



UNIwersYTET MEDYCZNY W ŁODZI
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Angelika Anna Adamus-Grabicka

Numer albumu: 2/SSD/2013

***Porównanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych pirazolin
skondensowanych z chromanonem lub flawanonem: synteza i badanie
właściwości fizykochemicznych***

***Comparison of anticancer activity of condensed pyrazoline derivatives with
chromanone or flavanone: synthesis and study of physicochemical properties***

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Budzisz

Promotorowi pracy - Pani prof. dr hab. n. farm. Elżbiecie Budzisz składam najserdeczniejsze podziękowania za patronat naukowy, cenne uwagi przy pisaniu publikacji oraz niniejszej dysertacji, za pomoc, cierpliwość i życzliwość w trakcie jej realizacji.

Pani dr hab. n. chem. Prof. UŁ Magdalenie Małeckiej dziękuję za pomoc w trakcie realizacji badań, cenne wskazówki i wsparcie przy pisaniu prac naukowych.

Dr hab. n. farm. Magdalenie Markowicz-Piaseckiej dziękuję za wsparcie, nieocenioną pomoc przy realizacji badań i pisaniu prac naukowych.

Pani mgr Urszuli Krajewskiej serdecznie dziękuję za pomoc w trakcie wykonywania badań biologicznych badanych związków.

Serdeczne podziękowania kieruję również do współautorów artykułów badawczych, które stanowią podstawę niniejszej pracy doktorskiej. Za współpracę i cenne wskazówki dziękuję: dr n. biol. Pawłowi Hikiszowi, dr hab. n. biol. Michałowi Ponczkowi, dr n. biol. Marcinowi Cieślakowi oraz dr n. biol. Karolinie Królewskiej-Golińskiej.

Serdeczne podziękowania kieruję do mojego Szefa, prof. UM dr hab. n. chem. Bolesława Karwowskiego za cierpliwość i wsparcie podczas pisania pracy doktorskiej.

Zespołowi badawczemu z Katedry Kosmetologii Wydziału Farmaceutycznego UM w Łodzi dziękuję za współpracę i miłą atmosferę podczas wieloletniej pracy w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych.

Współpracownikom z Zakładu Bromatologii serdecznie dziękuję za nieocenione wsparcie i miłą atmosferę podczas pracy oraz pisania niniejszej dysertacji.

Podziękowania kieruję do mojej Rodziny

Rodzicom: Wiesławie i Stanisławowi Adamus dziękuję za trud włożony w wychowanie i wykształcenie oraz wsparcie na każdym etapie mojego życia.

Teściom: Elżbiecie i Janowi Grabickim dziękuję za pomoc i wiarę w moją osobę.

Rodzeństwu: Ewelinie, Dawidowi, Klaudii oraz Oli dziękuję za to, że zawsze mogę na Was liczyć oraz wsparcie w dążeniu do celu.

Pracę doktorską dedykuję mojemu wspaniałemu Mężowi Krzysztofowi Grabickiemu oraz ukochanej córeczce Laurze.

Dziękuję Mężowi za wiarę we mnie, wsparcie w trudnych chwilach oraz za to , że zawsze jest przy mnie.

Mojej kochanej Laurze dziękuję za bezgraniczną i bezwarunkową miłość, która pomogła mi osiągnąć wymarzony cel.

Spis treści

I. Wstęp.....	11
II. Część literaturowa	13
1. Związki flawonoidowe	13
1.1. 3-arylidenochroman-4-ony.....	20
1.2. Pirazoliny	24
2. Właściwości biologiczne flawonoidów i ich pochodnych.....	27
3. Deskryptor lipofilowości w ocenie aktywności biologicznej związków	32
III. Cel pracy.....	35
1. Szczegółowe założenia i etapy pracy doktorskiej.....	35
IV. Część eksperymentalna	37
1. Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej	37
1.1. Lipofilowość jako parametr aktywności biologicznej związków	37
1.2. Aktywność cytotoksyczna.....	37
1.3. Badanie erytrotoksyczności, ocena morfologii erytrocytów	38
1.4. Wpływ badanych związków na cykl komórkowy.....	39
V. Najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej	41
1. Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells	42
1.1. Synteza i badania biologiczne pochodnych 3-benzylidenochromanonów	43
2. Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)2-phenylchroman-4-one	47
2.1. Synteza oraz analiza struktury krystalograficznej pochodnych arylidenochromanonów.....	48

3. Biological evaluation of 3-benzylidenechromanones and their spiropyrazolines-based analogues.....	50
3.1. Badania biologiczne analogów 3-benzylidenochromanonów i spiropirazolin.....	51
VI. Dyskusja	54
VII. Wnioski.....	61
VIII. Streszczenie.....	64
IX. Summary.....	66
X. Literatura	68
XI. Wykaz rycin.....	78
XII. Granty	79
XIII. Oświadczenia współautorów.....	80

WYKAZ STOSOWANY SKRÓTÓW:

PAL – amoniakoliza fenyloalaninowa

C4H – cynamonian 4-hydroksylazy

CoA – koenzym A

CHI – izomeraza chalkonowa

BCR (Breakpoint Cluster Region) - region skupienia punktu przerwania

MLL (Myeloid Lymphoid Leukemia) – mieloidalna białaczka limfatyczna

AML (Acute Myeloid Leukaemia) – ostra białaczka szpikowa

ALL (Acute Lymphoid Leukaemia) – ostra białaczka limfatyczna

RTF – reaktywne formy tlenu

PKC – kinaza białkowa

EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

FAK (Focal Adhesion Kinase) – kinaza ogniskowej adhezji

HL-60 – ludzka linia komórkowa nowotworu białaczki promielocytowej

NALM-6 – ludzka linia komórkowa nowotworu białaczki limfoblastycznej

WM-115 – ludzka linia komórkowa nowotworu czerniaka

COLO-205 – ludzka linia komórkowa raka okrężnicy

A431 – ludzka linia komórkowa nowotworu skóry

NOS – inhibitor syntazy tlenu azotu

CB1 – receptor kannabinoidowy

SAR (Structure-Activity Relationship Study) – zależność między strukturą chemiczną związku, a jego aktywnością biologiczną

XRD (X-ray powder diffraction) – proszkowa dyfrakcja rentgenowska

RP-TLC (Reverse – Phase Thin – Layer Chromatography) - chromatografia cienkowarstwowa w odwróconym układzie faz

RP-HPLC (Reverse – Phase High Pressure Liquid Chromatography) – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz

BamHI – endonukleaza restrykcyjna

HSA (Human Serum Albumin) - albumina ludzka

QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) – zależność struktura - aktywność

HRMS – wysokorozdzielcza analiza masowa

¹H NMR - protonowy magnetyczny rezonans jądrowy

¹³C NMR – węglowy magnetyczny rezonans jądrowy

IR – spektroskopia w podczerwieni

MS – analiza masowa

logP – deskryptor lipofilowości

MTT – dehydrogenaza bursztynianowa

HS – analiza powierzchni Hirshfelda

I. Wstęp

Choroby nowotworowe od wielu lat stanowią przyczynę wysokiej liczby zgonów. W krajach wysoko rozwiniętych nowotwory zaraz po chorobach sercowo-naczyniowych stanowią najważniejszą przyczynę śmiertelności. W ciągu ostatnich trzydziestu lat współczynnik zachorowalności i śmiertelności stale wzrastał. Polska należy do krajów wyróżniających się wysoką zachorowalnością i śmiertelnością pacjentów w wieku młodym i średnim (20 – 64 lata). W naszym kraju nowotwory stanowią drugą przyczynę zgonów, mimo dostępności do programów i badań profilaktycznych oraz stale pojawiających się kampanii społecznych. Obecnie nowotwory są przyczyną zgonów ponad 40% kobiet oraz 30% mężczyzn w wieku 45 – 60 lat, jednak rozwój medycyny i stale pogłębiające się badania nad cytostatykami zaczynają wpływać na zahamowanie tej tendencji. W minionym roku Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju przygotowała raport, z którego wynika, że w Polsce wskaźnik zachorowalności na nowotwory jest relatywnie niski, ponieważ na 100 tysięcy mieszkańców chorują 254 osoby. Niestety na tle innych krajów europejskich dynamika rozwoju złośliwych chorób nowotworowych w Polsce jest znacznie wyższa. W naszym kraju umiera 237 osób / 100 tysięcy populacji, co jest jednym z najwyższych wskaźników umieralności wśród pozostałych czterdziestu czterech państw biorących udział w badaniu. Leczenie chorych niezależnie od typu nowotworu ma na celu wyleczenie lub przedłużenie jego życia. Współczesna medycyna wykorzystuje dwie drogi leczenia: miejscową oraz systemową. Pierwsza dotyczy bezpośredniego oddziaływania na guz czyli chirurga, radioterapia. Druga obejmuje leczenie chemioterapeutyczne oparte na podawaniu leków oddziałujących na cykl komórkowych i wspomagane leczeniem hormonoterapeutycznym oraz biologicznym. Leki cytostatyczne stosowane były od wielu dziesięcioleci, a nawet w starożytności. Dzieli się na różne grupy ze względu na budowę, mechanizm działania oraz oddziaływanie na fazę cyklu komórkowego. Niestety mimo pozytywnych efektów leczenia niektórymi lekami należy zwrócić uwagę na inny aspekt. Toksyczność cytostatyków, zwłaszcza dla prawidłowych i szybko proliferujących tkanek gospodarza, jest tak duża, że może prowadzić do niebezpiecznych objawów niepożądanych np. neurotoksyczność. Spośród leków

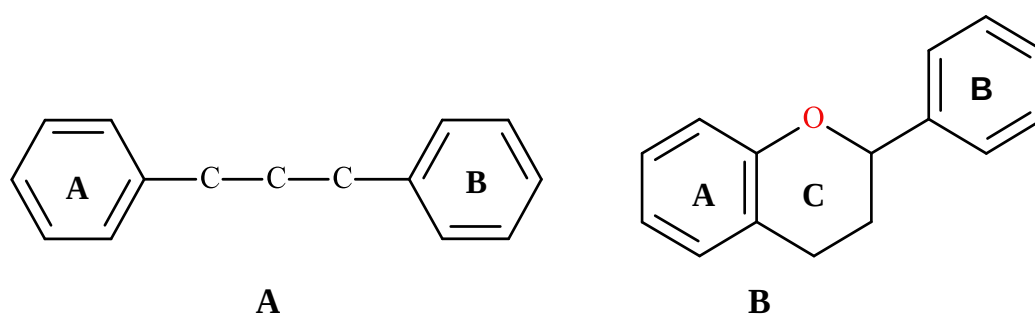
cytostatycznych najczęściej i najsilniej neurotoksycznie działają: alkaloidy, cisplatyna, ifosfamid, metotreksat, cytarabina. Z tego względu wciąż trwają badania nad nowymi substancjami o działaniu przeciwnowotworowym. Naukowcy na całym świecie pracują nad syntezą związków cytotoksycznych wobec linii komórkowych wybranych nowotworów, które będą bezpieczniejsze dla zdrowych tkanek.

W poniższej pracy przedstawiono syntezę serii związków, pochodnych pirazolin skondensowanych z pierścieniem benzo- γ -pironu oraz analizę struktury w oparciu o badania fizykochemiczne. Dla otrzymanych związków przeprowadzono serię badań biologicznych potwierdzających właściwości cytotoksyczne wobec nowotworowych linii komórkowych, działanie na fazę cyklu komórkowego oraz interakcje z błonami erytrocytów. Wyniki przeprowadzonych badań stanowią podstawę do dalszych, poszerzonych analiz potencjalnych leków o działaniu przeciwnowotworowych.

II. Część literaturowa

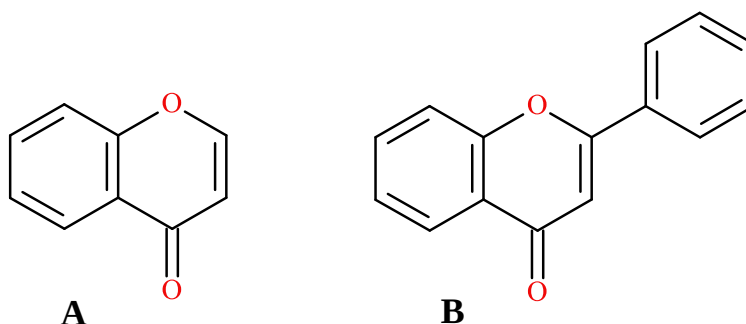
1. Związki flawonoidowe

Związki flawonoidowe, często nazywane fitozwiązkami ze względu na występowanie w roślinach, od wielu lat są wykorzystywane w leczeniu różnych chorób [1]. Dotąd poznano i sklasyfikowano ponad 10 000 związków występujących w gatunkach roślinach: leczniczych, strączkowych, owocach, warzywach oraz napojach (zielonej herbacie oraz czerwonym winie) [2]. Pierwsze odkrycie tej klasy związków miało miejsce prawie sto lat temu. Flawonoidy należą do polifenoli, które również są wykorzystywane w medycynie. Do tej grupy związków należą także kwasy fenolowe, stilbeny i lignany, jednak to flawonoidy są głównymi przedstawicielami tej klasy związków. Podstawowa struktura flawonoidów składa się z układu $C_6-C_3-C_6$ (diarylopropanowego) (**Ryc.1A**), gdzie dwa pierścienie aromatyczne połączone są trójwęglowym łańcuchem. Trójwęglowy fragment łączący dwa pierścienie może zawierać heteroatom (zwykle tlen) i w ten sposób tworzy trzeci, heterocykliczny pierścień (**Ryc.1B**) [3]. W wielu pozycjach literaturowych znaleźć można oznaczenia literowe pierścieni benzenowych (**A** i **B**, natomiast heterocykliczny pierścień oznacza się literą **C** (**Ryc.1**) [4].



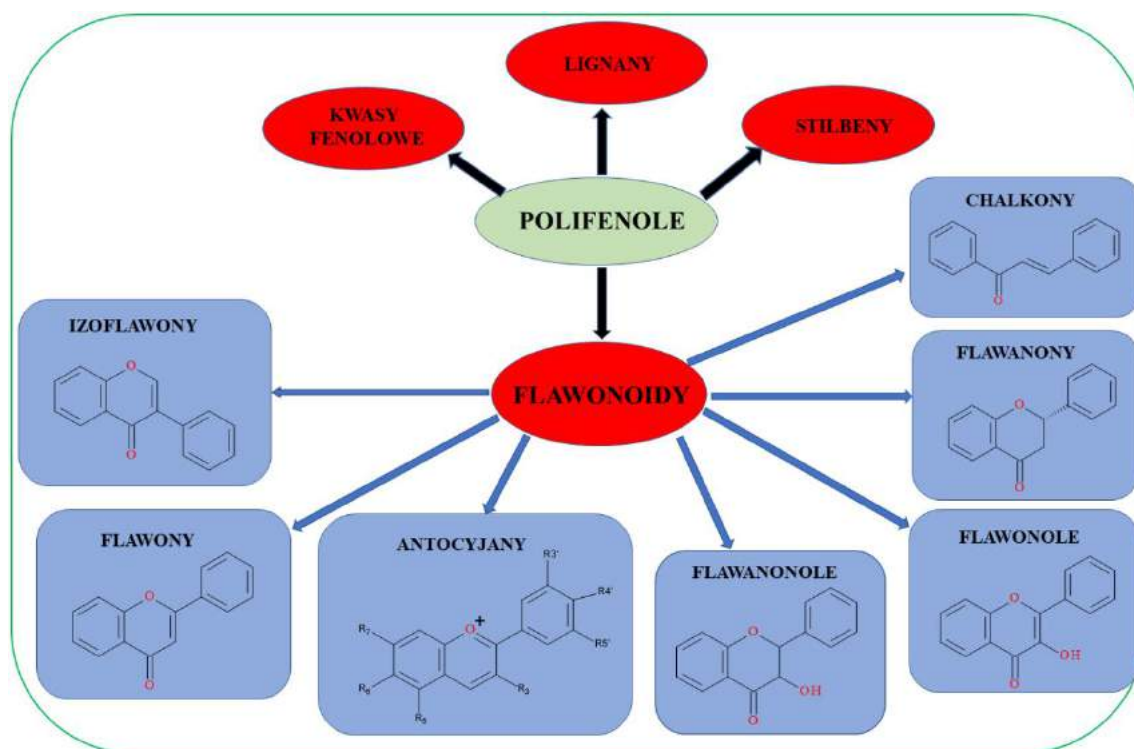
Ryc. 1. Struktura flawonoidu.

Większość flawonoidów posiada w pozycji C4 (w pierścieniu C) grupę karbonylową, co pozwala zaliczyć je do pochodnych benzo- γ -pironu (**Ryc.2A**) i dlatego nazywane są również 2-fenylo- benzo- γ -pironami (2-fenylo-4*H*-chromen-4-on) (**Ryc.2B**).



Ryc. 2. Struktura A - benzo- γ -pironu; B - 2-fenylo-benzo- γ -pironu.

Ze względu na obecność grupy karbonylowej w pozycji C4, wiązania podwójnego między atomami węgla C2, a C3 (w pierścieniu B) oraz obecność grupy hydroksylowej flawonoidy zostały podzielone na podgrupy: flawanony, flawonole, flawanonole, flawony, izoflawony, antocyjany (**Ryc.3**) [5]. Do związków flawonoidowych zaliczane są również biflawonoidy, flawonolignany, fenyloflawonoidy, glikozydoestry flawonoidowe, chalkony oraz proantocyjany [6].



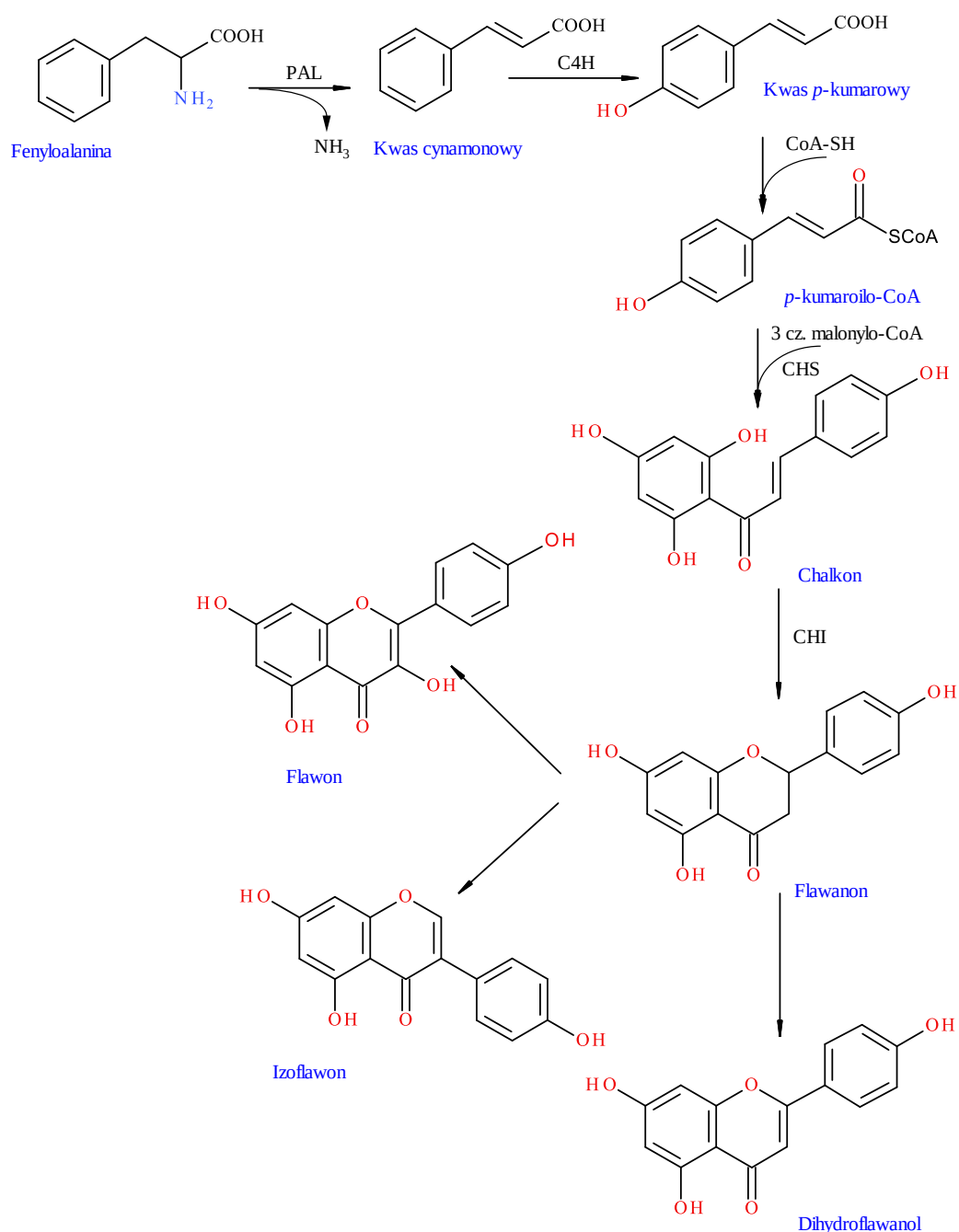
Ryc. 3. Klasyfikacja związków flawonoidowych.

Związki flawonoidowe zbudowane są z części cukrowej (glikonowej) oraz aglikonowej i połączone wiązaniem glikozydowym. Większość naturalnie występujących flawonoidów ma postać O-glikozydów. W części cukrowej występuje zwykle glukoza, galaktoza, ksylonoza czy arabinonoza, która przyłącza się w pozycji C7 flawonów i izoflawonów, natomiast w przypadku flawonoli w pozycji C3 i C7, a w antocyjanidynach w C3 i C5 [4]. Flawonoidy występujące naturalnie charakteryzują się obecnością trzech grup hydroksylowych: w pierścieniu **A** w pozycji C5 i C7 oraz w pierścieniu **B** w pozycji C3 [7]. Występujące w roślinach związki flawonoidowe, spożywane przez człowieka mają postać aglikonów lub β -glikozydów. Jako związki powszechnie występujące w roślinach stanowią istotny element diety każdego człowieka. Szacuje się, że dorosły człowiek przyjmuje ok 1 g związków flawonoidowych na dobę, głównie w postaci glikozydów. W Polsce do najczęściej spożywanych surowców zawierających flawonoidy zalicza się cebulę, jabłka oraz herbatę jednak występują w wielu grupach pokarmów: warzywach, owocach, roślinach strączkowych, ciemnej czekoladzie, czerwonym winie [4]. Flawonoidy w postaci aglikonowej mają charakter hydrofobowy, dlatego mogą być

transportowane przez błony lipidowe na zasadzie dyfuzji biernej. Po połączeniu w cukrem w postać glikozydową charakter związku jest hydrofilowy, przez co zmniejsza się stopień dyfuzji i mogą być przenoszone na zasadzie transportu aktywnego przy udziale transportera $\text{Na}^+/\text{glukoza}$. Dlatego też aglikony są wchłaniane w jelicie cienkim, dzięki β -glukozydazie obecnej w nabłonku jelita, która powoduje rozszczepienie wiązań β -glikozydowych [8]. Flawonoidy metabolizowane są w wątrobie, dzięki enzymom I fazy detoksykacji (cytochrom P-450) ulegają demetylacji i hydroksylacji [9]. W wyniku działania enzymów II fazy detoksykacji związki flawonoidowe ulegają O-metylacji i są sprzęgane z kwasem glukuronowym lub siarkowym. Metabolity flawonoidów z wątroby wędrują z krwią do tkanek. Część produktów metabolizmu jest wydalana z moczem oraz żółcią, a niewchłonięte są przetwarzane w jelicie grubym przez florę jelitową [10].

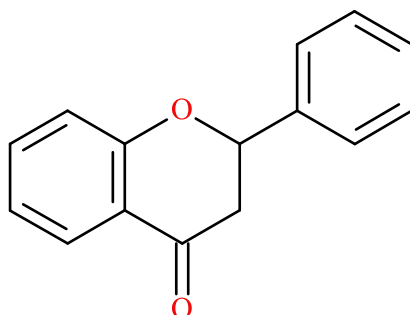
Powyżej opisane oznaczenia pierścieni szkieletu flawonoidów stosowano ze względu na ich biosyntezę, w której prekursorem jest chalkon (benzylidenoacetofenon) otrzymywany z fenyloalaniny (**Ryc. 4**). Synteza pierścieni zachodzi równolegle w dwóch szlakach: octanowym (pierścień **A**) oraz szikimowym (pierścień **B**) [11] [12]. Reakcję syntezy pierścienia **B** rozpoczyna kwas szikimowy, z którego otrzymywana jest fenyloalanina. W wyniku deaminacji ulega przekształceniu do kwasu cynamonowego za pośrednictwem amoniakolazy fenyloalaninowej (PAL). Przy użyciu cynamonianu 4-hydroksylazy (C4H) do pierścienia benzenowego zostaje przyłączona grupa hydroksylowa, w wyniku czego powstaje kwas 4-hydroksycynamonowy (kwas *p*-kumarowy). Następnie *p*-kumarynian zostaje przekształcony za pośrednictwem koenzymu A (CoA) do 4-kumaroilo-CoA, który wchodzi w reakcję z malonylo-CoA. Pierścień **A** flawonoidu powstaje z trzech cząsteczek malonylo-CoA. Malonylo-CoA jest prekursorem w syntezie wielu różnych związków biochemicznych. Otrzymywany jest z glukozy w wyniku przemian biochemicznych do pirogronianu, który w wyniku konwersji przechodzi w acetylo-CoA. Za pośrednictwem karboksylazy acetylo-CoA powstaje malonylo-CoA. Kondensacja jednej cząsteczki 4-kumaroilo-CoA (pierścień **B**) z trzema cząsteczkami malonylo-CoA (pierścień **A**) zachodzi z użyciem syntazy chalkonu (CHS) w wyniku czego powstaje chalkon. W następnym etapie za

pośrednictwem izomerazy chalkon - flawanon (izomeraza chalkonowa CHI) zachodzi cyklizacja do flawanonu, który stanowi prekursor do syntezy innych związków flawonoidowych.



Ryc. 4. Schemat otrzymywania flawonoidów.

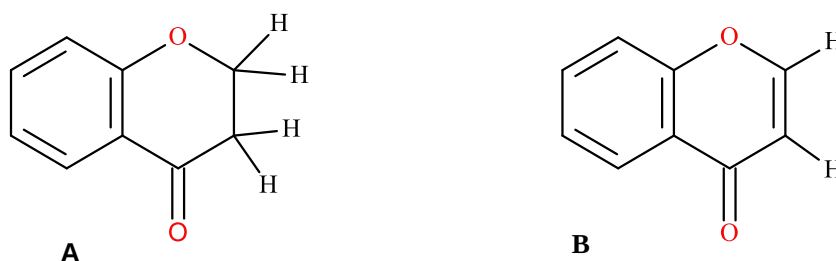
Flawanony (2-fenylo-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on) należą do jednej z głównych grup związków flawonoidowych, stanowią niezbędny składnik codziennej diety oraz leczniczych surowców roślinnych. Trzydzieści lat temu znane były jako niewielka grupa związków: chalkonów, dihydrochalkonów, auronów, a ich aktywność farmakologiczna nie była jeszcze znana [13]. Najczęściej wymienianymi przykładami należącymi do tej klasy związków była naryngenina i hesperedyna [14]. Późniejsze badania wykazały, że związki flawanonowe występują w 42 rodzinach roślin, zwłaszcza w *Compositae* (astrowate), *Leguminosae* (bobowate) oraz *Rutaceae* (rutowate) [15]. W zależności od rośliny można je pozyskać z części wegetatywnej oraz organów generatywnych: gałęzi, kory, liści, kwiatów owoców, łodyg, korzeni, nasion, kłaczy. Liczba zidentyfikowanych flawanonów wzrosła do tego stopnia, że zaliczane są do głównej klasy związków flawonoidowych [16]. Potwierdzono już ponad 350 aglikonów flawanonu oraz ponad 100 glikozydów flawanonu w naturze [15].



Ryc. 5. Szkielet flawanonu.

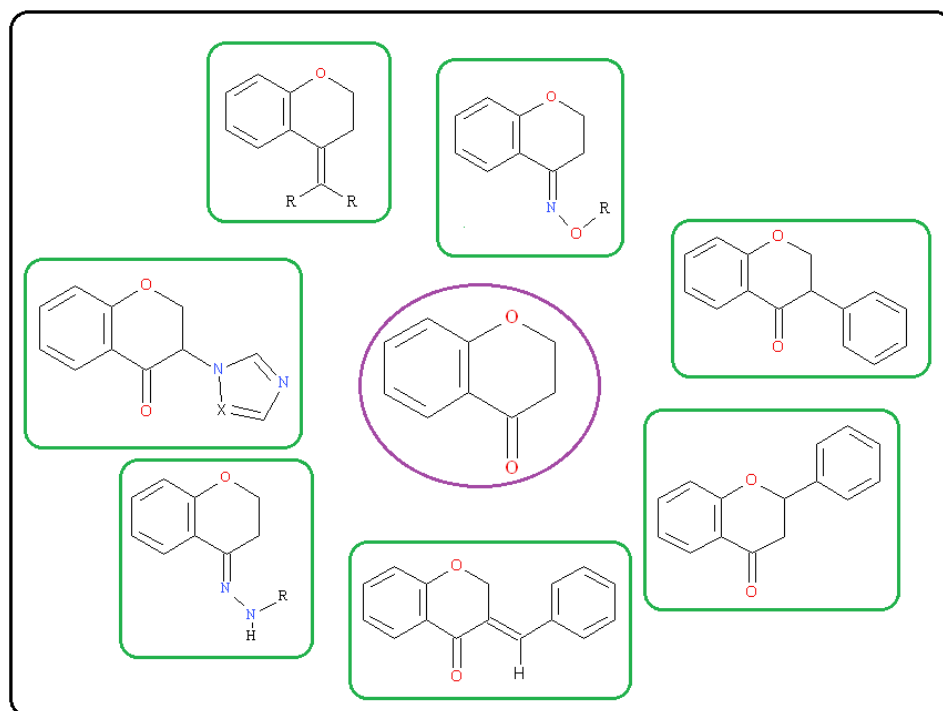
Flawanony nazywane również dihydroflawonami różnią się od innych związków brakiem wiązania podwójnego między drugim, a trzecim atomem węgla w pierścieniu C szkieletu flawonoidu (**Ryc. 5**). Przy drugim atomie węgla C-2 położony jest pierścień fenolowy (**B**) oraz atom wodoru. Ze względu na strukturę flawanonu możliwe są formy stereoizomeryczne (atom C-2 stanowi centrum asymetrii) [17]. Naturalnie występujące flawanony wykazują konfigurację (*S*) przy atomie węgla C2 w wyniku enancjoselektywności izomerazy chalkonowej, katalizującej reakcję Michaela, w wyniku której z chalkonu powstaje flawanon [18] [19].

Analogami chromanonów są flawanony (2-fenylo-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on). Chromanon (2,3-dihydro-1-benzopiran-4-on lub 2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on) należy do sześcioczłonowych związków heterocyklicznych i składa się z pierścienia benzeny skondensowanego z pierścieniem 2,3-dihydro- γ -pironu. (**Ryc. 6A**) (20) (21). Struktura 4*H*-1-benzopiran-4-onu (chroman-4-onu) jest podobna do 1-benzopiran-4-onu (chromonu) i często bywa z nią mylona. Chromon (kromon) posiada wiązanie podwójne między C2 – C3 (**Ryc. 6B**). Ta niewielka różnica w budowie chroman-4-onów i chromonów jest powodem istotnych różnic w aktywności biologicznej obu grup związków.



Ryc. 6. Struktura A - 4*H*-1-benzopiran-4-onu; B - 1-benzopiran-4-onu.

Szkielet chromanonu jest strukturą pożądaną w chemii związków heterocyklicznych dlatego, że stanowi jeden etapów pośrednich w projektowaniu i syntezie nowych związków o potencjale farmakologicznym. Różnorodność strukturalna znaleziona w rodzinie chromanonów doprowadziła do podziału na kategorie pochodnych i aktywnych biologicznie związków benzylidenochromano-4-ony, benzylidenoflawanony, flawanony, izoflawanony, spirochromanony, spiroflawanony, hydrazony (**Ryc. 7**).

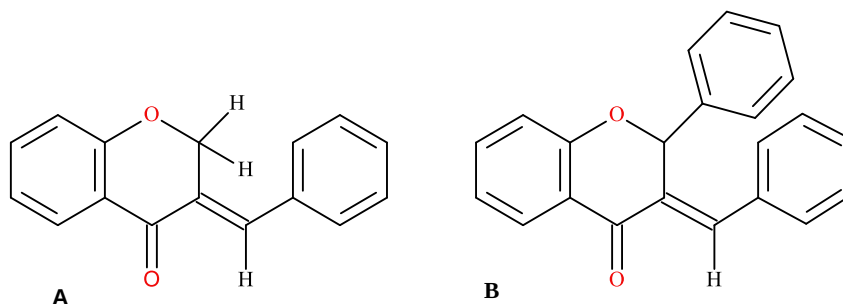


Ryc. 7. Podział chromanonów ze względu na budowę.

1.1. 3-arylidenochroman-4-ony

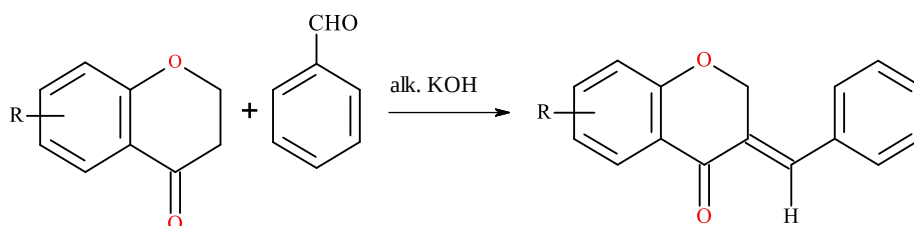
Należące do klasy związków flawonoidowych, homoizoflawonoidy należą do grupy związków heterocyklicznych wyizolowanych z roślin cebulowych: *Eucomis* (warkocznica), *Muscari* (szafirek) i *Bellevalia Romana* (szafirek rzymski). Do tej pory scharakteryzowano 240 naturalnie występujących homoizoflawonoidów otrzymanych z różnych części roślin [22]. Pierwsze homoizoflawonoidy: 3-benzylideno-3-hydroksychroman-4-on oraz 3-benzylo-3-hydroksychroman-4-on wyizolowali z surowców naturalnych *Eucomis bicolor* (hiacyntowate) w 1967 roku Bohler i Tamm [23]. Nazwa nowej klasy związków (homoizoflawonoidy) została poddana wątpliwości w 1970 roku przez Parkasa, który wraz z zespołem przeprowadził syntezę eucominu i eucomolu, otrzymanych wcześniej naturalnie związków [24]. Na podstawie struktury otrzymanych substancji okazało się, że w przeciwieństwie do izoflawonów posiadają pierścień dihydropironu. Mimo to nazwa homoizoflawonoidy jest szeroko stosowana od kilkadziesiąt lat. Związki należące do homoizoflawonoidów otrzymywane są z chalkonu. Od flawanonu lub

chromanonu różnią się obecnością wiązania podwójnego między atomem węgla C3 w pierścieniu γ -pironu, a atomem węgla pochodzącym od arylaldehydu. W wyniku kondensacji chroman-4-onu lub 2-fenylchroman-4-onu z aldehydem arylowym powstaje odpowiednio 3-benzylidenochroman-4-on (**Ryc. 8A**) oraz 3-benzylideno-2-fenylchroman-4-on (**Ryc. 8B**) [25].



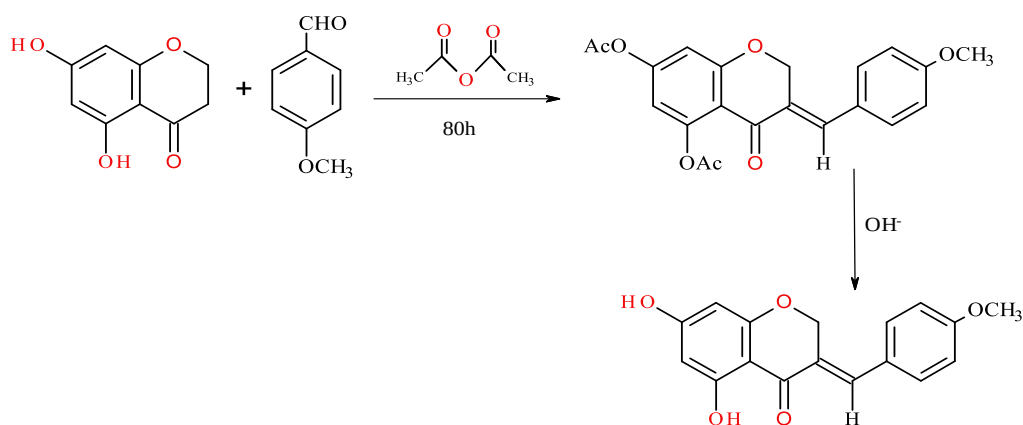
Ryc. 8. Struktura A - 3-benzylideno-4-chromanonu oraz B - 3-benzylideno-2-fenyl-4-chromanonu.

Syntetyczne 3-arylidenochroman-4-ony znane są od początku XX wieku. Tradycyjna synteza polegała na kondensacji chroman-4-onów z aromatycznym aldehydem w obecności kwasowego lub zasadowego katalizatora (23). W niektórych przypadkach stosowano katalizowaną kwasem kondensację np.: 4-chromanonu i aromatycznego aldehydu ponieważ pierścień chroman-4-onowy jest zwykle stabilny w środowisku kwasowym. Wykorzystywano jako katalizatory kwas siarkowy VI, kwas ortofosforowy i kwas solny. Reakcje katalizowane kwasem jednak nie zawsze były odpowiednie dla pochodnych benzylidenochromanonów, dlatego zaproponowano zastosowanie zasadowego katalizatora, takiego jak wodorotlenek potasu, wodorotlenek sodu czy metanolan sodu [26]. Pierwszej próby syntezy benzylidenochromanonów dokonali Perkin i Robinson w 1926 roku w reakcji kondensacji chroman-4-onu z benzaldehydem przy użyciu katalizatora alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu (**Ryc. 9**) [27]. W tym samym czasie Pfeiffer otrzymał *E*-3-aryliden-4-chromanony wykorzystując w reakcji wodorotlenek sodu i metanolan sodu [28]. Przez kolejne lata opracowywano nowe metody otrzymywania pochodnych arylidenochromanonów przy użyciu innych katalizatorów.



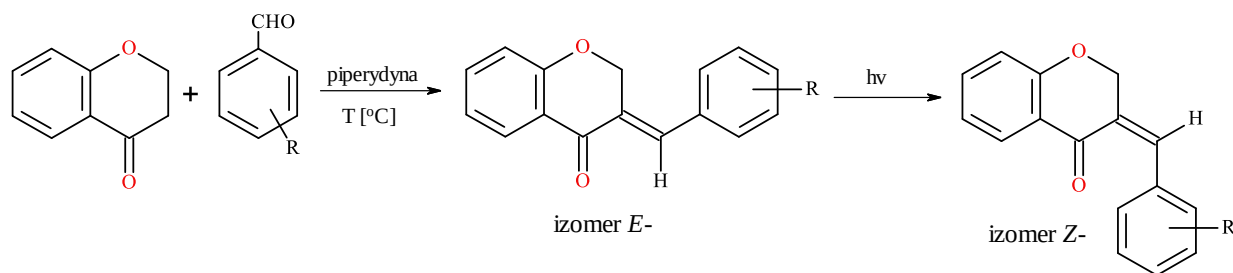
Ryc. 9. Schematreakcji syntezy benzylidenochromanonu wg Perkina i Robinsona.

Farkas w 1968 roku przeprowadził reakcję długiego ogrzewania w temperaturze wrzenia 5,7-dihydroksychroman-4-onu z 4-metoksybenzaldehydem w obecności bezwodnika octowego i otrzymał pochodną benzylidenochromanonu dioctan eucominy. W kolejnym etapie produkt pośredni poddano zmydlaniu w środowisku zasadowym otrzymując eucomin (**Ryc. 10**). Metoda okazała się prosta ale wymagała długiego czasu ogrzewania (ponad 80 godzin) w temperaturze wrzenia, dlatego nie została powszechnie przyjęta [29].



Ryc. 10. Synteza pochodnych 3-benzylidenochromanonu wg Farkasa.

W 1978 roku Levai i Hetey opublikowali metodę syntezy 3-benzylidenoflawanononów z flawanonu i aldehydu aromatycznego podstawionego różnymi grupami funkcyjnymi z zastosowanie piperydyny [30]. Rok później Levai i Schag dokładnie opisali metodę syntezy *E*-3-arylidenochroman-4-onów przy użyciu piperydyny (**Ryc. 11**) [31].



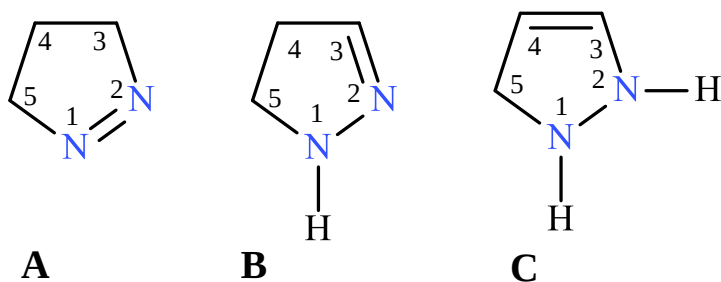
Ryc. 11. Synteza *E*-3-arylidenchroman-4-onów wg Levai'a i Schag'a.

Okazało się, że zastosowanie środowiska zasadowego i odpowiedniej temperatury w zależności od aldehydu pozwala na otrzymanie produktów o wysokiej wydajności w reakcji jednoetapowej [21]. Zastosowanie katalitycznej ilości piperydyny prowadzi do utworzenia wiązania podwójnego między trzecim atomem węgla w pierścieniu chromanonu / flawanonu, a atomem węgla pochodzącym od aldehydu aromatycznego [32]. Jeśli piperydyna zostanie dodana w nadmiarze zajdzie migracja wiązania egzo – endo i utworzenia wiązania podwójnego między drugim, a trzecim atomem węgla w efekcie produktem reakcji będzie 3-arylchromon/3-arylflawon [33]. Inne metody otrzymywania 3-benzylideno-4-chromanononów lub 3-benzylideno-2-fenylchroman-4-onów polegają na reakcji kondensacji odpowiednio chromanonów lub flawanonów i aldehydów w obecności kwasowego lub zasadowego katalizatora. Możliwe jest utworzenie zarówno (*E*)- jak i (*Z*)- stereoizomerów jednak wszystkie egzocykliczne α,β - nienasycone ketony syntezowane przez katalizowaną kwasem lub zasadą kondensację odpowiedniego cyklicznego ketonu i aromatycznego aldehydu są (*E*) - diastereomerami. Izomer (*Z*)- powstają w wyniku fotoizomeryzacji (*E*)- izomerów (**Ryc. 11**) [34]. W ciągu ostatnich stu lat opracowano wiele różnych metody syntezy analogów chromanonu, z użyciem reagentów kwasowych, zasadowych, temperatury czy promieniowania mikrofalowego [35] [36]. Jednak na uwagę zasługuje reakcja z wykorzystaniem piperydyny jako zasadowego katalizatora ponieważ nie wymaga rozpuszczalnika. Piperydyna stosowana jest również w reakcji kondensacji Knoevenagela, wykorzystywanej do syntezy kumaryn [35]. W zależności od substratu wyjściowego

podczas syntezy katalizowanej piperydyną możliwe jest utworzenie pochodnych odpowiednio: 3-arylideno-4-chromanonów, 3-arylideno-4-tiochromanonów, 3-benzyl-2-chromen-4-onów, 3-benzyl-2-tiochromen-4-onów, 2-benzylideno-1-tetralonów [37].

1.2. Pirazoliny

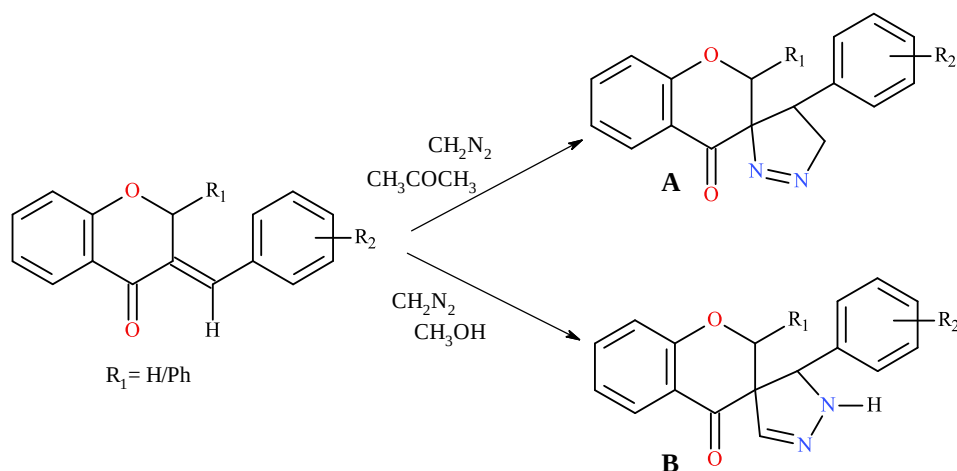
Pirazolina (dihydropirazol) jest pięciocłonowym heterocyklicznym związkiem z dwoma atomami azotu i trzema atomami węgla w pierścieniu. Pomiędzy atomem azotu, a atomem węgla występuje jedno endocykliczne wiązanie podwójne. W zależności od położenia wiązania podwójnego w pierścieniu można wyróżnić pochodne dihydropirazolu nazywane pirazolinami. Jeśli wiązanie podwójne łączy pierwszy i drugi atom azotu to mówimy o Δ^1 -pirazolinie (**A**), kiedy występuje pomiędzy drugim atomem azotu, a trzecim atomem węgla, wtedy wyróżniamy Δ^2 -pirazolinę (**B**) natomiast położenie wiązanie podwójnego pomiędzy trzecim, a czwartym atomem węgla wskazuje na Δ^3 -pirazolinę (**C**) (**Ryc. 12**) [38].



Ryc. 12. Struktury A - Δ^1 -pirazoliny, B - Δ^2 -pirazoliny, C - Δ^3 -pirazoliny.

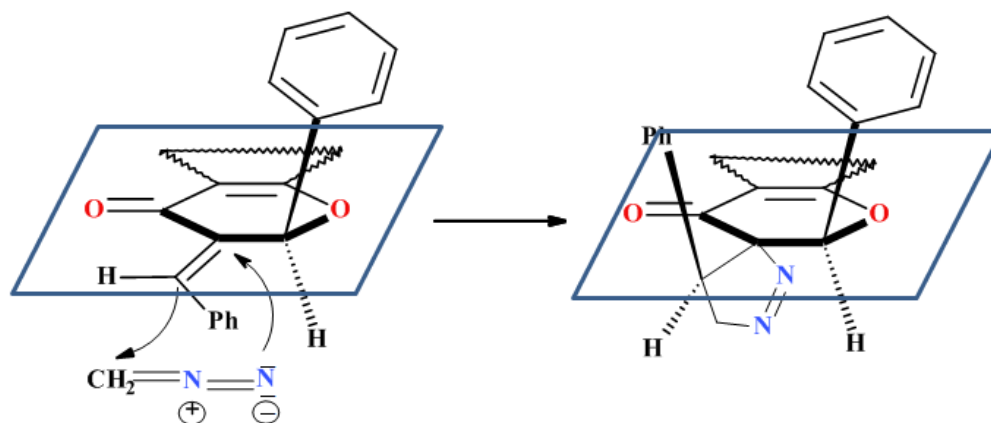
Opracowanie procedury wytwarzania czystych związków heterocyklicznych jest głównym wyzwaniem we współczesnej chemii heterocyklicznej ze względu na kwestie środowiskowe, praktyczne i ekonomiczne. Podobnie jak w przypadku benzylidenochromanonów, metody syntezy pirazolin od trzech dekad stanowią przedmiot zainteresowania chemików syntetyków. Do tej pory poznano szereg metod syntezy dihydropirazoli, jednak tylko nieliczne mają charakter uniwersalny.

Do najbardziej popularnych można zaliczyć reakcje cyklokondensacji α,β -nienasyconych związków karbonylowych z hydrazynami, białkowanie hydrazyn za pomocą 1,3-dihalogenopropanów, wewnątrzcząsteczkową cyklizację α,β -nienasyconych hydrazonów, częściową dekompozycję pirazolidyn oraz reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji alkenów z diazozwiązkami, nitryliminami, bądź azometynoiminami [39]. Ostatnia z wymienionych metod ma najbardziej uniwersalny charakter ponieważ w zależności od zastosowanego 1,3-dipola pozwala na otrzymanie zarówno Δ^1 -, Δ^2 -, a także Δ^3 -pirazolin. Ponadto, należy podkreślić, że reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji zachodzą w relatywnie łagodnych warunkach oraz są bezpieczne dla środowiska. Najbardziej znaną metodą syntezy jest reakcji α,β -nienasyconych ketonów z hydrazynami, co w efekcie prowadzi do powstania hydrazonu, który ulega cyklizacji z wytworzeniem 2-pirazoliny [40]. Wiele uwagi poświęcono syntezie 3-arylidenechromanonów / flawanonów, które są prekursorami w reakcji otrzymywania 3-spiropirazolin. Zsyntetyzowano je w reakcji 3-benzylidenechroman-4-onów lub 3-benzylidenoflawanonów z nadmiarem eterowego roztworu diazometanu w bezwodnym acetonie (**Ryc. 13A**) [41]. Metoda ta została opracowana i omówiona przez Toth'a i Szollosy'ego w 1986 roku i stała się najczęściej wybieraną do syntezy spiropirazolin z nienasyconych ketonów ponieważ pozwala na otrzymanie tylko jednego stereoizomeru spiro-1-pirazolin [41]. Wykazano, że reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji zamknięcia pierścienia jest regioselektywna, dając stereohomogeniczne spiropyrazoliny w jednym etapie. Jeśli w reakcji zostanie użyty diazometan i bezwodny metanol to produktem będzie 4-spiropirazolina (**Ryc. 13B**) [40].



