]kumaryny (**20**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(pirazynylo)piperazynylo]butoksy]kumaryny (**22**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(3-metoksyfenilo)piperazynylo]butoksy]kumaryny (**24**) i 6-acetyl-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(2,3-dichlorofenilo)piperazynylo]butoksy]kumaryny (**34**), które były bardziej selektywne względem komórek nowotworowych HeLa niż zdrowych NIH3T3. Także związki o numerach **25**, **29**, **30**: (odpowiednio, 4,7-dimetylo-5-[4-(morfolin-4-ylo)butoksy]kumaryna, 4,7-dimetylo-5-[4-(pirydylo)butoksy]kumaryna i 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-(pirydylo)butoksy] kumaryna) wykazały wpływ na żywotność komórek nowotworowych ale były mniej selektywne niż związki wymienione wcześniej. Związki **27**, **28** i **35** nie były aktywne w testach przeciwnowotworowych.

Tabela 5. Żywotność komórek $\pm\text{SD}$ po 48-godzinnej inkubacji w $100\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ roztworach badanych związków.

Związek	NIH3T3	HeLa
19	97% $\pm$ 4%	118% $\pm$ 4%
20	36% $\pm$ 5%	26% $\pm$ 3%
21	97% $\pm$ 6%	85% $\pm$ 3%
22	68% $\pm$ 1%	62% $\pm$ 1%
23	94% $\pm$ 3%	95% $\pm$ 8%
24	75% $\pm$ 1%	50% $\pm$ 6%
25	79% $\pm$ 3%	65% $\pm$ 3%
26	92% $\pm$ 3%	83% $\pm$ 2%
27	105% $\pm$ 7%	114% $\pm$ 7%
28	98% $\pm$ 4%	93% $\pm$ 2%
29	2% $\pm$ 1%	3% $\pm$ 1%
30	21% $\pm$ 1%	22% $\pm$ 2%
31	111% $\pm$ 2%	93% $\pm$ 5%
34	62% $\pm$ 3%	44% $\pm$ 7%
35	97% $\pm$ 2%	110% $\pm$ 4%

W związku z tym, że wyniki przeprowadzonych badań wskazały na słabą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą, postanowiłam podjąć próbę analizy otrzymanych związków w

kierunku innej aktywności. Zwróciłam uwagę na doniesienia literaturowe o powinowactwie arylopiperazynyłowych pochodnych hydroksykumaryn do receptorów serotoninowych. Dlatego w kolejnej pracy **H-4** zajęłam się oceną aktywności serii pochodnych z pracy **H-3** i nowych związków zaprezentowanych w pracy **H-4**, w stosunku do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Nowe pochodne, opisane i scharakteryzowane w pracy **H-4** zaplanowałam z myślą o porównaniu powinowactwa do receptorów serotoninowych dla związków różniących się jedynie długością łącznika alkilowego. W pracy **H-3** analizowałam układy zawierające 4-węglowy łańcuch alkilowy łączący kumarynę z pochodną arylopiperazyny, natomiast w pracy **H-4** dodatkowo zaprezentowałam układy, w których łącznik był 3-węglowy i zbadałam wpływ długości łącznika na powinowactwo do receptorów serotoninowych. Wszystkie syntezy, tak jak wcześniej przeprowadziłam w reaktorze mikrofalowym. Związki pośrednie **36** i **37** otrzymałam przez ogrzewanie w acetonitrylu odpowiedniej hydroksykumaryny z 1,3-dibromopropanem, bezwodnym węglanem potasu i katalityczną ilością jodku potasu (Schemat 8).



Schemat 8. Schemat syntezy nowych pochodnych 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny zawierających łącznik trójwęglowy.

Reakcje prowadziłam w zakresie temperatur 70-80 °C i monitorowałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (eluent: chloroform: metanol, 10:0,25). Następnie odsączałam sole nieorganiczne, odparowywałam rozpuszczalnik i oczyszczałam oleistą pozostałość za pomocą chromatografii kolumnowej (eluent: chloroform: heksan, 5:3). W takich samych warunkach otrzymałam następnie

szereg arylo/heteroarylopiperazynyłowych pochodnych wyjściowych kumaryn **Sa** i **Sb**. Do syntez zastosowałam te same, wcześniej wymienione *N*-podstawione piperazyny (Schemat 8). Tożsamość nowych pochodnych potwierdziłam przez interpretację widm ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS. 4,7-Dimetylo-5-[3-[4-(2-fluorofenilo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**39**) i 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-(morfolin-4-ylo)propoksy]kumaryna (**45**), dla których otrzymałam odpowiedniej jakości monokryształy, zostały poddane analizie rentgenostrukturalnej, której szczegóły zamieściłam w suplemencie pracy **H-4**. Wszystkie związki zaprezentowane w pracach **H-3** i **H-4** zostały poddane badaniom receptorowym *in vitro* powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Większość badanych związków wykazała nanomolowy zakres powinowactwa do receptora 5-HT_{1A}.

Tabela 6. Powinowactwo do receptorów serotoninergeicznych dla związków badanych **19-55** i związków odniesienia.

Związek	K _i (nM) ± SEM	
	5-HT _{1A} [^3H]8-OH-DPAT	5-HT _{2A} [^3H]Ketanseryna
19	1,7 ± 0,05	120,0 ± 9,0
20	0,7 ± 0,05	9,0 ± 0,3
21	6,7 ± 0,2	2300,0 ± 250,0
22	4,8 ± 0,08	2500,0 ± 84,0
23	1,0 ± 0,1	184,0 ± 4,7
24	15,0 ± 0,5	520,0 ± 37,0
25	3500,0 ± 350,0	> 10000,0
26	250,0 ± 3,0	4460,0 ± 160,0
27	809,0 ± 80,0	> 10000,0
28	33,0 ± 1,0	46,0 ± 0,3
29	389,0 ± 21,0	> 5000,0
30	308,0 ± 14,4	1595,0 ± 84,0
31	60,0 ± 2,0	465,0 ± 34,7
32	7,0 ± 1,0	1,7 ± 0,2
33	8,0 ± 0,4	167,0 ± 15,0
34	250,0 ± 29,0	2650,0 ± 215,0
35	1,5 ± 0,2	112,0 ± 4,4
38	0,3 ± 0,05	28,0 ± 0,5
39	3,0 ± 0,1	55,0 ± 3,7
40	11,0 ± 1,5	3000,0 ± 334,0
41	186,0 ± 7,0	4565,0 ± 269,0
42	0,4 ± 0,02	48,0 ± 2,8
43	6,0 ± 0,8	106,0 ± 11,0
44	850,0 ± 11,0	> 10000,0
45	1304,0 ± 50,0	> 10000,0
46	159,0 ± 8,5	286,0 ± 12,0
47	1210,0 ± 120,0	> 10000,0
48	1,2 ± 0,08	4,0 ± 0,5
49	161,0 ± 15,0	70,0 ± 6,4
50	0,4 ± 0,03	66,0 ± 3,0
51	4,0 ± 0,8	42,0 ± 1,5
52	0,3 ± 0,04	64,0 ± 2,3
53	3,0 ± 0,2	200,0 ± 17,9
54	154,0 ± 6,6	> 10000,0
55	450,0 ± 13,0	> 5000,0
SEROTONINA	1,1 ± 0,1	-
MIANSERYNA	-	1,2 ± 0,06

Pochodne posiadające w cząsteczce linker 4-węglowy wykazały generalnie lepsze powinowactwo niż posiadające linker 3-węglowy, ale tylko w grupie związków bez grupy acetylowej w pozycji sześć

pierścienia kumarynowego. Dla związków posiadających grupę acetylową niższe wartości K_i uzyskaliśmy dla układów z 3-węglowym łącznikiem (Tabela 6).

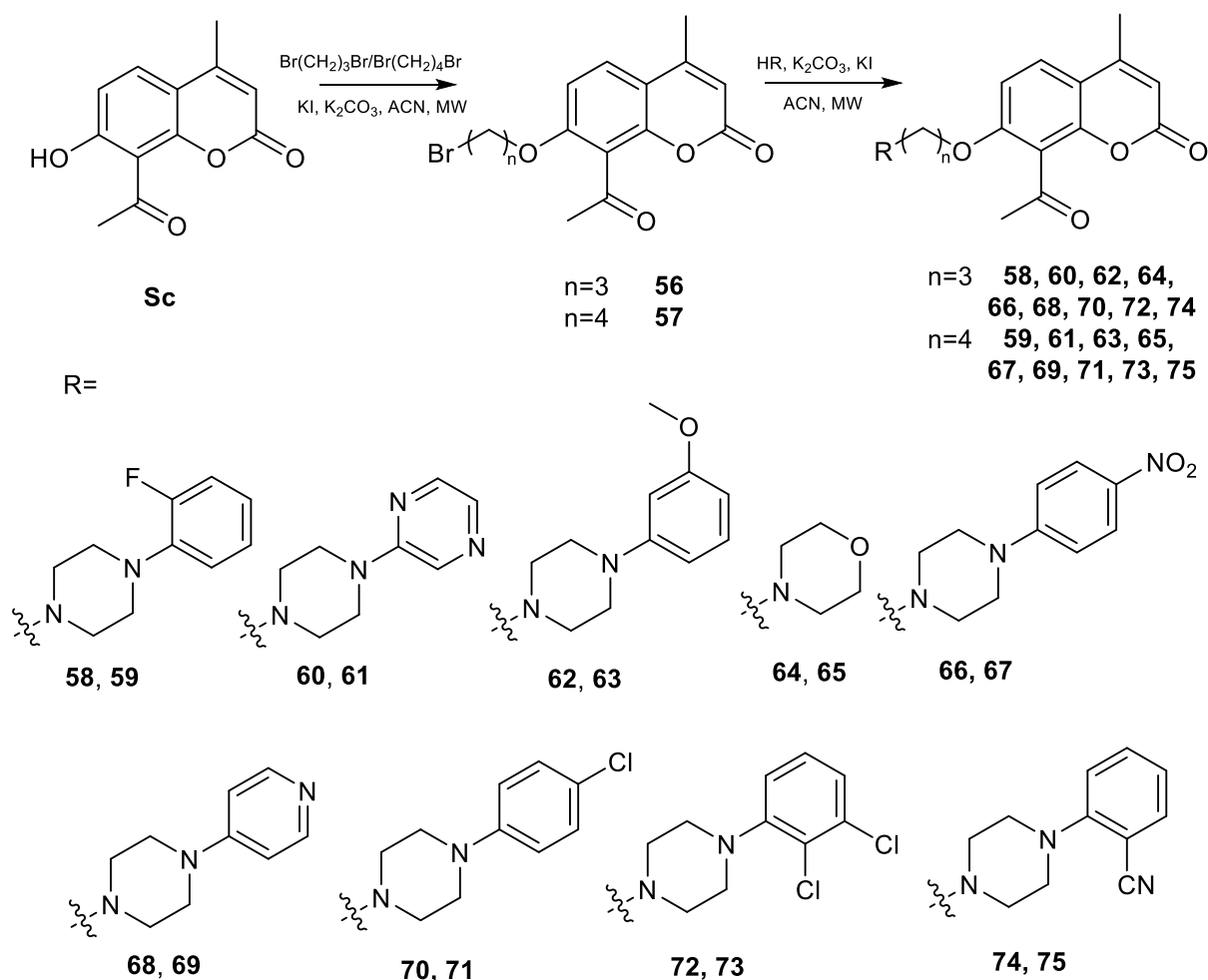
Analiza rezultatów wykazała także, że podstawniki arylopiperazynyłowe takie jak: 1-(2-fluorofenylo)piperazyna, 1-(3-metoksyfenylo)piperazyna, 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazyna i 1-(2-cyjanofenylo)piperazyna, podstawione do układu 5-hydroksykumaryny dały we wszystkich przypadkach najlepsze wyniki. W grupie związków nie posiadających grupy acetylowej tylko 4,7-dimetylo-5-[4-[4-(3-metoksyfenylo)piperazynylo]butoksy]kumaryna (**23**) wykazała aktywność na poziomie serotoniny, z wartością K_i 1.0 nM (K_i dla serotoniny wyniosło 1.1 nM). W grupie związków posiadających to ugrupowanie, 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(2-fluorofenylo)piperazynylo]butoksy]kumaryna (**20**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2-fluorofenylo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**38**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(3-metoksyfenylo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**42**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2,3-dichlorofenylo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**50**) i 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2-cyjanofenylo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**52**) osiągnęły wartość K_i dla receptora 5-HT_{1A} poniżej 1.0 nM (K_i = 0,7 nM dla **20**, 0,3 dla **38**, 0,4 dla **42**, 0,4 dla **50** i 0,3 dla **52**). Na tej podstawie, wyciągnęłam wnioski, że fluor, grupa metoksyłowa, cyjanowa oraz chlor w pozycjach 2, 3 lub 2 i 3 pierścienia fenyłowego przy piperazynie poprawiają powinowactwo pochodnych 5-hydroksykumaryny do receptora 5-HT_{1A} (K_i = 0,3 – 1,0 nM). Zamiana podstawionej piperazyny na pierścień morfoliny powoduje drastyczne obniżenie powinowactwa (związki **25**, **26**, **44** i **45**, K_i = 250,0 – 3500,0 nM), podobnie jak zamiana pierścienia fenyłowego przy piperazynie na układ heterocykliczny (związki **21**, **22**, **29** i **30**, **40**, **41**, **54** i **55**, K_i = 154,0 – 450,0 nM). Wprowadzenie podstawnika nitrowego lub chlorowego w pozycję 4 pierścienia fenyłowego również obniża powinowactwo, niezależnie od długości łańcucha alkilowego i obecności grupy acetylowej w pozycji 6 pierścienia kumaryny (związki **27**, **28**, **31** i **32**, **46-49**).

Większość badanych związków wykazała powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} (Tabela 6), z wartościami K_i na poziomie mikromolowym. Tylko trzy pochodne: 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(2-fluorofenylo)piperazynylo]butoksy]kumaryna (**20**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(4-chlorofenylo)piperazynylo]butoksy]kumaryna (**32**) i 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(4-chlorofenylo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**48**), miały wartości K_i poniżej 10 nM (odpowiednio, 9,0±0,3 nM, 1,7±0,2 nM i 4,0±0,5 nM). Niezależnie od długości łącznika alkilowego, wprowadzenie (4-chlorofenylo)piperazyny do układu kumarynowego, dało w przypadku receptora 5-HT_{2A} najlepsze rezultaty. Żaden z badanych związków nie osiągnął wartości K_i rzędu 1,2 nM, którą uzyskano dla związku odniesienia – mianseryny.

Aby uzyskać więcej szczegółów na temat sposobu wiązania ligandów w kieszeni receptora, wykorzystano teoretyczne symulacje dokowania ligandów do receptora, których szczegóły, tabele i rysunki znajdują się w pracy **H-4**. Uzyskane wyniki pozwoliły ustalić, że związek o najwyższym powinowactwie do receptora 5-HT_{1A}, 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2-fluorofenylo)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**38**), tworzy silne wiązania wodorowe z Asp 116, Ser 199 i Tyr 390. Natomiast słabe wiązanie niektórych związków można przypisać nieobecności uznanego w literaturze za kluczowe, wiązania wodorowego ligandów z Asp 116. Otrzymane rezultaty pozwalają przypuszczać, grupa acetylowa dodana do układu zawierającego linker 3-węglowy daje możliwość dogodnego ułożenia cząsteczki w kieszeni receptora, natomiast dodana do układu 4-węglowego pozbawia ligand możliwości optymalnego ułożenia ze względu na wielkość cząsteczki.

Zainspirowani wynikami, które wykazały ważną rolę grupy acetylowej, zdecydowaliśmy się na kolejny krok w badaniach nad związkami wykazującymi powinowactwo do receptorów

serotoninowych. Dlatego w pracy **H-5** wprowadziłam grupę acetylową do pochodnych 7-hydroksy-4-metylokumaryny, które jak wspomniałam we wstępie, były prezentowane w literaturze jako związki wykazujące powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}. Na strukturę wiodącą wytypowałam 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumarynę (**Sc**), która analogicznie do 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**) posiada w strukturze grupę hydroksylową w bezpośrednim sąsiedztwie grupy acetylowej (Schemat 9). Również w tej grupie związków przeanalizowałam wpływ długości linkera alifatycznego na powinowactwo do receptorów serotoninowych. Wszystkie procesy syntetyczne przeprowadziłam w reaktorze mikrofalowym, w analogiczny sposób do procesów zaprezentowanych wcześniej, przy opisie publikacji **H-4**. Synteza była dwuetapowa, w etapie pierwszym otrzymałam związki pośrednie 8-acetylo-7-(3-bromopropoksy)-4-metylokumarynę (**56**) lub 8-acetylo-7-(4-bromobutoksy)-4-metylokumarynę (**57**) przez ogrzewanie substancji wyjściowej **Sc** z 1,3-dibromopropanem lub 1,4-dibromobutanem, w obecności bezwodnego węgla potasu i katalitycznych ilości jodku potasu, w temperaturze wrzenia acetonitrylu. Następnie otrzymane pochodne **56** i **57** przeprowadziłam w arylo/heteroarylopiperazynylopropoksy/butoksykumaryny **58-75** z zastosowaniem odpowiednich amin (Schemat 9).