Ryc. 13. Reakcja syntezy 3-spiropirazolin (A) i 4-spiropirazolin (B).

Okazało się, że reakcje syntezy spiropirazolin stanowiły temat badań Mustafy już w latach pięćdziesiątych oraz Fateen'a i Kaddah'a w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku [42] [43] [44] jednak nie były wcześniej analizowane pod kątem stereochemii, dlatego Toth postanowił wyjaśnić mechanizm powstawania tych związków w reakcji z diazometanem. Substratami były *E*-benzylidenochromanony i ich pochodne otrzymane w reakcji katalizowanej piperydyną poprzez kondensację odpowiednich chromanonów i aryłaldehidów. Powstawanie związków spiro w wyniku ataku odczynnika nukleofilowego na atom β -węgla w pierścieniu benzylidenochromanonu zależy od stopnia jego elektropozytywności, umożliwiając w ten sposób reakcję różnych struktur rezonansowych diazometanu. W przypadku powstawania 3-spiropirazolin można rozważyć atak struktury rezonansowej diazometanu o częściowym ładunku ujemnym na atomie węgla, podczas gdy w przypadku 4-spiropirazolin częściowy ładunek ujemny znajduje się na atomie azotu. Biorąc pod uwagę rozkład elektronów α,β -nienasyconych ketonów i dodatnio naładowany atom β -węgla, można oczekiwać, że atom węgla diazometanu połączy się z miejscu położenia β -węgla i powstanie 3-spiro-1-pirazolina (**Ryc.14**) [45].

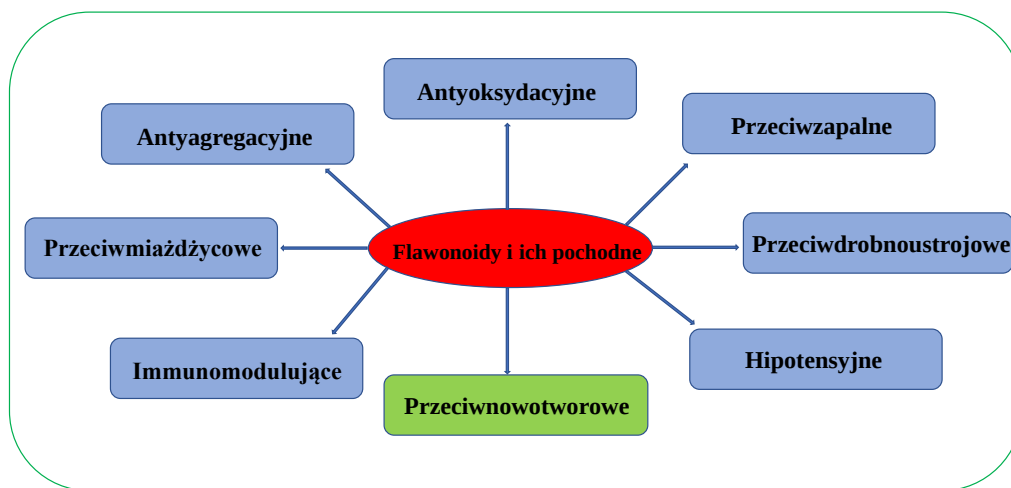


Ryc. 14. Mechanizm ataku odczynnika nukleofilowego na węgiel β 3-benzylideno pochodnych.

W późniejszych latach nowej metody syntezy z wydajnością bliską 90% dokonał Sangwan stosując hydrat hydrazyny w gorącym kwasie octowym w reakcji z 3-benzylidenochromanonem w efekcie otrzymując mieszaninę diastereomerycznych izomerów tricyklicznych skondensowanych pirazolin *N*-acetylowanych 3,3a-cis- i 3,3a-trans- [46].

2. Właściwości biologiczne flawonoidów i ich pochodnych

Flawonoidy wykazują szerokie spektrum działania biologicznego ze względu na strukturę chemiczną i obecność różnych grup funkcyjnych. Wielokierunkowość działania dotyczy funkcji: antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych, antyagregacyjnych, przeciwmiażdżycowych, hipotensyjnych oraz przeciwnowotworowych (**Ryc.15**).



Ryc. 15. Właściwości biologiczne związków flawonoidowych.

Związki flawonoidowe pełnią również funkcję insektycydów, fungicydów oraz barwników. Odpowiadają za granatowe i czerwone zabarwienie owoców jagodowych oraz pomarańczowe i żółte zabarwienie owoców cytrusowych. Odgrywają znaczącą rolę w procesach fizjologicznych roślin. Wykazują działanie hormonów roślinnych, regulują wzrost roślin, pełnią rolę przekaźników energii w systemach fotosyntezy, inhibitorów oraz prekursorów enzymatycznych. Ponadto chronią komórki roślinne przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych oraz grzybów i owadów. Aktualne doniesienia naukowe potwierdzają jednoznacznie pozytywny wpływ związków flawonowych na organizm wynikający głównie z właściwości antyoksydacyjnych, które wynikają z obecności grup hydroksylowych, wiązania podwójnego w pozycji C2-C3 oraz grupy karbonylowej w miejscu C4. Przez lata badano również inne właściwości tej grupy związków. Niektóre z badań są sprzeczne z założeniami, jednak dostępne są źródła, które potwierdzają działanie przeciwnowotworowe związków o strukturze benzo- γ -pironu.

Na przełomie lat 70 i 80 ubiegłego wieku wielu z badaczy przedstawiło dowody o aktywności przeciwnowotworowej związków chromanonu i ich pochodnych. Istotny wpływ na obniżenie ryzyka występowania niektórych nowotworów ma dieta bogata w związki flawonowe, zwłaszcza izoflawonoidy.

Związki te występują w żywności w formie wolnej oraz w postaci glikozydów [47]. Głównym źródłem flawonoidów w diecie są warzywa, owoce, czekolada, herbata i czerwone wino [48]. Wyniki badań przeprowadzone *in vivo* wykazały obiecujące właściwości flawonoidów w profilaktyce i leczeniu nowotworów. Zaobserwowano, że u kobiet dieta bogata w izoflawony zwłaszcza genisteinę obniża ryzyko zachorowania na nowotwór piersi, a u mężczyzn raka prostaty natomiast katechiny obecne w zielonej herbacie zapobiegają rozwojowi nowotworów płuc [49] [50]. Przeprowadzone *in vitro* badania potwierdziły, że niektóre flawonoidy obniżają aktywność mutagenną wybranych promutagenów/prokancerogenów i zmniejszają częstość występowania nowotworów u badanych zwierząt [51] [52] [53]. Działanie przeciwnowotworowe flawonoidów i ich pochodnych związane jest z aktywnością antyoksydacyjną oraz mechanizmami indukcji apoptozy, obniżającymi aktywność kinazy tyrozynowej, hamowania proliferacji komórek oraz metastazę. Podczas badań na liniach komórkowych zaobserwowano hamowanie proliferacji komórek nowotworowych w fazach cyklu komórkowego G₁/S oraz G₂/M, a nawet indukcję apoptozy przy wyższym stężeniu badanych związków flawonoidowych. W 2002 roku Lopez-Lazaro opisał właściwości przeciwnowotworowe oraz mechanizm działania różnych związków flawonoidowych w zależności od struktury [54]. Okazało się, że niektóre flawonoidy wykazały zdolność do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G₁/S lub G₂/M albo w obu fazach G₁/S i G₂/M oraz indukują apoptozę [55]. Ponadto udowodniono, że odpowiednia dieta bogata w flawonoidy wpływa naprawczo na uszkodzenia oksydacyjne rodników w DNA [56] [57]. Badania wykazały również wpływ związków na aktywność proapoptotycznych białek: p21 i p53, antyapoptotycznych białek Bcl-2, białek regulujących przebieg cyklu komórkowego oraz enzymów związanych z metabolizmem mutagenów [58]. Ponadto flawonoidy obniżają aktywność wybranych metaloproteinaz odpowiedzialnych za powstawanie przerzutów [59], hamują topoizomerazę II odpowiedzialną na powstawanie uszkodzeń w rejonie BCR (Breakpoint Cluster Region) genu MLL (Myeloid Lymphoid Leukemia), co prowadzi do rozwoju nowotworów krwi u dzieci i niemowląt zwłaszcza: ostrej białaczki szpikowej AML (Acute Myeloid Leukaemia) oraz ostrej białaczki limfatycznej ALL (Acute Lymphoid Leukaemia) [60]. Lopez-Lazaro potwierdził związek między

właściami redoks związków flawonoidowych, a ich wpływem na topoizomerazę. Z przeprowadzonych przez zespół badań wynika, że 3-gallusan epigalokatechiny i myricetyna powodowały powstawanie kompleksów topoizomerazy I i II z DNA w komórkach. Przypuszczalnie mechanizm działania opiera się na wytwarzaniu cząsteczki H_2O_2 przez flawonoidy posiadające w budowie grupę pirogalolową i indukcji apoptozy przez RTF (reaktywne formy tlenu). W wyniku tego dochodzi do formowania apoptotycznych kompleksów topoizomeraza – DNA [60]. Pochodne chromanonów wykazują również wpływ na kinazy białkowe odgrywające istotną rolę w biologii nowotworów: kinazę białkową C (PKC - protein kinase C), naskórkowy czynnik wzrostu (EGFR - epidermal growth factor receptor) oraz kinazę ogniskowo-adhezyjną (FAK - focal adhesion kinase). Kwercetyna jest najskuteczniejszym inhibitorem kinazy PKC, genisteina hamuje wzrost i różnicowanie ludzkich nowotworowych komórek białaczki HL-60 oraz obniża aktywność kinazy tyrozynowej EGFR w komórkach raka naskórka A431 [61]. Pirazoliny i ich pochodne jako bogate w elektrony heterocykle azotowe odgrywają ważną rolę w różnorodnych działaniach biologicznych. Ze względu na ich właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrybicze, przeciwzapalne i przeciwdepresyjne znalazły zastosowanie jako leki przeciwbólowe przeciwzapalne i przeciwgorączkowe [62] [63] [64]. Niektóre pochodne, takie jak inhibitor syntazy tlenu azotu (NOS) (4,5-dihydro-1*H*-pirazol) i antagonist receptoru kannabinoidowego CB1, również wykazują silną selektywną aktywność biologiczną wobec niektórych receptorów [65] [66]. Ze względu na swoją aktywność biologiczną były stosowane w leczeniu różnych chorób. Pirazoliny wykazują szerokie spektrum potencjalnych działań farmakologicznych i są obecne w wielu preparatach farmakologicznych, takich jak: fenazon / amidopiren / metampyron (przeciwbólowy i przeciwgorączkowy), azolid/tandearil (przeciwzapalny), indoksakarb (insektycyd) i anturan (uricosuric). Zmiany w ich strukturze zapewniły wysoki stopień różnorodności, który okazał się przydatny do opracowania nowych środków terapeutycznych o ulepszonej sile działania i mniejszej toksyczności. Podobnie jak pirazoliny, flawonoidy stanowią obiekt badań w terapii przeciwnowotworowej. Synergiczne działanie dotychczasowych chemioterapeutyków wraz z analogami flawonoidów zmniejszają toksyczne

działanie stosowanych leków [67]. Zauważono synergistyczne działanie między inhibitorami topoizomerazy I i II, a badanymi związkami zawierającymi pierścien flawonoidowy [68]. Z badań przeprowadzonych przez Kanclerla wynika, że inhibitory topoizomerazy I (topotekan, irynotekan) oraz topoizomerazy II (etopozyd) można łączyć w pochodnych flawonoidów [69]. Wykazano również synergiczny wpływ dobrze znanej cisplatyny z flawonidem (genisteiną) na ludzkie komórki rdzeniaka [70]. Związki heterocykliczne oparte na pirazolu wykazują obiecującą aktywność wobec nowotworowych linii komórkowych. Wielu badaczy analizowało wpływ pochodnych 2H-pirazoli na komórki nowotworowe w zależności od położenia grup funkcyjnych obecnych w skondensowanym pierścieniu chromanonu/flawanonu. Badania wykazały interesującą aktywność hamującą związków badanych w stosunku do proliferacji komórek nowotworowych białaczki, czerniaka skóry, raka okrężnicy, gruczolaka płuc [33] [54]. Badania zależności struktura-aktywność (SAR – Structure-Activity Relationship Study) wykazały, że aktywność pirazolin i jej pochodnych zależy od obecności reszty heterocyklicznej azotu, która jest szeroko rozpowszechnioną w medycynie podjednostką strukturalną, a jej właściwości biologiczne są wykorzystywane w farmakologii [71] [72]. Cząsteczki pirazolin dzięki chiralności wykazują większy stopień zmienności konformacji i podstawienia, co prowadzi do lepszej aktywności biologicznej. Analiza SAR wykazała, że szkielet dihydropirazolin jest kluczowym farmakoforem dla osiągnięcia dobrej aktywności hamującej, a obecność grup funkcyjnych w pierścieniu fenylowym połączonym z pirazolem może znacznie zwiększyć aktywność przeciwnowotworową związku [73]. Przy ocenie aktywności biologicznej związków jako potencjalnych leków niezwykle ważny jest parametr lipofilowości $\log P$.

3. Deskryptor lipofilowości w ocenie aktywności biologicznej związków

Lipofilowość jest jednym z podstawowych deskryptorów fizykochemicznych ksenobiotyków, który wpływa na ich właściwości biologiczne. Jest to główny czynnik wpływający na biodostępność, stopień biodegradacji i toksyczność substancji oraz pozwalający przewidzieć zachowanie się związku w organizmie pacjenta i możliwość wiązania z odpowiednim receptorem [74] [75]. Lipofilowość wyraża powinowactwo cząsteczki do środowiska lipofilnego oraz zdolność cząsteczek do rozpuszczania się w tłuszczach i rozpuszczalnikach niepolarnych. Miarą lipofilowości jest $\log P$, który wyraża właściwości hydrofobowo – hydrofilowych związku. Ilościowo lipofilowość wyrażana jest jako współczynnik podziału między dwie niemieszające się fazy ciecz – ciecz (oktanol/woda) lub ciało stałe – ciecz (metody chromatograficzne) czyli stosunek stężenia substancji w fazie niepolarnej do jej stężenia w fazie wodnej w warunkach równowagi. Lipofilowość wyznacza się metodami eksperymentalnymi oraz teoretycznymi z wykorzystaniem odpowiednich programów komputerowych. Doświadczalnie lipofilowość wyznacza się za pomocą następujących metod:

- a)** *Shake – flask* , czyli klasyczna metoda ekstrakcyjna w układzie *n*-oktanol – woda [76] [77]
- b)** RP-TLC, czyli metoda chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz [78] [79] [80]
- c)** RP-HPLC, czyli wysokosprawną chromatografią cieczową w odwróconym układzie faz [81] [82]
- d)** metody elektrochemiczne

Najczęściej stosowaną metodą doświadczalną stosowaną w przewidywaniu lipofilowości jest metoda RP-TLC oraz RP-HPLC ze względu na prostotę i szybkość wykonania w stosunku do metody shake-flask. Ponadto metody chromatograficzne pozwalają wyznaczyć wartość $\log P$ w szerokim zakresie wartości współczynnika

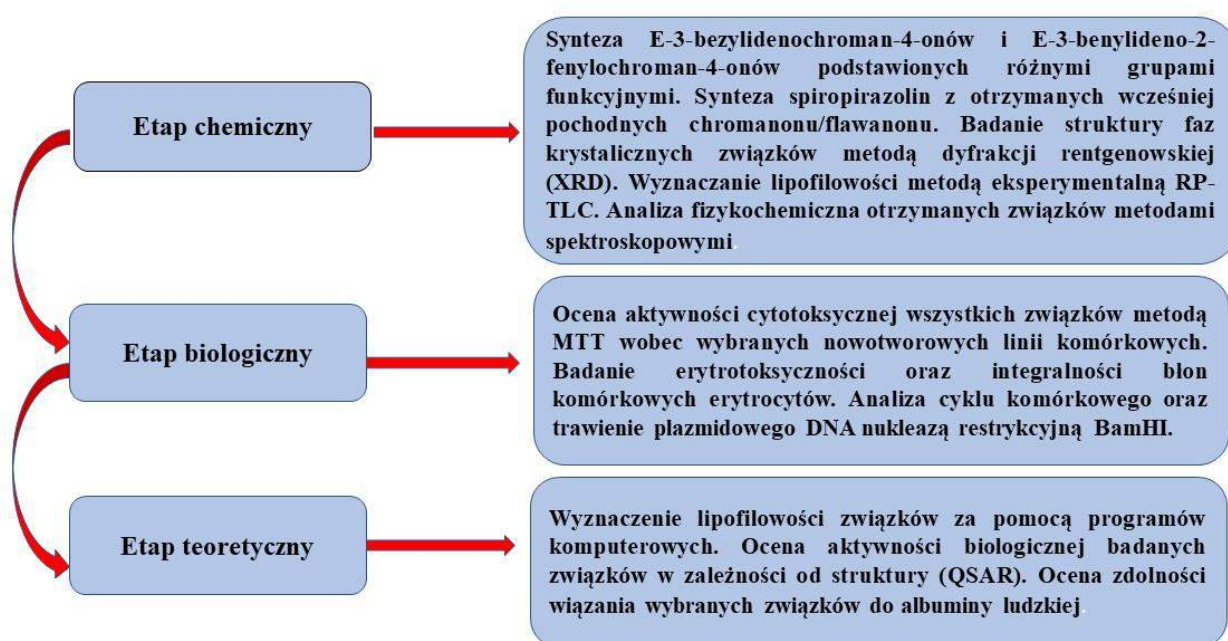
podziału, co jest istotne przy badaniu nowych związków. Klasyczna metoda ekstrakcji *shake-flask* przedstawia najprostszy i najbardziej adekwatny model biernej dyfuzji substancji przez błony biologiczne. Jednak jest to metoda czasochłonna i nie nadaje się do substancji powierzchniowo czynnych, metaloorganicznych, związków lotnych czy substancji jonowych. Dodatkowym problemem są zanieczyszczenia, rozdzielanie się faz i tworzenie się emulsji [83]. Lipofilowość jest jednym z parametrów koniecznym do wyznaczenia kiedy otrzymuje się nowe związki o potencjalnych właściwościach biologicznych oraz przy ocenie aktywności substancji leczniczych już istniejących na rynku farmaceutycznym [84]. Metody teoretyczne pozwalające określić $\log P$ związków są równie ważne jak eksperymentalne. Jednak należy zwrócić uwagę na fakt, że wyniki otrzymywane metodami eksperymentalnymi i teoretycznymi mogą się znacznie różnić. Programy komputerowe stosowane do oceny $\log P$ nie uwzględniają oddziaływań w środowisku reakcji. Korzystając z obliczeniowych programów komputerowych można wyznaczyć „*in silico*” $\log P$ badanych związków za pomocą: *milogP* (Molinspiration Cheminformatics), *clogP* (Organic Chemistry Portal), *logP_{HyperChem}* (HyperChem 8,0), *AlogPs*, *AclogP*, *AlogP*, *KOWWIN* (ALOGPS 2.1 vcclab.org), *logP_{ChS}* (ACD/ChemSketch Freware) [84] [85] [86] [87]. Lipofilowość ma największy wpływ na reakcje farmakokinetyczne i dystrybucję cząsteczki leku w organizmie. Ze wzrostem lipofilowości rośnie aktywność biologiczna związków, co wynika z powinowactwa do błon biologicznych i lepszej przenikalności, jednak zbyt wysoka wartość $\log P$ może powodować nadmierne powinowactwo do lipidów i utrudniać dystrybucję leku w organizmie. Optymalna wartość lipofilowości wynosi maksymalnie 5 i została określona przez Lipińskiego [88]. Jeśli wartość lipofilowości jest większa od zera to badany związek wykazuje powinowactwo do fazy lipofilowej, przy wartości $\log P$ mniejszej od zera ma charakter hydrofilowy, jest bardziej polarna i słabo przenika przez dwuwarstwę lipidową [75]. Uważa się, że optymalne wchłanianie substancji na drodze dyfuzji zachodzi kiedy lipofilowość leku mieści się w zakresie 0 – 3. Wtedy mówimy o substancjach średnio lipofilowych, których szybkość przenikania rośnie liniowo ze wzrostem lipofilowości [89]. Związki o wysokich wartościach $\log P > 5$ nie wchłaniają się lepiej,

a nawet pojawia się spadek przenikania ponieważ silnie wiążą się z błonami lipidowymi i nie mogą pokonać środowiska hydrofilowego [90].

Aktywność biologiczna związków flawonoidowych i ich pochodnych od lat stanowi interesujący temat do badań przez wielu naukowców. Jako składniki aktywne ziół stosowano je już wiele lat temu w medycynie naturalnej w leczeniu przeciwzapalnym, przeciwwirusowym, przeciwbólowym, hipoglikemicznym. Odpowiednia dieta bogata w polifenole stanowi ważny element w prewencji wielu chorób, m.in.: serca, neurologicznych, nowotworowych, spowodowanych przez stres oksydacyjny. Na podstawie prowadzonych przez kilka dekad badań uważa się, że syntetyczne analogi flawonoidów stanowią bardzo obiecujące źródło potencjalnych leków, co pokazuje jak powszechne jest wśród nich występowanie aktywności biologicznej. Potwierdzono w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* wielokierunkowe działanie terapeutyczne tej grupy związków: przeciwutleniające, antyproliferacyjne przeciwzapalne przeciwzakrzepowe, hipotensyjne, rozkurczowe, przeciwcukrzycowe oraz przeciwnowotworowe. Ze względu na tendencję wzrostową zachorowań na nowotwory wiele uwagi poświęca się związkom które mogłyby działać synergicznie z dotychczas stosowanymi chemioterapeutykami, a nawet potęgować ich działanie przeciwnowotworowe zarazem zmniejszając efekty niepożądane. Dlatego też w niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono szereg związków flawonoidowych skondensowanych z pierścieniem pirazolu, które mogą być wykorzystane jako potencjalne leki w leczeniu nowotworów.

III. Cel pracy

Celem niniejszej dysertacji była synteza pochodnych pirazolin skondensowanych z pierścieniem chromanonu (2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on) i flawanonu (2-fenylo-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on) oraz ocena aktywności cytotoksycznej wobec wybranych nowotworowych linii komórkowych. Temat pracy został zainicjowany na podstawie analizy dostępnej literatury oraz tematyki naukowo – badawczej realizowanej przez Kierownika Zakładu Chemii Surowców Kosmetycznych Panią Profesor Elżbietę Budzisz. Całość wykonanych badań została podzielona na trzy etapy: chemiczny, biologiczny oraz teoretyczny.



1. Szczegółowe założenia i etapy pracy doktorskiej

a) Synteza pochodnych E-3-benzylidenochroman-4-onów i E-3-benzylideno-2-fenylochroman-4-onów zawierających w pierścieniu benzenowym w pozycji *orto*-, *meta*- lub *para*- następujące podstawniki: -OCH₃, -N(C₂H₅)₂, -OH, -H. Opracowanie metody syntezy w oparciu o kondensację 4-chromanonu lub flawanonu z odpowiednim aldehydem arylowym w obecności katalitycznej ilości piperydyny. Optimalizacja warunków reakcji opisaney w literaturze.

- b)** Opracowanie i optymalizacja metody syntezy 3-spiropirazolin w wyniku ataku odczynnika nukleofilowego na trzeci atom węgla 3-benzylidenochromanonu/3-benzylidenoflwanonu. W tej reakcji najpierw przeprowadziłam syntezę diazometanu przy użyciu *N*-nitrozometylomocznika i wodorotlenku potasu w eterze dietylowym.
- c)** Strukturę i czystość otrzymanych związków potwierdzono w oparciu o metody fizykochemiczne: ^1H oraz ^{13}C NMR, IR, MS, analiza elementarna, analiza krystalograficzna, a dla wybranych związków dodatkowo wykonano analizę HRMS.
- d)** Dla otrzymanych związków wyznaczono parametr lipofilowości za pomocą metody eksperymentalnej RP-TLC oraz teoretycznej w oparciu o program Molinspiration Cheminformatics.
- e)** Zsyntezowane związki poddano badaniom oceny aktywności cytotoksycznej metodą MTT wobec linii komórkowych ludzkich: ostrej białaczki promielocytowej (HL-60), ostrej białaczki limfoblastycznej (NALM-6), czerniaka (pierwotne ognisko nowotworu o wzroście pionowym) (WM-115) oraz raka okrężnicy (COLO-205).
- f)** Ocena wpływu otrzymanych związków na morfologię erytrocytów.
- g)** Ocena wpływu zsyntezowanych związków na integralność błony komórkowej krwinek czerwonych, czyli ocena erytrotoksyczności związków. Celem eksperymentu było sprawdzenie czy zachodzi hemoliza erytrocytów potraktowanych badanymi związkami w różnych stężeniach.
- h)** Ocena wpływu badanych związków na cykl komórkowych komórek ostrej białaczki promielocytowej HL-60. Badanie przeprowadzono w celu sprawdzenia na którą fazę cyklu komórkowego oddziałują badane związki.
- i)** Analiza zdolności wybranych związków do modyfikacji DNA – test enzymatyczny (trawienie plazmidowego DNA).
- j)** Określenie zdolności wiązania się badanych związków do albuminy ludzkiej.
- k)** Analiza zależności między strukturą 3-benzylidenochromanonów/3-benzylidenoflwanonów oraz 3-spiro-1-pirazolin i ich pochodnych, a aktywnością biologiczną, zwłaszcza aktywnością cytotoksyczną.

IV. Część eksperymentalna

1. Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej

W części eksperymentalnej pracy doktorskiej zsyntezowane związki były poddane analizie fizykochemicznej oraz badaniom biologicznym. Wykorzystane metody badawcze obejmowały: wyznaczenie lipofilowości metodą eksperymentalną oraz teoretyczną, badanie aktywności cytotoksycznej, badanie erytrotoksyczności, analizę mikroskopową morfologii erytrocytów, analizę dystrybucji komórek w cyklu komórkowym, trawienie plazmidowego DNA.

1.1. Lipofilowość jako parametr aktywności biologicznej związków

W części eksperymentalnej pracy doktorskiej w celu wyznaczenia wartości $\log P$ otrzymanych związków wykorzystano metodę chromatograficzną RT-TLC. Dokładny opis metody został przedstawiony w pierwszej publikacji (*Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells*) składającej się na cykl artykułów stanowiących podstawę otrzymania stopnia doktora nauk farmaceutycznych.

1.2. Aktywność cytotoksyczna

Oznaczanie aktywności cytotoksycznej związków chemioterapeutycznych wobec komórek w hodowlach *in vitro* stanowi ważny etap badań toksykologicznych, niezbędnych do określenia prawidłowego działania i bezpieczeństwa leku. Zastosowanie modeli komórkowych w badaniach toksykologicznych posiada wiele zalet, takich jak: szybkość i łatwość badania procesów komórkowych i molekularnych, powtarzalność, możliwość stosowania niewielkich ilości badanych substancji, czy możliwość pracy na komórkach ludzkich. Miarą aktywności cytotoksycznej badanego związku jest wartość stężenia IC_{50} (ang. inhibitory concentration), czyli stężenie związku, przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% w odniesieniu do kontroli. Do ilościowego określenia aktywności cytotoksycznej związków chemioterapeutycznych wykorzystuje się różne testy komórkowe w zależności od charakteru i interakcji z organizmem

badanego związku. W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano jedną z najczęściej stosowanych metod, polegającą na pomiarze zahamowania wzrostu liczby komórek z wykorzystaniem aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów, czyli test MTT. Metoda ta opiera się na zdolności metabolizowania przez komórki rozpuszczalnej w wodzie soli tetrazolowej do nierozpuszczalnego w wodzie, fioletowego formazanu. Kryształy formazanu zostają rozpuszczone w DMSO, a następnie za pomocą spektrofotometru przy długości fali 492–570 nm mierzy się intensywność zabarwienia otrzymanego roztworu. Ilość zredukowanego MTT (intensywność zabarwienia) jest wprost proporcjonalna do aktywności oksydacyjnej mitochondriów komórki, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby żywych komórek w populacji [91]. Do badania cytotoksyczności zsyntezowanych związków wybrano nowotworowe linie komórkowe: HL-60 (ostra białaczka promielocytowa), NALM-6 (ostra białaczka limfoblastyczna), WM-115 (czerniak - pierwotne ognisko nowotworu o wzroście pionowym) oraz COLO-205 (rak okrężnicy). W zamieszczonych w dalszej części pracy artykułach znajduje się dokładny opis przeprowadzonego eksperymentu.

1.3. Badanie erytrotoksyczności, ocena morfologii erytrocytów

Wszystkie zsyntetyzowane związki o potencjalnej aktywności biologicznej należy zbadać pod kątem zgodności z krwią, ponieważ ksenobiotyki mogą reagować z krwią po podaniu. Należy sprawdzić czy potencjalne leki w kontakcie z krwią nie będą wywoływały działania hemolitycznego, nie będą zmieniały obrazu morfologicznego erytrocytów oraz czy nie będą wpływały na wartości parametrów układu czerwono krwinkowego [92]. W tym przypadku biokompatybilność odnosi się do kwantyfikacji składników komórkowych i osocza krwi. Pomiar integralności błony erytrocytów jest uważany za prostą i niezawodną metodę oceny hemokompatybilności, która pozwala ocenić wpływ badanych związków na erytrocyty [93]. Badania należy przeprowadzić w różnych stężeniach związków ponieważ często obserwuje się rozpad błony lub hemolizę erytrocytów wraz ze wzrostem stężenia. Następnie należy wykonać analizę statystyczną aby ocenić czy otrzymane wyniki są istotne. Nawet jeśli badane związki powodują hemolizę błony erytrocytów to należy sprawdzić w jakim stopniu i z jaką szybkością zachodzi

proces. Jeżeli hemoliza nie przekracza 10% (próg erytrotoksyczności) w stosunku do próby kontrolnej, to oznacza, że nie występuje ryzyko patologicznej hemolizy w warunkach *in vivo* [94]. Równie ważnym badaniem jest ocena morfologiczna erytrocytów poddanych działaniu badanych związków. Erytrocyty zdrowe, czynne biologicznie mają kształt dyskocyту, czyli dwuwklęsłego dysku [93]. W zależności od warunków fizykochemicznych środowiska, kształt dyskocyтary może ulegać zmianie na echinocyтary lub stomatocyтary. Obie transformacje zachodzą w sposób odwracalny. Stomatocyty mają kształt jednostronnie wklęsły i powstają w warunkach kwasowego pH oraz wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Kiedy panuje zasadowe pH, obniżony poziom ATP czy nadmiar cholesterolu to erytrocyt przyjmuje formę echinocyту, czyli kulistej krwinki z wypustkami [95]. Wpływ związków na morfologię erytrocytów można zaobserwować w badaniach mikroskopowych. W pracy doktorskiej morfologię czerwonych krwinek zbadano za pomocą odwróconego mikroskopu kontrastowego fazowego Opta-Tech, przy powiększeniu czterysta krotnym, wyposażonego w oprogramowanie (OptaView 7) do analizy obrazu.

1.4. Wpływ badanych związków na cykl komórkowy

Nowotwory nazywane są również chorobami cyklu komórkowego ponieważ komórki nowotworowe charakteryzują się niekontrolowaną proliferacją [96]. Cykl komórkowy jest kontrolowany przez punkty kontrolne, które warunkują rozpoczęcie kolejnej fazy i jej prawidłowy przebieg. W prawidłowo dzielących się komórkach punkty kontrolne hamują progresję cyklu komórkowego, dzięki czemu komórka usuwa błąd [97]. W przypadku komórek nowotworowych występują zaburzone mechanizmy regulujące cykl komórkowy, zwłaszcza nieaktywne lub zmienione punkty kontrolne, które nie zatrzymują proliferacji komórek nowotworowych. Wpływ zsyntezowanych związków na cykl komórkowy komórek nowotworowych ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) analizowano metodą cytometrii przepływowej i barwienia jodkiem propidyny. Jodek propidyny wiąże się w stosunku stechiometrycznym z DNA, dlatego intensywność fluorescencji jest wprost proporcjonalna do ilości DNA w komórce. W trakcie poszczególnych faz cyklu komórkowego ilość DNA ulega zmianom: w fazie G₁ komórki posiadają dwie kopie

chromosomów, w fazie G₂/M ilość kwasów nukleinowych ulega podwojeniu, w fazie S fluorescencja osiąga poziom pośredni pomiędzy G₁ i G₂/M co pozwala na zróżnicowanie poszczególnych faz cyklu komórkowego [98].

V. Najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej zostały przedstawione i omówione w cyklu trzech eksperymentalnych artykułów naukowych opublikowanych w recenzowanych czasopismach.

Publikacje będące przedmiotem rozprawy doktorskiej:

1. **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Magdalena Markowicz-Piasecka, Michał B. Ponczek, Joachim Kusz, Magdalena Małecka, Urszula Krajewska, Elżbieta Budzisz. *Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells*. *Molecules*. **2018**, 23, 3172–3187. Doi:10.3390/molecules23123172.
Wskaźnik Impact Factor: 3.060 punktacja MNiSW: 30
2. Kamil Suchojad, Anna Dołęga, **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Elżbieta Budzisz, Magdalena Małecka. *Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one*. *Acta Crystallographica Section E*. **2019**, E75, 1907–1913.
punktacja MNiSW: 20
3. **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Magdalena Markowicz-Piasecka, Marcin Cieślak, Karolina Królewska-Golińska, Paweł Hikisz, Joachim Kusz, Magdalena Małecka, Elżbieta Budzisz. *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-based Analogues*. *Molecules*. **2020**, 25(7), 1613-1638. Doi: 10.3390/molecules25071613.
Wskaźnik Impact Factor: 3.060 punktacja MNiSW: 100

Publikacja 1

- 1. Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells**

1.1. Synteza i badania biologiczne pochodnych 3-benzylidenochromanonów

Cykl publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej składa się z trzech prac eksperymentalnych. Zanim sprecyzowałam założenia i temat pracy dokonałam przeglądu literatury, która jest bardzo obszerna. Na podstawie literatury napisałam artykuł przeglądowy na temat aktywności biologicznej związków flawonowych, podzielony na dwie części. Pierwsza z nich opisuje właściwości przeciwnowotworowe flawonoidów [99], natomiast druga dotyczy właściwości przeciwdrobnoustrojowych [100]. Zainteresowanie powyższym tematem stało się motorem napędowym w planowaniu prac doświadczalnych. Budowa flawonoidów opiera się na heterocyklicznym układzie benzo- γ -pironu z grupą ketonową w pozycji 4 (związki te nazywane są chroman-4-ony lub benzopirony). Ze względu na różnice w budowie strukturalnej charakteryzują się wielokierunkową aktywnością biologiczną. Związki flawonoidowe są powszechnie znane ponieważ już wiele lat wstecz stosowano je jako naturalne substancje lecznicze, a dieta bogata w tego typu związków działała antyoksydacyjnie, przeciwzapalnie, przeciwalergicznie, przeciwwrzodowo, przeciwdrobnoustrojowo oraz przeciwnowotworowo. Właśnie działanie antykancerogenne stało się głównym tematem niniejszej dysertacji. Już pół wieku temu rozpoczęto badania nad aktywnością biologiczną flawonoidów jednak największą uwagę poświęcono roli flawonoidów w terapii nowotworów. Na przykładzie kwercetyny stwierdzono, że *in vivo* wywiera działanie chemoprewencyjne na komórki nowotworowe raka prostaty poprzez obniżenie aktywności białek proliferacyjnych i antyapoptotycznych. Ze względu na wielokierunkowe mechanizmy działania flawonoidy oraz ich pochodne są obiecującymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe.

Celem pierwszej eksperymentalnej pracy była synteza pochodnych flawonoidów: 3-arylidenochromanonów z podstawioną w pozycji 4 pierścienia benzenowego grupą *p*-aminodietylową. Otrzymane związki zostały poddane analizie fizykochemicznej oraz badaniom biologicznym. Przeprowadzono analizę struktury krystalograficznej, wyznaczono lipofilowość metodą eksperymentalną oraz teoretyczną, oceniono wpływ związków na błony erytrocytów, przeprowadzono

badanie cytotoksyczności wobec wybranych linii komórkowych oraz określono zdolność i sposób wiązania się badanych związków z albuminą surowicy ludzkiej.

Przeprowadzono jednocześnie dwie reakcje syntezy. W pierwszej kondensacji poddano chroman-4-on z 4-*N,N*-dietyloaminobenzaldehydem, natomiast w drugiej 2-fenylchroman-4-on z 4-*N,N*-dietyloaminobenzaldehydem. W obu reakcjach katalizatorem była piperydyna. Po czterech godzinach ogrzewania w temperaturze 140°C mieszaninę reakcyjną pozostawiono do ochłodzenia na 24 godziny. Po tym czasie dodano niewielką ilość metanolu i otrzymano pomarańczowy (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-chroman-4-on (**1**) oraz żółty (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-2-fenylchroman-4-on. Oba związki scharakteryzowano za pomocą IR, ¹H i ¹³C NMR, MS oraz analizy elementarnej. Następnie przeprowadzono powolną krystalizację z niewielkiej ilości metanolu, a wyhodowane kryształy związków zbadano za pomocą techniki dyfrakcji rentgenowskiej (XRD) aby ustalić strukturę krystalograficzną. W kolejnym etapie poddano pochodne 3-benzylidenochromanonu i 3-benzylidenoflawanonu badaniom biologicznym. Przeprowadzono test MTT w celu określenia działania toksycznego na komórki nowotworowe trzech wybranych linii komórkowych: ludzkiej promielocytowej białaczki (HL-60), ludzkiej białaczki limfoblastycznej (NALM-6) oraz czerniaka skóry (WM-115). Jako związki referencyjne wybrano 4-chromanon oraz 3-benzylidenoflawanon. Oba zsyntezowane związki wykazały wysoką cytotoksyczność wobec linii komórkowych, jednak (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloamino)benzylidenoflawanon (**2**) działał bardziej cytotoksycznie w stosunku do związku **1**. Najlepszy wynik IC₅₀=6.45 ± 0,69 μM związek **2** wykazał wobec komórek nowotworowych czerniaka WM-115 i działał trzykrotnie bardziej cytotoksycznie niż związek **1**. W porównaniu do 3-benzylidenoflawanonu jako związku referencyjnego, związek **2** wykazał prawie dziesięciokrotnie wyższe działanie cytotoksyczne wobec WM-115, ponad trzykrotnie bardziej cytotoksycznie działał na komórki białaczki NALM-6 i ośmiokrotnie bardziej cytotoksycznie na HL-60. 3-benzylidenochroman-4-on również wykazał wysoką aktywność w stosunku do komórek nowotworowych w porównaniu do 4-chromanonu. Biorąc pod uwagę strukturę obu z otrzymanych związków można zauważyć, że obecność pierścienia fenylowego w pozycji C2 chromanonu jest silnie związana z aktywnością

biologiczną. Związek 2, posiadający podstawnik fenyłowy jest potencjalnie lepszym związkiem przeciwnowotworowym w stosunku do związku 1, jednak oba zsyntezowane związki wykazują zadowalające właściwości antyproliferacyjne. Wyniki badań cytotoksyczności zachęciły mnie do przeprowadzenia kolejnego badania mającego na celu ocenę wpływu związków na integralność błony erytrocytów i ich morfologię. Okazało się, że badane związki nie wpłynęły na lizę erytrocytów, jednak zauważono, że przy wysokich stężeniach zarówno związek 1 jak i 2 oddziałuje na błony erytrocytów. Mimo to hemoliza nie przekroczyła 10%, co oznacza, że nie wpływa na integralność błony erytrocytów. Kiedy lek zostaje podany dożylnie jego cząsteczki mogą zainicjować szereg reakcji z komórkami krwi. Dlatego należy sprawdzić czy badany związek będzie wpływał na morfologię erytrocytów. W przypadku obu badanych związków wykonano zdjęcia wykorzystując mikroskop z odwróconym układem faz aby ocenić czy powstają nieprawidłowe formy erytrocytów. Oba związki przyczyniły się do powstania form echinocytarnych ale w niewielkiej ilości. Zauważono jednak, że w przypadku związku 1 o najwyższym stężeniu 24 $\mu\text{mol/l}$ echinocyty stanowiły główną część erytrocytów. Związek 2 niezależnie od stężenia doprowadził do transformacji form dyskocytarnych w echinocytarne. Należy jednak zwrócić szczególną uwagę na fakt, że transformacja dwuwklęsłych erytrocytów w echinocyty jest procesem naturalnym, zachodzącym w naczyniach krwionośnych, co potwierdzają wyniki w próbkach kontrolnych. Innych form patologicznych nie stwierdzono, zatem oba związki można uznać za biokompatybilne w stosunku do erytrocytów. Wyznaczanie współczynnika lipofilowości metodą RP-TLC (Reverse Phase – Thin Layer Chromatography) w odwróconym układzie faz jest istotnym czynnikiem decydującym o przenikaniu substancji leczniczej przez błony biologiczne. Dla związku 1 stwierdzono wartość średnią lipofilowości natomiast związek 2 charakteryzuje się wartością większą niż >5 , dlatego przenikanie może być utrudnione. Za pomocą programu Molinspiration Cheminformatics wyznaczono teoretyczne wartości $\log P$ ale okazały się wyższe w obu przypadkach. Obecność podstawnika fenyłowego w pozycji C2 w związku 2 zwiększa wartość $\log P$ zarówno eksperymentalnej jak i teoretycznej. Badania obliczeniowe sugerują niezwykle różną zdolność zsyntezowanych związków do wiązania się z HSA. Stwierdzono, że związki wiążą się poprzez oddziaływania

hydrofobowe, związek **1** w czterech różnych miejscach podczas gdy związek **2** tylko w miejscu IB i FA1. To pojedyncze wiązanie najprawdopodobniej wynika z obecności dodatkowego pierścienia fenyłowego w pozycji C2.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, zwłaszcza aktywność cytotoksyczną i biokompatybilność z błonami erytrocytów można wyciągnąć wniosek, że badane związki można poddać dalszym badaniom jako obiecujący kandydaci na leki przeciwnowotworowe.

Article

Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells

Angelika A. Adamus-Grabicka ¹, Magdalena Markowicz-Piasecka ² , Michał B. Ponczek ³, Joachim Kusz ⁴, Magdalena Małecka ⁵, Urszula Krajewska ⁶ and Elżbieta Budzisz ^{1,*}

¹ Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, ul Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; angelika.adamus@umed.lodz.pl

² Laboratory of Bioanalysis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy, Medical University of Lodz, Muszyńskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; magdalena.markowicz@umed.lodz.pl

³ Department of General Biochemistry, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; michal.ponczek@biol.uni.lodz.pl

⁴ Institute of Physics, University of Silesia, Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice, Poland; joachim.kusz@us.edu.pl

⁵ Department of Physical Chemistry, Theoretical and Structural Chemistry Group, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163/165, 90-236 Lodz, Poland; magdalena.malecka@chemia.uni.lodz.pl

⁶ Department of Pharmaceutical Biochemistry and Molecular Diagnostics, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; urszula.krajewska@umed.lodz.pl

* Correspondence: elzbieta.budzisz@umed.lodz.pl; Tel.: +42-272-55-95

Received: 25 October 2018; Accepted: 28 November 2018; Published: 1 December 2018



Abstract: The aim of this study was to determine the cytotoxic effect of 3-arylidenechromanone (**1**) and 3-arylidene flavanone (**2**) on HL-60 and NALM-6 cell lines (two human leukemia cell lines) and a WM-115 melanoma cell line. Both compounds exhibited high cytotoxic activity with higher cytotoxicity exerted by compound **2**, for which IC₅₀ values below 10 µM were found for each cell line. For compound **1**, the IC₅₀ values were higher than 10 µM for HL-60 and WM-115 cell lines, but IC₅₀ < 10 µM was found for the NALM-6 cell line. Both compounds, at the concentrations close to IC₅₀ (concentration range: 5–24 µM/L for compound **1** and 6–10 µM/L for compound **2**), are not toxic towards red blood cells. The synthesized compounds were characterized using spectroscopic methods ¹H- and ¹³C-NMR, IR, MS, elemental analysis, and X-ray diffraction. The lipophilicity of both synthesized compounds was determined using an RP-TLC method and the log*P* values found were compared with the theoretical ones taken from the Molinspiration Cheminformatics (miLog*P*) software package. The mode of binding of both compounds to human serum albumin was assessed using molecular docking methods.

Keywords: synthesis; crystal structure; cytotoxic effect; benzoflavanone/chromanone derivatives; erythrotoxicity

1. Introduction

Flavonoids constitute a large group of natural and synthetic polyphenolic compounds with a wide range of antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, anti-microbial, anti-coagulant, anti-cholesterol, or anti-cancer activities. These properties often depend on unknown structure-related interactions with nucleic acids and proteins [1,2]. Due to their antioxidant properties, flavonoids interfere with the initiation, promotion, and progression of cancer. Flavonoids modulate the activities of various enzymes and receptors involved in several signal transduction pathways, thus affecting cell proliferation,

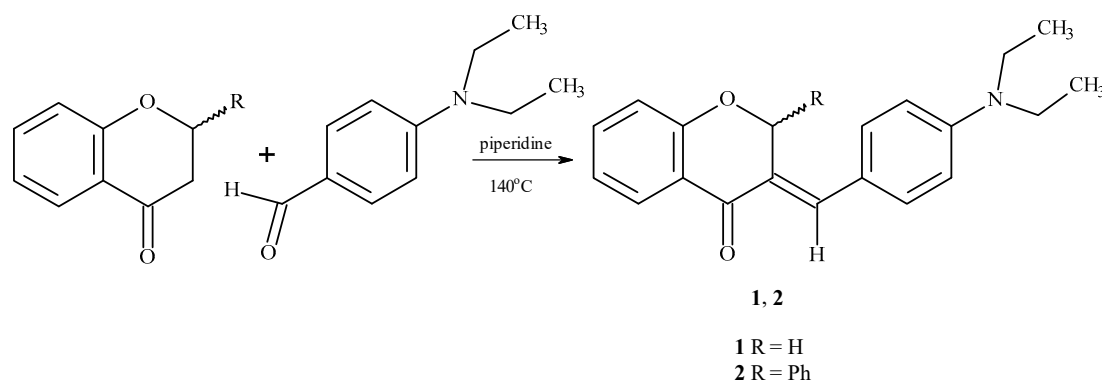
apoptosis, as well as the processes of inflammation, angiogenesis, and metastasis [3]. Due to their multidirectional mechanisms of action, flavonoids are promising candidates for novel anti-cancer agents and are being extensively investigated for the treatment of neoplastic diseases [3–5]. For instance, it was found that, in vivo, quercetin exerts a chemo-preventive effect on prostate cancer (reduces the cell viability) by downregulating the activity of pro-proliferative and anti-apoptotic proteins [6]. Additionally, synthetic derivatives of naturally occurring flavonoids (e.g., derivatives of chroman-4-one and tiochromane-4-one [7]) are studied for their anti-cancer properties.

3-arylidenechroman-4-ones, a group of naturally occurring homoisoflavones, can be obtained by the condensation of aryl aldehydes with chroman-4-ones (chromanones). It was first synthesized by Robinson and co-workers in the early twenties by condensation of chromanon with the corresponding aryl aldehyde using alcoholic potassium hydroxide as a catalyst [8]. Other catalysts have also been proposed. In 1979, Levai and Schag synthesized *E*-3-arylidenechroman-4-ones using piperidine as a catalyst, while piperidine has also been successfully used as a catalyst for the synthesis of 3-benzylidenechroman-4-ones and 3-benzylidene flavanones [9,10]. In recent years, Kupcewicz and co-authors [11], as well as our group [12], have investigated the cytotoxicity of *E* and *Z* isomers of 3-arylidene flavanone derivatives. Those compounds exhibit high cytotoxicity with $IC_{50} < 10 \mu M$. However, no significant difference in cytotoxicity of *E* and *Z* isomers was observed. In this study the structure of (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**1**) and (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**2**) was elucidated using single crystal X-ray diffraction (XRD), MS, and NMR spectroscopy. Despite being first synthesized in the 1970s [9,10], compound **1** was presented as an American patent in 2008 [13] and compound **2** was synthesized in 1993 by Pijewska [14], but their cytotoxic activity has never been studied. The cytotoxicity of 3-arylidenechromanone and flavanone substituted with *p*-aminodiethyl on C3 atom in benzene ring has also been investigated. In addition, the lipophilicity (miLog P) of **1** and **2** and their activity against red blood cells were determined. The mode of binding to human serum albumin (HSA, a protein important in binding and transport of various drugs [15]) has also been elucidated by molecular docking methods. Computational docking of ligand binding to target proteins is often performed as part of Structure-Based Virtual Screening used in drug discovery and this approach enables molecular interactions with macromolecules to be predicted [16]. We also assess the lipophilicity and their influence on the various biological properties.

2. Results and Discussion

2.1. Chemistry

The cytotoxic effects of *E* and *Z*-isomers of benzylidene flavanone are compared in a previous paper [11]. The current paper compares the cytotoxicity of chromanone and flavanone derivatives. (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**1**) and (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**2**) synthesized, as described previously [14] (Scheme 1).



Scheme 1. Synthesis of compounds **1** and **2** (when R = H or Ph).

Both compounds were fully characterized using IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, and MS spectroscopy and elemental analysis.

The $\nu(\text{C}=\text{O})$ band for compound **1** was observed at 1663 cm^{-1} , and bands typical for aromatic rings were noted at 1600 , 1584 , and 1524 cm^{-1} . An IR spectrum of **2** showed a band at 1654 cm^{-1} and typical bands for the aromatic rings at 1603 , 1559 , and 1524 cm^{-1} . The ^1H -NMR spectrum for compound **1** revealed the presence of a triplet from $-\text{CH}_3$ protons at 1.12 ppm and a quartet around 3.42 ppm corresponding to the CH_2 protons (see Figure S1). A singlet for $=\text{C}-\text{H}$ was observed at $\delta\ 5.45\text{ ppm}$. At $\delta\ 6.75\text{ ppm}$, a doublet for the $\text{C}2-\text{H}$ protons was observed. The characteristic signals $\delta\ 7.02\text{--}7.85\text{ ppm}$ correspond to the aromatic protons. The ^1H -NMR spectrum for compound **2** revealed the presence of a triplet from $-\text{CH}_3$ protons at 1.12 ppm (see Figure S2). A quartet corresponding to the CH_2 protons was observed at $\delta\ 3.36\text{ ppm}$. At $\delta\ 6.70\text{ ppm}$ a singlet for $\text{C}2-\text{H}$ protons was noted. The signals at $\delta\ 6.81\text{--}7.79\text{ ppm}$ correspond to the aromatic protons. A singlet for $=\text{C}-\text{H}$ was observed at $\delta\ 7.94\text{ ppm}$. In the ^{13}C -NMR spectrum for compound **1**, the characteristic CH_3 group signal was found at $\delta\ 12.9\text{ ppm}$, while the $-\text{CH}_2$ group was observed at 44.3 ppm (see Figure S1a). The $\text{C}2-\text{H}$ carbon signal was observed at $\delta\ 78.1\text{ ppm}$. At $\delta\ 181.0\text{ ppm}$, a signal for $\text{C}=\text{O}$ was observed. In addition the ^{13}C -NMR spectrum showed the presence of CH_{arom} and C_{arom} signals, which were expected for the postulated structure of (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one. For compound **2**, the ^{13}C -NMR spectrum showed the presence of signals located at $\delta\ 12.9\text{ ppm}$, attributed to a CH_3 group and at $-\text{CH}_2$ group at $\delta\ 44.3\text{ ppm}$ (see Figure S2a). In the ^{13}C -NMR spectrum, a $-\text{C}=\text{O}$ related resonance was found at $\delta\ 181.2\text{ ppm}$, those for CH_{arom} and C_{arom} were also found. The mass spectrum revealed a band in **1** at $m/z = 308.2$, indicating $([\text{M} + \text{H}]^+)$, and in **2**, at $m/z = 384$, indicating the presence of an $[\text{M} + \text{H}]$ ion.

2.2. Molecular Structures

The molecular structure of compound **1** and **2** is presented in (Figure 1). A molecule of **1** consists of two condensed rings (benzene and pyran) with 4-*N,N*-diethylaminobenzylidene substituent in position 3 of the benzopyran ring. It crystallizes in a triclinic system in a $\text{P}\bar{1}$ space group with two molecules in the asymmetric unit. The two independent molecules demonstrate different geometries in the arrangement of the 4-*N,N*-diethylaminobenzylidene moiety with respect to the main benzopyran skeleton. In molecule A, it is nearly planar with dihedral angles $\text{C}3-\text{C}11-\text{C}12-\text{C}13$ $-8.32(1)$ and $\text{C}3-\text{C}11-\text{C}12-\text{C}17$ $172.80(1)^\circ$, while in molecule B, it is rotated by about 35° with the dihedral angles $\text{C}53-\text{C}61-\text{C}62-\text{C}63$ of $-35.41(1)^\circ$ and $\text{C}53-\text{C}61-\text{C}62-\text{C}67$ of $148.31(1)$. Moreover, the pyran rings slightly vary in conformation. In molecule A, the pyran ring adopts an envelope conformation with puckering ring parameters [11] $Q = 0.300(2)\text{ \AA}$, $\varphi = 57.0(3)$, $\theta = 62.5(2)^\circ$, and the asymmetry parameter [12] $\Delta C_s(\text{C}2) = 2.75(1)^\circ$. The corresponding parameters for the pyran ring in the molecule B are: $Q = 0.451(2)\text{ \AA}$, $\varphi = 44.9(3)^\circ$, $\theta = 64.6(2)^\circ$, and the asymmetry parameter

$\Delta C_2(O51-C52) = 14.0(1)^\circ$, which indicates a screw-boat conformation. Valkonen [17] notes that, in the structure of (E)-3-(4-(dimethylamino)benzylidene)-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-one, there are also two independent molecules crystalizing in an asymmetric unit of the Pc group. The benzopyran skeleton and the 4-dimethylaminobenzylideno moiety are not planar with dihedral angles of $24.96(2)^\circ$ and $49.53(2)^\circ$ for molecules A and B, respectively. For the C6-C10-C2-C12/C9 and C22-C2)-C19-C21/C31, the corresponding torsion angles of $32.65(2)^\circ/149.33(2)^\circ$, $-29.42(2)^\circ$, and $156.30(2)^\circ$ were reported. However, the pyran rings adopt a similar conformation: An envelope conformation with the puckering ring parameters [18] $Q = 0.349(2)\text{\AA}$, $\varphi = 309.1(2)$, $\theta = 58.6(2)^\circ$, the asymmetry parameter [19] $\Delta C_s(C4) = 7.30(1)^\circ$ for O1/C5/C6/C3/C4/C1 ring, a screw boat conformation with $Q = 0.405(2)\text{\AA}$, $\varphi = 143.0(2)$, $\theta = 113.5(2)^\circ$, and the asymmetry parameter [20] $\Delta C_2(C24-C29) = 4.91(1)^\circ$ for the O4/C28/C22/C29/C24/C26 ring

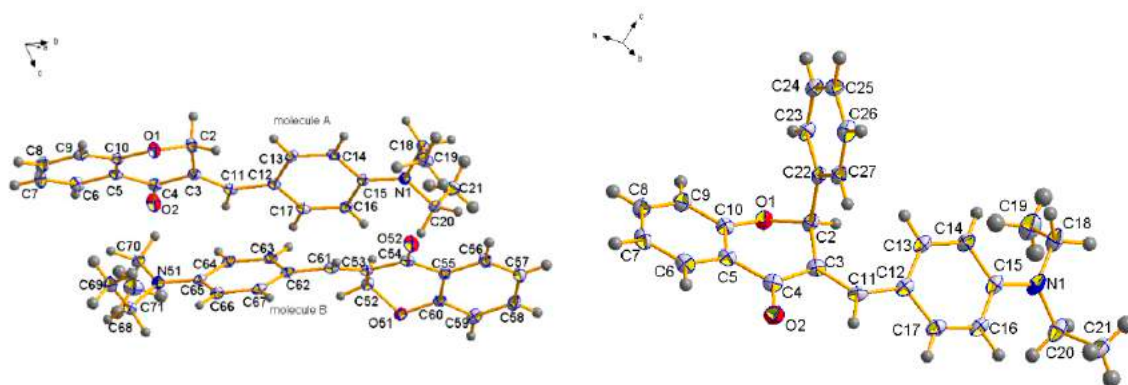


Figure 1. Molecular structures of **1** and **2**, with atom-numbering schemes. The anisotropic displacement parameters are shown at the 30% probability level. Hydrogen atoms are drawn as spheres of arbitrary radius.

The crystal packing of **1** is dominated by C-H ... O and C-H ... π interactions (Figure 2). The molecules A and B are linked by C8-H8 ... O2 ($-1 + x, y, z$) and C67-H67 ... O51 ($-1 + x, y, z$) hydrogen bonds, respectively, forming two ribbons, which are further coupled by C56-H56 ... O2 ($x, 1y, z$) hydrogen bond that produces a layer. Other C52-H52 ... O51 ($1 - x, 1 - y, 1 - z$) interactions are responsible for creating the 3-D network of hydrogen bonds connecting two layers. In both molecules, the intramolecular hydrogen bonds C11-H11 ... O2 and C61-H61 ... O52 are observed (Table 1).

Table 1. Hydrogen-bonding geometries (in $\text{\AA}$, $^\circ$) for structure **1**.

	D-H	H...A	D...A	D-H...A
C11-H11 ... O2	0.93	2.35	2.768 (2)	107
C61-H61 ... O52	0.93	2.45	2.811 (2)	103
C8-H8 ... O2 ⁱ	0.93	2.63	3.198 (2)	120
C67-H67 ... O51 ⁱ	0.93	2.59	3.409 (2)	147
C52-H52A ... O51 ⁱⁱ	0.97	2.60	3.274 (2)	126
C56-H56 ... O2 ⁱⁱⁱ	0.93	2.70	3.498 (2)	144
C2-H2B ... Cg3 ^{iv}	0.97	2.87	3.717 (2)	147
C16-H16 ... Cg7 ^v	0.93	2.90	3.726 (2)	148
C21-H21C ... Cg2 ^{iv}	0.96	2.95	3.712 (2)	137
C59-H59 ... Cg7 ⁱⁱ	0.93	2.71	3.545 (2)	150
C69-H69B ... Cg6 ^{vi}	0.96	2.93	3.645 (2)	132

Symmetry codes: (i): $-1+x, y, z$; (ii): $1-x, 1-y, 1-z$, (iii): $x, 1+y, z$ (iv): $1-x, 1-y, -z$, (v) $1+x, y, z$, (vi): $-x, 1-y, 1-z$ Cg2, Cg3, Cg6, Cg7—centroids of C5/C6/C7/C8/C9/C10, C12/C13/C14/C15/C16/C17, C55/C56/C57/C58/C59/C60, and C62/C63/C64/C65/C66/C67 rings.

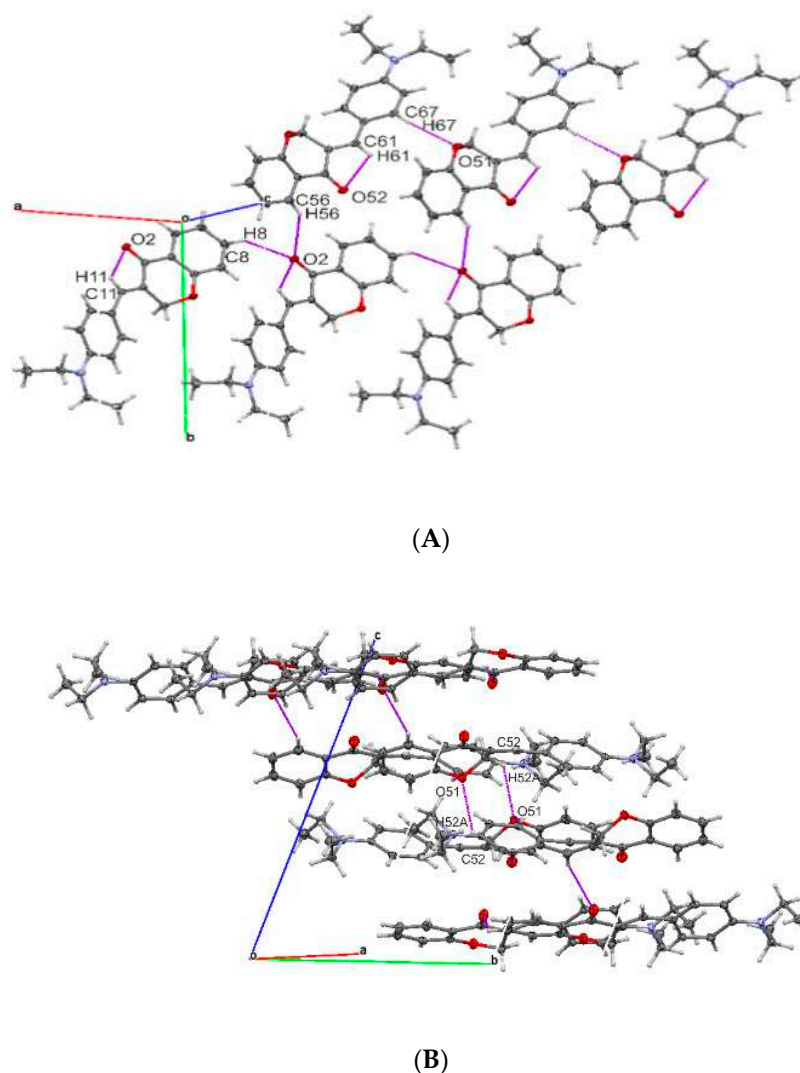


Figure 2. Chains and layer of (1) supported by C-H...O hydrogen bonds (A) that build a 3-D network of hydrogen bonds (B) and view of equivalent molecules linked by hydrogen bonds (top right).

Compound 2 crystallizes in a monoclinic system in the $P2_1/n$ space group. The main skeleton of the molecule consists of fused benzene and pyran rings, the latter bears a phenyl ring at position 2 and a 4-*N,N*-diethyloaminobenzylideno substituent at position 3. The C-2 phenyl ring is perpendicular, while the aminobenzylidene substituent is nearly co-planar to the pyran ring. The corresponding dihedral angles are: C3-C2-C22-C27 $-13.0(2)^\circ$ and C3-C11-C12-C13 $19.2(3)^\circ$, while the dihedral angle between the best planes of those phenyl rings is $83.7(2)^\circ$. In molecule 2, the pyran ring adopts a distorted half-boat conformation with the puckering ring parameters [21] $Q = 0.411(2)\text{\AA}$, $\varphi = 220.6(3)^\circ$, $\theta = 119.2(2)^\circ$, and the asymmetry parameter [22] $\Delta C_2(O1-C2) = 7.80(2)^\circ$.

In comparison to previously investigated similar molecules [11], the appropriate torsion angles are: $-16.4(2)^\circ$ and $32.5(2)^\circ$ with a dihedral angle observed between the best planes of phenyl rings $52.8(1)^\circ$. The pyran ring also adopts a nearly half boat conformation with puckering parameters [20] $Q = 0.341(2)\text{\AA}$, $\varphi = 226.1(3)^\circ$, and $\theta = 120.3(2)^\circ$.

In the crystal packing of 2, hydrogen bonded dimers are observed, and these are stabilized by C16-H16...O2 interactions ($1-x, 1-y, -z$) (Figure 3). The intramolecular C11-H11...O2 hydrogen bond is also observed similar to compound 1. The crystal packing is also enhanced by C-H... π interactions (Table 2).

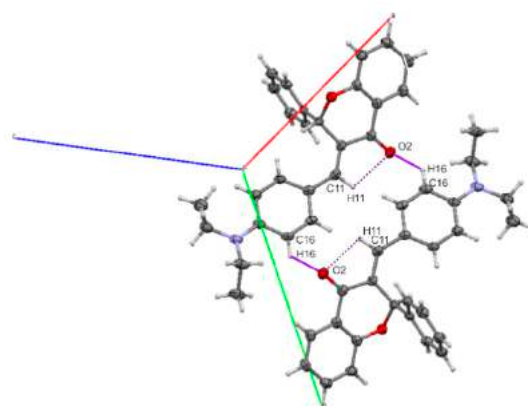


Figure 3. Partial molecular packing of **2** showing hydrogen-bonded dimers generated by C-H...O interaction.

Table 2. Hydrogen-bonding geometries (in Å, °) for structure **2**.

9	D-H	H—A	D—A	D-H—A
C11-H11—O2	0.97	2.39	2.811 (2)	105
C16-H16—O2 ⁱ	0.93	2.64	3.271 (2)	126
C7-H7 ... Cg4 ⁱⁱ	0.93	2.55	3.475 (2)	172
C14-H14 ... Cg2 ⁱⁱⁱ	0.93	2.84	3.619 (2)	142

Symmetry codes: (i) $1 - x, 1 - y, -z$; (ii): $1/2 + x, 1/2 - y, -1/2 + z$, (iii): $-1/2 + x, 1/2 - y, 1/2 + z$, Cg2, and Cg4 are centroids of C5/C6/C7/C8/C9/C10 C22/C23/C24/C25/C26/C27 rings.

2.3. Biological Assays

2.3.1. Cytotoxic Activity

The cytotoxicity of the synthesized compounds was evaluated *in vitro* by the MTT assay using three human cancer cell lines HL-60, NALM-6, and WM-115. The results, expressed as inhibitory concentration (IC_{50}), are shown in Table 3. Compound **2** exhibited high cytotoxic activity with $IC_{50} = 6.45 \pm 0.69 \mu M$, which is nine times lower than for 3-benzylidene flavanone and 154 times lower than for 4-chromanone, the reference compounds used in the WM-115 cell line. For the other cell lines, IC_{50} values were also satisfactory. In the NALM-6 cell culture, compound **1** showed an IC_{50} value almost 78 times lower than for 4-chromanone and more than three-fold lower than for 3-benzylidene flavanone. Perjesi and coworkers [23] also reported cytotoxicity of a series of 3-benzylidene-4-chromanones towards several cell lines. The authors found that most of the compounds inhibited the growth of 50% of HL-60 cells at the concentrations between 3–28 μM with 3-(3-bromobenzylidene)-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-one as the most active. In the current study we reveal that both synthesized compounds (**1** and **2**) exhibit good anti-proliferative properties at low micromolar range which make them promising candidates for further *in vitro* and *in vivo* studies.

Table 3. The cytotoxic activity of (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**1**) and (E)-3-(4-*N,N*-diethylamino)benzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**2**) against cancer HL-60, NALM-6, and WM-115. The results are presented as IC_{50} values in μM range.

Compounds	IC_{50} (μM)		
	HL-60	NALM-6	WM-115
1	11.76 ± 1.97	8.69 ± 0.40	18.09 ± 3.14
2	8.36 ± 0.63	9.08 ± 0.30	6.45 ± 0.69
4-chromanone	676.7 ± 32.6	673.7 ± 22.5	>1000
3-benzylidene flavanone [11]	33.3 ± 3.0	29.5 ± 4.7	59.4 ± 0.9

2.3.2. Rbcs Lysis Assay

In studies on the integrity of the erythrocyte membrane, statistically significant results in comparison with saline control were obtained for compound 2 at the highest concentrations tested (9 and 10 $\mu\text{mol/L}$) (Figure 4), which implies that compounds at these concentrations contributed to red blood cell breakdown. However, the values of hemolysis did not exceed 10%, which is considered to be a clinically important threshold of cytotoxicity [24].

In contrast, compound 1 did not lead to any significant increase in the hemolysis rate, therefore, it might be concluded that both examined compounds do not show adverse effects on the integrity of the red blood cells (RBCs) membrane over the entire concentration range.

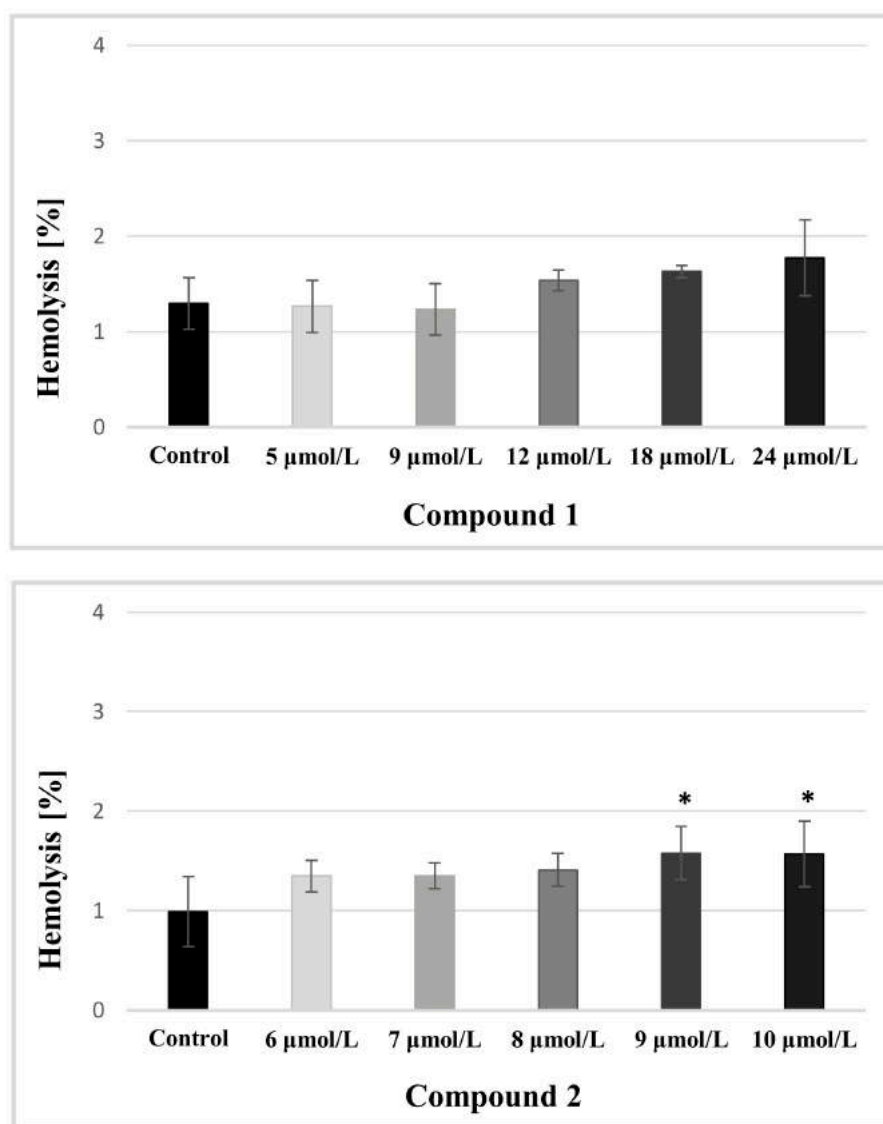


Figure 4. The effects of compound 1 and 2 on the integrity of the erythrocyte membrane. The results are presented as the percentage of hemolysis obtained from the interaction of studied compounds with 2% red blood cells (RBCs) suspension, compared to the positive control Triton X-100 at 0.2% (100% hemolysis) (mean $\pm$ SD; $n = 4$), * $p < 0.05$ vs. control.

2.3.3. RBCs Morphology

When a drug molecule is administered intravenously a series of interactions with blood cells might be initiated. The effects of **1** and **2** on the morphology of erythrocytes were visualized by microscope studies (Figure 5).

Both tested compounds **1** and **2**, contributed to the formation of echinocytes. Echinocytes accounted for the major part of erythrocytes when 24 $\mu\text{mol/L}$ compound **1** was applied. As presented in Figure 5, compound **2** led to the formation of echinocytes over the entire concentration range, however, the percentage of this erythrocyte form differed according to the concentration of **2**. The transformation of biconcave erythrocytes to echinocytes occurs naturally in blood vessels, and could be also seen in control samples. It has been proved that echinocytosis is a reversible transformation caused by various chemical and physical factors including increased ion strength, alkaline pH, and decreased in adenosine triphosphate (ATP) level [25].

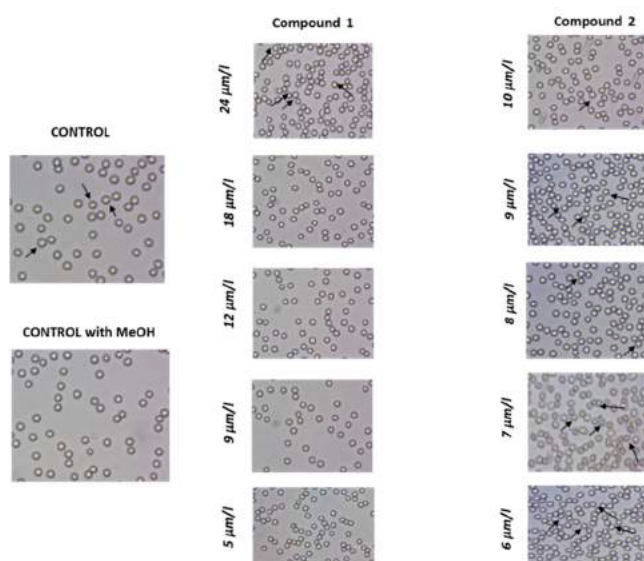


Figure 5. The microscope images of erythrocytes treated with compounds **1** and **2**. 2% erythrocyte suspension was treated at 37 °C for 60 min with indicated concentrations of compound **1** and **2**. Representative phase-contrast images are shown (magnification of 400 times). Black arrows indicate echinocytes.

2.4. Computational Studies

When drugs circulate in blood, they interact with biological macromolecules such as plasma proteins; these albumins constitute the majority and are important in the pharmacokinetics of medicines. For derivatives **1** and **2**, tenfold blind experiments of docking to HSA were performed to establish locations of their binding sites and the strength of the hypothetical interactions. The compounds were found to bind through hydrophobic interactions, **1** in four different places (near the cleft site, at the IB and FA1 sites, above the IIA—drug site and some additional atypical place) with average ΔG° -7.5 kcal/mol, whereas **2**, only in the IB FA1 site with average ΔG° -9.5 kcal/mol (Figure 6A,B). This single binding most likely resulted from the presence of an additional phenyl ring at the C2 position. The $\pi \dots \pi$ stacking was an important interaction between phenyl rings of the docked compounds and the aromatic side chains of tyrosine and phenylalanine. In the IB FA1 site, the aromatic rings of Tyr138 and 4-diethylaminobenzylidene substituent were parallel and were only slightly offset from each other with a distance between 4.4 and 4.5 Å. The phenyl ring in position 2 was located between the phenyl rings of Tyr138 and Phe125. The pyran ring was located between the phenyl ring of Phe125 and the aliphatic chain of Lys137 (Figure 6C,D). In contrast, compound **1** was located in the IB FA1 site inversely and showed less potent hydrophobic interactions.

The rings of the 4-*N,N*-diethyloaminobenzylidene substituent and Tyr138 were arranged in a parallel orientation, but were much more offset. The pyran ring was perpendicular to the phenyl ring of Tyr140 with a distance greater than 5 Å. His247 and Tyr30 were isolated with the distance greater than 20 Å. For compound **1**, mainly hydrophobic interactions with the aliphatic amino acid residues were observed in the other binding sites, and in the case of the cleft site, an oblique interaction between the pyran ring with the Tyr452 phenyl ring could be possible within a distance of 3.6 Å. In one atypical place, a similar interaction with the imidazole ring of His146 could take place within a distance of 3.3 Å. No specific hydrogen bonds were detected for either compounds.

To predict other properties of compounds **1** and **2**, the Molinspiration web tool was used and the drug descriptors were counted. For the Molinspiration GPCR ligand, Ion channel modulator, Kinase inhibitor, Nuclear receptor ligand, enzyme inhibitor and protease inhibitor bioactivity the scores were < zero or near zero, indicating that the compounds were not typical inhibitors or agonists of the listed types of proteins. Ligand efficiencies (LE) for derivatives calculated from computationally estimated ΔG° and known number of heavy atoms, theoretical $\log P$ and $\log P/LE$ (LELP), divided by the predicted number of binding sites were different for two compounds, but were still within the range of drug-likeness (Table 4).

The experimental lipophilicity of the synthesized compounds was determined using RP-TLC: $\log P$ values 3.43 was obtained for compound **1** and 5.69 for compound **2**. Theoretical values of lipophilicity were calculated using Molinspiration Cheminformatics (miLogP): miLogP 4.47 was obtained for **1** and 6.05 for **2**, i.e., similar to those obtained experimentally. Greater values of experimental and theoretical lipophilicity were noted for **2** because of the presence of the phenyl ring in the C2 position. Thus, molecular docking and Molinspiration predictions suggest that **1** and **2** have greater hydrophobicity than **1**, but also indicate potential specificity influence of an additional phenyl ring.

Table 4. Molinspiration bioactivity score and drug likeliness. H.A., the number of heavy atoms, n, number of binding sites, and LE, Ligand Efficiency ($-\Delta G^\circ/H.A.$), LELP ($\log P/LE$).

Compound	Bioactivity Score	H.A.	n	ΔG° Bind (kcal/mol)	$\log P$ (exp)	miLogP	LE	LELP
1	GPCR ligand −0.15	23	4	−7.5	3.43	4.47	0.33	13.55
	Ion channel modulator −0.30							
	Kinase inhibitor −0.30							
	Nuclear receptor ligand −0.04							
	Protease inhibitor −0.38							
2	Enzyme inhibitor −0.11	29	1	−9.1	5.69	6.05	0.31	19.52
	GPCR ligand −0.04							
	Ion channel modulator −0.32							
	Kinase inhibitor −0.26							
	Nuclear receptor ligand 0.03							
	Protease inhibitor −0.31							
	Enzyme inhibitor −0.08							

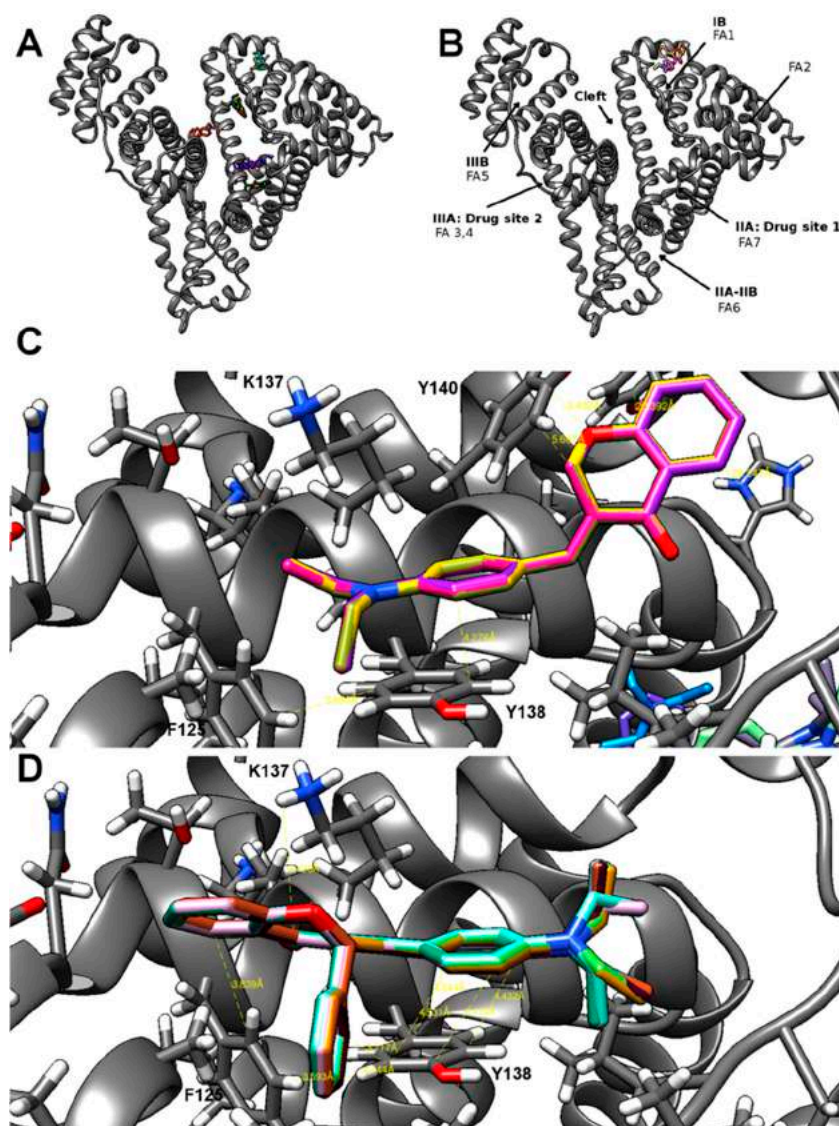


Figure 6. Tenfold blind docking of derivative **1** and **2** to HSA. Ribbon-stick models present the docking of derivatives (sticks) I-A, C and II-B, D to 1E7I human albumin structure (ribbon) with binding affinity energy (ΔG°) -7.5 ± 0.2 and -9.1 ± 0.1 (kcal/mol $\pm$ SD), respectively. C, D are the zoom of IB FA1 binding site area, distances marked by yellow dashed lines.

3. Materials and Methods

The second compound **2** was synthesized according to Pijewska [14]. Compounds **1** and **2** were purified by crystallization from methanol. All solvents (methanol, ethanol, and toluene) used in this work were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and POCH (Gliwice, Poland) chemical companies and were used without further purification.

Melting points were determined on a Büchi Melting Point B-540 apparatus in the capillary mode and they were uncorrected. The infrared transmission spectra of the crystalline products were recorded using a Nexus Thermo Nicolet FT-IR spectrophotometer (Wien, Austria; Faculty of Chemistry, University of Lodz). The MS-ESI were measured on Varian 500, MS LC Ion Trap mass spectrometer (Santa Clara, CA, United States; Faculty of Chemistry, University of Lodz). Elemental analyses were performed in the Faculty of Chemistry (University of Lodz) using a Vario Micro Cube (Langenselbold, Germany) by Elemental analyzer. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on a Bruker Avance III 600 MHz (Karlsruhe, Germany). Both samples were dissolved in DMSO deuterated. Chemical shifts

are given in ppm, coupling constants in Hz. Computational studies were used to predict the properties and future use of potential drugs. Molinspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com/products.html>) was used for the calculation of important molecular properties, molecular processing, bioactivity, and the high-quality depiction of new molecules. Molecular docking of the compounds to the HSA crystal structure 1E7I [21] was performed in AutodockVina 1.1.2 (<http://vina.scripps.edu>) [22], as previously described [12].

Lipophilicity was determined using an RP-TLC method with small amounts of organic solvents.

Assessment of erythrotoxicity of compounds **1** and **2** was made in Laboratory of Bioanalysis in the Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis, and Radiopharmacy in the Medical University of Lodz. The erythrocyte morphology was evaluated using a phase-contrast microscope Opta-Tech (Warsaw, Poland) using the OptaView 7 programme. Biological material (blood) for research came from the Regional Blood Donation Center in Lodz.

3.1. Synthesis of (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**1**)

A mechanically stirred mixture of 10 mmol of chroman-4-one, 10 mmol 4-*N,N*-diethylaminobenzaldehyde and five drops of piperidine was heated at 140 °C in an oil bath for 4 h. After cooling the reaction mixture was left for 24 h at room temperature. Next, methanol was added and the resulting was filtered and crystallized from methanol. Compound **1** was thus obtained as a light orange powder.

Yield: 33.5%. M.p. 124.9–125.4 °C. MS (ESI⁺): m/z 308. C₂₀H₂₁NO₂ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm^{−1}): 3037 (C-H_{aromat}), 2968, 2923, 2895, 2870 (C-H_{aliph}), 1663 (C=O), 1600, 1584, 1524 (C=C), 1154 (C-O-C). ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1.12 (3H, *t*, J_{H-H} —6 Hz, CH₃), 3.42 (2H, *q*, J_{H-H} —6 Hz, CH₂), 5.45 (1H, *s*, CH), 6.75 (2H, *d*, J_{H-H} —6 Hz, C2-H), 7.02 (1H, *d*, J_{H-H} —12 Hz, C4-H_{arom}), 7.09 (1H, *t*, J_{H-H} —6 Hz, C6-H_{arom}), 7.32 (1H, *d*, J_{H-H} —6 Hz, C8-H_{arom}), 7.54 (1H, *t*, J_{H-H} —6 Hz, C7-H_{arom}), 7.84 (1H, *d*, J_{H-H} —6 Hz, C6'-H_{arom}), 7.85 (1H, *d*, J_{H-H} —6 Hz, C5'-H_{arom}). ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.9 (CH₂CH₃), 44.3 (CH₂CH₃), 68.4 (C-2), 111.6, 118.1, 120.8, 122.2, 122.4, 125.2 (CH_{arom}, =CH), 135.9, 133.7, 137.9, 149.2, 160.7 (C_{arom}), and 181.0 (C=O). Anal. Calc. for C₂₀H₂₁NO₂ (M = 307.386 g/mol) % C: 78.14; and % H: 6.89. Found % C: 78.16; and % H: 7.06.

3.2. Synthesis of (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**2**)

The compound **2** was synthesized according to Pijewska in 1993 [14]. A racemic mixture was obtained.

Yield: 34%. M.p. 170–171 °C (MeOH). MS (ESI⁺): m/z 384. C₂₆H₂₅NO₂ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm^{−1}): 3056 (C-H_{aromat}), 2965, 2920, 2895, 2863 (C-H_{aliph}), 1654 (C=O), 1603, 1559, 1524 (C=C), 1150 (C-O-C). ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1.12 (3H, *t*, J_{H-H} —6 Hz, CH₃), 3.36 (2H, *q*, J_{H-H} —6 Hz, CH₂), 6.70 (1H, *s*, C2-H), 6.81–7.79 (13H, *m*, C-H_{arom}), 7.94 (1H, *s*, =CH). ¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12.9 (CH₂CH₃), 44.3 (CH₂CH₃), 78.1 (C2-H), 119.0, 120.2, 125.9, 127.2, 127.9, 129.1, 129.3, 136.2, 138.6, 140.3 (CH_{arom}, =CH), 122.3, 122.7, 122.7, 133.7, 149.6, 158.5 (C_{arom}), 181.2 (C=O). Anal. Calc. for C₂₆H₂₅NO₂ (M = 389.529 g/mol) % C: 81.43; % H: 6.57; % N: 3.65. Found % C: 81.57; % H: 6.78; and % N: 3.58.

3.3. Determination of Lipophilicity of Flavone Derivatives Using RP-TLC Method

The RP-TLC experiments were performed on TLC plates (5 × 10 cm) RP-18 F254S (Merck, Darmstadt, Germany). The synthesized compounds were dissolved in *N,N*-dimethylformamide DMF (2 mg/mL). High purity DMF 99.8% was obtained from Chempur (Piekary Slaskie, Poland). The solutions of each compound in DMF were spotted on plates. The spots were observed under UV light at λ = 254 nm. DMF-water solvent system was used as mobile phase. The composition of the solvent system changed from 50%:50% to 95%:5%. All experiments were performed at room temperature. The Log*P* parameter was calculated using the equation from the calibration curve.

3.4. X-ray Diffraction Experiment

The X-ray single crystal diffraction experiments for **1** and **2** were performed using an Agilent SuperNova diffractometer equipped with an Atlas detector at $T = 100(2)\text{K}$ with monochromatic $\text{MoK}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073\text{ \AA}$). Multi-scan absorption correction was applied to all data [26]. All structures were solved by direct methods using SHELX and further refined on F^2 using SHELX-2014/7 [27]. The position of the hydrogen atoms were calculated from the known geometry (C-H bond lengths at 0.93, 0.96, and 0.97 $\text{\AA}$ for aromatic CH, methylene CH_2 , and CH_3 methyl atoms, respectively) and treated as riding, where isotropic thermal parameters of these hydrogen atoms were fixed as $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.2 U_{\text{eq}}(\text{C})$ (for aromatic and methylene H atoms) or $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5 U_{\text{eq}}(\text{C})$ for (methyl H-atoms). Key experimental crystallographic data and refinement details of the studied compounds **1** and **2** are summarized in Table 5. To identify molecular geometries and hydrogen-bond patterns, PLATON and Mercury [28] were utilized. CCDC 1877734 (compound **2**) and 1877735 (compound **1**) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif, or by emailing data_request@ccdc.cam.ac.uk, or by contacting The Cambridge Crystallographic Data Centre, 12, Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44-1223-336-033.

Table 5. Crystal data, data collection, and refinement parameters of **1** and **2**.

	1	2
Crystal data		
Chemical formula	$\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_2$	$\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{NO}_2$
Mr	307.38	383.47
Cell setting, space group	Triclinic, $P-1$	Monoclinic, $P2_1/n$
a, b, c ($\text{\AA}$)	7.732(2), 13.998(2), 16.312(2)	11.764(2), 13.455(2), 12.832(2)
α, β, γ ($^\circ$)	64.74(2), 87.07(2), 87.58(2)	90.0, 93.75(2), 90.0
V ($\text{\AA}^3$)	1594.1(2)	2026.8(2)
Z	4	4
D_x (Mg m^{-3})	1.376	1.257
Temperature (K)	100	100
Radiation type ($\text{\AA}$)	0.71073	0.71073
μ (mm^{-1})	0.082	0.079
Crystal form, colour	prism, colourless	block, orange
Crystal size (mm)	$0.3 \times 0.2 \times 0.18$	$0.3 \times 0.2 \times 0.18$
Data collection		
Diffractometer	SuperNova, Atlas detector	SuperNova, Atlas detector
No. of measured and unique reflections	13098, 6603	25887, 4193
Observed data with $F^2 \geq 4\sigma(F^2)$	5664	3316
R_{int}	0.0265	0.0305
θ_{max} ($^\circ$)	26.49	26.49
Overall completeness to θ_{max} [%]	99.8	99.8
Refinement (SHELX)		
Refinement on	F^2	F^2
All data	6603	4193
R, wR [$I \geq 2(I)$]	0.0362, 0.0941	0.0513, 0.1347
R, wR (all data)	0.0434, 0.0989	0.0686, 0.1453
Goodness of fit	1.067	1.066
No. of parameters	419	268
$\rho_{\text{max}}, \rho_{\text{min}}$ ($\text{e \AA}^{-3}$)	0.249, -0.212	0.241, -0.265

3.5. Cells Cultures and Cytotoxicity Assay by MTT

Cytotoxicity was tested against human skin melanoma cells (WM-115 ECACC, Salisbury, UK), and two human leukemia cell lines—promyelocytic leukemia (HL-60) and lymphoblastic leukemia (NALM-6). The leukemia cells were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) and

gentamicin (25 µg/mL; KRKA, Slovenia). For melanoma WM-115 cells, Dulbecco's minimal essential medium (DMEM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 1640 was used. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

For all experiments, the studied compounds were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were further diluted in a culture medium to obtain <0.1 % DMSO concentration. In each experiment control without and with 0.1% DMSO was performed.

The cytotoxicity of both compounds, and the reference compounds (4-chromanone and 3-benzylidene-flavanone) was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA) assay, which measures the activity of cellular dehydrogenases [29]. Exponentially growing cells were seeded on 96-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark). Subsequently, various concentrations of the studied compounds (freshly prepared in DMSO and diluted with complete culture medium) were added. All compounds were tested for their cytotoxicity at a final concentration of 10⁻⁷–10⁻³ M. After 46 h of incubation with the studied compounds, the cells were treated with the MTT reagent and incubation was continued for another two hours. The MTT formazan crystals were dissolved in 20% SDS (Sodium dodecyl sulphate, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and 50% DMF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at pH 4.7, and the absorbance was read at 570 nm on a multifunctional Victor ELISA-plate reader (Perkin Elmer, Turku, Finland). The IC₅₀ values, the concentration of the test compound, was required to reduce the cell survival fraction to 50% of the controls, and were calculated from concentration response curves and was used as a measure of the sensitivity of the cells to a given treatment. As a control, cultured cells were grown in the absence of drugs. The data points represent the means of at least five to ten repeats ± S.D (standard deviation).

3.6. Red Blood Cells Lysis Assay

The studies on biological material were approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz, Poland (RNN/27/18/KE). The blood from healthy donors (Blood Donation Centre in Lodz) was collected in tubes containing a solution of potassium EDTA. RBCs were isolated by centrifugation (3000 × g, 10 min) at 20 °C and washed three times with 0.9% saline. The studies were performed on four biological samples obtained from different blood donors.

The effects of (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one **1** and (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one **2** on RBCs was performed using the method described earlier [30,31]. Briefly, 2% RBCs suspension prepared in 0.9% saline was incubated at 37 °C with tested compounds added in a 10 µL volume for one hour. The percentage of solvent (methanol) did not exceed 1% of the final sample volume (1 mL). Afterwards, the samples were centrifuged at 1000 × g for 10 min (20 °C), and the absorbance of the supernatant was measured at 550 nm wavelength (spectrophotometer (Cecil CE2021, London, England)). Samples containing saline solution were used to measure spontaneous hemolysis of RBCs, while samples with Triton X-100 ((2.0% *v/v*); Polish Chemical Reagents) constituted 100% of hemoglobin release. The results are presented as a percentage of released hemoglobin. The examined concentrations of tested compounds were chosen on the basis of obtained IC₅₀ values determined for three human cancer cell lines: HL-60, NALM-6, and WM-115.

3.7. RBCs Morphology

A 2% erythrocyte suspension was incubated at 37 °C for 1 h with various concentrations of tested compounds. The morphology of the RBCs was evaluated using a phase contrast Opta-Tech inverted microscope, at 400 times magnification, equipped with image analysis software (OptaView 7).

3.8. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted with a commercially available package (Statistica 12.0, StatSoft). All results are presented as mean ± SD. The normality of the distribution of continuous variables was

confirmed with the Shapiro-Wilk test. Paired t-tests were used for intergroup comparisons of normally distributed variables. The results were considered significant at *p*-values lower than 0.05.

4. Conclusions

This study presents the synthesis, chemical characterization, and biological activity of 3-benzylidenederivatives of chromanone and flavanone. The structure of synthesized compounds was confirmed using NMR, MS, IR, and single crystal X-ray diffraction (XRD) techniques. The anti-cancer properties of synthesized compounds **1** and **2** were evaluated using HL-60, NALM-6, and WM-115 cancer cell lines. Both compounds exerted a greater cytotoxic effect towards all cell lines than the reference 4-chromanone and 3-benzylideneflavanone. Compound **2** exerted the most profound cytotoxic effect towards WM-115 cell line with $IC_{50} = 6.45 \pm 0.69 \mu\text{mol/L}$. Lipophilicity of both compounds was determined using an RP-TLC method. Due to the presence of a phenyl substituent in the C2 position of chromanone, the value of $\log P$ for compound **2** was higher than that for **1**. Both compounds did not affect the integrity of erythrocyte membrane over the examined concentration range and did not contribute to hemolysis. In addition, tested compounds did not induce the pathological changes in the morphology of erythrocytes since only dyscocytes and echinocytes were recognized. Thus, both compounds at the concentrations close to the determined IC_{50} values might be regarded as biocompatible towards red blood cells. Computational studies suggest remarkably different ability of the synthesized compounds to bind with HSA, and different specificity as far as the future use as drugs is considered. Taking into consideration the promising cytotoxicity properties, i.e., IC_{50} values in a few micromolar range and being harmless to the red blood cells, the arylidenechromanone/flavanone derivatives can be further evaluated as promising anticancer compounds.

Supplementary Materials: Supplementary materials are available online.

Author Contributions: Conceptualization, E.B.; methodology, (Biological Assays) U.K.; (Computational Studies) M.B.P.; software (molecular modelling and docking in Vina, Molinspiration analysis, Figure 6) M.B.P.; validation, M.B.P.; formal analysis, M.M.; data curation, (molecular modelling and docking in Vina, Molinspiration analysis), M.B.P.; (X-ray experiment) M.M. and J.K.; writing—original draft preparation, (parts in introduction, computational studies, molecular modelling and docking in Vina, Molinspiration analysis) M.B.P.; (parts of introduction, X-ray analysis) M.M.; (introduction, synthesis, lipophilicity, part of biological assays, conclusions) A.A.A.-G.; (part of biological assays, conclusion) M.M.-P.; (part of biological assays, conclusion) E.B.; writing—review and editing (parts in introduction, computational studies, conclusion related to Computational Studies - molecular modelling and docking in Vina, Molinspiration analysis) M.B.P., (all text, especially X-ray structure) M.M., (all text, especially: introduction, chemistry, part of biological assays, conclusion) A.A.A.-G., (part of biological assays, conclusion) M.M.-P., (part of biological assays, conclusion) E.B.; visualization, (Figure 6) M.B.P.; (X-ray structure visualization) M.M.; (Figure 5) A.A.A.-G., (Figure 4) M.M.-P., (Scheme 1) E.B.; supervision, E.B.; project administration, A.A.A.-G., E.B.; funding acquisition, A.A.A.-G., E.B., M.M.

Funding: This research was funded by Medical University of Lodz (grant No 503/3-066-02/503-31-001, grant No 503/3-015-02/503-31-001, 503/3-015-01/503-31-004 and grant No 502-03/3-066-01/502-34-046).