Schemat 9. Schemat syntezy nowych pochodnych 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumarynę (**Sc**).

W każdym przypadku postęp reakcji oceniałam za pomocą chromatografii cienkowarstwowej z zastosowaniem układu chloroform: metanol (10:0,25) jako eluenta. Po zakończeniu poszczególnych procesów odsączałam sole nieorganiczne, odparowywałam rozpuszczalnik i oczyszczałam związki z zastosowaniem chromatografii kolumnowej (eluent chloroform: metanol 100:1 lub chloroform:

heksan). Struktury wszystkich związków potwierdziłam przez analizę widm ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS. Wszystkie widma zamieściłam w suplemencie pracy **H-5**. Nowe związki zostały poddane badaniom biologicznym w kierunku ich powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} (Tabela 7). Badania wykazały powinowactwo na poziomie subnanomolowym i niskim nanomolowym w stosunku do badanych receptorów. Tak jak w poprzednim przypadku (**H-4**) przeanalizowałam wpływ rodzaju podstawionej aminy na powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}. Okazało się, że podobnie jak dla pochodnych 6-acetylo-5-hydroksykumaryny także w grupie 8-acetylo-7-hydroksykumaryny, wprowadzenie podstawników arylopiperazynyowych takich jak: 1-(2-fluorofenilo)piperazyna, 1-(3-metoksyfenilo)piperazyna, 1-(2,3-dichlorofenilo)piperazyna i 1-(2-cyjanofenilo)piperazyna, dają najlepsze rezultaty. Najlepsze powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} wykazały bowiem pochodne o numerach **58**, **59**, **62**, **63**, **72**, **73** i **74**, **75**, posiadające zarówno trój- jak i czterowęglowy linker alkilowy. Dla arylopiperazyn z podstawnikami takimi jak fluor, grupa metoksyłowa, cyjanowa czy chlor w pozycjach 2, 3 lub 2 i 3 pierścienia fenylowego, powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} było zdecydowanie wysokie (K_i = 0,8 – 2,2 nM). Ponadto związki **58**, **59**, **63** i **74**, miały powinowactwo w zakresie porównywalnym z naturalnym neurotransmiterem jakim jest serotonina (K_i = 1,3 nM). I analogicznie do poprzedniej pracy – wprowadzenie chloru lub grupy nitrowej w pozycję 4 tego pierścienia lub zamiana pierścienia fenylowego na heterocykliczny, powodowało drastyczne obniżenie powinowactwa.

Tabela 7. Powinowactwo do receptorów serotonergiczných dla związków badanych **58-75** i związków odniesienia.

Związek	K _i ± SEM (nM)	
	5-HT _{1A} [³ H] 8-OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H] Ketanseryna
58	1,3 ± 0,1	27 ± 1
59	1 ± 0,1	47 ± 0,8
60	253 ± 9	> 5000
61	38 ± 3,7	1158 ± 13
62	1,6 ± 0,1	30 ± 1
63	0,8 ± 0,009	138 ± 11,5
64	180 ± 19	2542 ± 3
65	303 ± 27	> 10000
66	613 ± 58	42 ± 3,5
67	92 ± 5,5	155 ± 5,8
68	556 ± 54,8	2434 ± 320
69	190 ± 20	> 5000
70	11 ± 0,4	9,5 ± 0,7
71	28 ± 2,3	56 ± 6
72	1,6 ± 0,1	8 ± 0,8
73	2,2 ± 0,2	30 ± 1,7
74	1 ± 0,1	75 ± 1,5
75	1,5 ± 0,005	91 ± 9
SEROTONINA	1,3 ± 0,1	-
MIANSERYNA	-	2,2 ± 0,05

Otrzymane wyniki porównałam z opublikowanymi wcześniej przez grupę Chen'a [29]. Okazało się, że grupa acetyłowa w pozycji C8 pierścienia kumaryny poprawia powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} w porównaniu do związków, które tej grupy nie posiadają – z 89,2 nM dla 7-[4-[4-(3-metoksyfenilo)piperazynylo]butoksy]-4-metylokumaryny do 0,8 nM dla 8-acetylo-7-[4-[4-(3-metoksyfenilo)piperazynylo]butoksy]-4-metylokumaryny (**63**) oraz do 1,6 nM dla analogu z linkerem trójwęglowym 8-acetylo-7-[3-[4-(3-metoksyfenilo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**62**). Ten wpływ jest widoczny także dla powinowactwa do receptora do receptora 5-HT_{2A}, obserwujemy

wzrost z 469,2 nM dla 7-[4-[4-(3-metoksyfenylo)piperazynylo]butoksy]-4-metylokumaryny do 138,0 nM lub 30,0 nM odpowiednio dla **63** i **62**.

Dla pochodnych zaprezentowanych w pracy **H-5**, ważną rolę odgrywała długość łańcucha alkilowego łączącego część kumarynową z arylopiperazyną. Dla związków zawierających ugrupowanie (2-fluorofenylo)piperazynyłowe lub (3-metoksyfenylo)piperazynyłowe, te zawierające łańcuch czterowęglowy, miały niższe wartości K_i niż zawierające łańcuch trójwęglowy ($K_i=1,0$ nM dla **59** i 0,8 nM dla **63**, natomiast $K_i=1,3$ nM dla **58** i 1,6 nM dla **62**). Z drugiej jednak strony, dla związków z (2,3-dichlorofenylo)piperazyną i (2-cyjanofenylo)piperazyną, było odwrotne ($K_i=1,6$ nM dla **72** i 1,0 nM dla **74**, przeciwko $K_i=2,2$ nM dla **73** i 1,5 nM dla **75**). Wyniki sugerują więc, że generalnie powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, zależy tutaj głównie od pozycji i rodzaju podstawnika przy pierścieniu fenylowym połączonym z piperazyną, a w mniejszym stopniu od długości linkera alkilowego. Niemniej jednak najlepsze rezultaty otrzymaliśmy dla związku posiadającego linker czterowęglowy (0,8 nM dla **63**).

Badane związki wykazały słabsze powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} niż do 5-HT_{1A}. Najlepsze rezultaty uzyskaliśmy dla pochodnych **70** ($K_i=9,5$ nM) oraz dla **72** ($K_i=8,0$ nM), które jednak w obu przypadkach były znacząco słabsze niż dla substancji odniesienia – mianseryny ($K_i=2,2$ nM). Dodatkowo tylko dwa związki – **66** ($K_i=613$ nM dla 5-HT_{1A} i 42 nM dla 5-HT_{2A}) i **70** ($K_i=11,4$ nM dla 5-HT_{1A} i 9,5 nM dla 5-HT_{2A}) w całej serii posiadały wyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} niż do 5-HT_{1A}.

Dla związków wykazujących najlepsze powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} w badaniach radioizotopowych wykonano dodatkowo testy funkcjonalne, mające na celu określenie potencjalnej aktywności wewnętrznej dla pochodnych 8-acetyl-7-hydroksy-4-metylokumaryny w układzie ago- lub antagonistycznym. Na podstawie otrzymanych wyników badań radioizotopowych do badań funkcjonalnych wyselekcjonowano siedem związków: **58**, **59**, **62**, **63**, **73** i **74**, **75**, – uzyskane wyniki potwierdziły działanie antagonistyczne pochodnych w stosunku do receptora 5-HT_{1A} (Tabela 8).

Tabela 8. Badania funkcjonalne dla receptora 5-HT_{1A}.

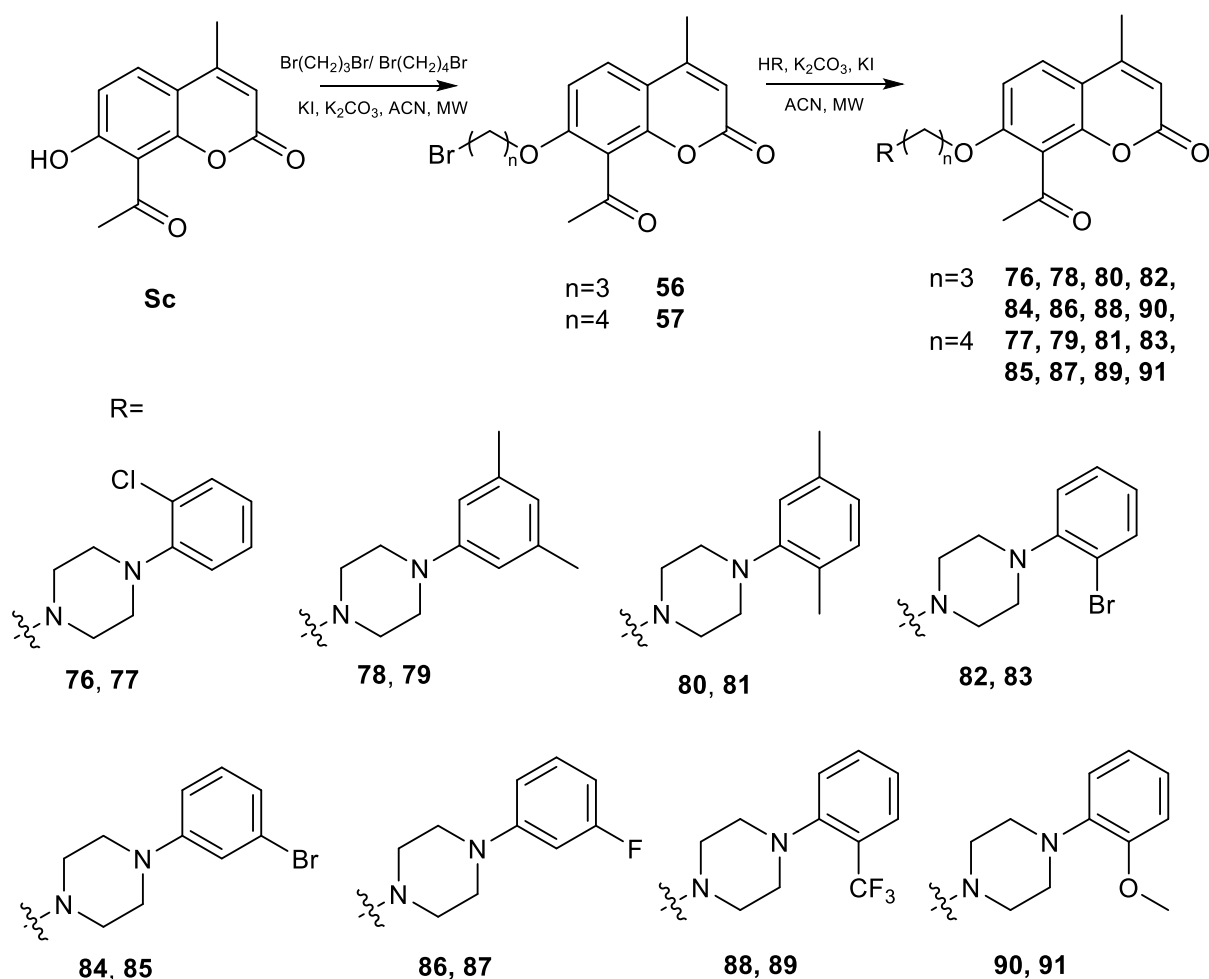
Związek	Tryb agonistyczny			Tryb antagonistyczny			
	E max %	SEM	pEC 50	E max %	SEM	IC ₅₀ nM	K _b nM
SEROTONINA	100%	4.0	7.16	0%	0.0	n.c.	n.c.
NAN-190	2%	n.c.	n.c.	0%	0.0	5	1
58	2%	n.c.	n.c.	3%	0.5	190	36
59	2%	n.c.	n.c.	1%	0.0	28	5
62	3%	n.c.	n.c.	0%	0.5	48	9
63	2%	n.c.	n.c.	1%	0.0	23	4
73	2%	n.c.	n.c.	1%	0.0	180	34
74	2%	n.c.	n.c.	1%	0.5	99	19
75	4%	n.c.	n.c.	0%	0.5	38	7

n.c. – non calculable

Związki wykazywały duży poziom zróżnicowania zarówno pomiędzy sobą, jak i w porównaniu do substancji referencyjnej, (wartość K_b – stała dysocjacji antagonisty). Związki **59**, **62**, **63** i **75** charakteryzował silny antagonizm do receptora 5-HT_{1A}, wartość K_b wynosiła odpowiednio: 5, 9, 4 oraz 7 nM. Wartość K_b dla związku **74** była prawie 20-krotnie większa w porównaniu do związku odniesienia NAN-190. Ponadto, związek **58** oraz **73** wykazywał prawie 40-krotny spadek aktywności w porównaniu do substancji referencyjnej NAN-190 (wysoka wartość K_b) oraz 2-krotny wzrost wartości K_b w porównaniu do pochodnej **74** (spadek aktywności wewnętrznej). Warto dodać, iż

wyniki badań funkcjonalnych badanych pochodnych ściśle korespondowały z wynikami badań radioizotopowych dla receptora 5-HT_{1A}.

Wyniki badań *in vitro* dla serii arylo/heteroarylopiperazynyłowych pochodnych 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny, zinterpretowaliśmy w oparciu o teoretyczne symulacje dokowania ligandów do receptora 5-HT_{1A} dla wszystkich nowych związków. W pracy **H-5** zaprezentowałam wyniki dla dwóch pochodnych - 8-acetylo-7-[4-[4-(3-metoksyfenylo)piperazynylo]butoksy]-4-metylokumaryny (**63**), która wykazała najwyższe powinowactwo dla tego receptora w badaniach eksperymentalnych, oraz 8-acetylo-7-[3-[4-(4-nitrofenylo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**66**), która była najmniej aktywna w badaniach *in vitro*. Oceniliśmy, że ligand **63** jest stabilizowany w kieszeni receptora głównie wiązaniem wodorowym z Ser 190 i wiązaniami wodorowymi z Asp 116, Cys 187 i His 376 oraz hydrofobowymi oddziaływaniami π - π pomiędzy Phe 361 i częścią kumarynową. Kompleks białko-ligand jest także stabilizowany przez oddziaływania π -alkil z Ala 365, Phe 362 oraz oddziaływania hydrofobowe z Val 117 i Ala 93. Natomiast związek **66** wykazał w badaniach receptorowych niskie powinowactwo do receptora 5HT_{1A}. Symulacje teoretyczne wykazały, że kompleks nie jest stabilizowany przez wiązania wodorowe i tylko słabe oddziaływania hydrofobowe są tu obserwowane. Asp 116 tworzy wiązania π – anion, Ala 93, Trp 358, Tyr 390 są zaangażowane w oddziaływania π -alkil. Wiązania te są słabe i niezdolne do stabilizacji cząsteczki w kieszeni receptora. Obliczenia teoretyczne były w pełnej zgodzie z badaniami receptorowymi *in vitro*.



Schemat 10. Schemat syntezy nowych pochodnych 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumarynę (**Sc**).

Obiecujące rezultaty zaprezentowane w pracy **H-5** były inspiracją do kontynuacji badań nad arylopiperazynyłowymi pochodnymi 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny (**Sc**) jako struktury wiodącej. Dlatego w kolejnej pracy **H-6** skupiłam się na badaniach kolejnej grupy związków z zastosowaniem amin wyselekcjonowanych na podstawie wcześniejszych wyników. W pracy **H-5** oceniłam 1-(2-fluorofenylo)piperazynę, 1-(3-metoksyfenylo)piperazynę, 1-(2,3-dichlorofenylo)piperazynę i 1-(2-cyjanofenylo)piperazynę jako aminy, których wprowadzenie daje najlepsze wyniki w badaniach receptorowych powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Do syntez w pracy **H-6** użyłam 1-(2-chlorofenylo)piperazynę, 1-(3,5-dimetylofenylo)piperazynę, 1-(2,5-dimetylofenylo)piperazynę, 1-(2-bromofenylo)piperazynę, 1-(3-bromofenylo)piperazynę, 1-(3-fluorofenylo)piperazynę, 1-(2-trifluorometylofenylo)piperazynę i 1-(2-metoksyfenylo)piperazynę. Wszystkie wymienione aminy miały podstawniki w pozycji 2 lub 3 pierścienia fenyłowego (ewentualnie w pozycjach 2 i 5 lub 3 i 5) przy piperazynie, zgodnie z wnioskami wyciągniętymi wcześniej w pracy **H-5**. Chciałam sprawdzić, czy w zaplanowanej grupie nowych związków znajdą się pochodne o jeszcze lepszym powinowactwie do receptorów serotoninowych, niż w grupie zaprezentowanej w pracy **H-5**. Dlatego też, ponownie zastosowałam linkery 3- i 4-węglowy, ze względu na to, że wyniki poprzedniej pracy nie dały jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, która długość łącznika zapewnia optymalne wartości powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Procesy syntetyczne prowadziłam z zastosowaniem reaktora mikrofalowego, według zoptymalizowanych i opisanych wcześniej procedur (**H-5**). Struktury wszystkich nowych związków potwierdziłam przez analizę widm ¹H NMR, ¹³C NMR i MS, a ich interpretację zamieściłam w pracy **H-6**. Sumarycznie otrzymałam szesnaście nowych, nieopisanych wcześniej w literaturze związków (Schemat 10). Seria nowych pochodnych została poddana badaniom biologicznym w kierunku ich powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} (Tabela 9). Badania wykazały powinowactwo na poziomie subnanomolowym i niskim nanomolowym w stosunku do badanych receptorów. Przeanalizowałam wpływ podstawnika przy pierścieniu fenyłowym piperazyny na powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}.