Acknowledgments: Magdalena Małeczka would like to thank the University of Lodz (grant No 506/1136) for financial support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Czaplińska, M.; Czepas, J.; Gwoździński, K. Budowa, właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe flawonoidów. *Post. Bioch.* **2012**, *58*, 235–242.
2. Nijveldt, R.J.; Van Nood, E.; Van Hoorn, D.E.; Boelens, P.G.; Van Norren, K.; Van Leeuwen, P.A. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *74*, 418–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Ravishankar, D.; Rajora, A.K.; Greco, F.; Osborn, H.M. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2013**, *45*, 2821–2831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Raffa, D.; Maggio, B.; Raimondi, M.V.; Plescia, F.; Daidone, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *142*, 213–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Perez-Vizcaino, F.; Fraga, C.G. Research trends in flavonoids and health. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *646*, 107–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sharmila, G.; Bhat, F.A.; Arunkumar, R.; Elumalai, P.; Singh, P.R.; Senthilkumar, K.; Arunakaran, J. Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model. *J. Clin. Nutr.* **2014**, *33*, 718–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Demirayak, S.; Yurttas, L.; Gundogdu-Karaburun, N.; Karaburun, A.C.; Kayagil, I. New chroman-4-one/thiochroman-4-one derivatives as potential anticancer agents. *Saudi Pharm. J.* **2017**, *25*, 1063–1072. [[CrossRef](#)]
8. Perkin, W.H.; Ray, J.N.; Robinson, R. Experiments on the synthesis of brazilin and haematoxylin and their derivatives. Part I. Veratrylidene-7-methoxychromanone and an account of a new synthesis of some benzopyrylium salts. *J. Chem. Soc.* **1926**, *129*, 941–953. [[CrossRef](#)]
9. Levai, A.; Schag, J.B. Synthesis of 3-benzylidenechroman-4-ones and -1-thiochroman-4-ones. *Pharmazie*. **1979**, *34*, 748–749.
10. Levai, A.; Dinya, Z.; Schag, J.B.; Toth, G.; Szollosy, A. Synthesis of 3-benzyl-4-chromones and 3-benzyl-1-thio-4-chromones. *Chem. Inf.* **1981**, *36*, 465.
11. Kupcewicz, B.; Balcerowska-Czerniak, G.; Małeczka, M.; Paneth, P.; Krajewska, U.; Rozalski, M. Structure-cytotoxic activity relationship of 3-arylidene-flavanone and chromanone (E, Z isomers) and 3-arylflavones. *Bioorganic Med. Chem. Letters*. **2013**, *23*, 4102–4106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Budzisz, E.; Paneth, P.; Geromino, I.; Muzioł, T.; Rozalski, M.; Krajewska, U.; Pipiak, P.; Ponczek, M.B.; Małeczka, M.; Kupcewicz, B. The cytotoxic effect of spiroflavanone derivatives, their binding ability to human serum albumin (HSA) and a DFT study on the mechanism of their synthesis. *J. Mol. Struct.* **1137**, 267–276. [[CrossRef](#)]
13. Teng, G.G. Negative laser sensitive lithographic printing plate having specific photosensitive composition. U.S. Patent 7,524,615, 14 February 2008.
14. Pijewska, L.; Kamecki, J.; Perka-Karolczak, W. 3-Arylidene-flavanones. Part 2 Reaction with diazomethane. *Pharmazie* **1993**, *48*, 254–257.
15. Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Narciso, G.P.; Notari, S.; Ascenzi, P. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*. **2005**, *57*, 787–796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gangwal, R.P.; Damre, M.V.; Das, N.R.; Dhoke, G.V.; Bhadauriya, A.; Varikoti, R.A.; Sangamwar, A.T. Structure based virtual screening to identify selective phosphodiesterase 4B inhibitors. *J. Mol. Graph. Model* **2015**, *57*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Valkonen, A.; Laihia, K.; Kolehmainen, E.; Kauppinen, R.; Perjesi, P. Structural studies of seven homoisoflavonoids, six thiohomoisoflavonoids and four structurally related compounds. *Struct. Chem.* **2012**, *23*, 209–217. [[CrossRef](#)]
18. Cremer, D.; Pople, J.A. General definition of ring puckering coordinates. *J. Amer. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358. [[CrossRef](#)]
19. Bhattacharya, A.A.; Grune, T.; Curry, S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721–732. [[CrossRef](#)]
20. Duax, W.L.; Norton, D.A. *Atlas of Steroid Structure*; Springer Science & Business Media: New York, NY, USA, 2012; pp. 3273–3274.
21. Kupcewicz, B.; Małeczka, M.; Zapadka, M.; Krajewska, U.; Róžalski, M.; Budzisz, E. Quantitative relationships between structure and cytotoxic activity of flavonoid derivatives. An application of Hirshfeld surface derived descriptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3336–3341. [[CrossRef](#)]
22. Trott, O.; Olson, A.J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455–461.
23. Perjesi, P.; Umashankar, D.; De Clercq, E.; Balzarini, J.; Kawase, M.; Sakagami, H.; Stables, J.; Lorand, T.; Rozmer, Z.; Dimmock, J. Design, synthesis and antiproliferative activity of some 3-benzylidene-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-ones which display selective toxicity for malignant cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 839–845. [[CrossRef](#)]
24. Fischer, D.; Li, Y.; Ahlemeyer, B.; Krieglstein, J. In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1121–1131. [[CrossRef](#)]

25. Stasiuk, M.; Kijanka, G.; Kozubek, A. Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące. *Post. biochemii.* **2009**, *55*, 425–433.
26. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Chem.* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)]
27. Spek, A.L. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Cryst.* **2009**, *65*, 148–155. [[CrossRef](#)]
28. Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P.A. New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. *J. App. Cryst.* **2008**, *41*, 466–470. [[CrossRef](#)]
29. Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods.* **1989**, *119*, 203–210. [[CrossRef](#)]
30. Markowicz-Piasecka, M.; Sikora, J.; Mateusiak, Ł.; Mikiciuk-Olasik, E.; Huttunen, K.M. New prodrugs of metformin do not influence the overall haemostasis potential and integrity of the erythrocyte membrane. *Eur. J. Pharm.* **2017**, *811*, 208–221. [[CrossRef](#)]
31. Markowicz-Piasecka, M.; Mikiciuk-Olasik, E.; Sikora, J. Stability of erythrocyte membrane and overall hemostasis potential—A biocompatibility study of mebrofenin and other iminodiacetic acid derivatives. *J. Pharm. Rep.* **2015**, *67*, 1230–1239. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**1**) and (E)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**2**) are available from the author Angelika A. Adamus-Grabicka.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publikacja 2

2. **Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)2-phenylchroman-4-one**

2.1. Synteza oraz analiza struktury krystalograficznej pochodnych aryliidenochromanonów

Druga praca eksperymentalna dotyczyła badań strukturalnych zsyntezowanych związków: (*E*)-3-(4-hydroksybenzylideno)chroman-4-onu (**1**) oraz (*E*)-3-(3-hydroksybenzylideno)-2-fenylochroman-4-onu (**2**) oraz oceny współczynnika lipofilowości. Ze względu na interesujące właściwości biologiczne tej grupy związków postanowiłam przeprowadzić reakcję kondensacji odpowiednio chroman-4-onu z 4-hydroksybenzaldehydem oraz 2-fenylochroman-4-onu z 3-hydroksybenzaldehydem i sprawdzić czy istnieje zależność między strukturą, a oddziaływaniami międzycząsteczkowymi i wielkością $\log P$, która jest istotna w projektowaniu leków. Projektowanie nowych leków jest możliwe dzięki poznaniu oddziaływań międzycząsteczkowych, które wpływają na lipofilowość substancji, a która jest skorelowana z aktywnością biologiczną. Już na przełomie XIX i XX wieku zauważono wpływ lipofilowości na właściwości znieczulające leków i uznano za pierwszy przykład analizy QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationships*) [75]. Analiza QSAR pozwala na poznanie korelacji między różnicami w aktywności biologicznej w zależności od struktury związków różniących się strukturą. Aby wyeksponować różnice w budowie cząsteczki stosuje się deskryptory wyznaczone eksperymentalnie lub za pomocą programów komputerowych. Jednym z takich deskryptorów jest lipofilowość [101].

Obydwa związki otrzymano w reakcji kondensacji chromanonu/flawanonu z hydroksybenzaldehydem w obecności piperydyny, a następnie scharakteryzowano struktury za pomocą metod fizykochemicznych. Deskryptor lipofilowości wyznaczono metodą RP-TLC oraz z użyciem programu Molinspiration Cheminformatics. Wartość lipofilowości związku **1** była niższa niż związku **2**, podobny trend zaobserwowano w teoretycznych obliczeniach $\log P$. Grupa hydroksylowa zmniejsza wartość $\log P$ jednak nie ma istotnej zależności między położeniem grupy (meta czy para) w pierścieniu. Różnica wynika z obecności podstawnika fenyłowego (który znacznie zwiększa wartość $\log P$) przy atomie C2 w pierścieniu piranu. Krystalizację związku **1** przeprowadzono z acetonu, a związku **2** z etanolu poprzez powolne odparowywanie w temperaturze pokojowej. Analiza krystalograficzna wykazała, że cząsteczki w kryształach związku **1** i **2** są połączone

równoległe do płaszczyzny za pomocą wiązań wodorowych $C-H\cdots O$ i $O-H\cdots O$, a interakcje $\pi-\pi$ w pierścieniach benzenowych w piranie skondensowanych z aromatycznymi grupami hydroksybenzenowymi dodatkowo zwiększa stabilność struktury. Jako, że parametr lipofilowości jest związany z udziałem interakcji międzycząsteczkowych w powierzchni Hirshfelda (HS), dodatkowo wykonano analizę powierzchni HS za pomocą programu Crystal Explorer dla pochodnych chromanonu, dla których wyznaczono $\log P$. Analiza HS może dostarczyć istotnych informacji na temat deskryptorów do badania QSAR. Okazało się, że dominującym oddziaływanie wszystkich pochodnych jest oddziaływanie $H\cdots H$ (udział powierzchni HS 39.2% - 55.5%). Dla oddziaływań $C\cdots C$ zaobserwowano największy udział procentowy dla związku 1, natomiast w przypadku związku 2 procentowo największy rozkład odczytano dla oddziaływań $C\cdots H$, co jest związane z obecnością grupy fenylovej. Ponadto zauważono zależność między wartością $\log P$, a frakcją powierzchni Hirshfelda. Wzrost $\log P$ odpowiada zwiększeniu udziału oddziaływań $C\cdots H$ w powierzchni HS.

Crystal structures of (*E*)-3-(4-hydroxybenzylidene)-chroman-4-one and (*E*)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one

Kamil Suchojad,^a Anna Dołęga,^b Angelika Adamus-Grabicka,^c Elżbieta Budzisz^c and Magdalena Małecka^{a*}

Received 8 October 2019

Accepted 19 November 2019

Edited by C. Rizzoli, Università degli Studi di Parma, Italy

Keywords: crystal structure; chromanone derivative; flavanone derivative; lipophilicity index; Hirshfeld surface analysis.

CCDC references: 1966749; 1966750

Supporting information: this article has supporting information at journals.iucr.org/e

^aDepartment of Physical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163/165, 90-236 Łódź, Poland,

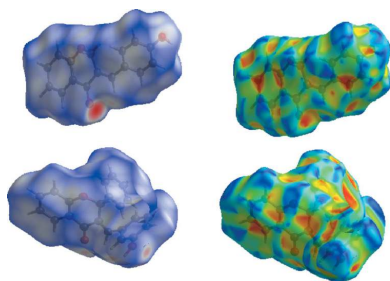
^bDepartment of Inorganic Chemistry, Gdańsk University of Technology, G. Narutowicza 11/12., 80-233 Gdańsk, Poland,

and ^cDepartment of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, 90-151 Łódź, Poland. *Correspondence e-mail: magdalena.malecka@chemia.uni.lodz.pl

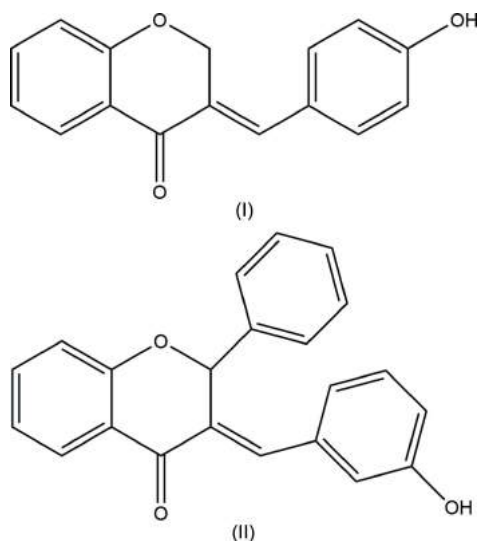
The synthesis and crystal structures of (*E*)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one, C₁₆H₁₂O₃, **I**, and (*E*)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one, C₂₂H₁₆O₃, **II**, are reported. These compounds are of interest with respect to biological activity. Both structures display intermolecular C—H...O and O—H...O hydrogen bonding, forming layers in the crystal lattice. The crystal structure of compound **I** is consolidated by π – π interactions. The lipophilicity (log*P*) was determined as it is one of the parameters qualifying compounds as potential drugs. The log*P* value for compound **I** is associated with a larger contribution of C...H interaction in the Hirshfeld surface.

1. Chemical context

Chromanone (chroman-4-one) and flavanone (2-phenylchroman-4-one) belong to the class of heterocyclic compounds and are composed of a benzene ring fused to a 2,3-dihydro- γ -pyranone ring (Emami & Ghanbarimasir, 2015). 3-Arylidenechromanones/flavanones and their derivatives are naturally occurring homoisoflavones, and can be obtained by condensing the corresponding aryl aldehydes with chromanone/flavanone. These compounds were synthesized for the first time by Robinson in the early 1920s by the condensation reaction of chromanone or flavanone with the appropriate aryl aldehyde using a catalyst (alcohol potassium hydroxide) (Perkin *et al.*, 1926). In 1979, Levai and Schag synthesized *E*-3-arylidenechroman-4-one using piperidine as a catalyst (Levai & Schag, 1979). Several years later, in 1993, Pijewska and coworkers (Pijewska *et al.*, 1993) obtained the series of 3-arylidenechromanones derivatives substituted by various groups using flavanones with aromatic aldehydes in the presence of piperidine. Flavonoid compounds belong to one of the largest and most interesting groups of chemical compounds. They are of interest to many scientists because they show biological properties (Nijveldt *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2004). Natural and synthetic flavonoids have a wide range of antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, antimicrobial, anti-coagulant, anti-cholesterol or anti-cancer activities (Czaplińska *et al.*, 2012).



OPEN ACCESS



2. Structural commentary

The molecular structures of **I** and **II** are shown in Fig. 1. The main chroman skeleton of each molecule consists of a benzene ring fused with a pyran ring. In position 3 of the chroman moiety, a *para*-hydroxybenzylidene (**I**) or a *meta*-hydroxybenzylidene (**II**) substituent is connected to give the *E*-isomer, similar to the previously mentioned structure (Kupcewicz, *et al.*, 2013). Moreover in compound **II**, the chroman moiety is substituted at position 2 by a phenyl ring. The pyran rings adopt an envelope conformation with puckering parameters $Q_T = 0.371$ (2) Å, $\varphi_2 = 233.8$ (4)°, $\theta_2 = 120.0$ (3)° for **I**, and $Q_T = 0.423$ (3) Å, $\varphi_2 = 65.9$ (5)°, $\theta_2 = 58.5$ (4)° for **II**. The dihedral angles between the hydroxybenzylidene rings and the main chroman skeleton are 47.54 (8) and 69.46 (12)°, respectively, for **I** and **II** (Fig. 2).

3. Supramolecular features

In the crystal packing of **I**, molecules are connected into layers parallel to the *bc* plane via C—H...O and O—H...O hydrogen bonds (Table 1, Fig. 3). The stability of the layers is further enhanced by π – π stacking interactions occurring between the benzene rings fused with the pyran rings and the

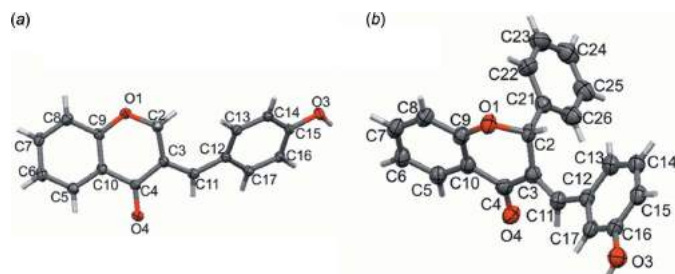


Figure 1

The molecular structures of compounds **I** and **II** with displacement ellipsoids drawn at the 50% probability level.

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °) for **I**.

<i>D</i> —H... <i>A</i>	<i>D</i> —H	H... <i>A</i>	<i>D</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> —H... <i>A</i>
C11—H11...O3 ⁱ	0.95	2.55	3.264 (2)	132
C11—H11...O3 ⁱⁱ	0.95	2.52	3.194 (2)	129
O3—H3...O4 ⁱⁱⁱ	0.84	1.85	2.6852 (19)	172
C2—H2A...O1 ^{iv}	0.99	2.53	3.397 (3)	147
C11—H11...O4	0.95	2.45	2.818 (2)	103

Symmetry codes: (i) $x - 1, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$; (ii) $x, -y + \frac{1}{2}, z - \frac{1}{2}$; (iii) $x + 1, -y + \frac{1}{2}, z + \frac{1}{2}$; (iv) $x - 1, y, z$.

aromatic rings of adjacent hydroxybenzylidene groups (Table 2). In the crystal packing of **II**, molecules are also linked by O—H...O and C—H...O hydrogen bonds (Table 3, Fig. 4) into layers parallel to the *ab* plane.

4. Database survey

A search of the Cambridge Structural Database (CSD version 5.40, last update November 2018; Groom *et al.*, 2016) using the scheme presented in Fig. 5 found 41 chromanone (Ishikawa *et al.*, 2013a,b; Zimmerman *et al.*, 2015; Marx, Suresh *et al.*, 2007; Katrusiak *et al.*, 1987; Brien *et al.*, 2012; Suresh *et al.*, 2007; Boonsri *et al.*, 2005; Biruntha *et al.*, 2018; Talhi *et al.*, 2016; Wu, Liu *et al.*, 2011; Marx *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2011; Valkonen *et al.*, 2012; Lepitre *et al.*, 2017; Gopaul, Shaikh, Koorbanally *et al.*, 2012; Gopaul, Koorbanally *et al.*, 2012; Marx, Manivannan *et al.*, 2007; Suresh *et al.*, 2007; Marx *et al.*, 2008; Hassaine *et al.*, 2016; Chantrapromma *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2012; Augustine *et al.*, 2008; Gopaul, Shaikh, Ramjugernath *et al.*, 2012; Gopaul & Koorbanally, 2012; Zhang *et al.*, 2013) and four flavanone structures (Zhong *et al.*, 2013; Kupcewicz *et al.*, 2013; Wu, Zeng *et al.*, 2011; Monserrat *et al.*, 2013). In the flavanone structures, the phenyl substituent at the C2 position is always nearly perpendicular to the chroman moiety, with the

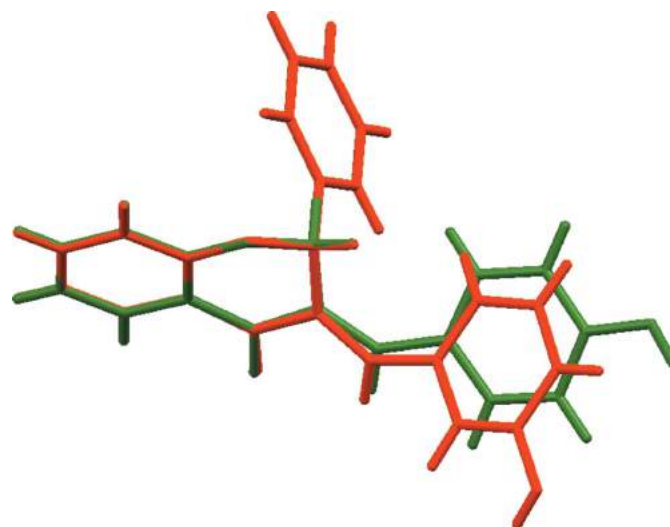


Figure 2

Overlay of compound **I** (green) and compound **II** (red).

Table 2

Geometrical parameters (Å, °) for the π - π stacking interactions for compound **1**.

$Cg(1)$ and $Cg(2)$ are the centroids of the C5–C10 and C12–C17 rings, respectively; α refers to the dihedral angle between planes (I) and (J); β refers to the angle between the $Cg(I)$ – $Cg(J)$ vector and normal to plane (I); γ refers to the angle between the $Cg(I)$ – $Cg(J)$ vector and normal to plane (J).

	$Cg(I) \cdots Cg(J)$	$Cg(I)_{\text{Perp}}$	$Cg(J)_{\text{Perp}}$	α	β	γ
$Cg(1) \cdots Cg(1)^i$	3.8508 (13)	3.5260 (9)	-3.5259 (9)	0.03 (10)	23.7	23.7
$Cg(1) \cdots Cg(1)^{ii}$	3.8512 (13)	3.5260 (9)	-3.5262 (9)	0.03 (10)	23.7	23.7
$Cg(2) \cdots Cg(2)^i$	3.8510 (13)	3.3739 (8)	-3.3738 (8)	0.03 (10)	28.8	28.8
$Cg(2) \cdots Cg(2)^{ii}$	3.8510 (13)	3.3740 (8)	-3.3738 (8)	0.03 (10)	28.8	28.8

Symmetry codes: (i) $-1 + x, y, z$; (ii) $1 + x, y, z$.

Table 3

Hydrogen-bond geometry (Å, °) for **II**.

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
O3-H3 $\cdots$ O4 ⁱ	0.84	1.89	2.728 (3)	172
C17-H17 $\cdots$ O4 ⁱ	0.95	2.49	3.184 (4)	130
C6-H6 $\cdots$ O3 ⁱⁱ	0.95	2.45	3.265 (4)	143
C11-H11 $\cdots$ O4	0.95	2.43	2.807 (3)	103

Symmetry codes: (i) $-x + 1, -y + 1, -z + 1$; (ii) $x + 1, y - 1, z$.

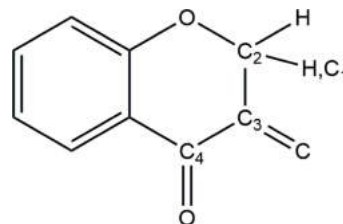


Figure 5
Reference moiety for database survey.

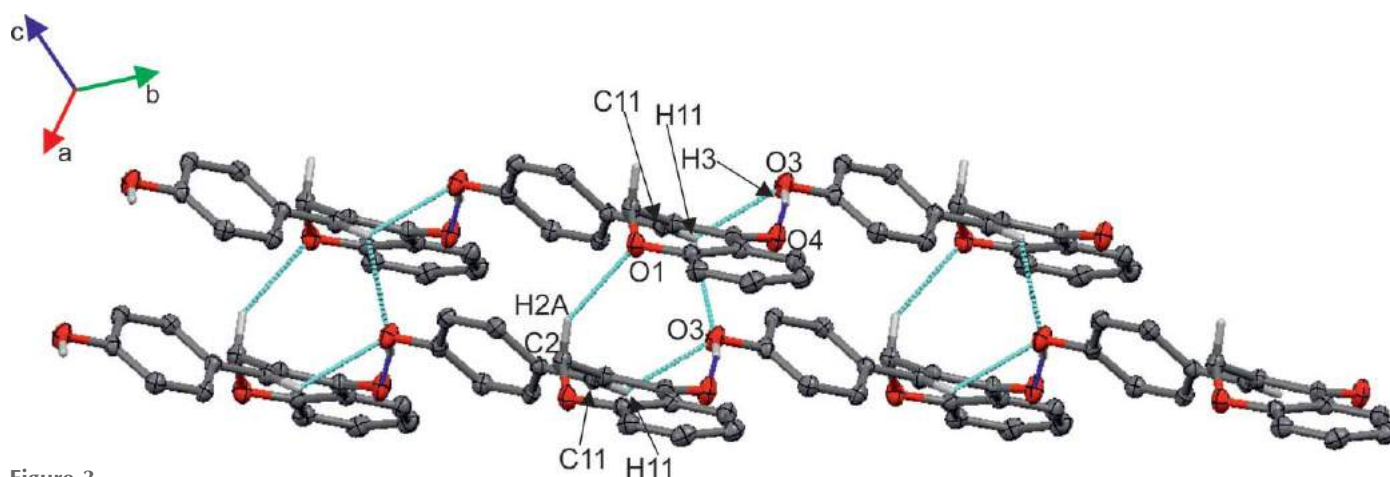


Figure 3
Partial packing of compound **1** showing the O—H...O (blue dotted lines) and C—H...O (cyan dotted lines) hydrogen-bonding network.

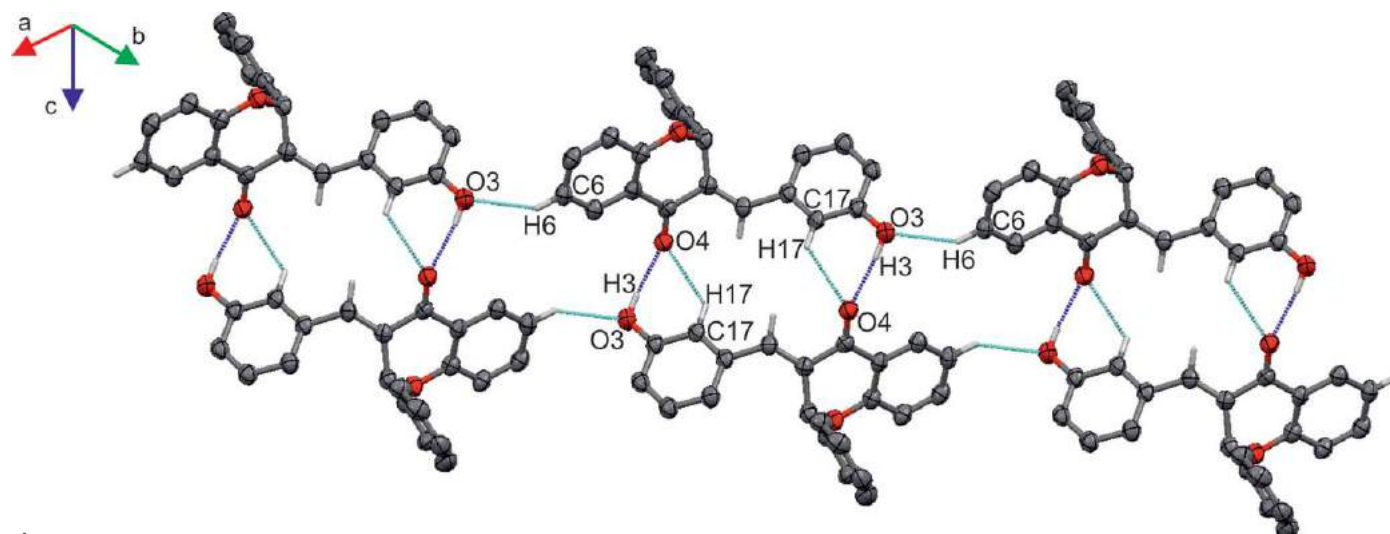


Figure 4
Partial packing of compound **II** showing the O—H...O (blue dotted lines) and C—H...O (cyan dotted lines) hydrogen-bonding network.

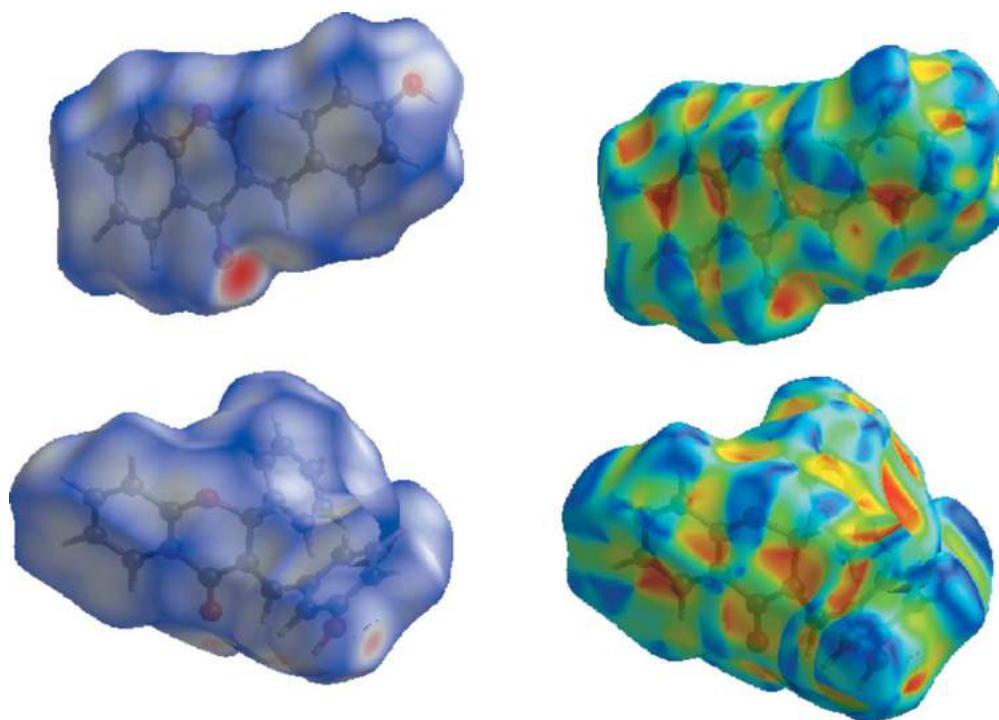


Figure 6
View of the three-dimensional Hirshfeld surfaces of the title compounds plotted over d_{norm} (left) and shape-index (right); first row: compound **I**, second row: compound **II**.

C(phen)—C2—C3—C4 torsion angle in the range 82.44–107.90°. In both chromanone and flavanone structures, the pyran ring adopts a slightly distorted envelope conformation. In the 41 chromanone derivatives, the bond distances and angles within the chroman moiety are in good agreement with those found in compound **I**.

5. Experimental and theoretical lipophilicity of compounds **I** and **II**

Lipophilicity is one of the descriptors that is currently used in the design of new drugs and in assessing the activity of medicinal substances (Jóźwiak *et al.*, 2001). Most often, the increase in lipophilicity increases the biological activity of compounds as a result of the affinity of substances with biological membranes and better permeability (Dołowy, 2009). However, a further increase in lipophilicity results in greater affinity for lipids and hinders the transport of compound molecules through the aqueous phase. That is why it is important to choose substances with optimal hydrophobic and hydrophilic properties and partition coefficient $\log P$ (Dołowy, 2009).

The experimental lipophilicity ($\log P$) of compounds **I** and **II** was determined using the RP-TLC method. The values of $\log P$ obtained are 2.95 and 3.98, respectively for **I** and **II**, the difference being due to the different, bulky substituent at the C2 position of the pyran ring. The theoretical values of lipophilicity (miLog P) also show the same trend, the value for compound **I** is lower (miLog P = 3.14) than that for compound **II** (miLog P = 4.70). This is in agreement with the values

previously reported for similar arylidenochromanone/flavanone derivatives (Adamus-Grabicka *et al.*, 2018). The theoretical values of lipophilicity were calculated using the online *Molinspiration Cheminformatics* software (<http://www.molinspiration.com>). According to the ‘rule of five’ proposed by Lipinski *et al.* (2001), compounds **I** and **II** may be potential anti-cancer drugs, the most important parameters according to Lipinski being the $\log P$ value ($\log P < 5$) and molar mass (< 500 Da).

6. Hirshfeld surface analysis and lipophilicity index versus C...H contact

As the Hirshfeld surface (HS) analysis may provide useful descriptors for QSAR study (Kupcewicz, *et al.*, 2016) and the lipophilicity parameter in biologically active compounds is associated with the contribution of intermolecular interactions to the Hirshfeld surface (Małeczka & Budzisz, 2014), we generated the Hirshfeld surfaces (Hirshfeld, 1977; Spackman & Jayatilaka, 2009) using the *CrystalExplorer* program (Turner *et al.*, 2017) for chromone and flavanone derivatives for which the lipophilicity parameters are available, *i.e.* compound **I**, **II**, 3-(4-chlorobenzylidene)-2-phenyl-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-one (**III**; Kupcewicz *et al.*, 2013), (*E*)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**IV**; Adamus-Grabicka *et al.*, 2018) and (*E*)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**V**; Adamus-Grabicka *et al.*, 2018).

The Hirshfeld surfaces were mapped over d_{norm} (Fig. 6). The red, white and blue regions visible on the d_{norm} surfaces

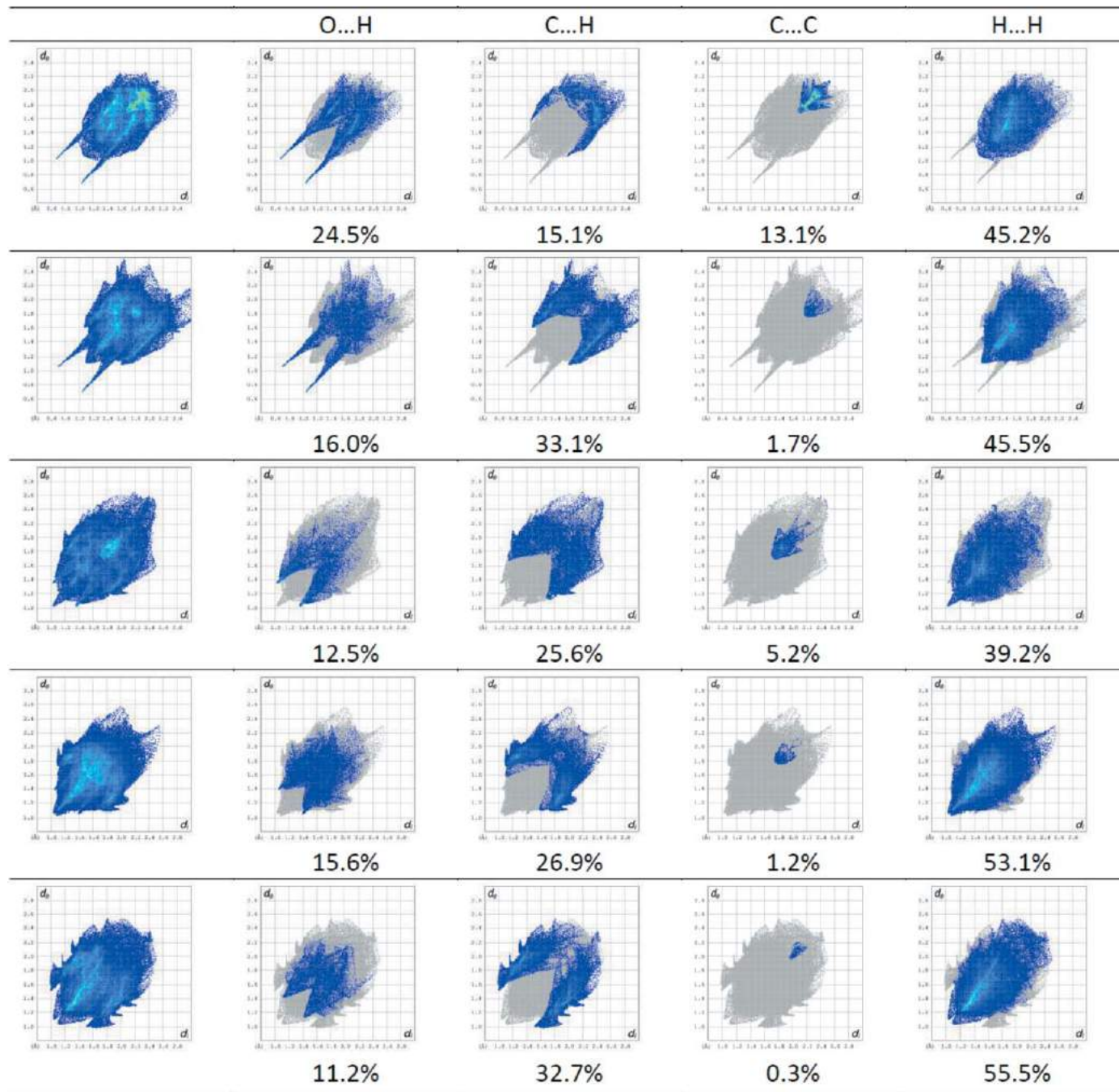


Figure 7

Fingerprint plots of the title compounds; full Hirshfeld surface (left) and delineated into H...O, H...C, C...C, and H...H contacts, showing the percentage contributions of the contacts to the total Hirshfeld surface area of the molecules. First row: compound **I**; second row: compound **II**; third row: 3-(4-chlorobenzylidene)-2-phenyl-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one (Kupciewicz *et al.*, 2013); fourth row: (E)-3-(4-N,N-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (Adamus-Grabicka *et al.*, 2018); fifth row: (E)-3-(4-N,N-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (Adamus-Grabicka *et al.*, 2018).

indicate contacts with distances shorter, longer and equal to the van der Waals radii. The decomposition of the HS into 2D fingerprint plots for particular contacts is presented in Fig. 7, together with the relative percentage of contributions of different contacts. The dominant interaction in all derivatives is the H...H interaction. The contribution to the Hirshfeld surface is in the range 39.2–55.5% for **III** and **V**. Comparing

the C...C contacts, we can observe a large spread of percentage contribution ranging from 0.3% for **V** to 13.1% for compound **I**. This is also reflected in the presence of π – π stacking interactions observed in compound **I** (Table 2).

As in our previous studies (Małacka *et al.*, 2014; Kupciewicz *et al.*, 2013), we found a relationship between the log*P* value and the fraction of the Hirshfeld surface covered by different

Table 4
Experimental details.

	I	II
Crystal data		
Chemical formula	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	C ₂₂ H ₁₆ O ₃
<i>M_r</i>	252.27	328.37
Crystal system, space group	Monoclinic, <i>P</i> 2 ₁ / <i>c</i>	Triclinic, <i>P</i> $\bar{1}$
Temperature (K)	120	120
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	3.8510 (2), 22.2541 (11), 13.7837 (9)	5.3969 (6), 11.6576 (16), 12.944 (2)
α , β , γ (°)	90, 96.766 (5), 90	91.992 (12), 98.282 (10), 97.568 (10)
<i>V</i> (Å ³)	1173.04 (11)	797.68 (19)
<i>Z</i>	4	2
Radiation type	Mo <i>K</i> α	Mo <i>K</i> α
μ (mm ⁻¹)	0.10	0.09
Crystal size (mm)	0.4 × 0.2 × 0.1	0.8 × 0.2 × 0.05
Data collection		
Diffractometer	STOE IPDS 2T	STOE IPDS 2T
Absorption correction	—	—
No. of measured, independent and observed [<i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)] reflections	7027, 2413, 1618	6849, 3281, 1804
<i>R</i> _{int}	0.050	0.077
(sin θ /λ) _{max} (Å ⁻¹)	0.628	0.628
Refinement		
<i>R</i> [<i>F</i> ² > 2 σ (<i>F</i> ²)], <i>wR</i> (<i>F</i> ²), <i>S</i>	0.048, 0.115, 1.03	0.068, 0.200, 0.94
No. of reflections	2413	3281
No. of parameters	173	228
H-atom treatment	H-atom parameters constrained	H-atom parameters constrained
$\Delta\rho_{\text{max}}$, $\Delta\rho_{\text{min}}$ (e Å ⁻³)	0.19, -0.19	0.23, -0.29

Computer programs: *X-Area* and *X-RED32* (Stoe & Cie, 2002), *SHELXT* (Sheldrick, 2015a), *SHELXL2014/7* (Sheldrick, 2015b) and *publCIF* (Westrip, 2010).

intermolecular interactions. The increase of log*P* corresponds in fact to increasing the C··H contribution in the Hirshfeld surface. Furthermore, for compounds **I–V**, the contribution of the O··H interaction in the Hirshfeld surface is inversely proportional to the value of log*P*.

7. Synthesis and crystallization

The synthesis of compounds **I** and **II** is based on the condensation of chromanone or flavanone with an aryl aldehyde in the presence of piperidine (Fig. 8). Compound **I** was prepared according to a slightly modified procedure with respect to that described in the literature (Levai & Schag, 1979). A mechanically stirred mixture of chroman-4-one (0.01 mol), *p*-methoxybenzaldehyde (0.01 mol) and five drops of piperidine was heated at 413 K in an oil bath for four h. The progress of the synthesis was controlled by thin layer chromatography (TLC) using toluene/methanol (9:1 *v/v*) as eluent. After cooling the reaction mixture was left for 24 h at room temperature. The solidified product was filtered and crystal-

lized from methanol. Compound **I** was obtained as a yellow powder. The isolated solid was further recrystallized by slow evaporation at room temperature of an acetone solution. Yield: 64%, M.p.: 501–502.5 K. MS (ESI⁺): *m/z* 253.3 C₁₆H₁₂O₃ [M+H]⁺. IR (KBr): 3126 (O–H), 2809 (C–H_{aromat}), 1652 (C=O), 1608, 1578 (C=C), 1164 (C–O–C), 751 (=C–H). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.42 (1H, *s*, =CH), 6.86–7.86 (8H, *m*, C–H_{aromat}), 7.87 (2H, *d*, *J*_{AB} = 18 Hz C2–H), 10.12 (1H, *s*, OH). Analysis calculated for C₁₆H₁₂O₃ (*M* = 252.23 g mol⁻¹) % C: 76.18; % H: 4.81; % O: 19.01. Found % C: 75.3; % H: 5.01; % O: 19.69.

Compound **II** was synthesized according to the procedure described by Pijewska *et al.*, (1993). A mixture of 2-phenylchroman-4-one (0.01 mol), 3-hydroxybenzaldehyde (0.01 mol) and five drops of piperidine was heated under reflux in an oil bath with mechanical stirring. The reaction proceeded at 413 K for 5 h. The progress of the reaction was controlled by TLC (eluent: toluene/methanol, 9:1 *v/v*). After cooling at room temperature, the mixture was dissolved in methanol. After 24 h compound **II** precipitated as a light-cream fine crystalline powder and was purified by crystallization from methanol. Crystal suitable for X-ray analysis were obtained by slow evaporation of an ethanol solution at room temperature. Yield: 52.4%. M.p.: 482–483 K. MS (ESI⁺): *m/z* 329.2 C₂₂H₁₆O₃ [M+H]⁺. IR (KBr): 3297 (O–H), 3054 (C–H_{aromat}), 2351 (C–H_{aliph}), 1663 (C=O), 1608, 1590, 1504 (C=C), 1141 (C–O–C), 757 (=C–H). ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 6.57 (1H, *s*, C2–H), 5.69 (1H, *s*, =CH), 6.89–7.91 (14H, *m*, CH_{aromat}), 8.12 (1H, *s*, OH). Analysis calculated For C₂₂H₁₆O₃ (*M* = 328.19 g mol⁻¹) %C: 80.51;

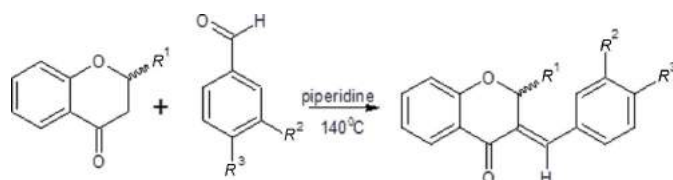


Figure 8

Scheme of the synthesis of compounds **I** and **II**. *R*¹ = H/Ph, *R*² = H/OH, *R*³ = OH/H, respectively for compound **I** and **II**.

%H: 4.87; % O: 14.62. Found %C: 79.99; %H: 5.11; % O: 14.90.

8. Refinement

Crystal data, data collection and structure refinement details are summarized in Table 4. All hydrogen atoms were fixed geometrically at calculated positions (O—H = 0.84 Å, C—H = 0.95–0.99 Å) and refined as riding model with $U_{\text{iso}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{eq}}(\text{O})$ or $1.2U_{\text{eq}}(\text{C})$. A rotating model was used for the hydroxy groups.

Funding information

Funding for this research was provided by: Uniwersytet Łódzki, Uniwersytet Medyczny w Łodzi (grant No. SGB_148_Suchojad_Kamil to K. Suchojad; grant No. 502-03/3-066-02/502-34-118 to A. Adamus-Grabicka, E. Budzisz).

References

- Adamus-Grabicka, A., Markowicz-Piasecka, M., Ponczek, M. B., Kusz, J., Małecka, M., Krajewska, U. & Budzisz, E. (2018). *Molecules*, **23**, 3172–3188.
- Augustine, T., Vithiya, S. M., Ramkumar, V. & Kanakam, C. C. (2008). *Acta Cryst.* **E64**, o2080.
- Biruntha, K., Reuben Jonathan, D., Mohamooda Sumaya, U., Dravida Thendral, E. R. A. & Usha, G. (2018). *IUCrData*, **3**, x181273.
- Boonsri, S., Chantrapromma, S., Fun, H.-K., Karalai, C., Kanjanapras, A. & Anjum, S. (2005). *Acta Cryst.* **E61**, o3930–o3932.
- Brien, K. A., Bandi, R. K., Behera, A. K., Mishra, B. K., Majumdar, P., Satam, V., Savagian, M., Tzou, S., Lee, M., Zeller, M., Robles, A. J., Mooberry, S., Pati, H. & Lee, M. (2012). *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **345**, 341–348.
- Chantrapromma, S., Boonsri, S., Fun, H.-K., Anjum, S. & Kanjanapras, A. (2006). *Acta Cryst.* **E62**, o1254–o1256.
- Cheng, X.-M., Huang, Z.-T. & Zheng, Q.-Y. (2011). *Tetrahedron*, **67**, 9093–9098.
- Czaplińska, M., Czepas, J. & Gwoździński, K. (2012). *Post. Bioch.* **58**, 235–242.
- Dołowy, M. (2009). *Farm. Pol.* **65**(10), 689–693.
- Emami, S. & Ghanbarimasir, Z. (2015). *Eur. J. Med. Chem.* **93**, 539–563.
- Gopaul, K. & Koorbanally, N. A. (2012). Private Communication (refcode ????). CCDC, Cambridge, England.
- Gopaul, K., Koorbanally, N. A., Shaikh, M. M., Su, H. & Ramjugernath, D. (2012). *Acta Cryst.* **E68**, o3062.
- Gopaul, K., Shaikh, M. M., Koorbanally, N. A., Ramjugernath, D. & Omondi, B. (2012). *Acta Cryst.* **E68**, o1972.
- Gopaul, K., Shaikh, M., Ramjugernath, D., Koorbanally, N. A. & Omondi, B. (2012). *Acta Cryst.* **E68**, o1006.
- Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P. & Ward, S. C. (2016). *Acta Cryst.* **B72**, 171–179.
- Hassaine, R., Talhi, O., Taibi, N., Almeida Paz, F., Bensaid, O., Bachari, K. & Silva, A. M. S. (2016). *Synlett*, **27**, 465–470.
- Hirshfeld, H. L. (1977). *Theor. Chim. Acta*, **44**, 129–138.
- Ishikawa, Y. & Motohashi, Y. (2013a). *Acta Cryst.* **E69**, o1225.
- Ishikawa, Y. & Motohashi, Y. (2013b). *Acta Cryst.* **E69**, o1226.
- Jóźwiak, K., Szumiło, H. & Soczewiński, E. (2001). *Wiad. Chem.* **55**, 1047–1073.
- Katrusiak, A., Ratajczak-Sitarz, M., Kałuski, Z. & Orlov, V. D. (1987). *Acta Cryst.* **C43**, 103–105.
- Kupcewicz, B., Balcerowska-Czerniak, G., Małecka, M., Paneth, P., Krajewska, U. & Rozalski, M. (2013). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4102–4106.
- Kupcewicz, B., Małecka, M., Zapadka, M., Krajewska, U., Rozalski, M. & Budzisz, E. (2016). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**, 3336–3341.
- Lepitre, T., Denhez, C., Moncol, J., Othman, M., Lawson, A. M. & Daich, A. (2017). *J. Org. Chem.* **82**, 12188–12201.
- Levai, A. & Schag, J. B. (1979). *Pharmazie*, **34**, 748–749.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (2001). *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 3–26.
- Małecka, M. & Budzisz, E. (2014). *CrystEngComm* **16**, 6654–6663.
- Marx, A., Manivannan, V., Suresh, R., Kanagam, C. C. & Büyükgüngör, O. (2007). *Acta Cryst.* **E63**, o4383.
- Marx, A., Suresh, R., Kanagam, C. C., Manivannan, V. & Büyükgüngör, O. (2007). *Acta Cryst.* **E63**, o4530.
- Marx, A., Suresh, R., Kanagam, C. C., Manivannan, V. & Vasam, C. S. (2008). *Acta Cryst.* **E64**, o27.
- Monserat, J.-P., Tiwari, K. N., Quentin, L., Pigeon, P., Jaouen, G., Vessières, A., Chabot, G. G. & Hillard, E. A. (2013). *J. Organomet. Chem.* **734**, 78–85.
- Nijveldt, R. J., van Nood, E., van Hoorn, D., Boelens, P. G., van Norren, K. & van Leeuwen, P. (2001). *Am. J. Clin. Nutr.* **74**, 418–425.
- Perkin, W. H., Rây, J. N. & Robinson, R. (1926). *J. Chem. Soc.* **129**, 941–953.
- Pijewska, L., Kamecki, J. & Perka-Karolczak, W. (1993). *Pharmazie*, **48**, 254–257.
- Sheldrick, G. M. (2015a). *Acta Cryst.* **A71**, 3–8.
- Sheldrick, G. M. (2015b). *Acta Cryst.* **C71**, 3–8.
- Spackman, M. A. & Jayatilaka, D. (2009). *CrystEngComm*, **11**, 19–32.
- Stoe & Cie (2002). *X-AREA and X-RED32*. Stoe & Cie, Darmstadt, Germany.
- Suresh, R., Kanagam, C. C., Umarani, P. R., Manivannan, V. & Büyükgüngör, O. (2007). *Acta Cryst.* **E63**, o4248.
- Talhi, O., Brodziak-Jarosz, L., Panning, J., Orlikova, B., Zwergel, C., Tzanova, T., Philippot, S., Pinto, D. C. G. A., Paz, F. A. A., Gerhäuser, C., Dick, T. P., Jacob, C., Diederich, M., Bagrel, D., Kirsch, G. & Silva, A. M. S. (2016). *Eur. J. Org. Chem.* pp. 965–975.
- Turner, M. J., McKinnon, J. J., Wolff, S. K., Grimwood, D. J., Spackman, P. R., Jayatilaka, D. & Spackman, M. A. (2017). *CrystalExplorer17*. The University of Western Australia.
- Valkonen, A., Laihia, K., Kolehmainen, E., Kauppinen, R. & Perjési, P. (2012). *Struct. Chem.* **23**, 209–217.
- Westrip, S. P. (2010). *J. Appl. Cryst.* **43**, 920–925.
- Williams, R. J., Spencer, J. P. & Rice-Evans, C. (2004). *Free Radical Biol. Med.* **36**, 838–849.
- Wu, Ch., Liu, Y., Zeng, H., Liu, L., Wang, D. & Chen, Y. (2011). *Org. Biomol. Chem.* **9**, 253–256.
- Wu, Ch., Zeng, H., Liu, L., Wang, D. & Chen, Y. (2011). *Tetrahedron*, **67**, 1231–1237.
- Zhang, H.-J., Becker, P., Huang, H., Pirwerdjan, R., Pan, F.-F. & Bolm, C. (2012). *Adv. Synth. Catal.* **354**, 2157–2161.
- Zhang, Y., Lv, Z., Zhang, M. & Li, K. (2013). *Tetrahedron*, **69**, 8839–8846.
- Zhong, N.-J., Liu, L., Wang, D. & Chen, Y.-J. (2013). *Chem. Commun.* **49**, 3697–3699.
- Zimmerman, J. R., Johntony, O., Steigerwald, D., Criss, C., Myers, B. J. & Kinder, D. H. (2015). *Org. Lett.* **17**, 3256–3259.

supporting information

Acta Cryst. (2019). E75, 1907-1913 [https://doi.org/10.1107/S2056989019015639]

Crystal structures of (*E*)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one and (*E*)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one

Kamil Suchojad, Anna Dołęga, Angelika Adamus-Grabicka, Elżbieta Budzisz and Magdalena Małecka

Computing details

For both structures, data collection: *X-AREA* (Stoe & Cie, 2002); cell refinement: *X-AREA* (Stoe & Cie, 2002); data reduction: *X-AREA* (Stoe & Cie, 2002), *X-RED32* (Stoe & Cie, 2002); program(s) used to solve structure: SHELXT (Sheldrick, 2015a); program(s) used to refine structure: *SHELXL2014/7* (Sheldrick, 2015b); software used to prepare material for publication: *SHELXL2014/7* (Sheldrick, 2015b), *publCIF* (Westrip, 2010).