Tabela 9. Powinowactwo do receptorów serotoninergicznych dla związków badanych **76-91** i związków odniesienia.

Związek	K _i [nM] ± SEM	
	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}
76	2,00 ± 0,10	22,0 ± 2,3
77	0,90 ± 0,10	20,0 ± 1,5
78	0,90 ± 0,10	12,5 ± 1,3
79	3,70 ± 0,40	58,0 ± 2,0
80	14,00 ± 1,50	102,0 ± 7,2
81	5,40 ± 0,50	46,8 ± 3,6
82	0,50 ± 0,05	7,0 ± 0,5
83	1,50 ± 0,10	10,0 ± 0,5
84	3,50 ± 0,50	6,0 ± 0,4
85	2,50 ± 0,20	6,5 ± 0,7
86	1350,00 ± 125,00	408,0 ± 19,4
87	50,00 ± 1,80	400,0 ± 19,7
88	8,80 ± 0,40	20,0 ± 1,0
89	11,00 ± 0,30	48,7 ± 1,9
90	0,60 ± 0,05	8,0 ± 0,7
91	1,0 ± 0,1	56,0 ± 1,5
SEROTONINA	1,4 ± 0,1	-
MIANSERYNA	-	2,0 ± 0,1

Związki **78**, **82**, **90** oraz **77**, **83** i **91** wykazały wysokie powinowactwo do receptora 5-HT_{1A}, na poziomie lub poniżej poziomu neurotransmitera – serotoniny ($K_i=1,4\pm0,1$), będącego substancją odniesienia. Interesujący jest fakt, że zarówno pochodne zawierające podstawniki elektronoakceptorowe (chloro- dla **77** lub bromo- dla **82**, **83**), jak i elektronodonorowe (metoksy- dla **90** i **91**) były zdolne do silnego zakotwiczenia w kieszeni receptora. Najlepsze rezultaty uzyskaliśmy jednak dla 8-acetylo-7-[3-[4-(2-bromofenylo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**82**) i 8-acetylo-7-[3-[4-(2-metoksy fenilo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**90**), zawierających 1-(2-bromofenylo) piperazynę i 1-(2-metoksyfenilo)piperazynę w strukturze (odpowiednio: $K_i=0,50\pm0,05$ nM i $K_i=0,60\pm0,05$ nM). W jednym przypadku, dla 8-acetylo-7-[3-[4-(3,5-dimetylofenilo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**78**), korzystne okazało się podstawienie jednocześnie pozycji 3 i 5 pierścienia fenyłowego przy piperazynie ($K_i=0,90\pm0,10$ nM). Wszystkie trzy związki wykazujące najwyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} (**78**, **82** i **90**) posiadały trójwęglowy łącznik między częścią kumarynową a piperazynylową. Ich odpowiedniki z łańcuchem czterowęglowym (**79**, **83** i **91**), wykazały niższe powinowactwo (odpowiednio: $K_i=3,7\pm0,4$ nM dla **79**, $K_i=1,5\pm0,1$ nM dla **83** i $K_i=1,0\pm0,1$ nM dla **91**).

Dla związków wykazujących najwyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} w badaniach radioizotopowych (**82**, **90**) wykonano dodatkowo testy funkcjonalne, mające na celu określenie potencjalnej aktywności wewnętrznej dla pochodnych 8-acetyl-7-hydroksy-4-metylokumaryny w układzie ago- lub antagonistycznym. Uzyskane wyniki potwierdziły działanie antagonistyczne pochodnych w stosunku do receptora 5-HT_{1A} (Tabela 10).

Tabela 10. Badania funkcjonalne dla receptora 5-HT_{1A}.

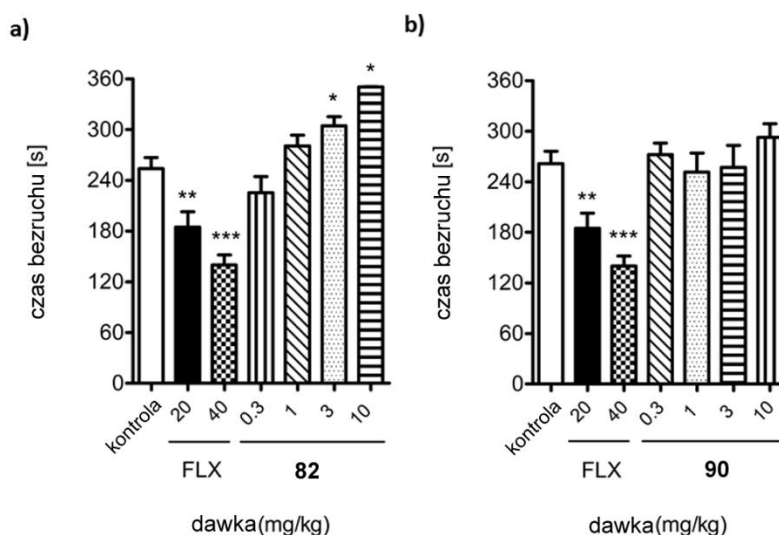
Związek	Tryb agonistyczny			Tryb antagonistyczny		
	E max %	pEC ₅₀	R ²	E max %	pEC ₅₀	R ²
82	112±2,6	7,4±0,47	0,24	82±1,2	6,9±0,15**	0,84
90	108±2,0	8,7±0,84	0,26	70±2,2	6,2±0,1	0,09

p<0,001 (82** vs. **90**)

Wszystkie badane związki wykazały niższe powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} niż do 5-HT_{1A}, z wyjątkiem pochodnej **86** (8-acetylo-7-[3-[4-(3-fluorofenylo)piperazynylo]propoksy]-4-metylo kumaryny), która wykazała wyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} niż do 5-HT_{1A}. Pochodna ta była jednak najslabiej działającym związkiem w badanej grupie ($K_i=1350,00\pm125,00$ nM dla 5-HT_{1A} i $K_i=408,0\pm19,4$ nM dla 5-HT_{2A}). Związki zawierające 1-(2-bromofenylo)piperazynę, 1-(3-bromofenylo)piperazynę lub 1-(2-metoksyfenilo)piperazynę (**82**, **84**, **85** i **90**) wykazały najwyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} (odpowiednio: $K_i=7,0\pm0,5$, $6,0\pm0,4$, $6,5\pm0,7$, $8,0\pm0,7$ nM). Podobnie jak w przypadku receptora 5-HT_{1A}, trójwęglowy linker dawał za każdym razem lepsze rezultaty. Zamiana łańcucha trójwęglowego na czterowęglowy, obniżała aktywność. Była tylko jedna para związków (**84** i **85**), które mimo różnicy w długości łańcucha wykazały powinowactwo do receptora 5-HT_{2A} na tym samym poziomie (odpowiednio: $K_i=6,0\pm0,4$ nM i $K_i=6,5\pm0,7$ nM). Żaden z badanych związków nie wykazał działania na poziomie mianseryny ($K_i=2,0\pm0,1$ nM), która była substancją odniesienia.

Teoretyczne symulacje dokowania ligandów do receptora 5-HT_{1A} dla wszystkich nowych związków pozwoliły dodatkowo zinterpretować wyniki badań *in vitro* dla serii arylo/heteroarylopiperazynyłowych pochodnych 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny. W pracy **H-6** zaprezentowałam, między innymi, wyniki badań teoretycznych dla dwóch pochodnych - 8-acetylo-7-[3-[4-(2-bromofenylo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**82**) i 8-acetylo-7-[4-[4-(2-bromofenylo)piperazynylo]butoksy]-4-metylokumaryny (**83**), różniących się jedynie długością łańcucha alkilowego w cząsteczce. Okazało się, że oba związki tworzą silne wiązania wodorowe

zapewniające zakotwiczenie w kieszeni receptora z Asp 116. Jednak w zależności od długości linkera, kumarynowa część cząsteczki zajmuje inną pozycję w kieszeni receptora i w przypadku trójwęglowego łańcucha tworzy dodatkowo silne wiązania wodorowe z Ser 199 i Thr 200, natomiast w przypadku czterowęglowego linkera – jedynie wiązanie wodorowe z Trp 358. Wszystkie szczegółowe rysunki i tabele, dotyczące dokowania molekularnego, oraz ich wnikliwą interpretację zamieściłam w pracy **H-6**.



Rysunek 13. Poziom zachowań depresyjnych mierzony w teście zawieszenia za ogon po dootrzewnym podaniu związków a) **82** lub b) **90**. Kontrolę pozytywną stanowiły osobniki otrzymujące fluoksetynę (FLX). Wyniki przedstawiono jako średnie z błędami standardowymi ($\pm$ SEM). Wszystkie grupy zwierząt stanowiło 6-8 myszy. Dane analizowano przy wykorzystaniu 1-czynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu post-hoc Bonferroniego. Istotność porównań grup badanych z grupą kontrolną przedstawiono przy pomocy jednego, dwóch lub trzech symboli określających istotność na poziomie 0.05, 0.01 lub 0.001.

Dwie pochodne - 8-acetylo-7-[3-[4-(2-bromofenylo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryna (**82**) i 8-acetylo-7-[3-[4-(2-metoksyfenylo)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryna (**90**), które wykazały najwyższe powinowactwo do receptora 5-HT_{1A} zostały poddane testom *in vivo* w celu oceny efektu ich przeciwdepresyjnego (Rysunek 13). W badaniach zastosowano test zawieszenia za ogon (TST – tail suspension test) z grupą myszy kontroli pozytywnej otrzymującej fluoksetynę - selektywny inhibitor wychwytu zwrotnego serotoniny. Zgodnie z oczekiwaniami zwierzęta z grupy kontroli pozytywnej otrzymujące fluoksetynę wykazywały zależne od dawki (20mg/kg oraz 40 mg/kg) zmniejszenie zachowań depresyjnych mierzone skróceniem czasu bezruchu. Podanie badanego związku **82** w dawkach 0,3mg/kg lub 1,0mg/kg nie skutkowało zmianami w ocenianym czasie bezruchu, natomiast podanie wyższych dawek 3mg/kg oraz 10mg/kg spowodowało istotne wydłużenie tego parametru, w porównaniu do myszy grup kontrolnych, świadczące o wywołaniu zachowań depresyjnych ($p < 0.05$). Zwierzęta otrzymujące związek **82** wykazywały zależny od dawki wzrost zachowań depresyjnych (wydłużenie czasu bezruchu). Ponadto myszy otrzymujące najwyższą dawkę związku **82** charakteryzowały się uogólnionym zmniejszeniem aktywności ruchowej w klatce (dane obserwacyjne). W porównaniu do związku **82** podanie związku **90** nie skutkowało zmianami w poziomie zachowań depresyjnych w teście TST ani zmianami uogólnionej aktywności ruchowej, co może wynikać z niższego potencjału aktywacji receptorów w porównaniu do związku **82** mierzonych w testach receptorowych. Możliwym jest, że wzrost czasu bezruchu w teście TST po podaniu związku

82 może być wynikiem zarówno prodepresyjnego, antagonistycznego oddziaływania na postsynaptyczne receptory 5-HT_{1A} jak również uogólnionego efektu hamującego aktywność ruchową zwierząt. Prawdopodobnie, to uogólnione zmniejszenie aktywności ruchowej spowodowało wydłużenie czasu bezruchu w teście TST – zatem efekt prodepresyjny był niespecyficzny.

3. Podsumowanie

Opisane w poprzednim rozdziale badania miały na celu poszukiwanie struktur wiodących o sprecyzowanej aktywności biologicznej wśród pochodnych hydroksykumaryny. Aby zrealizować założony cel przeprowadziłam szereg syntez nowych związków, udokumentowałam ich struktury za pomocą widm ¹H NMR, ¹³C NMR i MS, a dla niektórych także metodami dyfrakcji rentgenowskiej. Następnie poszczególne grupy związków zostały poddane badaniom biologicznym, w których oceniono ich cytotoksyczność *in vitro* w stosunku do ludzkich komórek nowotworowych, aktywność przeciwdrobnoustrojową i/lub powinowactwo do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. Na podstawie otrzymanych wyników przeprowadziłam analizę zależności struktura-aktywność. Każda z nowo otrzymanych substancji powiększyła bazę struktur, która może być wykorzystywana przy tworzeniu modeli ułatwiających poszukiwanie nowych substancji o zdefiniowanych właściwościach. Trzeba bowiem pamiętać, że nie sama tylko aktywność substancji decyduje o możliwości jej wykorzystania w terapii, ale także parametry fizykochemiczne umożliwiające stworzenie odpowiedniej postaci leku, gwarantującej dotarcie substancji leczniczej do celu molekularnego w organizmie. Polskie instytucje naukowe poszukują do analiz nowych, oryginalnych substancji, które mogłyby okazać się skuteczne w walce z chorobami nowotworowymi, zakażeniami bakteriami chorobotwórczymi czy chorobami ośrodkowego układu nerwowego.

Wyniki moich prac pokazały, że pochodne 5-hydroksykumaryny, obok dobrze poznanych, ale wciąż skrywających wiele niespodzianek pochodnych 7-hydroksykumaryny są ciekawym i obiecującym źródłem struktur wiodących do poszukiwania nowych chemoterapeutyków. Wstępne poszukiwanie związków działających na receptory serotoniny przyniosły zachęcające rezultaty. Analiza zależności struktura-aktywność pozwoliła sprecyzować jakie elementy struktury nowo otrzymanych związków decydują o ich właściwościach biologicznych, a tym samym udało się wyłonić struktury wiodące dobrze rokujące w badaniach planowanych w przyszłości.

Do głównych osiągnięć zaliczam:

- skuteczny plan syntezy nowych związków poprzez modyfikację struktur wiodących: 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sa**), 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**Sb**), 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny (**Sc**), 5-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)kumaryny (**Sd**), 7-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano [2',3'-f]-(8H)kumaryny (**Se**) i 7-hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)kumaryny (**Sf**),
- wykorzystanie zoptymalizowanych warunków ogrzewania mikrofalowego do syntezy 91 nowych, nieopisanych wcześniej literaturze naukowej związków,
- opracowanie metod oczyszczania nowych związków z zastosowaniem chromatografii kolumnowej, przez odpowiedni dobór rozpuszczalników i ich mieszanin,

- dokładne przypisanie sygnałów rezonansowych odpowiednim atomom w widmach ^1H NMR, ^{13}C NMR i MS, dla wszystkich nowych związków,
- określenie struktur w cieple stałym dla 7-hydroksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3'-f]-(8H)kumaryny (**Se**), 7-hydroksy-2',2'-dimetylopirano[2',3'-f]-(8H)kumaryny (**Sf**), 3,6,8-tribromo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny (**2**), 5-(2-dietyloamino)etoksy-2',2',4-trimetylopirano[2',3',f]-(8H)kumaryny (**13**), 4,7-dimetylo-5-[4-[4-(1-fluorofenyl)piperazynylo]butoksy]kumaryny (**19**), 4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2-fluorofenyl)piperazynylo]propoksy]kumaryny (**39**) i 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-(morfolin-4-yl)propoksy]kumaryny (**45**) metodami rentgenowskiej analizy strukturalnej,
- poszerzenie wiedzy na temat syntezy i działania przeciwdrobnoustrojowego, przeciwnowotworowego i powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} pochodnych hydroksykumaryn, w tym grupy słabo dotąd poznanych 5-hydroksykumaryn,
- wskazanie zarówno interesujących kierunków badań biologicznych dla otrzymanych pochodnych, jak i obszarów ich niskiej aktywności,
- ocenę aktywności przeciwnowotworowej pochodnych 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny oraz ich bromowanych analogów i kompleksów z Cu(II). Określenie pozytywnego wpływu zarówno wprowadzenia grupy acetylowej w bezpośrednie sąsiedztwo grupy hydroksylowej, jak i kompleksowania za pomocą Cu(II), na aktywność biologiczną oraz wyselekcjonowanie najbardziej aktywnych związków,
- ocenę pochodnych piranokumaryn jako związków o wysokim potencjale przeciwnowotworowym. Wskazanie, że pochodne alloksantoksyletyny z podstawnikami aminowymi po przeciwnej stronie do grupy laktonowej wykazują wysoką aktywność przeciwnowotworową oraz podwyższają czułość komórek nowotworowych na indukowaną lekami śmierć komórkową, a także wyselekcjonowanie struktur wiodących na podstawie analizy struktura-aktywność,
- ocenę powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} dla arylo/heterarylopiperazynylowych pochodnych 5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny i 6-acetylo-5-hydroksy-4,7-dimetylokumaryny. Określenie potencjału badanych pochodnych w zakresie powinowactwa do receptora 5-HT_{1A} i ocenę celowości wprowadzenia grupy acetylowej do struktury cząsteczki. Wskazanie struktur wiodących (6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-[4-(2-fluorofenyl)piperazynylo]butoksy]kumaryna (**20**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2-fluorofenyl)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**38**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(3-metoksyfenyl)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**42**), 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2,3-dichlorofenyl)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**50**) i 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[3-[4-(2-cyjanofenyl)piperazynylo]propoksy]kumaryna (**52**)) na podstawie analizy struktura-aktywność,
- ocenę powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} dla arylo/heteroarylopiperazynylowych pochodnych 8-acetylo-7-hydroksy-4-metylokumaryny. Określenie wysokiego potencjału badanych pochodnych w zakresie powinowactwa do receptora 5-HT_{1A}. Wskazanie struktur wiodących (8-acetylo-7-[3-[4-(2-bromofenyl)piperazynylo]propoksy]-4-metylokumaryny (**82**) i 8-acetylo-7-[3-[4-(2-metoksyfenyl)piperazynylo]propoksy]-4-metylo kumaryny (**90**)) na podstawie analizy struktura-aktywność.