(*E*)-3-(4-Hydroxybenzylidene)chroman-4-one (I)

Crystal data

$C_{16}H_{12}O_3$

$M_r = 252.27$

Monoclinic, $P2_1/c$

$a = 3.8510(2) \text{ \AA}$

$b = 22.2541(11) \text{ \AA}$

$c = 13.7837(9) \text{ \AA}$

$\beta = 96.766(5)^\circ$

$V = 1173.04(11) \text{ \AA}^3$

$Z = 4$

$F(000) = 528$

$D_x = 1.428 \text{ Mg m}^{-3}$

Melting point: 220 K

Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$

Cell parameters from 219 reflections

$\theta = 4.1\text{--}28.9^\circ$

$\mu = 0.10 \text{ mm}^{-1}$

$T = 120 \text{ K}$

Needle, light-yellow

$0.4 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}$

Data collection

STOE IPDS 2T

diffractometer

Radiation source: GeniX Mo, $0.05 \times 0.05 \text{ mm}^2$

microfocus

Detector resolution: $6.67 \text{ pixels mm}^{-1}$

rotation method, ω scans

7027 measured reflections

2413 independent reflections

1618 reflections with $I > 2\sigma(I)$

$R_{\text{int}} = 0.050$

$\theta_{\text{max}} = 26.5^\circ$, $\theta_{\text{min}} = 3.7^\circ$

$h = -4 \rightarrow 4$

$k = -27 \rightarrow 27$

$l = -16 \rightarrow 17$

Refinement

Refinement on F^2

Least-squares matrix: full

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.048$

$wR(F^2) = 0.115$

$S = 1.02$

2413 reflections

173 parameters

0 restraints

Primary atom site location: difference Fourier map

Secondary atom site location: difference Fourier map

Hydrogen site location: inferred from neighbouring sites

H-atom parameters constrained

$$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0546P)^2 + 0.2287P]$$

where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
 $(\Delta/\sigma)_{\max} < 0.001$

$$\Delta\rho_{\max} = 0.19 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$$

$$\Delta\rho_{\min} = -0.19 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$$

Special details

Geometry. All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
O3	0.5127 (4)	0.21588 (6)	0.68339 (10)	0.0282 (4)
H3	0.5952	0.1823	0.6701	0.042*
O4	−0.1988 (4)	0.39218 (6)	0.15977 (10)	0.0304 (4)
O1	0.2599 (4)	0.50810 (6)	0.36926 (10)	0.0252 (4)
C9	0.1347 (5)	0.52849 (8)	0.27851 (14)	0.0217 (4)
C17	0.3626 (5)	0.25884 (8)	0.42639 (15)	0.0218 (4)
H17	0.4012	0.2441	0.3639	0.026*
C3	0.0393 (5)	0.40641 (8)	0.32620 (14)	0.0207 (4)
C14	0.2335 (5)	0.29994 (8)	0.60754 (15)	0.0216 (4)
H14	0.1846	0.3135	0.6698	0.026*
C11	0.0949 (5)	0.34735 (8)	0.34238 (15)	0.0219 (4)
H11	0.0614	0.3229	0.2856	0.026*
C10	−0.0381 (5)	0.49118 (8)	0.20685 (15)	0.0217 (4)
C12	0.1982 (5)	0.31486 (8)	0.43307 (14)	0.0200 (4)
C13	0.1298 (5)	0.33398 (8)	0.52539 (15)	0.0219 (4)
H13	0.0104	0.3709	0.5318	0.026*
C8	0.2011 (6)	0.58826 (9)	0.25768 (15)	0.0256 (5)
H8	0.3229	0.6133	0.3061	0.031*
C15	0.4089 (5)	0.24590 (8)	0.59954 (15)	0.0208 (4)
C7	0.0889 (6)	0.61086 (9)	0.16621 (16)	0.0277 (5)
H7	0.1330	0.6518	0.1523	0.033*
C4	−0.0782 (5)	0.42671 (9)	0.22612 (14)	0.0216 (4)
C2	0.0920 (6)	0.45481 (8)	0.40230 (15)	0.0227 (4)
H2A	−0.1381	0.4662	0.4220	0.027*
H2B	0.2363	0.4387	0.4607	0.027*
C6	−0.0882 (6)	0.57486 (9)	0.09380 (16)	0.0283 (5)
H6	−0.1649	0.5909	0.0311	0.034*
C5	−0.1499 (6)	0.51545 (9)	0.11493 (15)	0.0249 (5)
H5	−0.2708	0.4906	0.0661	0.030*
C16	0.4693 (5)	0.22483 (8)	0.50797 (15)	0.0217 (4)
H16	0.5830	0.1874	0.5018	0.026*

Atomic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
O3	0.0407 (9)	0.0236 (7)	0.0200 (8)	0.0065 (7)	0.0022 (7)	0.0031 (6)

O4	0.0459 (10)	0.0235 (7)	0.0198 (8)	−0.0049 (7)	−0.0044 (7)	−0.0004 (6)
O1	0.0305 (8)	0.0209 (7)	0.0231 (8)	−0.0046 (6)	−0.0020 (6)	0.0006 (6)
C9	0.0221 (11)	0.0231 (10)	0.0200 (11)	0.0031 (8)	0.0023 (8)	0.0014 (8)
C17	0.0266 (11)	0.0229 (10)	0.0160 (10)	−0.0013 (8)	0.0025 (8)	−0.0018 (8)
C3	0.0204 (10)	0.0223 (9)	0.0190 (11)	−0.0003 (8)	0.0015 (8)	0.0008 (8)
C14	0.0257 (11)	0.0199 (9)	0.0192 (11)	−0.0036 (8)	0.0030 (8)	−0.0029 (7)
C11	0.0229 (11)	0.0242 (10)	0.0179 (11)	−0.0002 (8)	−0.0003 (8)	−0.0023 (8)
C10	0.0240 (11)	0.0200 (9)	0.0212 (11)	0.0025 (8)	0.0036 (9)	0.0006 (8)
C12	0.0205 (10)	0.0215 (9)	0.0178 (10)	−0.0019 (8)	0.0009 (8)	−0.0008 (8)
C13	0.0218 (10)	0.0192 (10)	0.0245 (11)	−0.0005 (8)	0.0015 (8)	−0.0001 (8)
C8	0.0271 (12)	0.0228 (10)	0.0276 (12)	−0.0012 (8)	0.0052 (9)	−0.0029 (8)
C15	0.0228 (10)	0.0198 (9)	0.0190 (10)	−0.0023 (8)	−0.0010 (8)	0.0035 (8)
C7	0.0345 (13)	0.0200 (10)	0.0303 (13)	0.0021 (9)	0.0111 (10)	0.0028 (8)
C4	0.0235 (11)	0.0234 (10)	0.0169 (11)	0.0013 (8)	−0.0014 (8)	−0.0001 (8)
C2	0.0280 (11)	0.0203 (9)	0.0193 (11)	−0.0016 (8)	0.0000 (9)	0.0005 (8)
C6	0.0326 (12)	0.0275 (11)	0.0256 (12)	0.0066 (9)	0.0070 (9)	0.0055 (9)
C5	0.0285 (12)	0.0250 (10)	0.0211 (11)	0.0024 (8)	0.0024 (9)	−0.0008 (8)
C16	0.0249 (11)	0.0169 (9)	0.0231 (11)	0.0006 (8)	0.0024 (9)	−0.0005 (8)

Geometric parameters (Å, °)

O3—C15	1.354 (2)	C11—H11	0.9500
O3—H3	0.8400	C10—C5	1.398 (3)
O4—C4	1.242 (2)	C10—C4	1.471 (3)
O1—C9	1.364 (2)	C12—C13	1.396 (3)
O1—C2	1.450 (2)	C13—H13	0.9500
C9—C8	1.391 (3)	C8—C7	1.379 (3)
C9—C10	1.397 (3)	C8—H8	0.9500
C17—C16	1.378 (3)	C15—C16	1.392 (3)
C17—C12	1.406 (3)	C7—C6	1.394 (3)
C17—H17	0.9500	C7—H7	0.9500
C3—C11	1.346 (3)	C2—H2A	0.9900
C3—C4	1.471 (3)	C2—H2B	0.9900
C3—C2	1.501 (3)	C6—C5	1.381 (3)
C14—C13	1.382 (3)	C6—H6	0.9500
C14—C15	1.390 (3)	C5—H5	0.9500
C14—H14	0.9500	C16—H16	0.9500
C11—C12	1.458 (3)		
C15—O3—H3	109.5	C7—C8—H8	120.3
C9—O1—C2	115.95 (15)	C9—C8—H8	120.3
O1—C9—C8	116.97 (18)	O3—C15—C14	117.16 (18)
O1—C9—C10	122.55 (17)	O3—C15—C16	122.95 (18)
C8—C9—C10	120.40 (18)	C14—C15—C16	119.89 (18)
C16—C17—C12	121.80 (19)	C8—C7—C6	121.30 (19)
C16—C17—H17	119.1	C8—C7—H7	119.4
C12—C17—H17	119.1	C6—C7—H7	119.4
C11—C3—C4	118.72 (18)	O4—C4—C10	120.57 (18)

C11—C3—C2	125.41 (18)	O4—C4—C3	123.19 (18)
C4—C3—C2	115.86 (16)	C10—C4—C3	116.22 (17)
C13—C14—C15	120.37 (19)	O1—C2—C3	113.35 (16)
C13—C14—H14	119.8	O1—C2—H2A	108.9
C15—C14—H14	119.8	C3—C2—H2A	108.9
C3—C11—C12	130.40 (19)	O1—C2—H2B	108.9
C3—C11—H11	114.8	C3—C2—H2B	108.9
C12—C11—H11	114.8	H2A—C2—H2B	107.7
C5—C10—C9	118.78 (18)	C5—C6—C7	118.8 (2)
C5—C10—C4	120.86 (18)	C5—C6—H6	120.6
C9—C10—C4	120.22 (18)	C7—C6—H6	120.6
C13—C12—C17	117.70 (18)	C6—C5—C10	121.3 (2)
C13—C12—C11	124.65 (18)	C6—C5—H5	119.4
C17—C12—C11	117.57 (17)	C10—C5—H5	119.4
C14—C13—C12	120.83 (18)	C17—C16—C15	119.31 (18)
C14—C13—H13	119.6	C17—C16—H16	120.3
C12—C13—H13	119.6	C15—C16—H16	120.3
C7—C8—C9	119.48 (19)		

Hydrogen-bond geometry ($\text{\AA}$, $^\circ$)

$D-H\cdots A$	$D-H$	$H\cdots A$	$D\cdots A$	$D-H\cdots A$
C11—H11 $\cdots$ O3 ⁱ	0.95	2.55	3.264 (2)	132
C11—H11 $\cdots$ O3 ⁱⁱ	0.95	2.52	3.194 (2)	129
O3—H3 $\cdots$ O4 ⁱⁱⁱ	0.84	1.85	2.6852 (19)	172
C2—H2A $\cdots$ O1 ^{iv}	0.99	2.53	3.397 (3)	147
C11—H11 $\cdots$ O4	0.95	2.45	2.818 (2)	103

Symmetry codes: (i) $x-1, -y+1/2, z-1/2$; (ii) $x, -y+1/2, z-1/2$; (iii) $x+1, -y+1/2, z+1/2$; (iv) $x-1, y, z$.

(*E*)-3-(3-Hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (II)

Crystal data

$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_3$
 $M_r = 328.37$
 Triclinic, $P\bar{1}$
 $a = 5.3969$ (6) $\text{\AA}$
 $b = 11.6576$ (16) $\text{\AA}$
 $c = 12.944$ (2) $\text{\AA}$
 $\alpha = 91.992$ (12) $^\circ$
 $\beta = 98.282$ (10) $^\circ$
 $\gamma = 97.568$ (10) $^\circ$
 $V = 797.68$ (19) $\text{\AA}^3$
 $Z = 2$

$F(000) = 344$
 $D_x = 1.367$ Mg m^{-3}
 Melting point: 210 K
 Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71073$ $\text{\AA}$
 Cell parameters from 3650 reflections
 $\theta = 3.5\text{--}29.5^\circ$
 $\mu = 0.09$ mm^{-1}
 $T = 120$ K
 Plate, colourless
 $0.8 \times 0.2 \times 0.05$ mm

Data collection

STOE IPDS 2T
 diffractometer
 Radiation source: GeniX Mo, 0.05 x 0.05 mm²
 microfocus
 Detector resolution: 6.67 pixels mm^{-1}

rotation method, ω scans
 6849 measured reflections
 3281 independent reflections
 1804 reflections with $I > 2\sigma(I)$
 $R_{\text{int}} = 0.077$

$\theta_{\max} = 26.5^\circ$, $\theta_{\min} = 3.5^\circ$
 $h = -6 \rightarrow 6$

$k = -13 \rightarrow 14$
 $l = -16 \rightarrow 16$

Refinement

Refinement on F^2
 Least-squares matrix: full
 $R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.068$
 $wR(F^2) = 0.200$
 $S = 0.94$
 3281 reflections
 228 parameters
 0 restraints
 Primary atom site location: difference Fourier
 map

Secondary atom site location: difference Fourier
 map
 Hydrogen site location: inferred from
 neighbouring sites
 H-atom parameters constrained
 $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.1159P)^2]$
 where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$
 $(\Delta/\sigma)_{\max} < 0.001$
 $\Delta\rho_{\max} = 0.23 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$
 $\Delta\rho_{\min} = -0.29 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$

Special details

Geometry. All esds (except the esd in the dihedral angle between two l.s. planes) are estimated using the full covariance matrix. The cell esds are taken into account individually in the estimation of esds in distances, angles and torsion angles; correlations between esds in cell parameters are only used when they are defined by crystal symmetry. An approximate (isotropic) treatment of cell esds is used for estimating esds involving l.s. planes.

Fractional atomic coordinates and isotropic or equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2$)

	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	$U_{\text{iso}}^*/U_{\text{eq}}$
O1	0.1107 (4)	0.13471 (17)	0.24184 (16)	0.0423 (6)
O4	0.7889 (4)	0.30522 (17)	0.39197 (16)	0.0432 (6)
O3	-0.1593 (4)	0.6939 (2)	0.44060 (17)	0.0503 (6)
H3	-0.0545	0.6964	0.4956	0.075*
C10	0.5289 (5)	0.1266 (2)	0.3391 (2)	0.0365 (7)
C17	0.1145 (5)	0.5660 (2)	0.3820 (2)	0.0390 (7)
H17	0.1940	0.5611	0.4518	0.047*
C9	0.2888 (5)	0.0736 (3)	0.2913 (2)	0.0386 (7)
C3	0.3849 (5)	0.3163 (3)	0.2945 (2)	0.0378 (7)
C7	0.3920 (6)	-0.1113 (3)	0.3446 (2)	0.0453 (8)
H7	0.3455	-0.1925	0.3474	0.054*
C5	0.6977 (6)	0.0575 (3)	0.3885 (2)	0.0405 (7)
H5	0.8608	0.0925	0.4207	0.049*
C4	0.5884 (5)	0.2528 (3)	0.3452 (2)	0.0370 (7)
C15	-0.1803 (6)	0.6487 (3)	0.2598 (2)	0.0431 (8)
H15	-0.3077	0.6973	0.2454	0.052*
C16	-0.0743 (5)	0.6358 (3)	0.3619 (2)	0.0401 (7)
C11	0.3763 (5)	0.4240 (3)	0.3311 (2)	0.0385 (7)
H11	0.5114	0.4544	0.3843	0.046*
C12	0.1891 (5)	0.5030 (2)	0.3014 (2)	0.0378 (7)
C8	0.2210 (6)	-0.0459 (3)	0.2943 (2)	0.0431 (7)
H8	0.0587	-0.0818	0.2620	0.052*
C13	0.0823 (6)	0.5165 (3)	0.1989 (3)	0.0442 (8)
H13	0.1332	0.4755	0.1427	0.053*
C14	-0.0998 (6)	0.5905 (3)	0.1791 (2)	0.0440 (8)
H14	-0.1694	0.6010	0.1090	0.053*

C2	0.2058 (5)	0.2476 (2)	0.2083 (2)	0.0376 (7)
H2	0.0587	0.2908	0.1899	0.045*
C21	0.3266 (5)	0.2321 (3)	0.1100 (2)	0.0387 (7)
C22	0.2451 (7)	0.1373 (3)	0.0408 (2)	0.0517 (9)
H22	0.1084	0.0819	0.0531	0.062*
C6	0.6322 (6)	−0.0602 (3)	0.3915 (2)	0.0440 (8)
H6	0.7491	−0.1062	0.4251	0.053*
C26	0.5228 (6)	0.3134 (3)	0.0894 (2)	0.0493 (8)
H26	0.5783	0.3797	0.1357	0.059*
C23	0.3612 (8)	0.1222 (3)	−0.0467 (3)	0.0632 (11)
H23	0.3042	0.0566	−0.0938	0.076*
C24	0.5596 (7)	0.2024 (4)	−0.0654 (3)	0.0593 (10)
H24	0.6417	0.1913	−0.1244	0.071*
C25	0.6382 (6)	0.2991 (3)	0.0022 (3)	0.0558 (9)
H25	0.7716	0.3556	−0.0114	0.067*

Atomic displacement parameters (Å²)

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{12}	U^{13}	U^{23}
O1	0.0412 (11)	0.0325 (12)	0.0520 (13)	0.0005 (9)	0.0064 (10)	0.0075 (10)
O4	0.0394 (11)	0.0355 (12)	0.0525 (13)	0.0035 (10)	0.0017 (10)	−0.0001 (10)
O3	0.0553 (13)	0.0463 (14)	0.0510 (13)	0.0193 (11)	0.0022 (10)	0.0025 (11)
C10	0.0432 (16)	0.0317 (17)	0.0372 (15)	0.0082 (13)	0.0115 (13)	0.0044 (12)
C17	0.0413 (16)	0.0267 (16)	0.0469 (17)	0.0024 (13)	0.0014 (13)	0.0043 (13)
C9	0.0412 (16)	0.0344 (17)	0.0416 (16)	0.0037 (13)	0.0122 (13)	0.0036 (13)
C3	0.0397 (15)	0.0375 (17)	0.0372 (16)	0.0058 (13)	0.0083 (13)	0.0043 (13)
C7	0.0550 (19)	0.0309 (17)	0.0522 (19)	0.0020 (15)	0.0195 (15)	0.0020 (14)
C5	0.0438 (16)	0.0377 (18)	0.0419 (16)	0.0075 (14)	0.0108 (13)	0.0049 (13)
C4	0.0406 (16)	0.0363 (17)	0.0343 (15)	0.0048 (14)	0.0077 (13)	−0.0015 (12)
C15	0.0397 (16)	0.0345 (17)	0.0538 (18)	0.0054 (13)	0.0007 (14)	0.0081 (14)
C16	0.0428 (16)	0.0294 (16)	0.0478 (18)	0.0044 (13)	0.0063 (14)	0.0033 (13)
C11	0.0410 (16)	0.0328 (17)	0.0426 (16)	0.0055 (13)	0.0082 (13)	0.0057 (13)
C12	0.0383 (15)	0.0275 (16)	0.0469 (17)	0.0018 (13)	0.0053 (13)	0.0053 (13)
C8	0.0455 (16)	0.0343 (18)	0.0504 (18)	0.0023 (14)	0.0134 (14)	0.0009 (14)
C13	0.0481 (17)	0.0372 (18)	0.0479 (17)	0.0061 (14)	0.0079 (14)	0.0074 (14)
C14	0.0477 (17)	0.0373 (18)	0.0473 (18)	0.0074 (14)	0.0055 (14)	0.0087 (14)
C2	0.0374 (15)	0.0285 (16)	0.0463 (17)	0.0015 (12)	0.0063 (13)	0.0070 (13)
C21	0.0391 (15)	0.0376 (17)	0.0390 (16)	0.0077 (13)	0.0016 (13)	0.0051 (13)
C22	0.064 (2)	0.041 (2)	0.0476 (19)	0.0048 (17)	0.0052 (16)	−0.0032 (15)
C6	0.0511 (18)	0.0351 (18)	0.0492 (18)	0.0124 (14)	0.0117 (15)	0.0086 (14)
C26	0.0465 (18)	0.058 (2)	0.0433 (18)	0.0043 (16)	0.0078 (15)	0.0034 (16)
C23	0.087 (3)	0.057 (2)	0.046 (2)	0.023 (2)	0.0006 (19)	−0.0052 (17)
C24	0.059 (2)	0.079 (3)	0.0456 (19)	0.032 (2)	0.0082 (17)	0.0074 (19)
C25	0.0512 (19)	0.070 (3)	0.0469 (19)	0.0052 (18)	0.0094 (15)	0.0139 (18)

Geometric parameters (Å, °)

O1—C9	1.369 (3)	C15—H15	0.9500
O1—C2	1.453 (3)	C11—C12	1.475 (4)
O4—C4	1.234 (3)	C11—H11	0.9500
O3—C16	1.370 (4)	C12—C13	1.391 (4)
O3—H3	0.8400	C8—H8	0.9500
C10—C5	1.397 (4)	C13—C14	1.393 (4)
C10—C9	1.405 (4)	C13—H13	0.9500
C10—C4	1.460 (4)	C14—H14	0.9500
C17—C12	1.392 (4)	C2—C21	1.526 (4)
C17—C16	1.388 (4)	C2—H2	1.0000
C17—H17	0.9500	C21—C22	1.381 (4)
C9—C8	1.396 (4)	C21—C26	1.388 (4)
C3—C11	1.335 (4)	C22—C23	1.387 (5)
C3—C4	1.492 (4)	C22—H22	0.9500
C3—C2	1.499 (4)	C6—H6	0.9500
C7—C8	1.380 (4)	C26—C25	1.381 (4)
C7—C6	1.396 (4)	C26—H26	0.9500
C7—H7	0.9500	C23—C24	1.381 (5)
C5—C6	1.374 (4)	C23—H23	0.9500
C5—H5	0.9500	C24—C25	1.383 (5)
C15—C14	1.378 (4)	C24—H24	0.9500
C15—C16	1.383 (4)	C25—H25	0.9500
C9—O1—C2	115.9 (2)	C7—C8—H8	120.3
C16—O3—H3	109.5	C9—C8—H8	120.3
C5—C10—C9	118.8 (3)	C12—C13—C14	119.7 (3)
C5—C10—C4	121.1 (3)	C12—C13—H13	120.1
C9—C10—C4	119.8 (2)	C14—C13—H13	120.1
C12—C17—C16	120.9 (3)	C15—C14—C13	121.0 (3)
C12—C17—H17	119.5	C15—C14—H14	119.5
C16—C17—H17	119.5	C13—C14—H14	119.5
O1—C9—C8	117.0 (3)	O1—C2—C3	111.0 (2)
O1—C9—C10	122.8 (3)	O1—C2—C21	109.4 (2)
C8—C9—C10	120.2 (3)	C3—C2—C21	112.3 (2)
C11—C3—C4	118.3 (3)	O1—C2—H2	108.0
C11—C3—C2	127.3 (3)	C3—C2—H2	108.0
C4—C3—C2	114.4 (2)	C21—C2—H2	108.0
C8—C7—C6	121.1 (3)	C22—C21—C26	118.9 (3)
C8—C7—H7	119.5	C22—C21—C2	121.1 (3)
C6—C7—H7	119.5	C26—C21—C2	120.1 (3)
C6—C5—C10	121.2 (3)	C21—C22—C23	120.6 (3)
C6—C5—H5	119.4	C21—C22—H22	119.7
C10—C5—H5	119.4	C23—C22—H22	119.7
O4—C4—C10	123.2 (3)	C5—C6—C7	119.3 (3)
O4—C4—C3	121.2 (3)	C5—C6—H6	120.3
C10—C4—C3	115.6 (3)	C7—C6—H6	120.3

C14—C15—C16	119.6 (3)	C25—C26—C21	120.7 (3)
C14—C15—H15	120.2	C25—C26—H26	119.6
C16—C15—H15	120.2	C21—C26—H26	119.6
O3—C16—C15	118.4 (2)	C24—C23—C22	120.1 (3)
O3—C16—C17	121.8 (3)	C24—C23—H23	120.0
C15—C16—C17	119.8 (3)	C22—C23—H23	120.0
C3—C11—C12	129.9 (3)	C23—C24—C25	119.7 (3)
C3—C11—H11	115.1	C23—C24—H24	120.2
C12—C11—H11	115.1	C25—C24—H24	120.2
C17—C12—C13	118.9 (2)	C26—C25—C24	120.0 (4)
C17—C12—C11	117.1 (3)	C26—C25—H25	120.0
C13—C12—C11	124.1 (3)	C24—C25—H25	120.0
C7—C8—C9	119.4 (3)		

Hydrogen-bond geometry (Å, °)

<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H	H $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> $\cdots$ <i>A</i>	<i>D</i> —H $\cdots$ <i>A</i>
O3—H3 $\cdots$ O4 ⁱ	0.84	1.89	2.728 (3)	172
C17—H17 $\cdots$ O4 ⁱ	0.95	2.49	3.184 (4)	130
C6—H6 $\cdots$ O3 ⁱⁱ	0.95	2.45	3.265 (4)	143
C11—H11 $\cdots$ O4	0.95	2.43	2.807 (3)	103

Symmetry codes: (i) $-x+1, -y+1, -z+1$; (ii) $x+1, y-1, z$.

Publikacja 3

- 3. Biological evaluation of 3-benzylidenechromanones and their spiropyrazolines-based analogues**

3.1. Badania biologiczne analogów 3-benzylidenochromanonów i spiropirazolin

Ostatnia z cyklu praca dotyczyła badania aktywności biologicznej analogów pirazolin skondensowanych z chromanonem lub flawanonem. W publikacji omówiono dwanaście związków w celu porównania ich aktywności biologicznej, z czego dziesięć z nich zostało zsyntezowanych jako pary: 3-benzylidenochromanony/flawanony podstawione różnymi grupami funkcyjnymi i spiropirazoliny. Synteza związków spiro-1-pirazolin polegała na reakcji odpowiednich pochodnych 3-benzylidenochromanonów z eterowym roztworem diazometanu w temperaturze 0°C. Produkt wypadł zwykle po 24 – 48 godzinach przechowywania kolby w zamrażarce. Każdy z otrzymanych związków scharakteryzowano metodami fizykochemicznymi i przeprowadzono badanie cytotoksyczności, sprawdzono oddziaływanie z błonami erytrocytów oraz wyznaczono parametr lipofilowości. Dla wybranych związków wykazujących najbardziej obiecujące działanie cytotoksyczne przeprowadzono analizę cyklu komórkowego oraz trawienie plazmidowego DNA. Aktywność cytotoksyczną oznaczono testem MTT wobec czterech nowotworowych linii komórkowych: HL-60 (białaczka promielocytowa), NALM-6 (ostra białaczka limfoblastyczna), WM-115 (czerniak) oraz COLO-205 (rak okrężnicy). Wyniki wskazują, że pirazoliny skondensowane z flawanonem (związki **2**, **6**, **10**) działają najbardziej cytotoksycznie wobec komórek nowotworowych spośród innych badanych związków. Porównując aktywność biologiczną par 3-benzylidenoflawanon – spiroflawanon można zauważyć, że to związki spiro działają bardziej toksycznie na komórki nowotworowe niż arylidenoflawanony. W przypadku związku numer **6** sytuacja jest nieco inna, ponieważ działa on lepiej niż związek **5** tylko na linię COLO-205 natomiast w przypadku komórek HL-60 nie wykazuje cytotoksyczności. Niestety wśród par arylidenochromanonów – spirochromanonów nie można zaobserwować podobnej tendencji. Związki **4** i **8** wykazują wysoką wartość IC₅₀ w porównaniu do ich pochodnych **3** i **7**. Jedynie wobec linii komórkowej COLO-205 związek **4** wykazuje ośmiokrotnie wyższą cytotoksyczność niż związek **3**. W porównaniu do związków referencyjnych podobnych strukturalnie prawie wszystkie zsyntezowane związki wykazują bardziej toksyczne działanie na komórki nowotworowe. Biorąc pod uwagę cisplatynę znaną od lat w leczeniu nowotworów to lepiej działają na komórki

czerniaka związki **2**, **7**, **9**, **11**, **12**, natomiast na raka okrężnicy działanie bardziej cytotoksyczne wykazują **1**, **2**, **4**, **7**. Wszystkie badane związki zostały poddane ocenie hemokompatybilności. W wyższych stężeniach niektóre związki zwiększały tempo hemolizy, jednak wartości te nie przekroczyły 5%, co oznacza, że nie występuje ryzyko patologicznej hemolizy w warunkach *in vivo*. W celu uzupełnienia powyższych badań przeprowadzono ocenę morfologii erytrocytów. Ekspozycja krwinek czerwonych *in vitro* na różne stężenia badanych związków spowodowała powstawanie echinocytów. Niemniej jednak proces transformacji erytrocytów dwuwklęsłych w echinocyty zachodzi naturalnie w naczyniach krwionośnych i wynika z wprowadzenia ksenobiotyków do zewnętrznej monowarstwy błony erytrocytów. Ponieważ jest to proces odwracalny spowodowany szeregiem czynników fizykochemicznych, można założyć, że badane związki nie wpływają na erytrocyty w sposób patologiczny. W kolejnym etapie zbadano wpływ wybranych związków na postęp cyklu komórkowego w komórkach białaczki HL-60. Wybrano związki działające najbardziej cytotoksycznie oraz kwercetynę jako związek referencyjny. Badane związki indukowały blok mitozy w fazie G2/M. Najlepszy wynik i zbliżony do kwercetyny zaobserwowano dla związków **2**, **10**, **11** i **12**. W obecności tych związków około 50%–60% komórek nowotworowych zostało zatrzymanych w fazie G2/M. Wyniki te potwierdzają, że badane związki mają silny wpływ na cykl komórkowy i zatrzymują komórki HL-60 w fazie G2/M. Struktury chemiczne testowanych związków sugerują, że mogą one interkalować z dwuniciowymi kwasami nukleinowymi. Aby potwierdzić tę hipotezę, plazmidowy DNA inkubowano z badanymi związkami, a następnie trawiono endonukleazą BamH1. Plazmid pcDNA3.1 HisC zawiera unikalne miejsce restrykcyjne dla enzymu BamH1. Pod wpływem trawienia enzymem BamH1 plazmid ten ulega przekształceniu do postaci liniowej. Jako kontrolę dla tego eksperymentu zastosowano daunorubicynę, która jest silnym interkalatorem do dwuniciowych kwasów nukleinowych. W obecności daunorubicyny praktycznie nie zaobserwowano trawienia plazmidowego DNA pod wpływem enzymu BamH1. Zauważono natomiast, że w obecności badanych związków plazmidowy DNA ulega częściowemu trawieniu przez enzym restrykcyjny Bam H1. Pojawia się forma liniowa plazmidu, jednakże obecna jest także forma kolista. Wynik ten świadczy, że badane związki mogą być interkalatorami DNA.

Aktywność biologiczna cząsteczki związku chemicznego związana jest bezpośrednio z jego właściwościami chemicznymi i fizycznymi. Dlatego do opisu zależności struktura – aktywność biologiczna związku zastosowano parametr lipofilowości opisujący zdolność związku do przenikania przez błony biologiczne. Lipofilowość to najważniejszy czynnik determinujący zachowanie się związku chemicznego *in vivo*. Wyniki $\log P$ wskazują, że badane związki mają charakter lipofilowy. Wartości wahają się od 4,08 do 5,88 dla wszystkich badanych związków z wyjątkiem **8** ($\log P = 2,35$), co wskazuje na możliwy związek między lipofilnością a strukturą chemiczną. Związek **2** wykazał pewną zależność pod względem struktury i aktywności cytotoksycznej w stosunku do związku **8**. Można to przypisać jego bardziej przestrzennej strukturze, w której podstawnik fenyłowy jest przyłączony w pozycji C2. Podobny trend można zaobserwować dla analogów benzylideneflanwonu, wszystkie związki z pierścieniem fenyłowym w pozycji C2 mają wyższe wartości $\log P$. Lipofilowość związku zależy nie tylko od jego budowy chemicznej ale również obecności grupy funkcyjnej. Podstawnik fenyłowego lub metoksyłowy zwiększa wartość $\log P$. Aktywność biologiczna związków wzrasta wraz z lipofilnością, ale nie może przekraczać wartości maksymalnej. Zgodnie z regułą Lipińskiego i zasadą *drug-likeness* związki o wyższej lipofilności mogą być dobrymi kandydatami na leki. Oczywiście należy przeprowadzić jeszcze szereg dodatkowych badań aby sprawdzić i lepiej poznać zależność między strukturą chemiczną, a aktywnością biologiczną i lipofilowością związków, które mogą w przyszłości zastąpić dotychczas stosowane chemioterapeutyki.

Article

Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues

Angelika A. Adamus-Grabicka ¹, Magdalena Markowicz-Piasecka ², Marcin Cieślak ³, Karolina Królewska-Golińska ³, Paweł Hikisz ⁴, Joachim Kusz ⁵, Magdalena Małecka ⁶ and Elzbieta Budzisz ^{1,*}

¹ Department of Cosmetic Raw Materials Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; angelika.adamus@umed.lodz.pl

² Laboratory of Bioanalysis, Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy, Medical University of Lodz, Muszynskiego 1, 90-151 Lodz, Poland; magdalena.markowicz@umed.lodz.pl

³ Centre of Molecular and Macromolecular Studies, Polish Academy of Sciences, Sienkiewicza 112, 90-363 Lodz, Poland; marcin@cbmm.lodz.pl (M.C.); kkrolews@cbmm.lodz.pl (K.K.-G.)

⁴ Department of Molecular Biophysics, Faculty of Biology and Environmental Protection, University of Lodz, Pomorska 141/143, 90-236 Lodz, Poland; pawel.hikisz@biol.uni.lodz.pl

⁵ Institute of Physics, University of Silesia, Uniwersytecka 4, 40-007 Katowice, Poland; joachim.kusz@us.edu.pl

⁶ Department of Physical Chemistry, Theoretical and Structural Chemistry Group, Faculty of Chemistry, University of Lodz, Pomorska 163/165, 90-236 Lodz, Poland; magdalena.malecka@chemia.uni.lodz.pl

* Correspondence: elzbieta.budzisz@umed.lodz.pl; Tel.: +48-42-272-55-95

Received: 8 February 2020; Accepted: 30 March 2020; Published: 1 April 2020



Abstract: A series of 3-benzylidenechromanones **1**, **3**, **5**, **7**, **9** and their spiropyrazoline analogues **2**, **4**, **6**, **8**, **10** were synthesized. X-ray analysis confirms that compounds **2** and **8** crystallize in a monoclinic system in P₂₁/n space groups with one and three molecules in each asymmetric unit. The crystal lattice of the analyzed compounds is enhanced by hydrogen bonds. The primary aim of the study was to evaluate the anti-proliferative potential of 3-benzylidenechromanones and their spiropyrazoline analogues towards four cancer cell lines. Our results indicate that parent compounds **1** and **9** with a phenyl ring at C2 have lower cytotoxic activity against cancer cell lines than their spiropyrazolines analogues. Analysis of IC₅₀ values showed that the compounds **3** and **7** exhibited higher cytotoxic activity against cancer cells, being more active than the reference compound (4-chromanone or quercetin). The results of this study indicate that the incorporation of a pyrazoline ring into the 3-arylidenechromanone results in an improvement of the compounds' activity and therefore it may be of use in the search of new anticancer agents. Further analysis allowed us to demonstrate the compounds to have a strong inhibitory effect on the cell cycle. For instance, compounds **2**, **10** induced 60% of HL-60 cells to be arrested in G2/M phase. Using a DNA-cleavage protection assay we also demonstrated that tested compounds interact with DNA. All compounds at the concentrations corresponding to cytotoxic properties are not toxic towards red blood cells, and do not contribute to hemolysis of RBCs.

Keywords: 3-benzylidenechromanone/3-benzylidenechromanone; spiropyrazolines; cytotoxicity; lipophilicity; DNA interaction

1. Introduction

The chromanones and their flavanone derivatives comprise an interesting group of compounds because they easily react with nucleophilic reagents, the most investigated of these reactions being those which take place with hydrazine or its analogues, resulting in the production of a five-membered heterocyclic ring. Pyrazolines are heterocyclic compounds having two adjacent atoms within the ring. They have only one endocyclic double bond and are basic in nature. The dihydro derivative

of pyrazole is known as pyrazoline. Depending on the position of the double bond it can exist in three separate forms: Δ^1 -pyrazoline (the double bond exists between the first and second nitrogen atoms), Δ^2 -pyrazoline (the double bond occurs between the second nitrogen atom and the third carbon atom) and Δ^3 -pyrazoline (the double bond occurs between the third and fourth carbon atom) [1]. As their chemical structure is based on the presence of electron-rich nitrogen heterocycles, they display important biological activities [2]. Pyrazoline derivatives widely occur in nature in the form of alkaloids, pigments and vitamins. Due to the anticancer (Figure 1A), antibacterial (Figure 1B), antifungal (Figure 1C), anti-inflammatory (Figure 1D), and antidepressant (Figure 1E) properties of spiropyrazole analogs, many studies have examined their biological activities [3–5]. Certain derivatives, such as nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (Figure 1F) and cannabinoid CB1 receptor antagonist (Figure 1G), also demonstrate potent selective biological activity against certain receptors [6,7]. Due to their biological activity, they have been used in the treatment of various diseases.

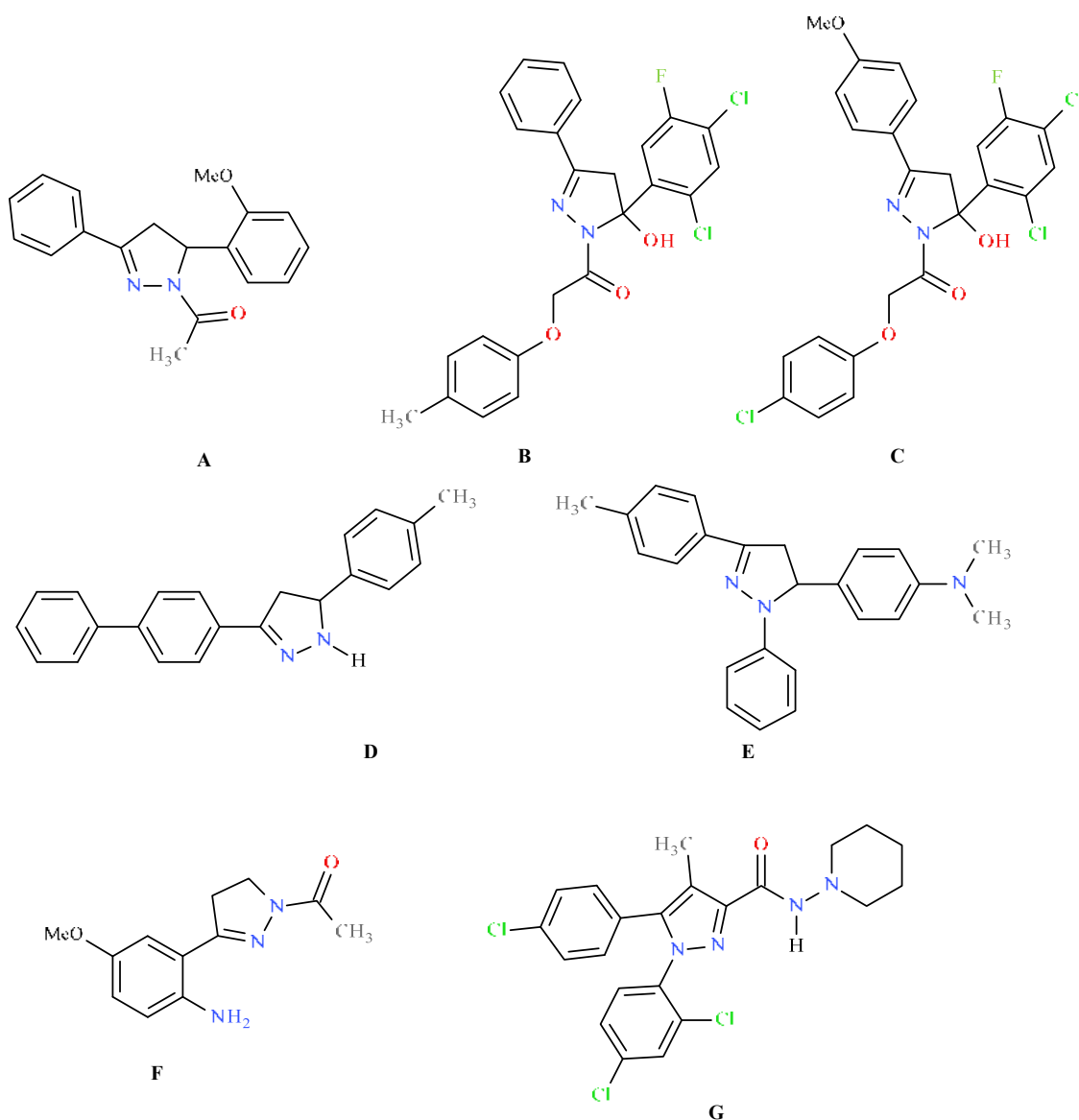
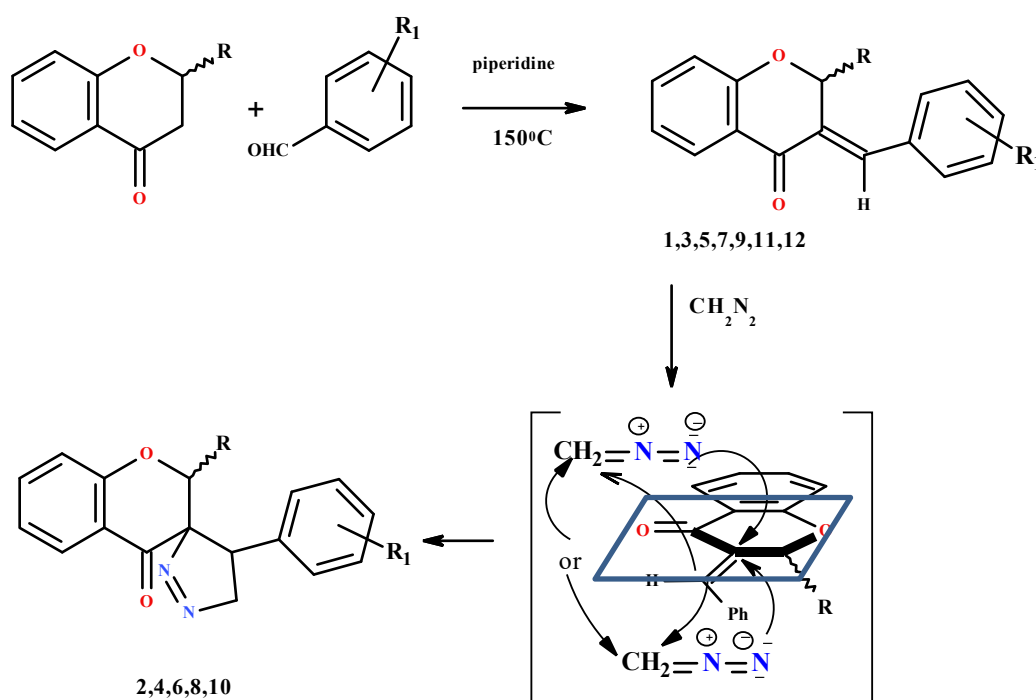


Figure 1. Examples of pyrazoline analogs with biological activity: (A)—anticancer, (B)—antibacterial, (C)—antifungal, (D)—anti-inflammatory, (E)—antidepressant, (F)—nitric oxide synthase (NOS) inhibitor and (G)—cannabinoid CB1 receptor antagonist.

Over the last thirty years, many methods have been developed for the synthesis of pyrazolines and their analogues; however, while numerous such analogues have been described in the literature, the 4,5-dihydro-1*H*-pyrazolines are the most often studied. Their best known method of synthesis is based on the reaction of α,β -unsaturated ketones with hydrazines, which results in the formation of a hydrazone, which is cyclized to form a 2-pyrazoline [8]. Much attention has been focused on the synthesis of 3-arylidenechromanones/flavanones, which are precursors in the reaction for obtaining 3-spiropyrazolines; these were synthesized by reacting 3-benzylidenechromanones or 3-benzylidene-flavanones with diazomethane in anhydrous acetone [9]. According to the Toth [9] the classical synthesis of 3-arylidenechromanones/chromanones with diazomethane allows only one stereoisomer of spiro-1-pyrazolines to be obtained.

Following on from a previous paper [10], the present study broadens our studies of the reactivity of 3-arylidenechromanones and 3-arylidenechromanone with diazomethane on a larger number of compounds containing various benzylidene substituents. The formation of spiro- compounds as a result of attack by a nucleophilic reagent on the carbon of the 3-arylidenechromanone most probably depends on the degree of electropositivity of the carbon; this would govern reactions with the various resonance structures of diazomethane [9]. It is possible that the resonance structure of diazomethane, with a partial negative charge on the carbon atom, may be attacked in the reaction of the formation of 3-spiropyrazolines (Scheme 1).



Scheme 1. The route of synthesis of the examined compounds. 1, 2: R = Ph, R₁ = *p*-OCH₃; 3, 4: R = H, R₁ = *p*-OCH₃; 5, 6: R = Ph, R₁ = H; 7, 8: R = H, R₁ = H; 9, 10: R = Ph, R₁ = *m*-OCH₃; 11: R = Ph, R₁ = *p*-N(C₂H₅)₂; 12: R = H, R₁ = *p*-N(C₂H₅)₂.

The aim of this study is to compare the cytotoxic activities of a series of chromanones/flavanones and spiro-pyrazoline analogues as substrates and products of their modification reactions with diazomethane. The compounds were tested for biological activity on four cell lines: HL-60 (human leukemia cell line), NALM-6 (human peripheral blood leukemia cell line), WM-115 (melanoma cell line) and COLO-205 (human colon adenocarcinoma cells). It also examines the influence of various substituents on the lipophilicity and cytotoxic effect of the compounds, as well as their interaction with DNA and cell cycle arrested studies. Moreover, we searched for the less toxic compounds compared to references compounds. Both the 3-benzylidene and spiro- analogues were digested of plasmid

DNA with BamHI restriction nuclease and the study of cell cycle phases using a flow cytometer has been done.

Correct design and systematic examination of the structure-activity relationship of pyrazoline compounds appears to be a good strategy for new drug design. The obtained compounds may be a valuable basis for discovering safe potent drug candidates with lesser side effects.

2. Results and Discussion

Two structures, benzylidene flavanone and benzylidene chromanone substituted with diethylamine group, have been examined previously in a study that compared the exocytotoxic activity of the two compounds and checked whether they destroy erythrocyte membranes [10]. Encouraged by these positive results, the present manuscript examines the relationship between the biological activity of the tested compounds and their chemical structure: for this purpose ten 3-arylidenechromanone analogues with a Δ^1 -pyrazoline ring were synthesized and their physicochemical characteristics, together with their cytotoxicity, determined. All synthesized compounds were tested for their compatibility with blood and whether they influenced the integrity of the erythrocyte membrane. Analogues **2**, **7**, **10**, **11**, and **12** exhibited the greatest cytotoxicity towards the tested cancer cell lines and thus were taken for further study. The next step examined whether the compounds would inhibit digestion of plasmid DNA in a similar way to a reference compound (daunorubicin); in addition, the compounds were subjected to DNA interaction studies to identify the phase of the cell cycle they would block. Finally, two analogues, **2** and **8**, were chosen for further testing to describe their crystal structure and characterize their intermolecular interactions in the crystal lattice.

2.1. Chemistry

The synthesis of the described compounds has been divided into two stages. In the first step the compounds **1**, **3**, **5**, **7** and **9** were prepared by a conventional reaction between 2-phenylchroman-4-one or chroman-4-one and the appropriate aryl aldehyde. The exocyclic α,β -unsaturated ketones were synthesized in the piperidine medium; in a second step, these unsaturated ketones were reacted with an ethereal solution of diazomethane in anhydrous acetone to produce spiro-1-pyrazolines **2**, **4**, **6**, **8**, **10** in a regioselective and stereospecific manner (Scheme 1). The structures of all compounds were characterized using IR, ^1H - and ^{13}C -NMR, MS spectroscopy and elemental analysis. A detailed description of the spectra of the tested compounds is provided in the Supporting Information with the ^1H - and ^{13}C -NMR spectra (see Figures S4–S13a). Part 3 (Materials and Methods) presents a detailed description of the IR bands and signal shifts of the spectra.

2.2. X-ray Single-Crystal Structure of **2** and **8**

The molecular structure of compounds **2** and **8** is shown in Figure 2. Molecules of **2** and **8** crystalize in a monoclinic system in $P2_1/n$; however, in **8**, an asymmetric unit has three molecules. The main chroman skeleton in **2** consists of a benzene and a pyran ring with a phenyl substituent at the C2 atom. In addition, 4-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-3H-pyrazole is attached at the C3 position.

Molecule **8** contains a chroman skeleton with a 4-phenyl-4,5-dihydro-3H-pyrazole at position C3. The pyran ring and 4,5-dihydro-3H-pyrazole adopt an envelope conformation in both structures, with puckering parameters and asymmetry parameters given in Table 1 [11,12].