4. Bibliografia

1. B.G. Lake, Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment, *Food. Chem. Toxicol.* 37 (1999) 423-453.
2. L. Wu, X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu, The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 4236-4260.
3. E. Yarnell, K. Abascal, Plant coumarins: myth and realities. *Alternative and complementary therapies, Alt. Compl. Ther.* 15 (2009) 24-30.
4. K. C. Fylaktakidou, D J. Hadjipavlou-Litina, K. E. Litinas, D. N. Nicolaides, Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 3816-3833.
5. Y. Kashman, K. R. Gustafson, R.W. Fuller, J. H. Cardellina, J. B. McMahon, M. J. Currens, R. W. Buckheit, S.H. Hughes, G. M. Cragg, M. R. Boyd, Hiv inhibitory natural-products. The calanolides, a novel hiv-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rain-forest tree, *Calophyllum-lanigerum*, *J. Med. Chem.* 35 (1992) 2735-2743.
6. Y. Shikishima, Y. Takaishi, G. Honda, M. Ito, Y. Takfda, O. K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, K. H. Lee, Chemical constituents of *Prangos tschimganica*; Structure elucidation and absolute configuration of coumarin and furanocoumarin derivatives with anti-HIV activity, *Chem. Pharm. Bull.* 49 (2001) 877-880.
7. M. Kimura, T. Masuda, K. Yamada, N. Kobuta, N. Kawakatsu, M. Mitani, K. Kishii, M. Inazu, T. Namiki, Novel diphenylalkyl piperazine derivatives with dual calcium antagonistic and antioxidative activities, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2 (2002) 1947-1950.
8. Y. P. Dang, Y. F. Chen, Y. Q. Li, L. Zhao, Developments of Anticoagulants and New Agents with Anti-Coagulant Effects in Deep Vein Thrombosis, *Mini_Rev. Med. Chem.* 17 (2017) 338-350.
9. R. S. Santhosh, B. Suriyanarayanan, Plants: A Source for New Antimycobacterial Drugs, *Planta Medica* 80 (2014) 9-21.
10. R. Z. Batran, D. H. Dawood, S. A. El-Seginy, M. M. Ali, T. J. Maher, K. S. Gughani, A. N. Rondon-Ortiz, New Coumarin Derivatives as Anti-Breast and Anti-Cervical Cancer Agents Targeting VEGFR-2 and p38 MAPK, *Arch. Pharm.* 350 (2017) 1-19.
11. K. Skalik-Woźniak, I. E. Orhan, G. A. Cordell, S. M. Nabavi, B. Budzyńska, Implication of coumarins towards central nervous system disorders, *Pharmacol. Res.* 103 (2016) 188-203.
12. Jak stosować leki kardiologiczne w codziennej praktyce? Wyd. Czelej, Opracowanie zbiorowe pod red. M. Dłużniewskiego, W. Gierlak, M. Kuch, Rozdział 6, Leki przeciwzakrzepowe w kardiologii – Antagoniści witaminy K (2010).
13. F. Salvo, J. Bezin, P. Bosco-Levy, L. Letinier, P. Blin, A. Pariente, N. Moore, Pharmacological treatments of cardiovascular diseases: Evidence from real-life studies, *Pharmacol. Res.* 118 (2017) 43-52.
14. G. Orefice, A. Grasso, N. Fazio, G. Delvecchio, G. Volpe, M. Coppola, A. Dalessio, P. B. Carrieri, No effect of cloricromen on some coagulation parameters in patients with ischemic cerebrovascular-disease, *J. Int. Med. Res.* 22 (1994) 287-291.
15. V. B. Fiedler, R. E. Nitz, S. Buchheim, Effects of oral carbocromene pretreatment on infarct size following experimental coronary artery occlusion, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 4 (1982) 14-25.
16. C. Y. Liang, W. H. Ju, S. M. Pei, Y. H. Tang, Y. D. Xiao, Pharmacological Activities and Synthesis of Esculetin and Its Derivatives: A Mini-Review, *Molecules* 22 (2017) 387-400.
17. Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne: *Farmakopea Polska VIII*. Warszawa: Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych, (2008) 3491.
18. X. Xiao, Z. Guo, J. Deng, G. Li, Separation and purification of isofraxidin from *Sarcandra glabra* by microwave-assisted extraction coupled with high-speed counter-current chromatography, *Sep. Purif. Technol.* 68 (2009) 250-254.
19. A. M. Gray, P.R. Flatt, Nature's own pharmacy: the diabetes perspective, *Proc. Nutr. Soc.* 56 (1997) 507-517.

20. A. Momin, Role of indigenous medicine in primary health care. Proceedings of first international seminar on Unani medicine. Kalyani Publishers, New Delhi, (1987) 54.
21. G. S. Bisacchi, J. I. Manchester, A New-Class Antibacterial-Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV, *ACS Infect. Dis.* 1 (2015) 4–41.
22. C. Kontogiorgis, A. Detsi, D. Hadjipavlou-Litina, Coumarin-based drugs: a patent review (2008 – present), *Expert Opin. Ther. Pat.* 22(2012) 437-454.
23. K. N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity, *BioMed. Res. Int.*, (2013) 1-14.
24. S. M. de Souza, F. Delle Monache, A. Smania, Antibacterial Activity of Coumarins, *Z. Naturforsch.* 60 (2005) 693-700.
25. C. Montagner, S. M. de Souza, C. Groposo, F. Delle Monache, E. F. A. Smania, A. Samania, Antifungal Activity of coumarins, *Z. Naturforsch.* 63 (2008) 21-28.
26. D. Kumar, P. Sharma, H. Singh, K. Nepali, G. K. Gupta, S. K. Jain, F. Ntie-Kang, The value of pyrans as anticancer scaffolds in medicinal chemistry, *RSC. Adv.* 7 (2017) 36977-36999.
27. J. H. Zhang, L. Li, C. Jiang, C. G. Xing, S. H. Kim, J. X. Lu, Anti-cancer and Other Bioactivities of Korean *Angelica gigas* Nakai (AGN) and Its Major Pyranocoumarin Compounds, *AntiCancer. Agents Me.* 12 (2012) 1239-1254.
28. L. Santana, E. Uriarte, Y. Fall, M. Teijeira, C. Teran, E. Garcia-Martinez, B.-R. Tolf, Synthesis and structure–activity relationships of new arylpiperazines: *para* substitution with electron-withdrawing groups decrease binding to 5-HT_{1A} and D_{2A} receptors, *Eur. J. Med. Chem.* 37 (2002) 503–510.
29. J. C. Gonzalez-Gomez, L. Santana, E. Uriarte, J. Brea, M. Villazon, M. I. Loza, M. De Luca, M. E. Rivas, G. Y. Montenegro, J. A. Fontenla, New Arylpiperazine Derivatives with High Affinity for α 1A, D₂ and 5-HT_{2A} Receptors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 175–178.
30. Y. Chen, S. Wang, X. Xu, X. Liu, M. Yu, S. Zhao, S. Liu, Y. Qiu, T. Zhang, B.-F. Liu, G. Zhang, Synthesis and Biological Investigation of Coumarin Piperazine (Piperidine) Derivatives as Potential Multireceptor Atypical Antipsychotics, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 4671–4690.
31. Y. Chen, Y. Lan, S. Wang, H. Zhang, X. Xu, X. Liu, M. Yu, B.-F. Liu, G. Zhang, Synthesis and evaluation of new coumarin derivatives as potential atypical antipsychotics, *Eur. J. Med. Chem.* 74 (2014) 427-439.
32. J. Trykowska Konc, E. Hejchman, H. Kruszewska, I. Wolska, D. Maciejewska, Synthesis and pharmacological activity of *O*-aminoalkyl derivatives of 7-hydroxycoumarin, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 2252-2263.
33. K. Ostrowska, E. Hejchman, D. Maciejewska, A. Włodarczyk, K. Wojnicki, D. Matosiuk, A. Czajkowska, I. Młynarczuk-Biały, Ł. Dobrzycki, Microwave-assisted preparation, structural characterization, lipophilicity, and anti-cancer assay of some hydroxycoumarin derivatives, *Monats. Chem.* 146 (2015) 89-98.
34. T. Furuta, H. Takeuchi, M. Isozaki, Y. Takahashi, M. Kanehara, M. Sugimoto, T. Watanabe, K. Noguchi, T. M. Dore, T. Kurahashi, M. Iwamura, R. Y. Tsien, Bhc-cNMPs as either Water-Soluble or Membrane-Permeant Photoreleasable Cyclic Nucleotides for both One- and Two-Photon Excitation, *Chembiochem*, 5 (2004) 1119-1128.
35. F.M. Dean, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, in: L. Zechmeister, ed., Vol. IX. Springer Verlag, Vienna (1952).
36. E. Tomer, R. Goren, S.P. Monselise, Isolation And identification of seselin in citrus roots, *Phytochemistry* 8 (1969) 1315–1316.
37. K. Kato, Crystal structure of amyrolin - seselin (C₁₄H₁₂O₃), *Acta Cryst. B* 26 (1970) 2022–2029.
38. L. Gunatilaka, D. Kingston, K. Wijeratne, R. Bandara, G. Hofmann, R.J. Johnson, Biological activity of some coumarins from *Srilankanrutaceae* Nat. Prod. 57 (1994) 518–520.
39. P. Magiatis, E. Melliou, A.L. Skaltsounis, Synthesis and cytotoxic activity of pyrano-coumarins of the seselin and xanthyletin series, *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 982–986.
40. C. Pessoa, E.R. Silveira, T.L.G. Lemos, L.A. Wetmore, M.O. Moraes, A. Leyva, Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil, *Phytother. Res.* 14 (2000) 187–191.

41. N. S. Reddy, G. Gumireddy, M. R. Mallireddigari, S. C. Cosenza, P. Venkatapuram, S. C. Bell, E. P. Reddy, M. V. R. Reddy, Novel coumarin-3-(N-aryl)carboxamides arrest breast cancer cell growth by inhibiting ErbB-2 and ERK1, *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 3141-3147.
42. X.-H. Liu, H.-F. Liu, J. Chen, Y. Yang, B.-A. Song, L.-S. Bai, J.-X. Liu, H.-L. Zhu, X.-B. Qi, Synthesis and molecular docking study of novel coumarin derivatives containing 4,5-dihydropyrazole moiety as potential antitumor agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5705-5708.
43. N. B. Yaragattia, M. V. Kulkarnia, M. D. Ghateb, S. S. Hebbarc, G. R. Hegdec, Synthesis and biological evaluation of some new coumarinyl thiazolopyrimidinones, *J. Sulfur. Chem.* 31 (2010) 123-133.
44. H. G. Raj, V. S. Parmar, S. C. Jain, S. G. Poonam, H. S. Malhotra, A. Singh, C. E. Olsen, J. Wengeld, Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part I: dioxygenated 4-methylcoumarins as superb antioxidant and radical scavenging agents, *Bioorg. Med. Chem.* 6 (1998) 833-839.
45. R. G. Kalkhambkar, G. M. Kulkarni, H. Shivkumar, R. N. Rao, Synthesis of novel triheterocyclic thiazoles as anti-inflammatory and analgesic agents, *Eur. J. med. Chem.* 42 (2007) 1272-1276.
46. J. Deng, T. Sanchez, L. Q. Al-Mawsawi, R. Dayam, R. A. Yunes, A. Garofalo, M. B. Bolgerd, N. Neamati, Discovery of structurally diverse HIV-1 integrase inhibitors based on a chalcone pharmacophore, *Bioorg. Med. Chem.* 15 (2007) 4985-5002.
47. E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, Multicopper oxidases and oxygenases, *Chem. Rev.* 96 (1996) 2563-2605.
48. K. S. Patel, J. C. Patel, H. R. Dholariya, K.D. Patel, Multiple heating rate kinetic parameters, thermal, X-ray diffraction studies of newly synthesized octahedral copper complexes based on bromo-coumarins along with their antioxidant, anti-tubercular and antimicrobial activity evaluation, *Spectrochim. Acta A* 96 (2012) 468-479.
49. A. S. Quemeneur, J. M. Trocello, H. K. Ea, F. Woimant, F. Liote, Musculoskeletal conditions associated with Wilson's disease, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25 (2011) 627-636.
50. C. Duncan, A. R. White, Copper complexes as therapeutic agents, *Metallomics*, 4 (2012) 127-138.
51. S. R. Bareggi, U. Cornelli, Clonidine: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders, *Neurosci. Ther.* 18 (2012) 41-46.
52. C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in Copper Complexes as anticancer agents, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815-862.
53. C. Pessoa, E. R. Silveira, T. L. G. Lemos, L. A. Wetmore, M. O. Moraes, A. Leyva, Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil, *Phytother. Res.* 14 (2000) 187-191.
54. C.-Y. Duh, S.-K. Wang, Y.-C. Wu, Cytotoxic pyranocoumarins from the aerial parts of *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry* 30 (1991) 2812-2814.
55. C.-Y. Duh, S.-K. Wang, Y.-C. Wu, Cytotoxic pyranocoumarins from roots of *Peucedanum japonicum*, *Phytochemistry* 31 (1992) 1829-1830.
56. P. Promsuwan, C. Yenjai, Synthesis and cytotoxicity of coumarin derivatives and nordenatin, *Asian J. Chem.* 25 (2013) 3629-3632.
57. S. Zeng, W. Liu, F. F. Nie, Q. Zhao, J. J. Rong, J. Wang, L. Tao, Q. Qi, N. Lu, Z. Y. Li, Q. L. Guo, LYG-202, a new flavonoid with a piperazine substitution, shows antitumor effects in vivo and in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385 (2009) 551-556.
58. L. L. Rokosz, C. Y. Huang, J. C. Reader, T. M. Stauffer, D. Chelsky, N. H. Sigal, A. K. Ganguly, J. J. Baldwin, Surfing the piperazine core of tricyclic farnesyltransferase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 5537-5543.
59. M. S. Mustafa, M. M. El-Abadelach, M. A. Zihlif, R. G. Naffa, M. S. Mubarak, Synthesis, and antitumor activity of some N1-(coumarin-7-yl) amidrazones and related congeners, *Molecules*, 16 (2011) 4305-4317.
60. D. Mandala, A. Valeru, J. Pochampalli, S. R. Vankadari, P. Tigulla, R. Gatla, R. Thampu, Synthesis, antimicrobial activity, and molecular modeling of novel 4-(3-(4-benzylpiperazin-1-yl)propoxy)-7-methoxy-3-substituted phenyl-2H-chromen-2-one, *Med. Chem. Res.* 22 (2013) 5481-5489.

61. S. F. Razawi, M. Khoobi, H. Nadri, A. Sakhteman, A. Morad, S. Emami, A. Foroumadi, A. Shafiee, Synthesis and evaluation of 4-substituted coumarins as novel acetylcholinesterase inhibitors, Eur. J. Med. Chem. 64 (2013) 252-259.
62. K. Ostrowska, E. Hejchman, Ł. Dobrzycki, D. Maciejewska, Solid state structure of new 5-[2-(*N,N*-diethylamino)ethoxy]-4,7-dimethylcoumarins by X-ray and ^{13}C CP/MAS NMR, J. Mol. Struct. 1088 (2015) 123-128.
63. K. Ostrowska, D. Maciejewska, Ł. Dobrzycki, P. Socha, Solid state structure by X-ray and ^{13}C CP/MAS NMR of new 5-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethoxy]-4,7-dimethylcoumarins, J. Mol. Struct. 1112 (2016) 25-32.

Krzysztof Ostrowski