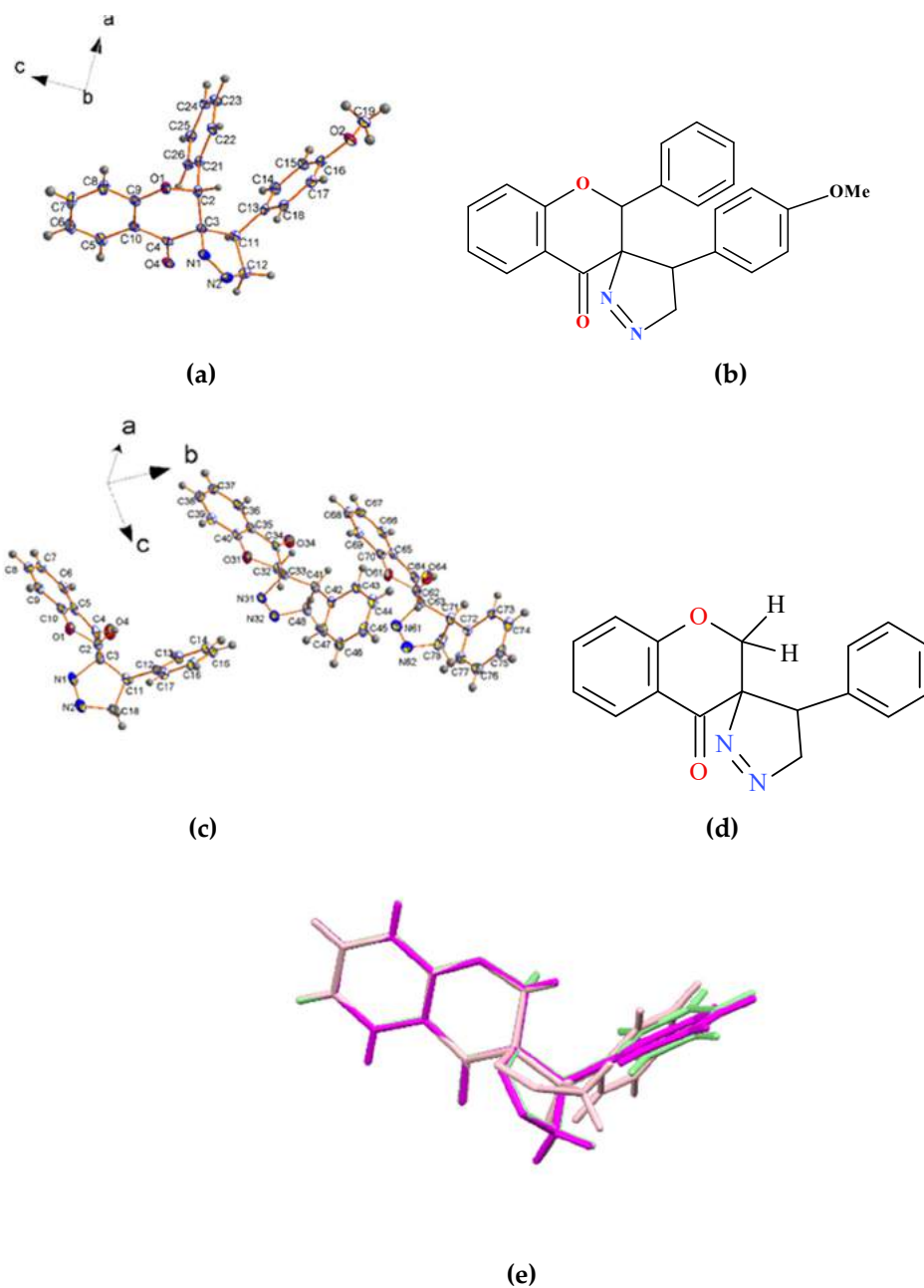


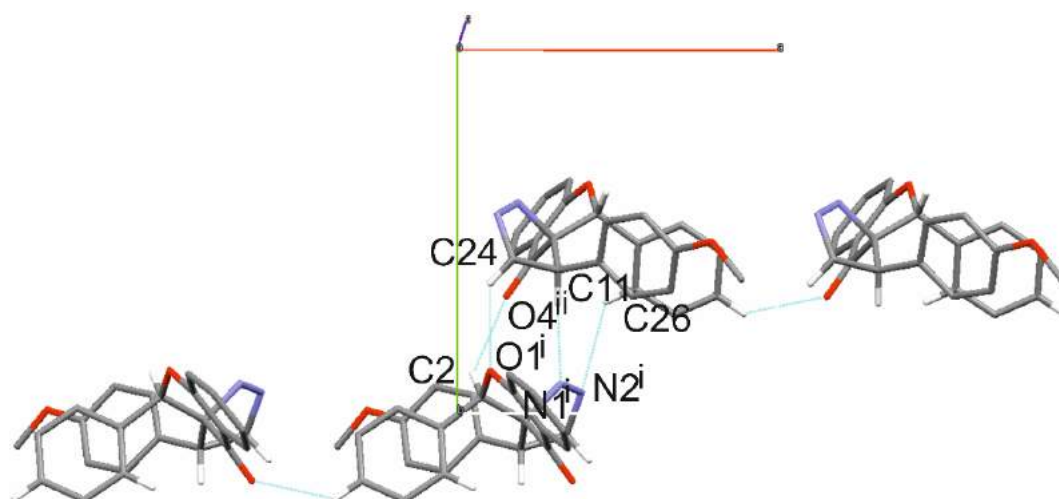
Figure 2. The molecular structure of **2** (a) and **8** (c) with an atom numbering. The chemical structure of **2** (b) and **8** (d). Scheme. (e) represents the overlay of three molecules in the asymmetric unit in the compound **8** crystal structure.

The crystal packing of **2** and **8** is enhanced by a network of hydrogen bonds (Figure 2). The molecules of compound **2** are linked by four intermolecular hydrogen bonds: C12-H12A ... O1 ($1/2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z$), C2-H2 ... O4 ($1/2 - x, -1/2 + y, 1/2 - z$), C26-H26 ... N2 ($1/2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z$), C11-H11 ... N1 ($1/2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z$), which are responsible for the formation of dimers (Figure 3).

Table 1. Ring puckering parameters with asymmetry parameters and dihedral angle between chromanone skeleton (A/B rings) and C ring.

Compound/Molecule 5-Membered Ring 6-Membered Ring	Q (Å)	θ (°)	Φ (°)	Asymmetry Parameter (°)	Conformation
2	0.211(2)	-	108.9(3)	$\Delta C_s(C11) = 0.2(2)$	E
	0.411(2)	51.2(2)	73.2(2)	$\Delta C_s(C10) = 5.9(2)$	E
8/molecule 1	0.307(2)	-	288.45(4)	$\Delta C_s(C11) = 0.4(2)$	E
	0.469(2)	54.0(2)	83.8(3)	$\Delta C_2(C2-C3) = 9.5(2)$	distorted H
molecule 2	0.236(2)	-	108.8(5)	$\Delta C_s(C41) = 0.2(2)$	E
	0.431(2)	53.9(2)	78.6(3)	$\Delta C_s(C32) = 10.5(2)$	distorted E
molecule 3	0.240(2)	-	108.8(5)	$\Delta C_s(C61) = 0.1(2)$	E
	0.414(2)	53.9(3)	74.7(3)	$\Delta C_s(C62) = 7.4(2)$	distorted E

Q, θ , Φ puckering parameters calculated according to Cremer & Pople [11], ΔC_s , ΔC_2 —asymmetry parameters calculated due to Duax & Norton [12] E, B, S/B, T/B define conformations: envelope, boat, between screw-boat & boat and between twist boat & boat. Molecule 1,2,3 (see Table 1) corresponds to three different molecules in compound 8.

**Figure 3.** Partial molecular packing of **2** showing hydrogen-bonded dimers and chains.

Additionally, each molecule is linked by a C24-H24 ... O4 (1 + x, y, z) hydrogen bond forming chains propagating along *a* axis. The intermolecular hydrogen bonds in crystal structure **8** produce a 3-D net of hydrogen bonds (Figure 4). The geometric parameters for the hydrogen bonds are presented in Table 2. Additionally, it is worth mentioning that compound **2** has higher values for all tested cytotoxic activities compared to **8** (Table 3); this is associated with its more extended spatial structure, in which a bulky phenyl substituent is attached in the C2 position. A similar trend is observed for benzylidene flavanone and benzylidene chromanone analogues [13]. However, taking into account the structure **2** and **10**, which are similar and differ only the position of methoxy group in phenyl fragment cytotoxic activity is different. Therefore it could be concluded that in case of COLO-205 the position of OCH₃ group influences on the activity (higher when *m*-OCH₃ group is attached). This trend is also visible if we compare **2**, **4** and **10** structures, for *p*-OCH₃ substituent cytotoxic activity (COLO-205) is lower than for *m*-OCH₃ substituent.

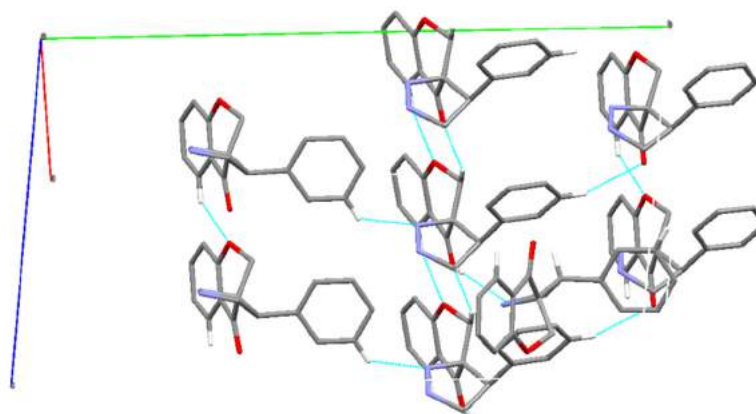


Figure 4. Partial molecular packing of **8** showing the 3-D network of hydrogen bonds.

Table 2. Hydrogen bond geometry in (Å).

	D-H	H ... A	D ... A	<D-H ... A
2				
C12-H12A ... O1 ⁱ	0.99	2.56	3.392(2)	136
C2-H2 ... O4 ⁱⁱ	1.00	2.61	3.388(2)	135
C24-H24 ... O4 ⁱⁱⁱ	0.95	2.53	3.239(2)	131
C26-H26 ... N2 ⁱ	0.95	2.74	3.416(2)	129
C11-H11 ... N1 ⁱ	0.85	2.67	3.653(2)	180
C11-H11 ... O4 ^{intra}	0.93	2.68	3.497(2)	147
8				
Molecule 1				
C6-H6 ... O1 ^{iv}	0.95	2.59	3.304(2)	132
C14-H14 ... N31	0.95	2.60	3.316(3)	133
C11-H11 ... O4 ^{intra}	1.00	2.45	2.863(2)	104
Molecule 2				
C32-H32A ... O34 ^v	0.99	2.47	3.373(2)	152
C36-H36 ... O31 ⁱⁱⁱ	0.99	2.45	3.361(2)	161
C48-H48A ... N2 ^{vi}	0.99	2.61	3.473(2)	146
C44-H44 ... O64	0.95	2.53	3.418(2)	157
C41-H41 ... O34 ^{intra}	1.00	2.45	2.799(2)	100
Molecule 3				
C66-H66 ... O61 ⁱⁱⁱ	0.95	2.57	3.281(2)	132
C71-H71 ... O64 ^{intra}	1.00	2.43	2.783(2)	100

symmetry code: (i) $1/2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z$; (ii): $1/2 - x, -1/2 + y, 1/2 - z$; (iii): $1 + x, y, z$; (iv): $1 + x, y, z$; (v): $-1 + x, y, z$; (vi): $3/2 - x, 1/2 + y, 1/2 - z$.

2.3. Experimental Lipophilicity of the Synthesized Flavone Analogues

Lipophilicity is one of the most important physicochemical properties in pharmaceutical research. It can be considered a key determinant of the pharmacokinetic properties of a drug. It is commonly measured by the partition coefficient between water and *n*-octanol, being expressed as $\log P$ [14]. The coefficient $\log P$ shows the affinity of a molecule for a lipophilic environment [15,16]. Knowledge of the partition coefficient is valuable: it is frequently used in structure–activity relationship (SAR) and quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies [17,18]. The experimental lipophilicity of the synthesized compounds, *viz.* benzylideneflavanones, benzylidenechromanones and spiropyrazolines, was determined using RP-TLC. The $\log P$ results indicate that the tested compounds have lipophilic character. The $\log P$ values ranged from 4.08 to 5.88 for all tested compounds except **8** ($\log P = 2.35$), indicating a possible relationship between lipophilicity and chemical structure. Compound **2** demonstrated some dependence in terms of spatial arrangement, and greater cytotoxicity than **8**

towards four cell lines (Table 3). This can be attributed to its more spatial structure, where a bulky phenyl substituent is attached in the C2 position. A similar trend can be seen for benzylidenechromanone analogues: all compounds with a phenyl ring in the C2 position have higher $\log P$ values. It was also found that lipophilicity of a compound depends on its chemical structure: the presence of a phenyl or methoxy substituent increases the $\log P$ value, and unsubstituted compounds have lower lipophilicity (8). Compound **12** has a lower $\log P$ value (3.43) than **11** (5.69) (Figure 5). It is important to examine the relationship between structure of the compound and its lipophilicity and cytotoxicity. Compound **11**, with a phenyl ring at C2, exhibits greater biological activity than the unsubstituted benzylidenechromanone. The biological activity of the compounds increases with lipophilicity, but it cannot exceed the maximum value. According to Lipinski's rule and drug likeliness parameters, compounds with higher lipophilicity, up to a maximum $\log P$ value of 5, may be good candidates for drugs [19,20]. The compounds with $\log P$ greater than 3 present high lipophilicity and high potential for bioaccumulation in cells.

2.4. Cytotoxicity toward Human Cancer Cells

Modern medicine is still struggling with the problem of fully effective chemotherapy. Therefore, there is a strong need to develop and synthesize new chemotherapeutics characterized by adequate effectiveness, selectivity and specificity of action against cancer cells. The need to identify new compounds with effective anticancer activity, and high selectivity against cancer cells and low toxicity to normal cells, demands the testing of a wide variety of candidates. Undoubtedly, the turning point for the development of research on organometallic complexes was the discovery of cisplatin in the 20th century, which is used to treat lung, ovarian, neck or head cancer, among others. However, its effective biological anticancer activity is unfortunately associated with high systemic cytotoxicity, particularly myelosuppression and nephro- and hepatotoxicity, which is a serious factor limiting its wide use.

Our present study evaluated the anticancer activity of a large group of 3-arylidenechromanone, 3-arylidenechromanone, spirochromanone and spiroflavanone analogues against four tumor lines. The experiments serve as targeted basic research and are aimed at gaining new knowledge related to the anticancer activity of selected 3-benzylidenechromanone/3-benzylidenechromanone analogues and their pyrazolines.

The first stage of the study used the MTT viability test to determine the cytotoxicity of ten compounds, i.e., 3-arylidenechromanone, 3-arylidenechromanone, spirochromanone and spiroflavanone analogues, against four human cancer cell lines: HL-60, NALM-6, WM-115 and COLO-205. In addition, and 4-chromanone, quercetin, cisplatin and carboplatin were included in the tests as reference compounds. The IC_{50} values for the entire series of tested compounds are given in Table 3.

Our studies indicate that the antiproliferative activity of the test compounds was determined by their chemical structure. Compounds **2**, **7** and **10** demonstrated the greatest antiproliferative activity against cancer cells. As expected, they demonstrated dose-dependent inhibition of human cancer cell line growth with a significant decrease in cell viability being associated with increasing concentrations. The most active compound was **2**, with $IC_{50} < 10 \mu M$ against three cancer cell lines: HL-60, NALM-6 and WM-115; however, COLO 205 proliferation was slightly less inhibited ($IC_{50} 29.3 \mu mol/L$).

Table 3. The lipophilicity values and cytotoxic activity of compounds against HL-60, NALM-6, WM-115 and COLO-205 cancer cell lines. The results are presented as IC_{50} values in the μM range.

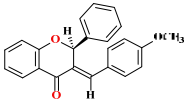
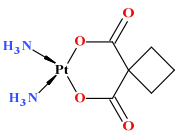
Number of Compound	Chemical Structure	IC_{50} (μM)					$\log P$
		HL-60	NALM-6	WM-115	COLO-205		
1		53.38 ± 2.49	49.81 ± 2.35	58.13 ± 4.93	51.0 ± 2.3		4.79

Table 3. Cont.

Number of Compound	Chemical Structure	IC ₅₀ (μM)				
		HL-60	NALM-6	WM-115	COLO-205	logP
2		3.0 ± 0.3	6.8 ± 0.4	5.5 ± 0.4	29.3 ± 2.35	5.42
3		45.36 ± 4.77	30.07 ± 3.15	23.53 ± 1.71	193.1 ± 2.9	4.08
4		74.05 ± 1.85	72.60 ± 4.56	75.27 ± 4.89	26.5 ± 1.8	4.68
5		33.74 ± 3.87	27.02 ± 3.10	47.41 ± 4.62	77.1 ± 1.9	4.90
6		>1000	44.4 ± 6.3	57.4 ± 5.8	53.6 ± 1.6	5.88
7		34.78 ± 2.87	6.83 ± 0.18	12.75 ± 1.83	31 ± 1.4	4.23
8		473.9 ± 29.0	281.6 ± 49.4	415.0 ± 75.4	>1000	2.35
9		35.89 ± 2.96	15.7 ± 6.23	16.89 ± 3.78	169.94 ± 3.81	5.83
10		9.4 ± 0.4	25.0 ± 3.3	49.2 ± 2.7	487.1 ± 4.1	5.42
11		8.36 ± 0.63 *	9.08 ± 0.30 *	6.45 ± 0.69 *	-	5.69
12		11.76 ± 1.97 *	8.69 ± 0.40 *	18.09 ± 3.14 *	-	3.43
4-Chromanone **		676.7 ± 32.6	673.7 ± 22.5	>1000	721.5 ± 6.4	2.19
Quercetin **		58.0 ± 4.0	77.1 ± 7.8	177.5 ± 21.5	-	2.16

Table 3. Cont.

Number of Compound	Chemical Structure	IC ₅₀ (μM)				
		HL-60	NALM-6	WM-115	COLO-205	logP
Cisplatin **		0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.3	18.2 ± 4.3	61.45 ± 3.2	−2.21
Carboplatin **		4.3 ± 1.3	0.7 ± 0.2	422.2 ± 50.2	354.6 ± 73.7	−2.30

* See literature [10]; ** Reference compounds.

Compound **7** demonstrated promising antiproliferative properties, especially towards NALM-6 and WM-115 cell lines, with IC₅₀ is equal to 6.83 and 12.75 μmol/L respectively. It is worth mentioning that **10** also demonstrated noticeable cytotoxic effects against HL-60 and NALM-6 cells (IC₅₀ about 9.4 and 25 μmol/L respectively); however, WM-115 and COLO-205 were markedly more resistant. On the basis of these results, further studies were performed on the molecular mechanisms of the anticancer activity of the complexes against the corresponding cell lines.

It is also worth mentioning that in further studies we also used two additional compounds: (*E*)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)chroman-4-one (**12**) and (*E*)-3-(4-*N,N*-diethylaminobenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (**11**). Their synthesis, structure and promising antiproliferative properties against cancer cells (HL-60, NALM-6 and WM-115) have been described previously [10]. Both compounds showed high cytotoxic activity against the HL-60 cell line: 11.76 μM **12** and 8.36 μM **11**. The IC₅₀ values for NALM-6 cell line were similar: 8.69 μM **12** and 9.08 μM **11**. Only for WM-115 cell line the cytotoxicity values were not similar. The compound **11** exhibited high cytotoxic activity with an IC₅₀ value of 6.45 μM, i.e., three times lower than for **12**. Hence, both compounds appear to exhibit selectivity for human leukemia cell lines.

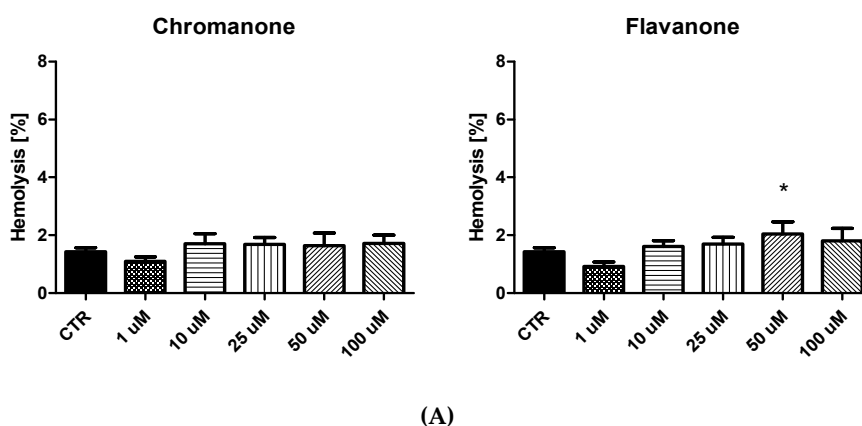
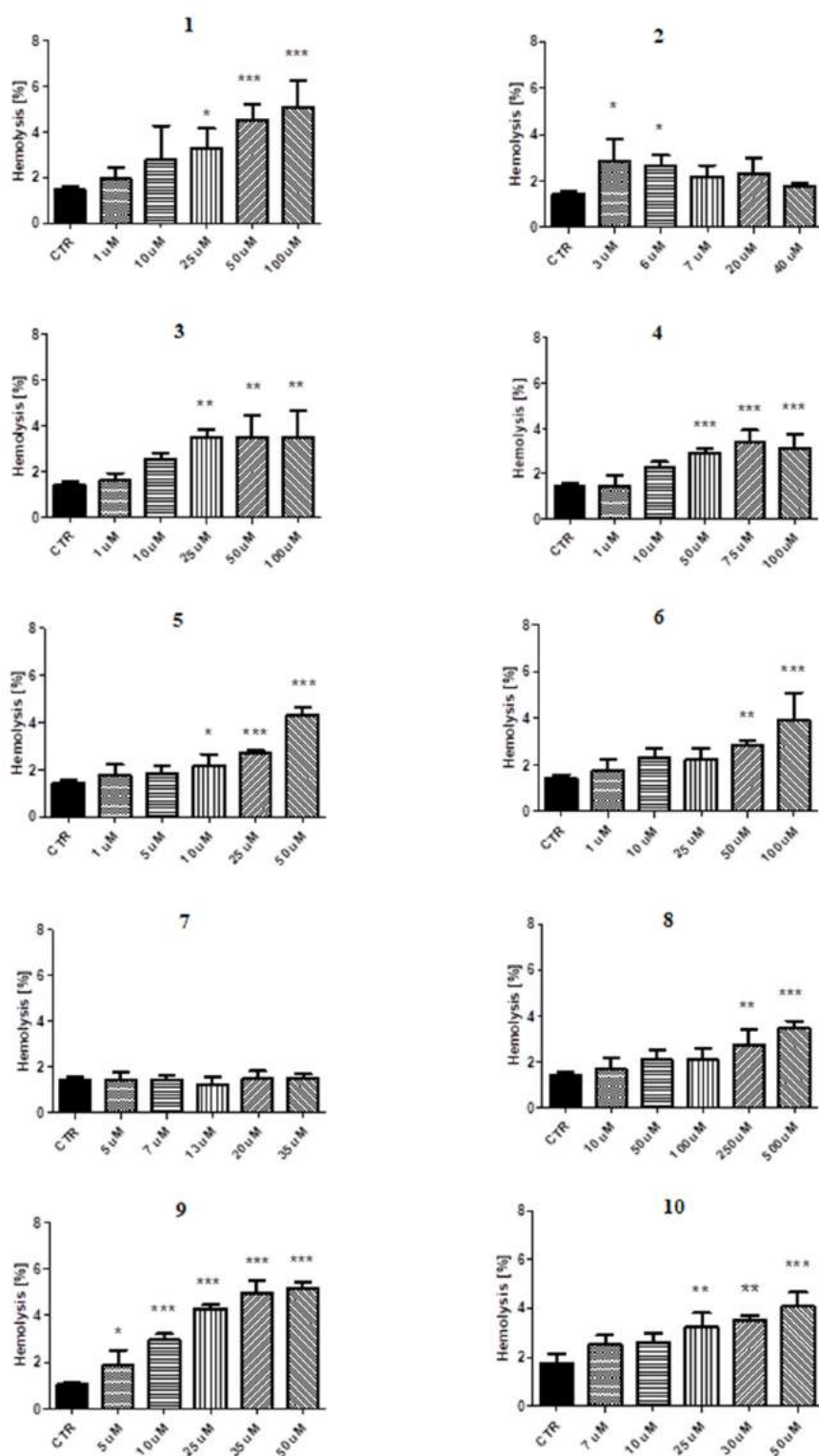


Figure 5. Cont.



(B)

Figure 5. The effects of reference compounds, flavanone and chromanone (A) and synthesized compounds (B) on the integrity of the erythrocyte membrane. The results are presented as the percentage of hemolysis obtained from the interaction of studied compounds with 2% RBCs (red blood cell) suspension, compared to the positive control Triton X-100 constituting 100% hemolysis. The results are presented as mean $\pm$ SD; $n = 4$, * $p < 0.05$ vs. control; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

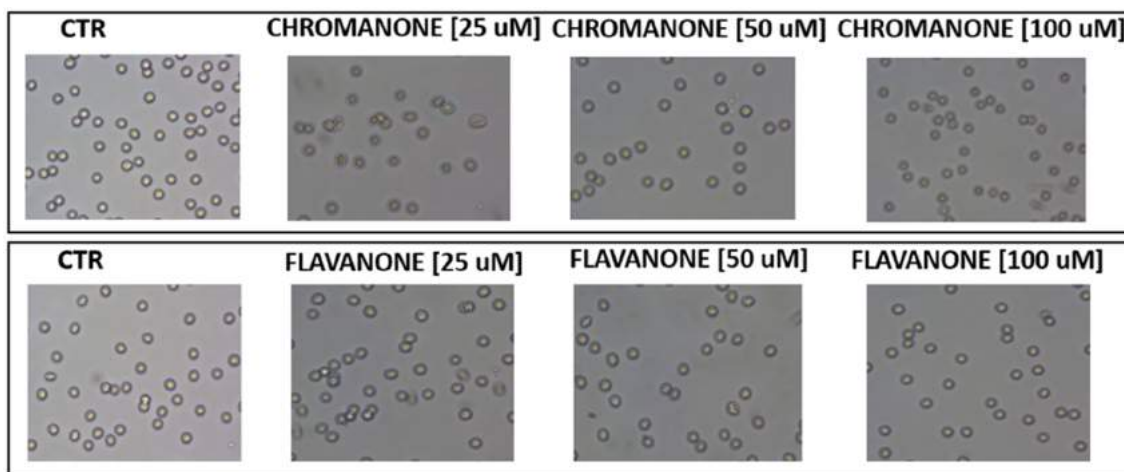
2.5. Red Blood Cell Lysis Assay

All synthesized compounds with potential biological activity have to be tested for blood compatibility since xenobiotics will react with blood cells upon administration. In this case, biocompatibility refers to the quantification of cellular and plasma components of the blood. The measurement of the integrity of RBC membrane is considered a simple and reliable method for estimating hemocompatibility [21,22]. The effects of the synthesized compounds, together with those of the two reference compounds flavanone and chromanone, on RBC hemolysis are depicted in Figure 6A,B. Neither flavanone nor chromanone was found to have any unfavourable effect on the erythrocyte membrane over the whole concentration range. A statistically significant increase in the rate of haemolysis was observed for most of the tested compounds at the higher concentrations. For instance, compounds **3** and **4** contributed to a significant disintegration of the erythrocyte membrane at concentrations above 25 μ M, manifested by a higher percentage of hemolysis in comparison to control. However, these values did not exceed 5%, which means that there is not a risk of pathological hemolysis in in vivo conditions. Similar results were obtained for compounds **5**, **6**, **9**, and **10**.

In the case of compound **7**, no significant effects on RBC hemolysis were observed up to 35 μ M; however, a significantly greater disintegration of RBC membrane was reported at concentrations of 250 μ M and 500 μ M in the related compound **8**. The differences in the tested concentrations of these compounds stem from the fact that they affect the cellular growth (Table 3) at different concentration ranges.

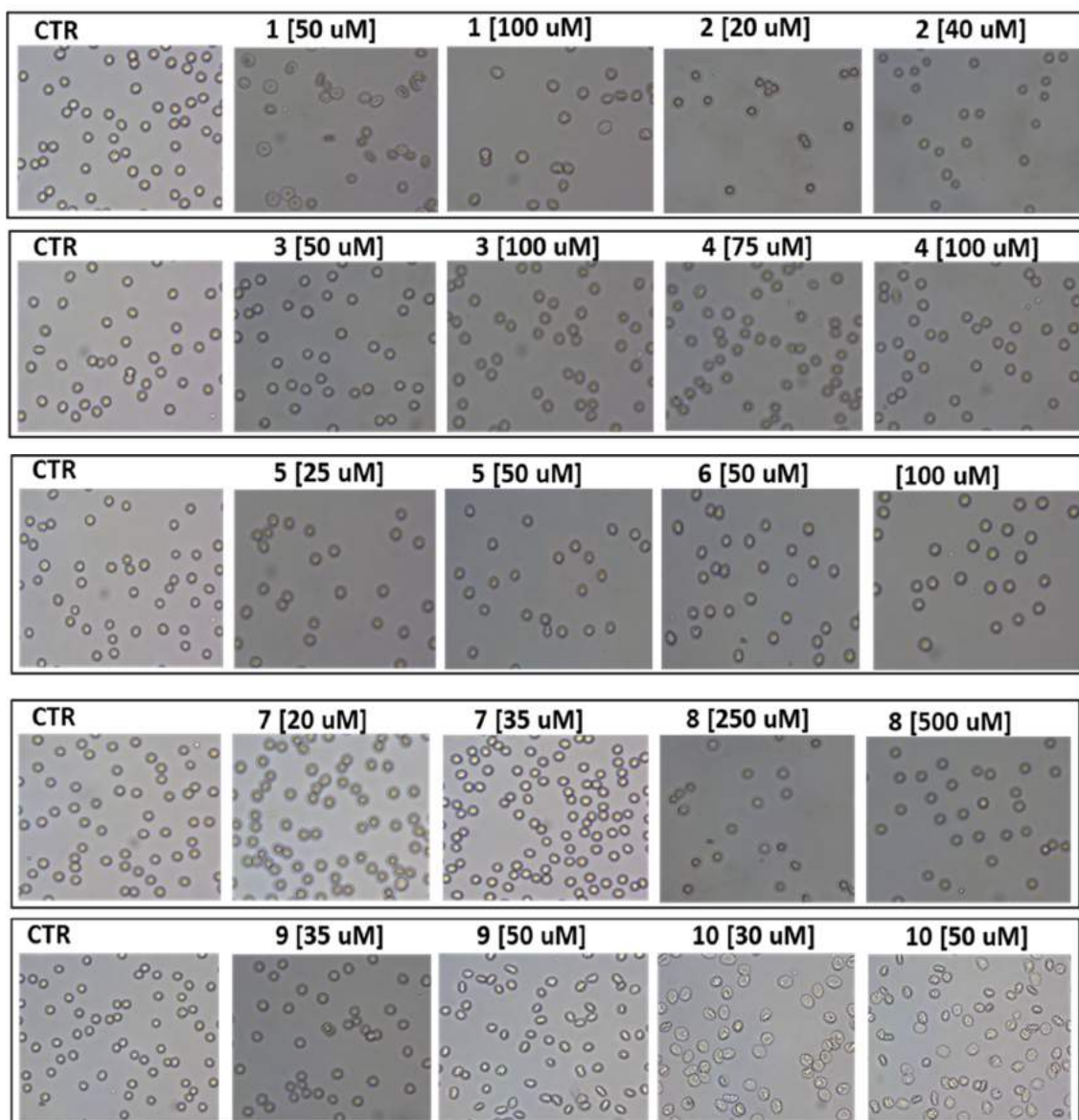
2.6. Red Blood Cell Morphology

Studies on erythrocyte morphology complement the erythrotoxicity studies because they provide information on potential immediate interactions of the tested compounds with the erythrocyte lipid bilayer, and the possibility of creating pathological forms of erythrocytes, which are not able to carry oxygen. The effects of the synthesized compounds, and the two reference compounds chromanone and flavanone, on the morphology of erythrocytes is shown in Figure 6. Briefly, 2% RBC suspension was incubated with 0.9% NaCl (control samples) or tested compounds at various concentrations corresponding to their activity towards cancer cell lines. Dyscocytes were observed in control samples, while echinocyte formation was observed in cultures treated with chromanone or flavanone over the entire concentration range (Figure 6A).



(A)

Figure 6. Cont.



(B)

Figure 6. Microscope images of erythrocytes treated with (A)—reference compounds, chromanone and flavanone; (B)—compounds 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. 2% erythrocyte suspension was treated at 37 °C for 60 min with indicated concentrations of compound. Representative phase-contrast images are shown (magnification of 400 times).

Echinocytes are formed when the agents that preferentially accumulate in the outer layer of the RBC membrane bilayer expand it, thus giving the cell an echinocytic shape [21]. In most samples, the population of echinocytes exceeded 80% of the total erythrocytes observed in the microscopic field of view. Incubation of erythrocytes with compound 1 led to the extensive formation of echinocytes and anisocytes, while compound 2 resulted mainly in echinocytosis. In addition, echinocytes accounted for the major part of erythrocytes following treatment with compounds 3 and 4 at a concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$, and for compounds 5 and 6, as well as 9 and 10. Compound 7 primarily led to echinocytosis, however single anisocytes could also be detected. In summary, in vitro exposure of RBCs to different concentrations of examined compounds and reference molecules resulted mostly in the formation of echinocytes. Nevertheless, the process of transformation of biconcave erythrocyte to echinocyte occurs naturally in blood vessels, and results from the insertion of xenobiotics into the outer monolayer

of the erythrocyte membrane. As this is a reversible process [22] caused by a series of chemical and physical factors including increased ion strength, alkaline pH and decreased ATP level, it may be assumed that most of the analyzed compounds do not affect RBCs in a pathological manner at the relevant concentrations.

2.7. Digestion of Plasmid DNA with *Bam*HI Restriction Nuclease

Some of the test compounds showed significant toxicity toward cancer cells. For example compounds **2** or **7** demonstrated IC_{50} values in the single micromolar range (Table 3). This cytotoxicity was tested with regard to its effect on the cell cycle and the ability to modify DNA. In addition to the compounds shown in Table 4, two highly-cytotoxic compounds (**11** and **12**) were also tested. Their structure and biological activity were described in a previous article [10]. The chemical structures of the test compounds suggests that they may intercalate with double-stranded nucleic acids. To test this hypothesis, plasmid DNA was incubated with the test compounds and subsequently digested with *Bam*HI endonuclease. As expected, daunorubicin (positive control) which is a strong DNA intercalator, prevented linearization of DNA (Figure 7, lane B). Interestingly, chromanone/flavanone test compounds also inhibited digestion of plasmid DNA (Figure 7, lanes C–I). This conclusion is supported by the presence of the circular form of plasmid DNA after digestion with *Bam*HI. These results suggest that chromanone/flavanone analogues intercalate to genomic DNA.

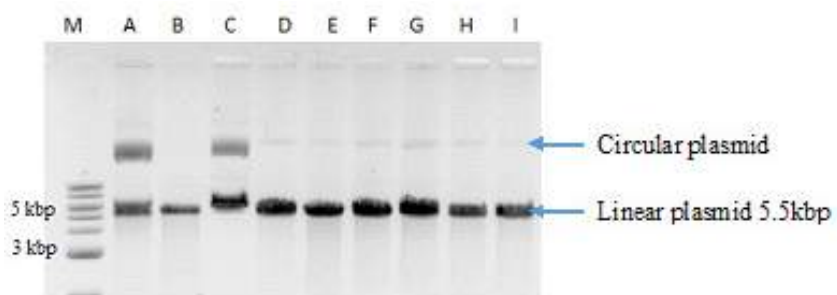


Figure 7. Digestion of pcDNA3.1HisC (total length 5.5 kbp) with *Bam*HI endonuclease. M—marker DNA; A—not digested plasmid DNA; B—plasmid DNA digested with *Bam*HI (DNA present in linear form); C—plasmid DNA + daunorubicin + *Bam*HI; D—plasmid DNA + quercetin + *Bam*HI; E—plasmid DNA + **2** + *Bam*HI; F—plasmid DNA + **7** + *Bam*HI, G—plasmid DNA + **12** + *Bam*HI, H—plasmid DNA + **11** + *Bam*HI, I—plasmid DNA + **10** + *Bam*HI.

2.8. Cell Cycle Analysis

The next stage examined the effects of the selected compounds on cell cycle progression in HL-60 leukemia cells. The five chromanone/flavanone compounds and quercetin (reference) were tested at concentrations of IC_{50} and $0.5 \times IC_{50}$. The cell cycle distribution of HL 60 cells after treatment with test compounds is shown in Figure 8 and Table 4. As expected, in the presence of quercetin, about 50–60% of cells were blocked in the G2/M phase (see Figure S2). Interestingly, the test compounds also induced mitosis block in G2/M. Only **7** moderately inhibited cell cycle progression, arresting 20–26% of cells. The effect of **2**, **10**, **11** and **12** was very pronounced and similar to quercetin. In the presence of these compounds, about 50–60% of cells were arrested in G2/M. These results confirm that test compounds have a strong influence on the cell cycle and arrest the HL-60 cells in the G2/M phase.

Table 4. The cell cycle distribution of HL 60 cells after treatment with test compounds. The results are given as mean $\pm$ standard deviation. The concentrations of the compounds (in μ M) are given in the parenthesis and correspond to $1 \times IC_{50}$ and $0.5 \times IC_{50}$ (μ M). (n = 2) n-number of repetition (see Figure S3).

	HL 60	DMSO Control	Quercetin (58)	Quercetin (29)	2 (3)	2 (1.5)	7 (35)	7 (18)	12 (12)	12 (6)	11 (4.5)	11 (9)	10 (9.4)	10 (4.7)
G1	45.2	70.3 $\pm$ 2.2	11.6 $\pm$ 1.7	14.3 $\pm$ 2.4	21.3 $\pm$ 10.9	23.5 $\pm$ 21.7	50.4 $\pm$ 1.0	57.7 $\pm$ 7.2	19.5 $\pm$ 12.3	19.3 $\pm$ 2.6	3.2 $\pm$ 2.8	6 $\pm$ 3.5	16.2 $\pm$ 13.4	40.3 $\pm$ 26.8
G2	39.2	20.5 $\pm$ 1.7	39.4 $\pm$ 2.5	25.0 $\pm$ 2.0	25.0 $\pm$ 10.4	23 $\pm$ 2.3	23.5 $\pm$ 0.9	21.5 $\pm$ 3.8	28.0 $\pm$ 1.4	28.4 $\pm$ 8.8	29.1 $\pm$ 3.1	34.8 $\pm$ 10.5	33.3 $\pm$ 1.1	30.2 $\pm$ 13.9
G2/M	15.6	9.2 $\pm$ 3.9	49.0 $\pm$ 4.2	60.8 $\pm$ 0.4	53.7 $\pm$ 21.4	53.5 $\pm$ 19.4	26.1 $\pm$ 0.1	20.8 $\pm$ 3.4	52.4 $\pm$ 10.9	52.4 $\pm$ 6.2	67.8 $\pm$ 0.3	59.2 $\pm$ 6.9	50.5 $\pm$ 12.2	29.4 $\pm$ 12.9

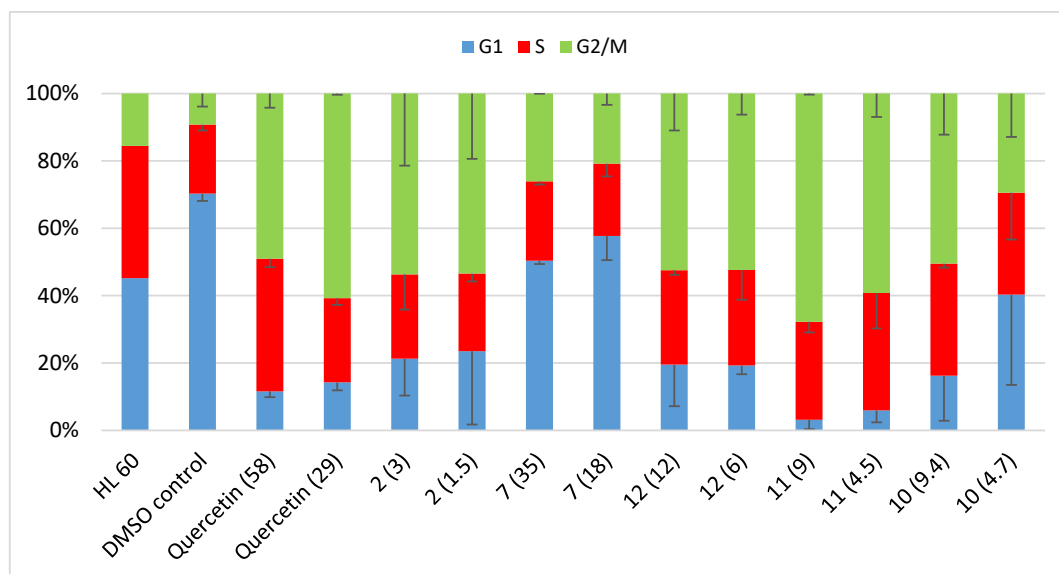


Figure 8. The effect of the test compounds and quercetin on the cell cycle in HL-60 cells. Cell cycle distribution of HL-60 cells after treatment with the test compounds. The concentrations of the compounds (in μM) are given in the parenthesis and correspond to $1 \times \text{IC}_{50}$ and $0.5 \times \text{IC}_{50}$ (μM). 1% DMSO was used as the vehicle control. Bars represent mean values from two independent experiments.

3. Materials and Methods

3.1. General Information

The compound pairs **1** and **2**, **5** and **6** and **9** and **10** were synthesized according to Pijewska [8]. Compounds **3** and **7** were synthesized according to Levai and Schag [23]. Compounds **4** and **8** were synthesized according to Toth and Szollosy [9].

All compounds were purified by crystallization from methanol. All solvents (methanol, ethanol, toluene) used in this work were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Polish Chemical Reagents (Gliwice, Poland), and used without further purification. Melting points were determined on a B-540 Melting Point apparatus (Büchi, Flawil, Switzerland) in capillary mode and they were uncorrected. The infrared transmission spectra of the crystalline products were recorded at the University of Lodz Faculty of Chemistry using a Nexus FT-IR spectrophotometer (Thermo Nicolet, Waltham, MA, USA). The MS-ESI were measured at the University of Lodz Faculty of Chemistry on a 500-MS LC Ion Trap mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA). Accurate mass measurements of product ions were confirmed using a Waters (Manchester, UK) q-TOF Synapt quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer. Elemental analyses were performed at the Faculty of Chemistry (University of Lodz) using a Vario Micro Cube analyzer by Elemental (Langensfeld, Germany). ^1H - (600 MHz) and ^{13}C -NMR spectra (150 MHz) were recorded at the University of Lodz Faculty of Chemistry on an Avance III 600 MHz instrument (Bruker, Billerica, MA, USA). The samples were dissolved in deuterated DMSO and CDCl_3 . Chemical shifts are given in ppm, coupling constants in Hz. Chemical shifts are referenced to the residual solvent signals, 2.50 ppm for ^1H in $\text{DMSO}-d_6$, 7.26 ppm for ^1H in CDCl_3 and 39.5 ppm for ^{13}C in $\text{DMSO}-d_6$, 77.0 ppm for ^{13}C in CDCl_3 . Computational studies were used to predict the properties and future use of potential drugs. Molinspiration Cheminformatics was used for the calculation of important molecular properties, molecular processing, bioactivity and the high-quality depiction of new molecules. Lipophilicity was determined by RP-TLC with small amounts of organic solvents. The erythrotoxicity of the compounds was evaluated in Laboratory of Bioanalysis in the Department of Pharmaceutical Chemistry, Drug Analysis and Radiopharmacy (Medical University of Lodz). The erythrocyte morphology was evaluated using an Opta-Tech phase-contrast microscope (Opta-Tech, Warsaw, Poland) with OptaView 7 software.

Diazomethane was prepared for the synthesis spiropyrazolines analogues as follows: Briefly, 50% aqueous potassium hydroxide solution (30 mL) and 100 mL diethyl ether was placed in a 500 mL flat-bottomed flask. The solution was cooled in an ice-salt mixture to 5 °C and 0.2 M of *N*-nitrosomethylurea (10.3 g) was added in portions. The mixture was stirred. The solution turned yellow and was placed in a previously-cooled separatory funnel. The solution was separated and the ether layer of the diazomethane was placed in a flask covered with pellets of potassium hydroxide. The aqueous layer was placed into a flask with an aqueous solution of benzoic acid.

3.2. Synthesis of (E)-3-(4-methoxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (1)

A mixture of 0.01 mol (2.243 g) 2-phenylchroman-4-one, 0.01 mol (1.362 g) 4-methoxy-benzaldehyde and five drops of piperidine were heated in oil bath with mechanical stirring at 130 °C for five hours. The progress of the reaction was tested by TLC (toluene:methanol 9:1). The mixture was left to cool at room temperature and dissolved in methanol. After 24 h, the compound was precipitated and then purified by crystallization from methanol. The compound **1** was obtained as a white powder. Yield: 41% m.p: 139.8–141.3 °C. MS (ESI+): *m/z* 343.3 C₂₃H₁₈O₃ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3030 (C-H arom), 2945, 2910 (C-H aliph.), 1675 (C=O), 1602, 1578, 1506 (C=C), 1304 (C-O), 1172 (C-O), 1148 (C-O-C). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 2.28 (3H, s, OCH₃), 6.74 (1H, s, C2-H), 7.99 (1H, s, =CH), 7.04–7.81 (13H, m, C-H arom.) (Figure S4). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 29.7 (OCH₃), 77.9 (C2-H), 116.2, 118.6, 121.7, 126.0, 127.6, 127.7, 128.6, 132.5, 136.0, 138.1, 140.0 (CH_{arom}, =CH), 122.3, 132.5, 158.6, 158.9 (C_{arom}), 183.0 (C=O) (Figure S4a). Anal. Calc. For C₂₃H₁₈O₃ (M = 342.38 g/mol) % C: 80.68; %H: 5.26. Found %C: 80.60; % H: 5.25.

3.3. Synthesis of 5'-(4-methoxyphenyl)-2-phenyl-4',5'-dihydro-4H-spiro [chromano-3,3'-pirazol]-4-one (2)

Briefly, 2.5 mmol (0.856 g) of compound **1** was dissolved in anhydrous acetone (5 mL) to give a light yellow solution. The flask containing the solution was placed in the ice bath and an ethereal solution of diazomethane (10 mmol) was added in excess. The mixture in the flask was left in the freezer for 48 h. The yellow precipitate was filtered off and purified by column chromatography and crystallized from methanol. Yield: 34% m.p. 128–129 °C. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3029 (C-H arom.), 2958, 2837 (C-H aliph.), 1677 (C=O), 1605, 1580, 1547, 1512, 1472 (C=C, N=N), 1307 (C-N), 1240 (C-O), 1146 (C-O-C). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 3.74 (3H, s, OCH₃), 4.01 (1H, dd, *J*_{AB} = 7.6 Hz, *J*_{BX} = 6.9 Hz, CH), 4.14 (1H, dd, *J*_{AB} = 12.27 Hz, *J*_{BX} = 7.15 Hz CH₂), 4.23 (1H, dd, *J*_{AB} = 12.27 Hz, *J*_{BX} = 1.96 Hz CH₂), 5.86 (1H, s, C2-H), 6.87–7.68 (13H, m, C-H arom) (Figure S5). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 23.6 (OCH₃), 55.2 (CH), 77.3 (CH), 79.5 (C2-H), 112.4, 113.9, 118.2, 119.2, 123.4, 127.3, 127.4, 128.5, 129.8, 138.9 (CH_{arom}), 121.3, 135.7, 142.6, 152.8, 158.7, 159.6 (C_{arom}), 186.3 (C=O) (Figure S5a). Anal. Calc. For C₂₄H₂₀O₃N₂ (M = 384.43 g/mol) %C: 74.98; %H: 5.20; %N: 7.34. Found %C: 74.07; %H: 5.21; %N: 7.43. MS (ESI+): *m/z* 385.4 C₂₄H₂₀O₃N₂ [M + H]⁺. HRMS (ESI+): *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₂₄H₂₁O₃N₂: 385.1552; found: 385.1548 (see Figure S5b).

3.4. Synthesis of (E)-3-(4-methoxybenzylidene)chroman-4-one (3)

A mechanically-stirred mixture of 0.01 mol (1.481 g) of chroman-4-one, 0.01 mol (1.362 g) of *p*-methoxybenzaldehyde and five drops of piperidine were heated at 150 °C in an oil bath for four hours. After cooling, the reaction mixture was left for 24 h at room temperature. The solidified product was filtered and crystallized from methanol. Compound **3** was obtained as a cream-colored powder. Yield: 55% m.p: 133.8–134.85 °C. MS (ESI+): *m/z* 267.5 C₁₇H₁₄O₃ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3038, 3000 (C-H arom.), 2958, 2866 (C-H aliph.), 1665 (C=O), 1603, 1568, 1510, 1477, 1463 (C=C), 1146 (C-O-C), 1112 (C-O). ¹H-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 1.58 (3H, s, OCH₃), 3.87 (1H, s, =CH), 5.38 (2H, d, *J*_{AB} = 16.60 Hz C2-H), 6.96–8.03 (8H, m, C-H arom.) (see Figure S6). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 55.5 (OCH₃), 67.8 (CH₂), 114.3, 117.9, 127.0, 127.9, 128.9 (CH_{arom}, =CH), 121.9, 132.1, 135.7, 137.4, 160.1 (C_{arom}), 182.3 (C=O) (see Figure S6a). Anal. Calc. For C₁₇H₁₄O₃ (M = 366.30 g/mol) %C: 76.67; %H: 5.25. Found %C: 76.68; %H: 5.20.

3.5. Synthesis of 4'-[(4-methoxy)phenyl]-4',5'-dihydro-4H-spiro[chroman-3,3'-pirazol]-4-one (4)

Compound 3 (2.5 mmol) (0.666 g) was dissolved in anhydrous acetone (4.5 mL) to give a light yellow solution. The flask with the solution was placed in the ice bath and an ethereal solution of diazomethane (10 mmol) was added in excess. The mixture in the flask was left in the freezer. The creamy precipitate was filtered off and purified by the column chromatography and crystallized from methanol. Yield: 56% m.p: 109–111.3 °C. IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3126, 3025 (C-H arom.), 2968, 2934 (C-H aliph.), 1684 (C=O), 1607, 1580, 1544, 1514, 1476, 1468 (C=C, N=N), 1311 (C-N), 1184 (C-O-C), 1115 (C-O). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 1.58 (3H, s, OCH_3), 3.74 (1H, dd, $J_{\text{AB}} = 8.4$ Hz, $J_{\text{BX}} = 8.4$ Hz CH_2), 3.78 (3H, s, CH), 4.16 (1H, d, $J_{\text{AB}} = 12.6$ Hz CH_2), 4.55 (1H, d, $J_{\text{AB}} = 12$ Hz CH_2), 4.90 (1H, d, $J_{\text{AB}} = 24$ Hz CH_2), 5.13 (1H, d, $J_{\text{AB}} = 13.39$ Hz CH_2), 6.82–7.68 (8H, m, C-H arom.) (see Figure S7). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 41.9 (CH), 55.3 (OCH_3), 69.5 (CH_2), 85.8 (CH_2), 98.0, 114.3, 118.2, 121.9, 128.0, 137.0 (CH_{arom}), 119.5, 128.8, 159.2, 161.7 (C_{arom}), 186.2 (C=O) (see Figure S7a). Anal. Calc. for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2$ (M = 308.34 g/mol) % C: 70.11; % H: 5.19; % N: 9.08. Found % C: 70.10; % H: 5.20; % N: 9.10. MS (ESI+): m/z 309.4 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2$ [M + H] $^+$. HRMS (ESI+): m/z [M + H] $^+$ calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{N}_2$: 309.1239; found: 309.1236 (see Figure S7b).

3.6. Synthesis of (E)-3-benzylidene-2-phenylchroman-4-one (5)

Compound 5 was synthesized by the same method as compound 1 [8]. Reagents: 0.01 mol (2.243 g) 2-phenylchroman-4-one, 0.01 mol (1.062 g) benzaldehyde and 5 drops of piperidine. Yield: 85% m.p: 103–105 °C. MS (ESI+): m/z 313.5 $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_2$ [M + H] $^+$. IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3068 (C-H arom.), 2932 (C-H aliph.), 1668 (C=O), 1604, 1577, 1506, 1492, 1472, 1461 (C=C), 1142 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ (ppm): 6.30 (1H, s, C2-H), 7.69 (1H, s, =CH), 6.99–7.81 (14H, m, CH arom.) (Figure S8). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 77.3 (C2-H), 118.7, 121.8, 127.6, 128.7, 128.9, 129.8, 129.9, 136.1, 139.5 (CH_{arom} , =CH), 122.2, 132.5, 134.1, 138.1, 158.9 (C_{arom}), 182.7 (C=O) (Figure S8a). Anal. Calc. For $\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_2$ (M = 312.36 g/mol) %C: 84.59; %H: 5.16. Found %C: 84.55; %H: 5.18.

3.7. Synthesis of 2'-phenylchromanone-3'-spiro-3,4-phenyl-1-pyrazoline (6)

Compound 6 was synthesized by the same method as compound 2 [8]. Compound 5 (2.5 mmol, 0.781 g) was dissolved in anhydrous acetone (6 mL) to give a clear solution. The next steps were the same as for the synthesis of compound 2. Yield: 78% m.p: 126.5–127 °C. MS (ESI+): m/z 355.3 $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$ [M + H] $^+$. IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3061, 3032 (C-H arom.), 1697 (C=O), 1602, 1579, 1493, 1473, 1460 (C=C, N=N), 1303 (C-N), 1146 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ (ppm): 4.07 (1H, dd, $J_{\text{AB}} = 7.16$ Hz, $J_{\text{BX}} = 1.96$ Hz CH), 4.20 (1H, dd, $J_{\text{AB}} = 11.96$ Hz, $J_{\text{BX}} = 7.16$ Hz CH_2), 4.21 (1H, dd, $J_{\text{AB}} = 11.95$ Hz, $J_{\text{BX}} = 1.96$ Hz CH_2), 5.86 (1H, s, C2-H), 7.10–7.69 (14, m, C-H arom.) (Figure S9). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 55.2 (CH), 77.0 (CH), 79.5 (C2-H), 112.4, 113.9, 118.2, 121.3, 127.3, 128.0, 128.5, 129.8, 135.7, 138.9, 142.8 (CH_{arom}), 100.1, 119.2, 138.9, 152.8, 159.6 (C_{arom}), 185.3 (C=O) (see Figure S9a). Anal. Calc. For $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{O}_2\text{N}_2$ (M = 354.41 g/mol) %C: 77.95; %H: 5.11; %N: 7.90. Found %C: 78.80; %H: 5.20; %N: 7.70.

3.8. Synthesis of (E)-3-benzylidene-chroman-4-one (7)

Compound 7 was synthesized according to Levai and Schag [22]. Reagents used for the reaction were: 0.01 mol (1.481 g) chroman-4-one, 0.01 mol (1.062 g) benzaldehyde and five drops of piperidine. Next steps were the same as for the synthesis of compound 3. Yield: 85% m.p: 111–112 °C. MS (ESI+): m/z 237.4 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{N}_2$ [M + H] $^+$. IR (KBr) $\nu(\text{cm}^{-1})$: 3056, 3028 (C-H arom.), 2904, 2854 (C-H aliph.), 1666 (C=O), 1600, 1572, 1461, 1454 (C=C), 1306 (C-O), 1144 (C-O-C). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) δ (ppm): 5.43 (1H, s, =CH), 7.59 (2H, d, $J_{\text{AB}} = 14.22$ Hz C2-H), 7.05–7.90 (9H, m, C-H arom.) (see Figure S10). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 67.6 (CH_2), 108.2, 119.3, 121.9, 125.2, 128.6, 129.5, 129.9, 131.1, 134.5 (CH_{arom} , =CH), 137.5, 154.5, 155.9 (C_{arom}), 182.3 (C=O) (see Figure S10a). Anal. Calc. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_2$ (M = 236.26 g/mol) %C: 81.33; %H: 5.08. Found %C: 81.03; %H: 5.10.

3.9. Synthesis of 4'-phenyl-4',5'-dihydro-4H-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-one (8)

Compound **8** was synthesized by the same method as compound **4** [9]. Compound **7** (2.5 mmol, 0.590 g) was dissolved in anhydrous acetone (5 mL) to give a clear solution. Next step were the same as for the synthesis of compound **4**. Yield: 92.5% m.p.: 141–142 °C. MS (ESI+): m/z 279.4 $C_{17}H_{14}O_2N_2$ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3064, 3031 (C-H, aromat.), 1677 (C=O), 1606, 1576, 1543, 1473, 1464 (C=C, N=N), 1309 (C-N), 1148 (C-O-C). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 4.15 (1H, dd, J_{AB} = 12.01 Hz, J_{BX} = 6.98 Hz CH₂), 4.46 (1H, dd, J_{AB} = 7.58 Hz, J_{BX} = 6.98 Hz CH), 4.94 (1H, d, J_{AB} = 12.56 Hz CH), 5.12 (1H, d, J_{AB} = 12.56 Hz CH), 7.09–7.68 (9, m, C-H aromat) (see Figure S11). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ (ppm): 42.4 (CH), 69.6 (CH₂), 85.7 (CH₂), 98.0, 118.2, 122.0, 128.0, 137.1, (CH_{arom}), 119.5, 129.0, 161.8 (C_{arom}), 186.1 (C=O) (see Figure S11a). Anal. Calc. for $C_{17}H_{14}O_2N_2$ (M = 278.31 g/mol) %C: 73.36; %H: 5.03; %N: 10.06. Found %C: 73.40; %H: 5.13; %N: 10.10.

3.10. Synthesis of (E)-3-(3-methoxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one (9)

Compound **9** was synthesized by the same method as compounds **1** and **5** [8]. Reagents: 0.01 mol (2.243 g) 2-phenylchroman-4-one, 0.01 mol (1.362 g) 3-methoxybenzaldehyde and five drops of piperidine. Yield: 80% m.p.: 96.2–98.4 °C. MS (ESI+): m/z 343.5 $C_{23}H_{18}O_3$ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3064 (C-H aromat.), 2958, 2829 (C-H aliph), 1663 (C=O), 1608, 1599, 1581 (C=C). 1176 (C-O), 1140 (C-O-C). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 2.28 (3H, s, OCH₃), 6.74 (1H, s, C2-H), 7.99 (1H, s, =CH), 7.04–7.81 (13H, m, C-H aromat) (see Figure S12). ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 54.9 (OCH₃), 77.2 (C2-H), 115.1, 116.1, 118.8, 126.9, 127.4, 128.8, 129.0, 130.1, 134.6, 136.7, 138.9 (CH_{arom}, =CH), 121.5, 122.1, 122.2, 131.8, 137.7, 158.3 (C_{arom}), 181.3 (C=O) (see Figure S12a). Anal. Calc. For $C_{23}H_{18}O_3$ (M = 342.39 g/mol) %C: 80.68; %H: 5.26. Found %C: 81.60; %H: 5.55.

3.11. Synthesis of 5'-(3-methoxyphenyl)-2-phenyl-4',5'-dihydro-4H-spiro[chromano-3,3'-pyrazol]-4-one (10)

Compound **10** was synthesized by the same method as compounds **2** and **6** [8]. Reagents used for the reaction were: 2.5 mmol (0.856 g) of compound **9** dissolved in anhydrous acetone (6 mL) to give a clear solution. Next steps were the same as for the synthesis of compound **2**. Yield: 41.3% m.p. 126–128 °C. MS (ESI+): m/z 385.4 $C_{24}H_{20}O_3N_2$ [M + H]⁺. IR (KBr) ν (cm⁻¹): 3027 (C-H aromat.), 2975, 2828 (C-H aliph.), 1677 (C=O), 1603, 1579, 1550, 1515, 1472 (C=C, N=N), 1307 (C-N), 1232 (C-O), 1146 (C-O-C). ¹H-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 2.13 (3H, s, OCH₃), 2.31 (1H, dd, J_{AB} = 3.1 Hz, J_{BX} = 6.9 Hz, CH), 6.01 (1H, s, C2-H), 6.36 (1H, dd, J_{AB} = 18 Hz, J_{BX} = 3 Hz CH₂), 6.37 (1H, dd, J_{AB} = 18 Hz, J_{BX} = 7.15 Hz CH₂), 6.73–7.82 (13H, m, C-H aromat.) (Figure S13). ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ (ppm): 20.6 (CH), 39.8 (OCH₃), 81.1 (C2-H), 118.6, 121.8, 126.8, 127.8, 128.2, 128.6, 138.0 (CH_{arom}) 102.2, 119.8, 134.7, 134.9, 136.1, 159.4 (C_{arom}), 185.5 (C=O) (Figure S13a). Anal. Calc. For $C_{24}H_{20}O_3N_2$ (M = 384.43 g/mol) %C: 74.98; %H: 5.20; %N: 7.34. Found %C: 74.77; %H: 5.25; %N: 7.45.

3.12. Determination of Lipophilicity of Flavone Analogues Using a RP-TLC Method

The RP-TLC experiments were performed on TLC plates (5 × 10 cm) RP-18 F254S (Merck, Darmstadt, Germany). The synthesized compounds were dissolved in *N,N*-dimethylformamide DMF (2 mg/mL). DMF was obtained from Chempur (Piekary Slaskie, Poland) and used with high purity (99.8%). The solutions of each compound in DMF were spotted on the plates, and observed under UV light at λ = 254 nm. A DMF-water solvent system was used as mobile phase. The composition of the solvent system has changed from 50%:50% to 95%:5%. All experiments were performed at room temperature. The log*P* parameter was calculated using the equation from the calibration curve.

3.13. Cells Cultures and Cytotoxicity Assay by MTT

Cytotoxicity was tested against human skin melanoma cells (WM-115, ECACC, Salisbury, UK), two human leukemia cell lines, *viz.* promyelocytic leukemia (HL-60) and lymphoblastic leukemia (NALM-6), and human colon adenocarcinoma cells (COLO-205). The cell lines COLO-205, WM-115 and

HL-60 used in this work came from the ATCC American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), whereas the NALM-6 cell line was purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). The leukaemia cells and colon adenocarcinoma were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and gentamicin (25 µg/mL; KRKA, Novo Mesto, Slovenia). For melanoma WM-115 cells, Dulbecco's minimal essential medium (DMEM; Invitrogen) was used. All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

For all experiments, the studied compounds were dissolved in DMSO (Sigma-Aldrich) and were further diluted in culture medium to obtain <0.1% DMSO concentration. In each experiment, controls with and without 0.1% DMSO were performed. The cytotoxicity of all compounds and of the reference compounds 4-chromanone and 3-benzylideneflavanone was determined by the MTT assay, i.e., 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma, St. Louis, MO, USA), which measures cellular dehydrogenase activity [24]. Exponentially growing cells were seeded a day before the experiment onto a 96-well microplates (Nunc, Roskilde, Denmark) at a density up to $6\text{--}8 \times 10^3$ cells/well (depending on the cell line). Subsequently, various concentrations of the studied compounds freshly prepared in DMSO and diluted with complete culture medium were added. All compounds were tested for their cytotoxicity at a final concentration of $10^{-7}\text{--}10^{-3}$ M. After 46 h of incubation with the studied compounds, the cells were treated with the MTT reagent and incubation was continued for another two hours. MTT – formazan crystals were dissolved in 20% sodium dodecyl sulphate (SDS, Sigma-Aldrich) and 50% DMF (Sigma-Aldrich) at pH 4.7; following this, absorbance was read at 570 nm on a multifunctional Victor ELISA-plate reader (Perkin Elmer, Turku, Finland). The IC₅₀ values, i.e., the concentration of the test compound required to reduce the cell survival fraction to 50% of controls, were calculated from concentration-response curves and used as a measure of the sensitivity of the cells to a given treatment. As a control, cultured cells were grown in the absence of drugs. The data points represent the means of at least five to ten repeats ± standard deviation (S.D.).

3.14. Red Blood Cells Lysis Assay

The studies on biological material were approved by the Bioethics Committee of the Medical University of Lodz, Poland (RNN/109/16/KE). The blood samples were obtained from healthy donors at the Blood Donation Centre in Lodz. The procedure for plasma preparation for erythrotoxicity studies was described previously [10]. The influence of synthesized compounds as well as two reference compounds flavanone and chromanone on RBC membrane integrity was performed by lysis assay which was conducted according to our previous protocol [10]. Briefly, 2% RBC suspension in 0.9% NaCl was incubated at 37 °C for one hour with the tested compounds at various concentrations corresponding to their activity towards cancer cell lines or 0.9% NaCl (control). The samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 min and the absorbance of the supernatant was measured at 550 nm. The results are presented as percentage of haemolysis where a sample containing 10 µL of 2.0% *v/v* Triton X-100 was regarded as a positive control contributing to 100% of haemolysis. A sample containing saline solution represented spontaneous haemolysis of RBCs (control). The studies were performed on four biological samples obtained from different blood donors ($n = 4$). The results are presented as mean ± standard deviation (SD). The coefficient of variability for the method was counted: $W = 9.51\%$, $n = 5$.

3.15. RBCs Morphology

A 2% erythrocyte suspension was incubated at 37 °C for one hour with various concentrations of synthesized compounds. The morphology of the RBCs was examined by means of a phase contrast Opta-Tech inverted microscope, at 400× magnification, equipped with software (OptaView 7) for image analysis.

3.16. Cell Cycle Analysis

One million HL-60 (subline CCL 240; cell type: promyeloblast) cells in 3 mL of RPMI 1640 supplemented with 20% FBS were seeded on 6-well plate. Following 20 h incubation with the test compounds at the concentrations of $0.5 \times IC_{50}$ and $1 \times IC_{50}$, or 1% DMSO as the vehicle control, the cells were centrifuged (6 min, 700 rpm, room temperature (RT)), washed with PBS (without Ca^{2+} and Mg^{2+}) and suspended in 1 mL of cold 70% ethanol in PBS. Fixed cells were stored in $-20^{\circ}C$ for 2–3 days. Before analysis, cells were centrifuged (10 min, 1500 rpm, $4^{\circ}C$) and washed twice with cold PBS. After the second wash, the cells were suspended in 1 mL of PBS containing 100 μg of RNase A and incubated in $37^{\circ}C$ for 10 min. Next, 5 μL of solution of propidium iodide (1 mg/mL) was added to each sample and incubated in dark for 30 min at RT. Stained cells were analyzed by flow cytometry (FACS Calibur, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 gated cells were collected using CellQuestPro software (Ver 6.0, Becton Dickinson) and cell cycle analysis was performed with ModFit LT software (Ver 3.2, Verity Software House, Topsham, ME, USA).

3.17. Digestion of Plasmid DNA with BamHI Restriction Nuclease

First, 0.5 μg of plasmid DNA (pcDNAHisC, total length 5.5 kbp) containing a unique BamHI restriction site was dissolved in a 1x BamHI reaction buffer and incubated overnight at $37^{\circ}C$ with the test compounds or daunorubicin, which was used as a positive control. The concentration of the test compounds and daunorubicin in the samples was 10 μM . The final concentration of DMSO in all samples was 10%. In the next step, the reaction mixtures were digested with BamHI restriction endonuclease (2 U/ μL) for 3 h at $37^{\circ}C$. Total reaction volume was 10 μL . Products of the reaction were separated in the 1% agarose gel in TBE buffer. The gel was stained with ethidium bromide and DNA fragments were visualized under a UV lamp (GBox, Syngene, Frederick, MD, USA).

3.18. X-ray Diffraction Experiment

X-ray data for compounds **2** and **8** were collected on a SuperNova diffractometer (Agilent, Santa Clara, CA, USA) at $T = 100(2)K$. The intensities were recorded with an Atlas detector with $MoK\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). For all data, multi-scan absorption was applied [25]. Both structures were solved using direct methods and the least-square refinement on F^2 . All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. SHELXT [26] and SHELXL-2014/7 programs were used to solve and refine the structures [27]. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. The positions of all H-atoms were calculated based on known geometry; the respective C-H bond lengths for aromatic CH, methine CH and methyl CH_3 atoms are 0.95, 1.00 and 0.98 $\text{\AA}$. The H atoms were included as riding contributions, with isotropic thermal parameters set at 1.5 and 1.2 times the U_{eq} of the parent atom (both the methyl and remaining atoms). To identify molecular geometries and hydrogen-bond patterns, PLATON [28] and MERCURY [29] were used. The experimental, refinement and crystallographic details are shown in Table 5. Further crystallographic details for the structures reported in this paper may be obtained free of charge on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB21, EZ, UK [fax: (44) 1223-336-033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk] on quoting the depository numbers: CCDC 1957835 for **2** and CCDC 1957892 for **8**.

Table 5. Crystallographic data for structures **2** and **8**.

	2	8
Chemical formula	C ₂₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	C ₁₇ H ₁₄ N ₂ O ₂
Formula weight	384.42	278.30
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic
Space group	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
Temperature (K)	100.0(1)	100.0(1)
a (Å)	9.3885(2)	6.7189(1)
b (Å)	10.6241(2)	23.6127(5)
c (Å)	19.2202(5)	25.0637(7)
α (°)	90	90
β (°)	90.768(2)	95.700(2)
γ (°)	90	90
V (Å ³)	1916.93(7)	3956.73(15)
Z	4	12
Radiation type	Mo Kα	Cu Kα
Measured reflections	15,186	25,640
Uniquereflections	3965	7120
Observed reflections	3578	5196
R[F ² > 2σ(F ²)]	0.0334	0.0466
wR(F ²)	0.0874	0.1228
S	1.02	1.00
No. of reflections	2 3965	7120
No. of parameters	263	568
No. of restraints	0	0
Δρ _{max} (e Å ^{−3})	0.33	0.22
Δρ _{min} (e Å ^{−3})	−0.20	−0.25

3.19. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted with a commercially-available package (GraphPad Prism 5, GraphPad, San Diego, CA USA). All results are presented as means ± standard deviation (SD). Normal distribution of continuous variables was confirmed with Shapiro-Wilk test, and homogeneity of variances was checked using Levene's test. The results were analyzed using one way ANOVA, and Dunnett's post hoc test. The results were considered significant at *p*-values lower than 0.05.

4. Discussion and Conclusions

This paper explores the biological activity of a series of ten compounds comprising various 3-benzylideneflavanones and 3-benzylidenechromanones, as well as their spiro- analogues with various substituents at the C3 position. The tested compounds exhibited relatively high cytotoxicity against four cancer cell lines: HL-60, NALM-6, WM-115 and COLO-205. We indicate that parent compounds **1** and **9** with a phenyl ring at C2 show lower cytotoxicity for the studied cancer cell lines than their spiropyrazolines analogues. Regarding the compounds with a methoxy substituent, compound **1** demonstrated lower cytotoxic activity than **3**. Similarly **5** was found to display lower cytotoxic activity than **7**. The most cytotoxic compound was **2**, which demonstrated an IC₅₀ = 3.0 ± 0.3 μM against HL-60.

The presence of a fused pyrazoline ring may well play a key role in selective cytotoxicity. The *p*-methoxy-substituted analogues of 3-arylideneflavanone exhibit high cytotoxicity against four cancer cell lines [30,31]. The unsubstituted compound **6**, with a phenyl ring bound to the pyrazoline ring, exhibited more than 330-fold lower cytotoxicity against HL-60 than compound **2**, bearing a *p*-methoxy group on the phenyl ring.

Cytotoxicity was also strongly influenced by the position of any substituents in the phenyl ring of the spiroflavanones or spirochromanones, especially against the HL-60 cell line. Both **6** and **10** have a methoxy group in the phenyl ring, and *m*-methoxy- **10** and *p*-methoxy- **6** exhibited high activity towards the HL-60, NALM-6 and WM-115 cell lines.

One of the aims of this study is to evaluate the $\log P$ of the synthesized compounds. Unfortunately, no significant relationship was observed between chemical structure and lipophilicity, nor between cytotoxicity and the electron-attracting or electron-donating properties of the substituents. Some of the analyzed complexes demonstrated promising anti-proliferative properties against specific human cancer cell lines. It is worth noting that the ability to inhibit the proliferation of cancer cells was determined by the structure of the studied compounds. Additional structure–activity relationship (SAR) studies are needed to better understand the relationship between the structure of the compound and its biological activity.

Our present findings indicate that the ability of the studied compounds to inhibit the growth of cancer cells may result from cell cycle inhibition. The compounds were found to block the cell cycle of several cancer cells in the G2/M phase. In addition, as indicated by their ability to prevent digestion of plasmid DNA with BamHI restriction nuclease, the studied chromanone/flavanone analogues appear to be capable of intercalating with genomic DNA of cancer cells, thus leading to cell damage and ultimately apoptosis. It is noteworthy that commercially-used anticancer drugs, such as docetaxel, doxorubicin, cisplatin or etoposide, are also known to arrest the cycle of cancer cells in the G2/M phase [32–34]. Our findings correspond closely with those of previous reports on the cell cycle distribution in HL-60 cells following treatment with cisplatin. Velma et al. [35] demonstrated that cisplatin caused changes in the expression of genes involved in cell cycle regulation and programmed cell death among HL-60 cells, with both cell cycle blockade and apoptotic pathway activation being observed. It is worth noting that not only do our chromanone/flavanone analogues demonstrate similar molecular anti-proliferative activity to cisplatin, but they also possess the ability to interact with DNA and damage it [35]. Our results are in agreement with those of previous experiments carried out on leukemia cells exposed to etoposide, another commonly-used chemotherapeutic drug. Etoposide has also been shown to inhibit the cell cycle of HL-60 cells in the G2/M phase [35].

Our findings also indicate that the test compounds protected DNA against cleavage catalyzed by BamHI endonuclease in a similar way to quercetin, which has also previously been shown to intercalate with DNA [36]. This suggests that the test compounds interact with DNA, possibly by intercalation. Furthermore, the test compounds arrested leukemia cells in the G2/M phase to an extent comparable with quercetin, suggesting that they share a similar mechanism of action.

We intend to continue this line of research into chromanone/flavanone analogues towards better understanding their influence on the mechanisms of cell cycle arrest of cancer cells. It is planned to extend our research to include expression analysis of genes involved in cell cycle regulation and apoptosis.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1420-3049/25/7/1613/s1>, IR spectrum of compounds; the effect of the test compounds and quercetin on the cell cycle in HL-60 cells; the cell cycle of the tested compounds; ^1H NMR and ^{13}C NMR spectrum of compounds are available in supplementary materials.

Author Contributions: E.B. conceptualization, writing-review and edition, supervision; A.A.A.-G. methodology, chemistry (synthesis and lipophilicity), formal analysis, writing—review and edition; J.K.—X-ray data measurements; M.M. crystal structure solution & determination, molecular and crystal packing analysis, writing, review-edition of crystallographic part; M.M.-P. investigation of erythrotoxicity, statistical analysis of RBCs lysis assay, writing—review and edition; M.C. and K.K.-G. Digestion of Plasmid DNA with BamHI Restriction Nuclease and Cell cycle analysis, writing-review, edition; P.H.—investigation; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Medical University of Lodz (grant No. 503/3-066-02/503-31-001 and grant No. 502-03/3-066-02/502-34-118).

Acknowledgments: The authors would like to thank Joanna Sikora for her skillful assistance in biological material collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Marella, A.; Ali, R.; Alam, T.; Saha, R.; Tanwar, O.; Akhter, M.; Alam, M. Pyrazolines: A Biological Review. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2013**, *13*, 921–931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yusuf, M.; Jain, P. Synthetic and biological studies of prrazolines and related heterocyclic compounds. *Arab. J. Chem.* **2014**, *7*, 553–596. [[CrossRef](#)]
3. Amir, M.; Kumar, H.; Khan, S.A. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazoline derivatives as new anti-inflammatory and analgesic agents. *Bio-org. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 918–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Karthikeyan, M.S.; Holla, B.S.; Kumari, N.S. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxypyrazolines. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 30–36. [[CrossRef](#)]
5. Prasad, Y.R.; Rao, A.L.; Prasoon, L.; Murali, K.; Kumar, P.R. Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2''-hydroxynaphthalen-1''-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Bio-Org. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5030–5034. [[CrossRef](#)]
6. Camacho, M.; Leon, J.; Entrena, A.; Velasco, G.; Carrion, M.; Escames, G.; Vivo, A.; Acuna-Castroviejo, D.; Gallo, M.; Espinosa, A. 4,5-Dihydro-1H-pyrazole Derivatives with Inhibitory nNOS Activity in Rat Brain: Synthesis and Structure–Activity Relationships. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5641–5650. [[CrossRef](#)]
7. Carrión, M.; Lopez, C.; Tapias, V.; Escames, G.; Acuña-Castroviejo, D.; Espinosa, A.; Gallo, M.; Entrena, A. Pyrazoles and pyrazolines as neural and inducible nitric oxide synthase (nNOS and iNOS) potential inhibitors (III). *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2579–2591. [[CrossRef](#)]
8. Pijewska, L.; Kamiecki, J.; Perka-Karolczak, W. 3-Arylidene flavanones. Part 2 Reaction with diazomethane. *Pharmazie* **1993**, *48*, 254–257.
9. Toth, G.; Szollosy, A.; Lévai, A.; Kotovych, G. Synthesis and stereochemistry of spiropyrazolines. *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. II* **1986**, *12*, 1895–1898. [[CrossRef](#)]
10. Adamus-Grabicka, A.; Markowicz-Piasecka, M.; Ponczek, M.; Kusz, J.; Malecka, M.; Krajewska, U.; Budzisz, E. Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells. *Molecules* **2018**, *23*, 3172. [[CrossRef](#)]
11. Cremer, D.; Pople, J.A. General definition of ring puckering coordinates. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1354–1358. [[CrossRef](#)]
12. Duax, W.L.; Norton, D.A. *Atlas of Steroid Structure*; Plenum Press: London, UK, 1975; pp. 3273–3274.
13. Suchojad, K.; Dołęga, A.; Adamus-Grabicka, A.; Budzisz, E.; Małecka, M. Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one. *Acta Cryst. E* **2019**, *E75*, 1907–1913. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pastuszko, A.; Majchrzak, K.; Czyz, M.; Kupcewicz, B.; Budzisz, E. The synthesis, lipophilicity and cytotoxic effects of new ruthenium(II) arene complexes with chromone derivatives. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *159*, 133–141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jóźwiak, K.; Szumiło, H.; Soczewiński, E. Lipofilowość, metody wyznaczania i rola w działaniu biologicznym substancji chemicznych. *Wiad. Chem.* **2001**, *55*, 1047–1074.
16. Gao, S.; Cao, C. A New Approach on Estimation of Solubility and n-Octanol/Water Partition Coefficient for Organohalogen Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *6*, 962–977.
17. Dearden, J.C. The History and Development of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs). *IJQSPR* **2016**, *1*, 1–44. [[CrossRef](#)]
18. Hoekman, D. Exploring QSAR Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, Volume 1. Hydrophobic, Electronic and Steric Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10678. [[CrossRef](#)]
19. Soskic, M.; Magnus, V. Binding of ring-substituted indole-3-acetic acids to human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4595–5000. [[CrossRef](#)]
20. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26. [[CrossRef](#)]
21. Gallagher, P.G. Red Blood Cell Membrane Disorders. In *Hematology*, 7th ed.; Hoffman, R., Benz, E., Heslop, H., Weitz, J., Eds.; Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2018.
22. Stasiuk, M.; Kijanka, G.; Kozubek, A. Changes in the shape of erythrocytes and the factors causing them. *Post. Biochem.* **2009**, *55*, 425–433.

23. Levai, A.; Schag, J.B. Synthesis of 3-benzylidenechroman-4-ones and -1-thiochroman-4-ones. *Pharmazie* **1979**, *34*, 747–749.
24. Hansen, M.B.; Nielsen, S.E.; Berg, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods* **1989**, *119*, 203–210. [[CrossRef](#)]
25. *CrysAlis PRO*; Agilent Technologies: Yarnton, Oxfordshire, UK, 2013.
26. Sheldrick, G.M. *SHELXT*—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallogr. A* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sheldrick, G.M. Crystal structure refinement with *SHELXL*. *Acta Cryst. C* **2015**, *71*, 3–8. [[CrossRef](#)]
28. Spek, A.L. Structure validation in chemical crystallography. *Acta Cryst. D* **2009**, *65*, 148–155. [[CrossRef](#)]
29. Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; Van de Streek, J.; Wood, P.A. New Features for the Visualization and Investigation of Crystal Structures. *J. Appl. Cryst.* **2008**, *41*, 466–470. [[CrossRef](#)]
30. Kupcewicz, B.; Balcerowska-Czerniak, G.; Małecka, M.; Paneth, P.; Krajewska, U.; Rozalski, M. Structure-cytotoxic activity relationship of 3-arylidene flavanone and chromanone (E, Z isomers) and 3-arylflavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *23*, 4102–4106. [[CrossRef](#)]
31. Kupcewicz, B.; Małecka, M.; Zapadka, M.; Krajewska, U.; Rozalski, M.; Budzisz, E. Quantitative relationships between structure and cytotoxic activity of flavonoid derivatives. An application of Hirshfeld surface derived descriptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3336–3341. [[CrossRef](#)]
32. Velma, V.; Dasari, S.R.; Tchounwou, P.B. Low Doses of Cisplatin Induce Gene Alterations, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells. *Biomark. Insights* **2016**, *24*, 113–121. [[CrossRef](#)]
33. Żuryń, A.; Krajewski, A.; Szulc, D.; Litwiniec, A.; Grzanka, A. Activity of cyclin B1 in HL-60 cells treated with etoposide. *Acta Histochem.* **2016**, *118*, 537–543. [[CrossRef](#)]
34. Ghelli, A.; di Rora, L.; Iacobucci, I.; Martinelli, G. The cell cycle checkpoint inhibitors in the treatment of leukemia. *J. Hematol. Oncol.* **2017**, *10*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Dasari, S.R.; Velma, V.; Yedjou, C.G.; Tchounwou, P.B. Preclinical assessment of low doses of cisplatin in the management of acute promyelocytic leukemia. *Int. J. Cancer Res. Mol. Mech.* **2015**, *1*, 1–6.
36. Srivastava, S.; Somasagara, R.; Hedge, M. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 240–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Sample Availability: Samples of the compounds **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10** are available from the author Angelika A. Adamus-Grabicka.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

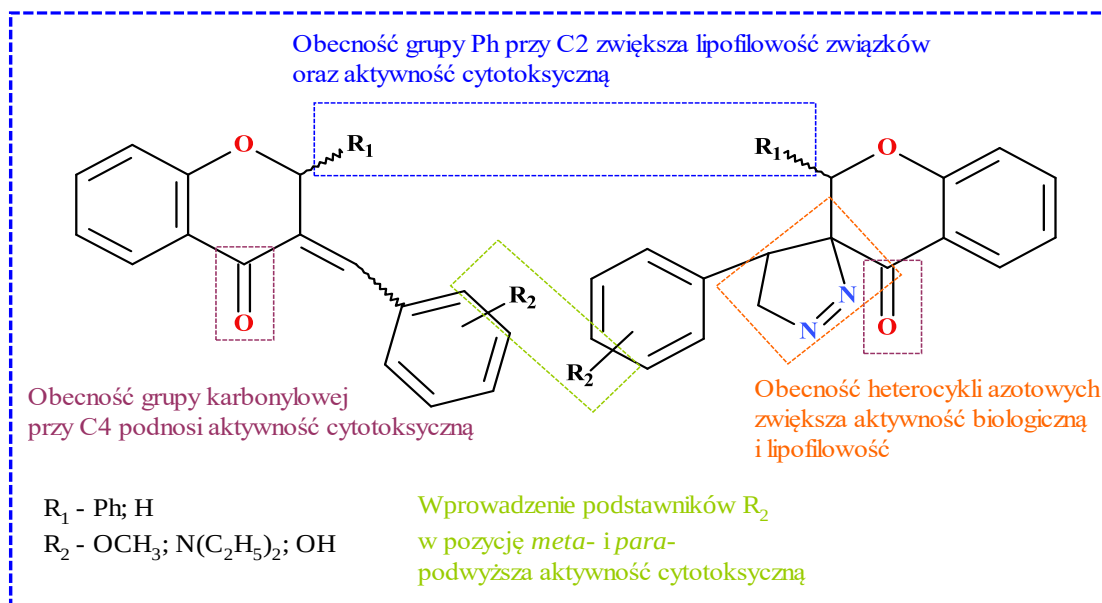
VI. Dyskusja

Współczesna medycyna boryka się z problemem w pełni skutecznej chemioterapii, dlatego nadal poszukuje się nowych chemioterapeutyków charakteryzujących się odpowiednią skutecznością, selektywnością i specyfiką działania na komórki nowotworowe. Konieczność zidentyfikowania nowych związków o skutecznej aktywności przeciwnowotworowej i wysokiej selektywności wobec komórek rakowych oraz niskiej toksyczności wobec prawidłowych komórek wymaga przeprowadzenia wielu badań biologicznych na zsyntezowanych związkach będących potencjalnymi kandydatami na leki przeciwnowotworowe. Niewątpliwie punktem zwrotnym w rozwoju badań nad chemioterapeutykami było odkrycie kompleksów metaloorganicznych w dwudziestym wieku ponieważ okazało się, że mogą być stosowane w leczeniu raka płuca, jajników, szyi oraz głowy [102] [103]. Najbardziej znanymi metalami występującymi w formie związków koordynacyjnych wykazujących działanie przeciwnowotworowe są platyna i ruten. Kompleksy platyny: cisplatyna, carboplatyna czy oxaliplatyna stały się pierwszymi skutecznymi cytostatykami, które znalazły zastosowanie w medycynie. Dalsze badania związków koordynacyjnych metali doprowadziły do odkrycia właściwości kompleksów rutenu. Kompleks rutenu KP1019 wykazał właściwości przeciwnowotworowe w stosunku do komórek nowotworowych jelita grubego [102]. Mimo wysokiej skuteczności przeciwnowotworowej związki te wykazały ogólnoustrojową cytotoksyczność, szczególnie związaną z mielosupresją oraz nefro- i hepatotoksycznością, co jest poważnym czynnikiem ograniczającym jej szerokie zastosowanie. Dlatego naukowcy wciąż pracują nad nowymi związkami, które w terapii nowotworów będą niszczyć tkanki objęte nowotworzeniem z minimalnym i odwracalnym uszkodzeniem prawidłowych tkanek pacjenta [104]. W badaniach biologicznych nowych związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych zwykle porównuje się je do dobrze znanych i stosowanych w chemioterapii cisplatyny, carboplatyny czy innych kompleksów metali.

W wykonanej przeze mnie pracy celem było zsyntezowanie związków opartych na strukturze pirazolin i skondensowanych z pierścieniem chromanonu (2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on) oraz flawanonu (2-fenyl-2,3-dihydro-4*H*-chromen-4-on) podstawionych wybranymi grupami funkcyjnymi, a następnie określenie i porównanie ich aktywności

cytotoksycznej. W pracy otrzymałam **14** związków, w tym **5** związków to (*E*)-3-benzylideno-2-fenyl-chroman-4-ony oraz **4** związki (*E*)-3-benzylidenochroman-4-ony, podstawione grupami funkcyjnymi: metoksyową, metylową, hydroksylową, dietyloaminową oraz niepodstawione. Otrzymane produkty zostały poddane reakcji z diazometanem w celu otrzymania pochodnych pirazolin, dzięki czemu otrzymałam **5** związków spiro-1-pirazolin skondensowanych z odpowiednio podstawionym pierścieniem flawanonu lub chromanonu. Wykorzystując metodę protonowego i węglowego rezonansu magnetycznego, spektroskopię w podczerwieni, analizę masową oraz pierwiastkową potwierdziłam struktury otrzymanych związków. Za pomocą krystalografii rentgenostrukturalnej udało się ustalić strukturę krystalograficzną kryształów czterech związków: (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)chroman-4-onu, (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-2-fenylchroman-4-onu, (*E*)-3-(4-hydroksybenzylideno)chroman-4-onu, (*E*)-3-(3-hydroksybenzylideno)-2-fenylchroman-4-onu, 5'-(4-metoksy)-2-fenyl-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-onu oraz 4'-fenyl-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-onu. Wyniki analizy fizykochemicznej pozwoliły na wykonanie kolejnego etapu, czyli badań biologicznych, których głównym punktem było określenie aktywności cytotoksycznej związków. Część dotycząca badań biologicznych stanowiła najistotniejszy element pracy doktorskiej. Dzięki nim na postawione na początku pracy pytania odnośnie działania przeciwnowotworowego związków, toksycznego oddziaływania wobec erytrocytów oraz akumulacji w błonach biologicznych uzyskałam odpowiedzi, co zachęciło mnie do rozwijania tematyki związków o działaniu przeciwnowotworowym. Ze względu na strukturę badane związki mogą stanowić potencjalne leki w leczeniu chorób nowotworowych. W literaturze znajduje się wiele potwierdzonych badaniami doniesień na temat przeciwnowotworowego działania związków o strukturze benzo- γ -pironu [105]. Modyfikacje rdzenia flawonu były podstawą wielu syntetycznych i strukturalnych badań nad poprawą ich aktywności biologicznej [106]. Na podstawie badań zależności struktury związków flawonu, a aktywnością stwierdzono, że podwójne wiązanie między węglem C2 a C3, obecność grupy karbonylowej w pozycji 4, grupy fenylowej przy C2 oraz podstawników: metoksyowego, hydroksylowego i aminowego przyłączonych do benzylidenopochodnych poprawiają aktywność biologiczną [107]. Takie związki wykazały silne działanie przeciwnowotworowe, inhibując niektóre enzymy z grupy

kinaz np. kinazy cyklinozależne, tyrozynowe czy topoizomerazy [106]. Ugrupowanie flawonowe, dzięki swoim zróżnicowanym właściwościom farmakologicznym, stanowi potencjalny farmakofor [108] określający grupy funkcyjne potrzebne do związania leku z obiektem docelowym oraz wykazujący aktywność biologiczną, a także sposób przestrzennego rozmieszczenia grup względem siebie [109]. Podobnie zachowują się luteolina i kwercetyna, które hamują aktywność topoizomerazy w komórkach białaczkowych, dzięki czemu mogą mieć implikacje terapeutyczne ponieważ enzymy te są celem dla stosowanych w leczeniu raka etopozydu, topotekanu czy irynotekanu [110]. Badania biologiczne analogów flawonów prowadzone na przestrzeni kilkudziesięciu lat wykazały, że tego typu związki wykazują działanie cytotoksyczne w stosunku do wybranych linii komórkowych. Badanie cytotoksyczności *in vitro* kompleksów imidazolinowych aminoflawonu wykazało zwiększenie aktywności antyproliferacyjnej. Podstawienie dodatkowo grupy metoksyłowej wzmocniło działanie cytotoksyczne związku [108]. Podobną zależność zauważyłam analizując wyniki badań zsyntezowanych związków. Badanie aktywności cytotoksycznej zostało przeprowadzone wobec czterech nowotworowych linii komórkowych: ostrej białaczki promielocytowej (HL-60), ostrej białaczki limfoblastycznej (NALM-6), czerniaka (WM-115) oraz raka okrężnicy (COLO-205). W badaniach wzięłam pod uwagę stosowane najczęściej chemioterapeutyki: cisplatynę, karboplatinę oraz kwercetynę, które stanowiły grupę odniesienia. Wyniki badań wskazują, że związek (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-2-fenylochroman-4-onu, 5'-(4-metoksyfenylo)-2-fenylo-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-onu oraz 5'-(3-metoksyfenylo)-2-fenylo-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazolo]-4-on wykazały największą aktywność antyproliferacyjną przeciwko komórkom nowotworowym ostrej białaczki promielocytowej. Wyniki IC₅₀ wynosiły odpowiednio 3.0±0.3 μM, 8.36±0.63 μM oraz 9.4±0.4 μM. Powyższe związki w swojej strukturze miały przyłączoną grupę metoksyłową oraz dietyloaminową. Ponadto każdy z tych związków posiada grupę fenylową przy atomie węgla C2 chromanonu (Ryc.16).



Ryc. 16. Wpływ grup funkcyjnych na aktywność biologiczną badanych związków.

Warto również pochylić się nad różnicą aktywności cytotoksycznej w zależności od występowania izomeru *E,Z* 3-benzylidenoflawanonu oraz 3-benzylidenochromanonu. *E*-izomery pochodnych flawanonów i chromanonów ogólnie wykazują wyższą lub zbliżoną aktywność cytotoksyczną w stosunku do izomerów *Z*. W badaniach przeprowadzonych przez Kupcewicz różnice można zaobserwować w związkach zawierających atom halogenu (chloru lub bromu) w pozycji *para* podstawnika aryłowego (101). Izomery *E* tych związków wykazują w stosunku do linii komórkowej białaczki HL-60 wysoką aktywność cytotoksyczną natomiast izomery *Z* nie wykazują w ogóle cytotoksyczności wobec tej linii komórkowej. Zastąpienie halogenu grupą metylową lub obecność niepodstawionego pierścienia benzenowego w związkach o izomerii *E* nie wykazuje istotnych różnic w stosunku do izomeru *Z* [111]. Wartości IC_{50} są zbliżone w badaniu linii komórkowej HL-60. Dopiero w stosunku do komórek nowotworowych linii NAML-6 widać istotną różnicę cytotoksyczności. Izomery *E* wykazały wysoką aktywność antyproliferacyjną podczas gdy izomery *Z* nie wykazały żadnej aktywności. Odwrotna zależność występuje w aktywności cytotoksycznej izomerów w stosunku do komórek

nowotworowych czerniaka skóry (WM-115). Co prawda oba izomery E i Z wykazały umiarkowaną aktywność cytotoksyczną jednak izomery Z były kilkakrotnie bardziej aktywne niż izomery E [111] (116). Związki, w których występują bogate w elektrony heterocykle azotowe również wykazują aktywność biologiczną jako związki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwzapalne i przeciwdepresyjne [71]. W literaturze dobrze znany jest indazol, którego pochodne wykazują szeroką aktywność biologiczną podobnie jak pirazoliny [112] [113]. Szczególnie interesujące jest działanie przeciwnowotworowe pochodnych indazolu, dlatego też pierścienie indazolowe są obecne w wielu związkach o aktywności cytotoksycznej, które zostały poddane badaniom klinicznym. Pochodne mocznika zawierające pierścień indazolowy okazały się skuteczne w leczeniu różnych typów nowotworów. Linifanib czyli 1-[4-(3-amino-1*H*-indazol-4-yl)-fenylo]-3-(2-fluoro-5-metylofenylo)mocznik działa przeciwnowotworowo w stosunku do komórek niedrobnokomórkowego raka płuc, piersi oraz jelita grubego. Inne pochodne przebadano na liniach komórkowych raka płuc (NCI-H460 oraz A549), raka okrężnicy (HT-29), raka żołądka (SGC-7901) oraz raka piersi (MDA-MB-231) i okazało się, że wykazują wysoką aktywność antyproliferacyjną na każdą z tych linii. Związki indazolu podstawione pierścieniem pirolipirydynowym wykazały silną aktywność w stosunku do komórek ludzkiej białaczki HL-60 [114]. Najbardziej obiecujące wyniki wykazał 1-(2-(1*H*-indazol-3-yl)-1*H*-pirolo[3,2-*b*]piridyn-5-yl)-1-metyl-3-fenylo-mocznik $IC_{50} = 8.3$ nM w stosunku do HL-60 [115]. Zastąpienie w strukturze linifanibu cząsteczki mocznika, łączącego pierścienie aromatyczne, łącznikiem *N,N'*-dibenzoilopiperazyny lub *N,N'*-dibenzoiloetylenodiaminy doprowadziło do otrzymania szeregu związków o potencjalnych właściwościach antyproliferacyjnych oraz inhibitujących kinazę tyrozynową. Dalsze badania wielu związków pochodnych indazolu wykazały, że obecność grupy metoksyowej wzmacnia apoptozę zwłaszcza komórek raka płuc [116]. Pochodne indazolu zawierające grupę sulfonamidową wykazały działanie antyproliferacyjne i apoptotyczne w stosunku do linii komórkowych raka jajnika i raka płuc [117].

Biorąc pod uwagę wyniki dla związków referencyjnych warto wskazać, że zarówno kwercetyna jak i chromanon wykazały niską aktywność cytotoksyczną wobec HL-60. Związek 5'-(4-metoksy)-2-phenylo-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-on również wykazał silne działanie cytotoksyczne w stosunku do linii

komórkowej NALM-6 ($6.8 \pm 0.4 \mu\text{M}$) oraz WM-115 ($5.5 \pm 0.4 \mu\text{M}$). Podobną zależność widać w przypadku (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-2-fenylochroman-4-onu, który w stosunku do linii komórkowej NALM wykazał wartość $\text{IC}_{50} = 9.08 \pm 0.30 \mu\text{M}$ natomiast wobec WM-115 $\text{IC}_{50} = 6.45 \pm 0.69 \mu\text{M}$. Wobec linii komórkowej raka okrężnicy najlepsze wyniki wykazał związek posiadający pierścień chromanonu (4'-[(4-metoksy)fenylo]-4',5,-dihydro-4*H*-spiro[chroman-3,3,-pirazol]-4-on) $\text{IC}_{50} = 26.5 \pm 1.8 \mu\text{M}$. Już pół wieku temu przeprowadzono badania pochodnych 4*H*-1-benzopiran-4-onu, w wyniku których okazało się, że związki flawonoidowe obniżają ryzyko występowania nowotworów, hamują cykl komórkowy w fazie G_1/S lub G_2/M oraz indukują apoptozę komórek nowotworowych [54]. Analizując wyniki aktywności cytotoksycznej wybrałam związki o najwyższej zdolności antyproliferacyjnej aby przeprowadzić kolejne badania: oddziaływanie na cykl komórkowy oraz trawienie plazmidowego DNA. Okazało się, że związki hamują proliferację ok 60% komórek nowotworowych HL-60 w fazie G_2/M , podobnie do kwercetyny. Plazmidowy DNA po inkubacji z badanymi związkami poddano trawieniu endonukleazą BamH1, w wyniku czego plazmid uległ częściowemu trawieniu oraz przekształceniu do postaci liniowej. Oznacza to, że związki poddane temu badaniu mogą interkalować DNA. Aby sprawdzić czy związki o wysokiej aktywności cytotoksycznej nie będą działały toksycznie na erytrocyty krwi przeprowadziłam test hemokompatybilności. Jest to badanie wstępne, które może wyjaśnić zachodzenie hemolizy erytrocytów, dlatego pozytywny wynik jest informacją o konieczności przeprowadzenia kolejnych zaawansowanych analiz dla potencjalnych leków. Wszystkie poddane ocenie związki nie wykazały patologicznego wpływu na komórki krwi, ponadto nie zaobserwowano tworzenia form echinocytarnych pod wpływem związków. Równie ważnym badaniem, które wykonałam było obliczenie deskryptora lipofilowości, który związany jest ze strukturą związków. Związki posiadające podstawnik fenylowy w pozycji C2 wykazują wyższe wartości $\log P$, podobnie jak obecność podstawnika metylowego i metoksyłowego. Związki charakteryzujące się największą aktywnością cytotoksyczną wykazywały wartość lipofilowości w zakresie 3.43 – 5.69. Według zasady drug-likeness aktywność biologiczna związków wzrasta wraz z wartością $\log P$, co przekłada się na fakt, że takie związki mogą być brane pod uwagę w dalszych badaniach nad nowymi lekami przeciwnowotworowymi. Badania zależności struktura-aktywność (SAR) wykazały, że aktywność pirazolin i jej pochodnych zależy od obecności

heterocyklicznej grupy azotowej, która jest podjednostką strukturalną o różnych właściwościach farmakologicznych [71] [72]. Doniesienia literaturowe na temat badań biologicznych związków zawierających w swojej strukturze pirazoliny potwierdzają tę hipotezę [118]. Analiza SAR wykazała, że rusztowanie pirazolowe 1H jest kluczowym farmakoforem dla uzyskania interesującej aktywności hamującej, a podstawienia w pozycjach 3, 4 i 5 pierścienia fenyłowego znacznie zwiększają aktywność hamującą [119].

Postawione przeze mnie pytania oraz hipotezy dotyczące aktywności biologicznej pirazolin skondensowanych z chromanone lub flawanone zostały potwierdzone wynikami przeprowadzonych badań. Związki, które wykazały najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec wybranych linii komórkowych, jak również dały pozytywne wyniki w pozostałych testach biologicznych mogą być poddane bardziej zaawansowanym badaniom dedykowanym przyszłym lekom o działaniu przeciwnowotworowym.

VII. Wnioski

Wyniki uzyskane podczas przeprowadzonych badań eksperymentalnych pozwalają na sformułowanie następujących wniosków.

- Zsyntezowano 14 związków, pochodnych benzylidenochromanonów z podstawnikami: H, OCH₃, OH, N(C₂H₅)₂ w pozycji *meta* lub *para* podstawnika fenyłowego grupy benzylidenowej optymalizując metody opisane wcześniej w literaturze.
- W reakcji pochodnych (*E*)-3-benzylidenochroman-4-onów i (*E*)-3-benzyliden-2-fenylochroman-4-onów z diazometanem otrzymano spiro-1-pirazoliny.
- Struktury zsyntezowanych związków ustalono w oparciu o metody spektroskopowe: ¹H i ¹³C NMR, IR, MS oraz analizę pierwiastkową.
- W oparciu o metody krystalograficzne ustalono struktury 6 związków:
(*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)chroman-4-onu,
(*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-2-fenylochroman-4-onu,
(*E*)-3-(4-hydroksybenzylideno)chroman-4-onu,
(*E*)-3-(3-hydroksybenzylideno)-2-fenylochroman-4-onu,
5'-(4-metoksyfenylo)-2-fenylo-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-onu,
4'-fenylo-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-onu
- Zbadano aktywność biologiczną związków: cytotoksyczność, hemokompatybilność, morfologię erytrocytów, oddziaływanie na cykl komórkowy, trawienie plazmidowego DNA.
- Zsyntezowane związki wykazywały zróżnicowaną aktywność cytotoksyczną wobec nowotworowych linii komórkowych. Pirazoliny skondensowane z flawanem działały bardziej cytotoksycznie na komórki nowotworowe niż pirazoliny skondensowane z chromanem.
- Najbardziej aktywnym cytotoksycznie związkiem wobec linii komórkowej ostrej białaczki promielocytowej (HL-60) jest 5'-(4-metoksyfenylo)-2-fenylo-4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chromano-3,3'-pirazol]-4-on (2). Wartość IC₅₀ = 3.0 ± 0.3 μM.
- Wśród analogów spirochromanonów najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec linii komórkowej raka okrężnicy (COLO-205) wykazał 4'-(4-metoksyfenylo)-

4',5'-dihydro-4*H*-spiro[chroman-3,3'-pirazol]-4-on (**4**). Wartość $IC_{50} = 26.5 \pm 1.8 \mu M$.

- Wśród pochodnych 3-benzylidenochromanonów, największą aktywność wobec wybranych linii komórkowych wykazał (*E*)-3-(4-*N,N*-dietyloaminobenzylideno)-2-fenylchroman-4-on (**11**). Wartość IC_{50} odpowiednio $8.36 \pm 0.63 \mu M$ wobec komórek ostrej białaczki promielocytowej (HL-60), $9.08 \pm 0.30 \mu M$ wobec komórek ostrej białaczki limfoblastycznej (NALM-6), $6.45 \pm 0.69 \mu M$ wobec komórek czerniaka (WM-115).
- Wszystkie badane związki poddane ocenie hemokompatybilności wykazały, że nie występuje ryzyko patologicznej hemolizy w warunkach *in vivo* w badanym zakresie stężeń.
- Ocena morfologii erytrocytów wykazała, że w wyższych stężeniach badane związki mogą wpływać na transformację erytrocytów w echinocyty, jednak jest to proces odwracalny, a formy echinocytarne występują naturalnie w naczyniach krwionośnych.
- Związki o najwyższej cytotoksyczności wybrane do analizy cyklu komórkowego wykazały, że zatrzymują proliferację komórek nowotworowych w fazie G2/M w zakresie 50% - 60%.
- Trawienie plazmidowego DNA wykazało, że związki o najwyższej aktywności cytotoksycznej mogą być interkalatorami DNA.
- Za pomocą metody RP-TLC wyznaczono wartości lipofilowości dla badanych związków. Zaobserwowano, że wszystkie wykazują umiarkowany charakter lipofilowy. Można jednak zaobserwować, że analogi flawanonu wykazują wyższą wartość $\log P$ niż pochodne chromanonu.
- Obecność skondensowanego pierścienia pirazolinowego może odgrywać kluczową rolę w selektywnej cytotoksyczności. *Para*-metoksy-podstawione analogi 3-arylidene flawanonu wykazują wysoką cytotoksyczność wobec czterech linii komórek nowotworowych. Niepodstawiony związek, z pierścieniem fenylowym związanym z pirazoliną wykazywał wielokrotnie niższą cytotoksyczność.
- Silny wpływ na cytotoksyczność wykazuje również pozycja podstawników w pierścieniu fenylowym spiroflawanonów szczególnie w stosunku do linii

komórkowej HL-60. Związki posiadające grupę OCH_3 w pozycji *meta* i *para* w pierścieniu fenylowym połączonym z pirazolem, wykazały wysoką aktywność w stosunku do linii komórkowych białaczki.

- Znaleziono zależność między wartością $\log P$, a frakcją powierzchni Hirshfelda. Wzrost $\log P$ odpowiada zwiększeniu udziału oddziaływań C...H w powierzchni HS.
- Wykonano badania teoretyczne dokowania *p*-diaminobenzylidenochromanu i *p*-diaminobenzylidenoflawanu do albuminy ludzkiej. Związki wiążą się z HSA poprzez oddziaływania hydrofobowe, jednak pierwszy z nich w różnych miejscach: IB, FA1i powyżej miejsca IIA (miejsce wiązania leku) natomiast drugi tylko w miejscu IB i FA1. Wykazano również, że energia wiązania drugiego związku jest wyższa niż pierwszego.

VIII. Streszczenie

Choroby nowotworowe stanowią jedną z głównych przyczyn zgonów na świecie. Stosowane współcześnie metody leczenia nie zawsze przynoszą oczekiwany efekt i niestety wpływają niekorzystnie na zdrowe komórki. W ostatnich latach zaobserwowano wzrastającą oporność komórek nowotworowych wobec stosowanych chemioterapeutyków. Dlatego wciąż poszukuje się nowych i skutecznych metod leczenia nowotworów. Poszukiwania nowych chemioterapeutyków przebiegają dwutorowo: poprzez modyfikację znanych leków oraz syntezę nowych związków o wysokiej aktywności biologicznej. Niniejsza dysertacja dotyczy syntezy pochodnych pirazolin skondensowanych z pierścieniem chromanonu lub flawanonu oraz porównania aktywności cytotoksycznej otrzymanych związków. Praca doktorska obejmowała kilka etapów. Pierwszy dotyczył syntezy pochodnych (E)-benzylidenochroman-4-onów i (E)-benzylideno-2-fenylochromanonów oraz spiro-1-pirazolin. Otrzymane związki poddano analizie fizykochemicznej oraz badaniom krystalograficznym. W drugim etapie pracy doktorskiej skupiłam się na ocenie właściwości biologicznych związków. Główną część stanowiły badania cytotoksyczności wobec wybranych nowotworowych linii komórkowych. Zachęcona pozytywnymi wynikami postanowiłam poszerzyć badania aby sprawdzić czy zachodzą interakcje między związkami, a erytrocytami. Przeprowadziłam badanie polegające na ocenie integralności błony erytrocytów pod wpływem działania zsyntezowanych związków oraz oceniłam morfologię czerwonych krwinek przy użyciu mikroskopu optycznego w układzie odwróconym. Dla związków wykazujących najwyższą cytotoksyczność przeprowadzono badanie cyklu komórkowego aby sprawdzić, w której fazie cyklu badane związki będą hamowały proliferację komórek nowotworowych. Trzecia część badań obejmowała zarówno eksperymentalne jak i teoretyczne obliczenia. Wyznaczyłam parametr lipofilowości metodą doświadczalną oraz z użyciem programu komputerowego Molinspiration Cheminformatics. Lipofilowość jest jednym z najważniejszych deskryptorów wykorzystywanych przy projektowaniu nowych leków. Ponadto określono energię i miejsce wiązania wybranych związków do albuminy ludzkiej oraz przeprowadzono analizę powierzchni

Hirshfelda aby sprawdzić rodzaj oddziaływań międzycząsteczkowych. Ponadto poszukiwałam zależności między aktywnością biologiczną związków, lipofilowością a ich strukturą, co jest stosowane w modelach ilościowej zależności struktura – aktywność (QSAR) służących do przewidywania farmakokinetyki i farmakodynamiki działania leków.

IX. Summary

Cancer diseases are one of the leading causes of death in the world. Contemporary methods of treatment do not always bring the expected effect and unfortunately adversely affect healthy cells. In recent years, increasing resistance of cancer cells to the chemotherapeutics used has been observed. That is why new and effective cancer treatments are still being sought. The search for new chemotherapeutics is two-fold: by modifying known drugs and by synthesizing new compounds with high biological activity. This dissertation concerns the synthesis of fused pyrazolines derivatives with a chromanone or flavanone ring and comparison of cytotoxic activity of obtained compounds. The doctoral dissertation included several stages. The first step concerned the synthesis of (*E*)-benzylidene-chroman-4-ones and (*E*)-benzylidene-2-phenylchroman-4-ones and spiro-1-pyrazoline derivatives. The structures of all compounds were characterized using physicochemical and crystallographic methods. In the second stage of my Ph.D. thesis, I focused on assessing the biological properties of compounds. The main part was cytotoxicity studies on selected cancer cell lines. Encouraged by positive results, I decided to broaden my research to check if there are interactions between compounds and erythrocytes. I conducted a study consisting of assessing the integrity of the erythrocyte membrane under the influence of synthesized compounds and evaluated the morphology of RBCs using a phase-contrast Opta-Tech inverted microscope. For compounds with the highest cytotoxicity, a cell cycle analysis was performed to see in which phase of the cycle the tested compounds would inhibit the proliferation of the cancer cell. The third part of the research included both experimental and theoretical calculations. I determined the lipophilicity parameter using the experimental method and the Molinspiration Cheminformatics computer program. Lipophilicity is one of the most important descriptors used in the design of new drugs. Besides, the energy and binding site of selected compounds for human albumin was determined and a Hirshfeld surface analysis was performed to check the type of intermolecular interaction. Also, I was looking for relationships between the biological activity of compounds, lipophilicity, and their structure, which is used in

models of quantitative structure-activity relationship (QSAR) to predict the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs.

X. Literatura

1. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* październik 2001;74(4):418–25.
2. Lairon D, Amiot MJ. Flavonoids in food and natural antioxidants in wine. *Curr Opin Lipidol.* luty 1999;10(1):23–8.
3. Malinska D, Kiersztan A. Flawonoidy - charakterystyka i znaczenie w terapii. *Postępy Biochem.* 2004;50(2):182–96.
4. Majewska M, Czeczot H. Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Ter Lek.* 2009;65(5):369–77.
5. Sadowska A, Świdorski F, Kromołowska R. Polifenole - źródło naturalnych przeciwutleniaczy. *Postępy Tech Przetwórstwa Spoż.* 2011;(1).
6. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.* 1 kwiecień 2016;8:33–42.
7. Czaplińska M, Czepas J, Gwoździński K. Budowa, właściwości przeciwutleniające i przeciwnowotworowe flawonoidów. *Postępy Biochem.* 2012;58(3):235–44.
8. Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SKS, i in. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med.* 15 styczeń 2004;36(2):212–25.
9. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact.* 22 styczeń 2002;139(1):1–21.
10. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1 Suppl):230S–242S.
11. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* 1 listopad 1998;56(11):317–33.
12. Wildman REC, Bruno RS. *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Third Edition. CRC Press; 2019. 412 s.
13. Harborn JB. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. *J Chem Educ.* 1995;72(3):A73.
14. Khan MK, Zill-E-Huma, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *J Food Compos Anal.* 1 luty 2014;33(1):85–104.

15. Iwashina T. The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *J Plant Res.* 1 wrzesień 2000;113(3):287–99.
16. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 1 grudzień 2010;2:1231–46.
17. Overwin H, Wray V, Seeger M, Sepúlveda-Boza S, Hofer B. Flavanone and isoflavone glucosylation by non-Leloir glycosyltransferases. *J Biotechnol.* 10 wrzesień 2016;233:121–8.
18. Tomás-Barberán FA, Clifford MN. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):1073–80.
19. Jez JM, Noel JP. Reaction mechanism of chalcone isomerase. pH dependence, diffusion control, and product binding differences. *J Biol Chem.* 11 styczeń 2002;277(2):1361–9.
20. Demirayak S, Yurttas L, Gundogdu-Karaburun N, Karaburun AC, Kayagil I. New chroman-4-one/thiochroman-4-one derivatives as potential anticancer agents. *Saudi Pharm J.* 1 listopad 2017;25(7):1063–72.
21. Emami S, Ghanbarimasir Z. Recent advances of chroman-4-one derivatives: Synthetic approaches and bioactivities. *Eur J Med Chem.* 26 marzec 2015;93:539–63.
22. Lin L-G, Liu Q-Y, Ye Y. Naturally Occurring Homoisoflavonoids and Their Pharmacological Activities. *Planta Med.* 25 sierpień 2014;80(13):1053–66.
23. Böhler P, Tamm Ch. The homo-isoflavones, a new class of natural product. Isolation and structure of eucomin and eucomol. *Tetrahedron Lett.* 1 styczeń 1967;8(36):3479–83.
24. Farkas L, Gottsegen A, Nógrádi M. The synthesis of eucomin and (±)-eucomol. *Tetrahedron.* 1 styczeń 1970;26(11):2787–90.
25. Takao K, Yamashita M, Yashiro A, Sugita Y. Synthesis and Biological Evaluation of 3-Benzylidene-4-chromanone Derivatives as Free Radical Scavengers and α -Glucosidase Inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2016;64(8):1203–7.
26. Lévai A. Synthesis of exocyclic α,β -unsaturated ketones. *Arkivoc.* 1 styczeń 2004;2004(7):15–33.
27. Perkin WH, Rây JN, Robinson R. CXXXIII.—Experiments on the synthesis of brazilin and hæmatoxylin and their derivatives. Part I. Veratrylidene-7-methoxychromanone and an account of a new synthesis of some benzopyrylium salts. *J Chem Soc Resumed.* 1 styczeń 1926;129(0):941–53.
28. Pfeiffer P, Oberlin H, Konermann E. Über Methoxychromonole und das Schall-Drallesche Abbauprodukt des Brasilins. (IV. Mitteilung zur Brasilin- und

- Hämatoxylin-Frage). *Berichte Dtsch Chem Ges B Ser.* 16 wrzesień 1925;58(8):1947–58.
29. Farkas L, Gottsegen A, Nogradi M. Synthesis of eucomin and ($\pm$)eucomol. *Tetrahedron Lett.* styczeń 1968;9(38):4099–100.
30. Lévai A, Hetey E. A simple convenient synthesis of 3-Benzylidene flavanones. *Pharm.* 1 lipiec 1978;33:378–9.
31. Levai A, Schag J. Synthesis of 3-benzylidenechroman-4-ones and 1-thiochroman-4-ones. *Synth 3-Benzylidenechroman-4-Ones 1-Thiochroman-4-Ones.* 1979;
32. Valkonen A, Laihia K, Kolehmainen E, Kauppinen R, Perjési P. Structural studies of seven homoisoflavonoids, six thiohomoisoflavonoids, and four structurally related compounds. *Struct Chem.* 1 luty 2012;23(1):209–17.
33. Budzisz E, Paneth P, Geromino I, Muzioł T, Rozalski M, Krajewska U, i in. The cytotoxic effect of spiroflavanone derivatives, their binding ability to human serum albumin (HSA) and a DFT study on the mechanism of their synthesis. *J Mol Struct.* 5 czerwiec 2017;1137:267–76.
34. Perjési P, Das U, De Clercq E, Balzarini J, Kawase M, Sakagami H, i in. Design, synthesis and antiproliferative activity of some 3-benzylidene-2,3-dihydro-1-benzopyran-4-ones which display selective toxicity for malignant cells. *Eur J Med Chem.* 1 kwiecień 2008;43(4):839–45.
35. Bogdał D. Coumarins: Fast Synthesis by Knoevenagel Condensation under Microwave Irradiation. *J Chem Res Synop.* 1 styczeń 1998;(8):468–9.
36. Biddle MM, Lin M, Scheidt KA. Catalytic Enantioselective Synthesis of Flavanones and Chromanones. *J Am Chem Soc.* 1 kwiecień 2007;129(13):3830–1.
37. Al Nakib T, Bezjak V, Meegan M, Chandy R. Synthesis and antifungal activity of some 3-benzylidenechroman-4-ones, 3-benzylidenethiochroman-4-ones and 2-benzylidene-1-tetralones. *Eur J Med Chem.* 1 czerwiec 1990;25(5):455–62.
38. Marella A, Ali MR, Alam MT, Saha R, Tanwar O, Akhter M, i in. Pyrazolines: a biological review. *Mini Rev Med Chem.* 1 maj 2013;13(6):921–31.
39. Yusuf M, Jain P. Synthetic and biological studies of pyrazolines and related heterocyclic compounds. *Arab J Chem.* 1 listopad 2014;7(5):553–96.
40. Pijewska L, Kamecki J, Perka-Karolczak W. 3-Arylidene flavanones. II: Reaction with diazomethane. *Pharmazie.* 1993;48:254–7.
41. Tóth G, Szöllősy Á, Lévai A, Kotovych G. Synthesis and stereochemistry of spiropyrazolines. *J Chem Soc Perkin Trans 2.* 1 styczeń 1986;(12):1895–8.

42. Mustafa A, Hilmy M. Reaction with diazomethane and its derivatives. Part III. Action of diazo-compounds on 2-arylideneindane-1 : 3-diones and methyleneanthrone. *J Chem Soc.* 1952;1434–6.
43. Fateen A, Ali M. *Indian J Chem Sect B.* 1972;10:968.
44. Fateen A, Kaddah A. *Rev Roum Chim.* 1978;(23):791.
45. Adamus-Grabicka AA, Markowicz-Piasecka M, Cieślak M, Królewska-Golińska K, Hikisz P, Kusz J, i in. Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues. *Molecules.* styczeń 2020;25(7):1613.
46. Sangwan N, Rastogi S. Studies in anti-fertility agents. 32. Synthesis and stereochemistry of 3,3A-trans and cis-2(H)-acetyl-3-aryl-3,3A-duhydropyrazolo-[4,3-C][2H]chromenes, pyrazolo[3,4A] benzocycloalk-1-enes and 3,3A-trans and cis-(2H)-acetyl-3-aryl-8-methoxy-5-tosyl-3,3A,4,5-tetrahydropyrazolo[4, 3-C]quinolines. *Indian J Chem.* 1981;20B:135–9.
47. Dueñas M, Surco-Laos F, González-Manzano S, González-Paramás AM, Santos-Buelga C. Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *Eur Food Res Technol.* 1 styczeń 2011;232(1):103–11.
48. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000;130(8S Suppl):2073S-85S.
49. Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S, Japan Public Health Center-Based Prospective Study on Cancer Cardiovascular Diseases Group. Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst.* 18 czerwiec 2003;95(12):906–13.
50. Zhong L, Goldberg MS, Gao YT, Hanley JA, Parent ME, Jin F. A population-based case-control study of lung cancer and green tea consumption among women living in Shanghai, China. *Epidemiol Camb Mass.* listopad 2001;12(6):695–700.
51. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* grudzień 2000;52(4):673–751.
52. Kandaswami C, Kanadaswami C, Lee L-T, Lee P-PH, Hwang J-J, Ke F-C, i in. The antitumor activities of flavonoids. *Vivo Athens Greece.* październik 2005;19(5):895–909.
53. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:381–406.
54. Lopez-Lazaro M. Flavonoids as Anticancer Agents: Structure-Activity Relationship Study. *Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents.* 1 listopad 2002;2(6):691–714.

55. Lian F, Bhuiyan M, Li YW, Wall N, Kraut M, Sarkar FH. Genistein-induced G2-M arrest, p21WAF1 upregulation, and apoptosis in a non-small-cell lung cancer cell line. *Nutr Cancer*. 1998;31(3):184–91.
56. Anderson RF, Fisher LJ, Hara Y, Harris T, Mak WB, Melton LD, i in. Green tea catechins partially protect DNA from (.)OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis*. sierpień 2001;22(8):1189–93.
57. Abalea V, Cillard J, Dubos MP, Sergeant O, Cillard P, Morel I. Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures. *Free Radic Biol Med*. czerwiec 1999;26(11–12):1457–66.
58. Carlson B, Lahusen T, Singh S, Loaiza-Perez A, Worland PJ, Pestell R, i in. Down-Regulation of Cyclin D1 by Transcriptional Repression in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells Induced by Flavopiridol. *Cancer Res*. 15 wrzesień 1999;59(18):4634–41.
59. Lindenmeyer F, Li H, Menashi S, Soria C, Lu H. Apigenin Acts on the Tumor Cell Invasion Process and Regulates Protease Production. *Nutr Cancer*. 1 luty 2001;39:139–47.
60. López-Lázaro M, Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Austin CA. Green tea constituents (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and gallic acid induce topoisomerase I– and topoisomerase II–DNA complexes in cells mediated by pyrogallol-induced hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 1 lipiec 2011;26(4):489–98.
61. Ferriola PC, Cody V, Middleton E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol*. 15 maj 1989;38(10):1617–24.
62. Amir M, Kumar H, Khan SA. Synthesis and pharmacological evaluation of pyrazoline derivatives as new anti-inflammatory and analgesic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 1 luty 2008;18(3):918–22.
63. Rajendra Prasad Y, Lakshmana Rao A, Prasoon L, Murali K, Ravi Kumar P. Synthesis and antidepressant activity of some 1,3,5-triphenyl-2-pyrazolines and 3-(2''-hydroxy naphthalen-1''-yl)-1,5-diphenyl-2-pyrazolines. *Bioorg Med Chem Lett*. 15 listopad 2005;15(22):5030–4.
64. Karthikeyan MS, Holla BS, Kumari NS. Synthesis and antimicrobial studies on novel chloro-fluorine containing hydroxy pyrazolines. *Eur J Med Chem*. styczeń 2007;42(1):30–6.
65. Camacho ME, León J, Entrena A, Velasco G, Carrión MD, Escames G, i in. 4,5-Dihydro-1H-pyrazole Derivatives with Inhibitory nNOS Activity in Rat Brain: Synthesis and Structure–Activity Relationships. *J Med Chem*. 1 listopad 2004;47(23):5641–50.

66. López Cara LC, Camacho ME, Carrión MD, Tapias V, Gallo MA, Escames G, i in. Phenylpyrrole derivatives as neural and inducible nitric oxide synthase (nNOS and iNOS) inhibitors. *Eur J Med Chem.* 1 czerwiec 2009;44(6):2655–66.
67. Liu J-D, Chen S-H, Lin C-L, Tsai S-H, Liang Y-C. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (–)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem.* 2001;83(4):631–42.
68. Cortés F, Piñero J. Synergistic effect of inhibitors of topoisomerase I and II on chromosome damage and cell killing in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1 wrzesień 1994;34(5):411–5.
69. Kancherla RR, Nair JS, Ahmed T, Durrani H, Seiter K, Mannancheril A, i in. Evaluation of topotecan and etoposide for non-Hodgkin lymphoma: correlation of topoisomerase-DNA complex formation with clinical response. *Cancer.* 1 luty 2001;91(3):463–71.
70. Khoshyomn S, Manske GC, Lew SM, Wald SL, Penar PL. Synergistic action of genistein and cisplatin on growth inhibition and cytotoxicity of human medulloblastoma cells. *Pediatr Neurosurg.* wrzesień 2000;33(3):123–31.
71. Kucukoglu K, Oral F, Aydin T, Yamali C, Algul O, Sakagami H, i in. Synthesis, cytotoxicity and carbonic anhydrase inhibitory activities of new pyrazolines. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(4):20–4.
72. Lobo PL, Poojary B, Kumsi M, Chandra V, Kumari NS, Chandrashekar KR. Synthesis, antimicrobial and antioxidant activities of 2-[1-{3,5-diaryl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-5-yl}-4-(4-nitrophenyl)-[1,3]-thiazoles. *Med Chem Res.* 1 kwiecień 2013;22(4):1689–99.
73. Wang H, Zheng J, Xu W, Chen C, Wei D, Ni W, i in. A New Series of Cytotoxic Pyrazoline Derivatives as Potential Anticancer Agents that Induce Cell Cycle Arrest and Apoptosis. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem.* 2017; 22(10): 1635.
74. Dołowy M. Wyznaczenie lipofilowości acidum dehydrocholicum różnymi metodami. 2009;65(10):689–93.
75. Jóźwiak K, Szumiło H, Soczewiński E. Lipofilowość, metody wyznaczania i rola w działaniu biologicznym substancji chemicznych. *Wiad Chem.* 2001;[Z] 55, 11-12:1047–74.
76. Takács-Novák K, Avdeef A. Interlaboratory study of log P determination by shake-flask and potentiometric methods. *J Pharm Biomed Anal.* sierpień 1996;14(11):1405–13.
77. Henczi M, Nagy J, Weaver DF. Determination of Octanol-Water Partition Coefficients for a Series of Imidazolidinediones by a Novel Combination of Micro Shake-Flask and HPLC Techniques. *J Liq Chromatogr.* 1 lipiec 1994;17(12):2605–13.

78. Kowalska A, Pluta K. Rp Tlc Assay of the Lipophilicity of New Azathioprine Analogs. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 15 lipiec 2012;35(12):1686–96.
79. Komsta Ł, Skibiński R, Berecka A, Gumieniczek A, Radkiewicz B, Radoń M. Revisiting thin-layer chromatography as a lipophilicity determination tool--a comparative study on several techniques with a model solute set. *J Pharm Biomed Anal.* 1 grudzień 2010;53(4):911–8.
80. Starek M, Komsta Ł, Krzek J. Reversed-phase thin-layer chromatography technique for the comparison of the lipophilicity of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Pharm Biomed Anal.* listopad 2013;85:132–7.
81. Pignatello R, Puglisi G. Lipophilicity evaluation by RP-HPLC of two homologous series of methotrexate derivatives. *Pharm Acta Helv.* kwiecień 2000;74(4):405–10.
82. Ilijaš M, Malnar I, Marković VG, Stepanić V. Study of lipophilicity and membrane partition of 4-hydroxycoumarins by HPLC and PCA. *J Pharm Biomed Anal.* 2013;76:104–11.
83. Héberger K. Quantitative structure-chromatographic retention relationships. *J Chromatogr A.* 2007;1158(1–2):273–305.
84. Polak S, Wiśniowska B. Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – projektowanie i poszukiwanie cząstki aktywnej, ocena właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. 2009;10.
85. Tetko IV, Tanchuk VY. Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J Chem Inf Comput Sci.* październik 2002;42(5):1136–45.
86. Moriguchi I, Hirono S, Liu Q, Nakagome I, Matsushita Y. Simple Method of Calculating Octanol/Water Partition Coefficient. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1992;40(1):127–30.
87. Nycz–Empel A, Bober K, Wyszomirski M, Kisiel E, Zięba A. The Application of CA and PCA to the Evaluation of Lipophilicity and Physicochemical Properties of Tetracyclic Diazaphenothiazine Derivatives. *J Anal Methods Chem* 2019; 8131235.
88. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 marzec 2001;46(1–3):3–26.
89. Soskić M, Magnus V. Binding of ring-substituted indole-3-acetic acids to human serum albumin. *Bioorg Med Chem.* 1 lipiec 2007;15(13):4595–600.
90. van de Waterbeemd H, Smith DA, Jones BC. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *J Comput Aided Mol Des.* marzec 2001;15(3):273–86.

91. Baharith LA, Al-Khouli A, Raab GM. Cytotoxic assays for screening anticancer agents. *Stat Med.* 15 lipiec 2006;25(13):2323–39.
92. Fischer D, Li Y, Ahlemeyer B, Krieglstein J, Kissel T. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials.* marzec 2003;24(7):1121–31.
93. Stasiuk M, Kijanka G, Kozubek A. Zmiany kształtu erytrocytów i czynniki je wywołujące. *Postępy Biochem.* 2009;55(4):425–33.
94. Markowicz-Piasecka M, Sikora J, Mateusiak Ł, Mikiciuk-Olasik E, Huttunen KM. New prodrugs of metformin do not influence the overall haemostasis potential and integrity of the erythrocyte membrane. *Eur J Pharmacol.* 15 wrzesień 2017;811:208–21.
95. Spychalska J. Membranopatie krwinek czerwonych — patogeneza, obraz kliniczny i diagnostyka. *Hematologia.* 2012;3(2):81–119.
96. Sabisz M, Składanowski A. Cykl komórkowy jako cel nowych terapii przeciwnowotworowych. W: *Na pograniczu chemii i biologii.* Poznań: Wydawnictwo Naukowe UAM; 2007. s. 111–31.
97. Yamasaki L. Role of the RB tumor suppressor in cancer. *Cancer Treat Res.* 2003;115:209–39.
98. Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods San Diego Calif.* 1 czerwiec 2013;61(2):90–7.
99. Adamus-Grabicka AA, Namiecińska EA, Budzisz EZ. Aktywność biologiczna związków flawonowych. Część I Właściwości przeciwnowotworowe flawonoidów. W: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze Cz 8, Rośliny i ochrona środowiska.* Poznań; 2018.
100. Namiecińska EA, Adamus-Grabicka AA, Kasperkiewicz KM, Budzisz EZ. Aktywność biologiczna związków flawonowych. Część II Właściwości przeciwdrobnoustrojowe flawonoidów. W: *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze Cz 8, Rośliny i ochrona środowiska.* Poznań; 2018.
101. Kupcewicz B, Małecka M, Zapadka M, Krajewska U, Rozalski M, Budzisz E. Quantitative relationships between structure and cytotoxic activity of flavonoid derivatives. An application of Hirshfeld surface derived descriptors. *Bioorg Med Chem Lett.* 15 2016;26(14):3336–41.
102. Śliwińska-Hill U, Celmer J. Ruthenium coordination compounds as drugs in modern anticancer therapy. *Nowotw J Oncol.* 2015;65(6):517–28.
103. Śliwińska-Hill U, Celmer J, Trynda-Lemiesz L. Związki złota jako potencjalne leki przeciwnowotworowe nowej generacji. *NowotworyJournal Oncol.* 2013;63(6):456–62.

104. Łyskawa W. Chemioterapia w leczeniu choroby nowotworowej i jej neurotoksyczność. *Anestezjologia Ratow.* 2009;3:80–7.
105. Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev Med Chem.* kwiecień 2011;11(4):298–344.
106. Habashneh AY, El-Abadelah MM, Zihlif MA, Imraish A, Taha MO. Synthesis and Antitumor Activities of Some New N1-(Flavon-6-yl)amidrazone Derivatives. *Arch Pharm Chem Life Sci.* 2014;347(6):415–22.
107. Hadjeri M, Boumendjel CB and A. Recent Advances in the Synthesis of Conveniently Substituted Flavones, Quinolones, Chalcones and Aurones: Potential Biologically Active Molecules. *Curr Org Chem.* 2003;7(7):679–89.
108. Moorkoth S, Srinivasan KK, Kutty NG, Joseph A, Naseer M. Synthesis and evaluation a series of novel imidazolidinone analogues of 6-aminoflavones as anticancer and antiinflammatory agents. *Med Chem Res.* 2013;22:5066–75.
109. Graham P. *Chemia leków. Krótkie wykłady.* Warszawa, 1, 2018. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2004
110. Lopez-Lazaro M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Rev Med Chem.* 1 styczeń 2009;9(1):31–59.
111. Kupcewicz B, Balcerowska-Czerniak G, Małecka M, Paneth P, Krajewska U, Rozalski M. Structure-cytotoxic activity relationship of 3-arylidene flavanone and chromanone (E,Z isomers) and 3-arylflavones. *Bioorg Med Chem Lett.* 15 lipiec 2013;23(14):4102–6.
112. Affek A, Niemyjska M, Wępa M. Pochodne indazolu jako związki o działaniu przeciwnowotworowym. *Biul Wydz Farm Warsz Uniw Med.* 2017;1:1–7.
113. Pérez-Villanueva J, Yépez-Mulia L, González-Sánchez I, Palacios-Espinosa JF, Soria-Arteche O, Sainz-Espuñes TDR, i in. Synthesis and Biological Evaluation of 2H-Indazole Derivatives: Towards Antimicrobial and Anti-Inflammatory Dual Agents. *Mol Basel Switz.* 31 październik 2017;22(11).
114. Thangadurai A, Minu M, Wakode S, Agrawal S, Narasimhan B. Indazole: a medicinally important heterocyclic moiety. *Med Chem Res.* lipiec 2012;21(7):1509–23.
115. Song P, Chen M, Ma X, Xu L, Liu T, Zhou Y, i in. Identification of novel inhibitors of Aurora A with a 3-(pyrrolopyridin-2-yl)indazole scaffold. *Bioorg Med Chem.* 15 kwiecień 2015;23(8):1858–68.
116. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, i in. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 1 październik 2004;64(19):7099–109.

117. Abbassi N, Chicha H, Rakib EM, Hannioui A, Alaoui M, Hajjaji A, i in. Synthesis, antiproliferative and apoptotic activities of N-(6(4)-indazolyl)-benzenesulfonamide derivatives as potential anticancer agents. Eur J Med Chem. listopad 2012;57:240–9.
118. Mushtaque Md, Avecilla F, Haque A, Perwez A, Khan MdS, Rizvi MMA. Experimental and theoretical studies of a pyrazole-thiazolidin-2,4-di-one hybrid. J Mol Struct. 5 sierpień 2017;1141:417–27.
119. Havrylyuk D, Zimenkovsky B, Vasylenko O, Gzella A, Lesyk R. Synthesis of New 4-Thiazolidinone-, Pyrazoline-, and Isatin-Based Conjugates with Promising Antitumor Activity. J Med Chem. 25 październik 2012;55(20):8630–41.

XI. Wykaz rycin

Ryc. 1. Struktura flawonoidu.....	13
Ryc. 2. Struktura A - benzo- γ -pironu; B - 2-fenyl-benzo- γ -pironu.....	14
Ryc. 3. Klasyfikacja związków flawonoidowych.....	15
Ryc. 4. Schemat otrzymywania flawonoidów.....	17
Ryc. 5. Szkielet flawanonu.	18
Ryc. 6. Struktura A - 4H-1-benzopiran-4-onu; B - 1-benzopiran-4-onu.	19
Ryc. 7. Podział chromanonów ze względu na budowę.....	20
Ryc. 8. Struktura A - 3-benzylideno-4-chromanonu oraz B - 3-benzylideno-2-fenyl-4-chromanonu.	21
Ryc. 9. Schematreakcji syntezy benzylidenochromanonu wg Perkina i Robinsona.	22
Ryc. 10. Synteza pochodnych 3-benzylidenochromanonu wg Farkasa.	22
Ryc. 11. Synteza E-3-arylidenochroman-4-onów wg Levai'a i Schag'a.....	23
Ryc. 12. Struktury A - Δ^1-pirazoliny, B - Δ^2-pirazoliny, C - Δ^3-pirazoliny.....	24
Ryc. 13. Reakcja syntezy 3-spiropirazolin (A) i 4-spiropirazolin (B).	26
Ryc. 14. Mechanizm ataku odczynnika nukleofilowego na węgiel β 3-benzylideno pochodnych.....	27
Ryc. 15. Właściwości biologiczne związków flawonoidowych.	28
Ryc. 16. Wpływ grup funkcyjnych na aktywność biologiczną badanych związków.	56

XII. Granty

Praca doktorska finansowana była z grantu dla Młodych Naukowców Uniwersytetu Medycznego w Łodzi nr **502-03/3-066-01/502-34-046**: „Synteza liposomów oraz badanie aktywności biologicznej enkapsulowanych związków“ oraz **502-03/3-066-02/502-34-118**: „Synteza i badanie aktywności biologicznej pochodnych benzylidenoflawanonów oraz benzylidenochromanonów“.

XIII. Oświadczenia współautorów

prof. dr hab. inż. Anna Dołęga
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska
ul. Gabriela Narutowicza 11/12
80-233 Gdańsk

Gdańsk, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)-chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one* autorstwa Kamila Suchojady, Anny Dołęgi, Angeliki Adamus-Grabickiej, Elżbiety Budzisz oraz Magdaleny Małeckiej. Artykuł opublikowano w czasopiśmie *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications* **2019**, E75, 1907 – 1913.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: pomiar kryształów badanych związków.

Anna Dołęga

dr hab. Magdalena Małecka, prof. UŁ
Wydział Chemii
Uniwersytetu Łódzkiego
Ul. Pomorska 163/165
90-236 Łódź

Łódź, dn. 15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)-chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one* autorstwa Kamila Suchojady, Anny Dołęgi, Angeliki Adamus-Grabickiej, Elżbiety Budzisz oraz Magdaleny Małeckiej. Artykuł opublikowano w czasopiśmie Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications **2019**, E75, 1907 – 1913.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy polegał na napisaniu manuskryptu i nadzorowaniu prac krystalograficznych p. Kamila Suchojady.

M. Małecka

dr hab. Magdalena Małecka, prof. UŁ
Wydział Chemii
Uniwersytetu Łódzkiego
Ul. Pomorska 163/165
90-236 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hikisza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, 25, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: część krystalograficzną, w tym rozwiązanie struktury krystalicznej, oraz analizę molekularną i krystaliczną badanych związków, jak również pomoc, pisanie oraz edycję manuskryptu.

M. Małecka

dr hab. Magdalena Małecka, prof. UL
Wydział Chemii
Uniwersytetu Łódzkiego
Ul. Pomorska 163/165
90-236 Łódź

Łódź, dn. 15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Michała B. Ponczka, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej, Urszuli Krajewskiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2018**, 23, 3172–3187.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: wykonanie i opis badań krystalograficznych badanych związków, napisanie części wstępu, analizy wyników krystalograficznych oraz częściowo wniosków.

M. Małecka

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Michała B. Ponczka, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej, Urszuli Krajewskiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2018**, 23, 3172–3187.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: opis części badań biologicznych wraz z przygotowaniem rycin oraz opracowanie wniosków.

Magdalena Markowicz-
Piasecka



UNIwersYTET
MEDYCZNY
W ŁODZI

dr hab. n. farm. Magdalena Markowicz -
Piasecka

Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1, 91-151 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hikisza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, *25*, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: badanie erytrotoksyczności oraz analizę statystyczną, edycję manuskryptu.

Magdalena Markowicz -
Piasecka

Prof. dr hab. inż. Joachim Kusz
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytetu Śląski w Katowicach
Ul. 75. Pułku Piechoty 1
41-500 Chorzów

Chorzów, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hekisza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, 25, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: pomiar danych dyfrakcyjnych i ich redukcja dla kryształów badanych związków.



Prof. dr hab. inż. Joachim Kusz
Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych
Uniwersytetu Śląski w Katowicach
Ul. 75. Pułku Piechoty 1
41-500 Chorzów

Chorzów, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Michała B. Ponczka, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej, Urszuli Krajewskiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2018**, 23, 3172–3187.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: pomiar danych dyfrakcyjnych i ich redukcja dla kryształów badanych związków.



Łódź, dn.23.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hikisza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, 25, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: nadzór merytoryczny, przegląd manuskryptu, opracowanie schematu syntezy, edycja tekstu.

Prof. Elżbieta Budzisz

Dokument "Oświadczenie Molecules 2020 E.B..pdf" został podpisany przez Elżbieta Zofia Budzisz certyfikatem kwalifikowanym o numerze seryjnym 256414631570184485486267033986409507068099813416 wydanym przez 2.5.4.97=VATPL-5260300517,CN=COPE SZAFIR - Kwalifikowany,O=Krajowa Izba Rozliczeniowa S.A.,C=PL, w dniu 2020-06-23 15:22:23.

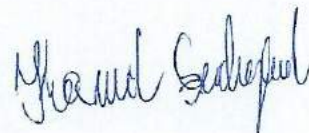
Kamil Suchojad
Wydział Chemii
Katedra Chemii Fizycznej
Uniwersytet Łódzki
Ul. Pomorska 163/165
90-236 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Kamil Suchojad, student II roku studiów stacjonarnych I^o na kierunku Chemia w Nauce i Gospodarce na Wydziale Chemii wykonał pracę badawczą w ramach Studenckiego Grantu Badawczego. Wynikiem przeprowadzonych badań jest publikacja: *Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)- chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)- 2-phenylchroman-4-one* autorstwa Kamila Suchojada, Anny Dołęgi, Angeliki Adamus-Grabickiej, Elżbiety Budzisz oraz Magdaleny Małeckiej. Artykuł opublikowano w czasopiśmie Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications **2019**, E75, 1907 – 1913.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: proces krystalizacji oraz pomiar dyfrakcyjny kryształów, udokładnienie ich struktur, a także przygotowanie publikacji z opiekunem grantu dr hab. Magdaleną Małecką.



Łódź, dn.23.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Michała B. Ponczka, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej, Urszuli Krajewskiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2018**, 23, 3172–3187.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: koncepcja i nadzór merytoryczny oraz edycja manuskryptu.

Prof. Elżbieta Budzisz

Dokument "Oświadczenie Molecules 2018 E.B..pdf" został podpisany przez Elżbieta Zofia Budzisz certyfikatem kwalifikowanym o numerze seryjnym 256414631570184485486267033986409507068099813416 wydanym przez 2.5.4.97=VATPL-5260300517,CN=COPE SZAFIR - Kwalifikowany,O=Krajowa Izba Rozliczeniowa S.A.,C=PL, w dniu 2020-06-23 15:18:46.

dr hab. Michał Ponczek
Wydział Biologii
Uniwersytet Łódzki
Ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Interaction of Arylidenechromanone/Flavanone Derivatives with Biological Macromolecules Studied as Human Serum Albumin Binding, Cytotoxic Effect, Biocompatibility Towards Red Blood Cells* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Michała B. Ponczka, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej, Urszuli Krajewskiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2018**, 23, 3172–3187.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: opracowanie oraz opis części dotyczącej obliczeń teoretycznych dla badanych związków, dokowanie, modelowanie molekularne, wnioski.



Dr Karolina Królewska-Golińska
Dział Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
Ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hikisza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, 25, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: analizę cyklu komórkowego, trawienie plazmidowego DNA, pisanie oraz edycję części eksperymentalnej manuskryptu.

Królewska-Golińska Karolina

Dr Marcin Cieślak
Dział Chemii Bioorganicznej
Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych
Polskiej Akademii Nauk
Ul. Sienkiewicza 112
90-363 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hikisza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, 25, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: analizę cyklu komórkowego, trawienie plazmidowego DNA, pisanie oraz edycję części eksperymentalnej manuskryptu.



Dr Paweł Hikiśz
Zakład Badań Struktur Biopolimerów
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytet Łódzki
ul. Pomorska 141/143
90-236 Łódź

Łódź, dn.15.06.2020

OŚWIADCZENIE

Niniejsze oświadczenie dotyczy artykułu: *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrazolines-Based Analogues* autorstwa Angeliki A. Adamus-Grabickiej, Magdaleny Markowicz-Piaseckiej, Marcina Cieślaka, Karoliny Królewskiej-Golińskiej, Pawła Hikiśza, Joachima Kusza, Magdaleny Małeckiej oraz Elżbiety Budzisz. Artykuł opublikowano w *Molecules*, **2020**, 25, 1613 – 1638.

Oświadczam, że mój udział w tej pracy obejmował: analizę i opis wyników cytotoksyczności badanych związków oraz edycję manuskryptu.

Paweł Hikiśz

XIV. Oświadczenie autora pracy

Łódź, 15.06.2020

mgr chemii Angelika Adamus-Grabicka
Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Ja, niżej podpisana **Angelika Adamus-Grabicka** informuję Przewodniczącego Rady Naukowej ds. Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, że ani badania stanowiące podstawę mojej pracy doktorskiej, ani sama praca pt.

Porównanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanonem lub flawanonem: synteza i badanie właściwości fizykochemicznych

Nie były przedmiotem postępowania o wszczęcie przewodu doktorskiego w innej jednostce uprawnionej do nadawania takiego stopnia. Jestem współwykonawcą badań stanowiących podstawę mojego doktoratu i posiadam protokoły badań dostępne do wglądu na życzenie władz uczelni.

.....

(podpis kandydata)



UNIwersytet MEDYCZNY W ŁODZI

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Angelika Anna Adamus-Grabicka

Numer albumu: 2/SSD/2013

SUPLEMENT DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Porównanie aktywności przeciwnowotworowej pochodnych pirazolin skondensowanych z chromanone lub flawanone: synteza i badanie właściwości fizykochemicznych

Comparison of anticancer activity of condensed pyrazoline derivatives with chromanone or flavanone: synthesis and study of physicochemical properties

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor: prof. dr hab. Elżbieta Budzisz

Łódź 2020

CURRICULUM VITAE



Dane osobowe

Imię i Nazwisko: **Angelika Anna Adamus-Grabicka**

Data urodzenia: 16.04.1986 r.

Adres zamieszkania: Łódź 94-004

Ul. Janusza Kusocińskiego 4 m.29

Telefon: 600 795 015

Adres e-mail: angelika.adamus@umed.lodz.pl

Wykształcenie

01.10.2013 – rozpoczęcie studiów doktoranckich na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (30.06.2015 – otwarcie przewodu doktorskiego)

2012 – 2013 – studia podyplomowe „Biomateriały – Materiały dla medycyny” Akademia Górniczo Hutnicza w Krakowie

2006 – 2011 – studia magisterskie na Uniwersytecie Łódzkim na Wydziale Chemii, Indywidualny Tok Studiów realizowany na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska UŁ.

Praca magisterska przygotowywana w Katedrze Chemii Organicznej pod kierunkiem prof. dr hab. Z. Kudzina oraz w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN pod kierunkiem prof. dr hab. M. Potrzebowskiego: „Synteza i badania strukturalne nanolipopolimersomów”

2010 - 2011 – Studia podyplomowe „Mikro- i Nanotechnologie” Politechnika Łódzka

2002 – 2005 – nauka w I Liceum Ogólnokształcącym im. Mikołaja Kopernika w Bielsku-Białej, klasa o profilu biologiczno-chemicznym

Doświadczenie zawodowe:

01.10.2018 do teraz – asystent z Zakładzie Bromatologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

2016 - 2018 – szkoleniowiec w projekcie FARM@BIO dla studentów Wydziału Farmaceutycznego oraz Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

29.10.2013 – 30.09.2018 – zatrudnienie w Zakładzie Chemii Surowców Kosmetycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi na stanowisku: samodzielny referent ds. naukowo-dydaktycznych

01.01.2013 – 31.07.2013 – staż zawodowy w Katedrze Kosmetologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

01.10.2010 – 30.06.2011 – staż studencki w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych

Sierpień 2009 – staż w firmie farmaceutycznej Medana Pharma S.A. Sieradz w Dziale Kontroli Jakości

Działalność studencka i doktorancka:

2019 - organizacja III Konferencji Naukowo – Szkoleniowej Studentów Wydziału Farmaceutycznego

2018 – organizacja II Konferencji Naukowo – Szkoleniowej Studentów Wydziału Farmaceutycznego

2017 – organizacja I Konferencji Naukowo – Szkoleniowej Studentów Wydziału Farmaceutycznego

2016 – organizacja Konferencji Kosmetologia – nauka i przyszłość Uniwersytet Medyczny w Łodzi

2016 - Organizacja i uczestnictwo w Łódzkich Senioraliach

23-24.04.2016 – przygotowywanie oraz uczestnictwo w XVI Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki w Łodzi

20-27.04.2015 – przygotowywanie oraz uczestnictwo w XV Festiwalu Nauki Techniki i Sztuki w Łodzi

2014 – 2018 - Organizacja Drzwi Otwartych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (wykłady i pokazy dla licealistów)

2014 - 2018 – współopiekun Studenckiego Koła Naukowego przy Katedrze Kosmetologii

2014 - 2015 – sekretarz Rady Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

2013 - 2018 – członek Rady Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

2010 - 2013 – działalność w Stowarzyszeniu Niepełnosprawnych Studentów i Absolwentów Uniwersytetu Łódzkiego

2007 – 2009 – działalność w Samorządzie studenckim Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

2008 – 2010 – członek Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

Konferencje, kongresy, sympozja naukowe:

12-13.04.2019 - III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Studentów Wydziału Farmaceutycznego, Łódź. Prezentacja plakatu: *Otrzymywanie i badania biologiczne ekstraktów zawierających związki o właściwościach przeciwnowotworowych.* Górecka A., Adamus-Grabicka A., Karwowski B.

12.06.2018 - Konferencja Beauty Innovation, Łódź. Prezentacja ustna: *Nowoczesne i alternatywne środki konserwujące w preparatach kosmetycznych.* Adamus-Grabicka A.

22.05.2018 - II Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nanotechnologia wobec oczekiwań XXI wieku” Lublin. Prezentacja plakatu: *Nanocząsteczki jako nośniki substancji biologicznie aktywnych.* Adamus-Grabicka A., Kasperkiewicz K., Budzisz E.

06-07.05.2018 - VII Ogólnokrajowa Konferencja Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój, Poznań. Prezentacja plakatu: *Flawanony i kumaryny jako alternatywa dla leków przeciwnowotworowych oraz przeciwdrobnoustrojowych.* Adamus-Grabicka A., Bartnicka E., Kasperkiewicz K., Budzisz E.

12-13.05.2017 - IV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój Lublin. Prezentacja ustna wyników: *Nośniki substancji czynnych stosowane w farmakologii i kosmetologii.* Adamus-Grabicka A., Kasperkiewicz K., Budzisz E.

22.04.2017 – I Konferencja Naukowa 150 Rocznica Urodzin Marii Skłodowskiej-Curie Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Prezentacja plakatu: *Nośniki substancji czynnych stosowane w farmakologii i kosmetologii.* Adamus-Grabicka A., Kasperkiewicz K., Bartnicka E., Budzisz E.

09-10.12.2016 – III Konferencja Naukowa Mała Wielka Nauka W Labiryncie Nauki Politechnika Łódzka. Prezentacja ustna wyników: *Otrzymywanie nośników liposomowych oraz enkapsulacja związków czynnych w preparatach kosmetycznych.* Adamus-Grabicka A., Kadłubowski S., Budzisz E.

30.11.2016 – Konferencja „Nowoczesne metody badawcze dla branży farmaceutycznej i kosmetycznej jako odpowiedź na aktualne wyzwania przemysłu” Kraków Life Science Park. Wykład: *Kompaktyfikacja składu kosmetyków sposobem na otrzymanie wielofunkcyjnego produktu łączącego funkcje pielęgnacyjne, ochronne oraz lecznicze.* Adamus-Grabicka A.

23-24.11.2016 – IV Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój Oleśnica. Prezentacja plakatu: *Metody otrzymywania nośników liposomowych z enkapsulowanymi flawonoidami wykorzystywanymi w kosmetologii.* Adamus-Grabicka A., Kadłubowski S., Budzisz E.

18.04.2016 – III Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój Gdańsk. Prezentacja plakatu: *Zastosowanie liposomów do modyfikacji nanowłókien wykorzystywanych w farmakologii i kosmetologii.* Adamus-Grabicka A., Batory M., Budzisz E.

12.03.2016 – I Konferencja Kosmetologia – nauka i przyszłość Uniwersytet Medyczny w Łodzi. Prezentacja plakatu: *Otrzymywanie nośników liposomowych oraz zamykanie substancji czynnych stosowanych w preparatach kosmetycznych.* Kuźniecowa A., Adamus-Grabicka A., Budzisz E.

10-11.12.2015 – II Konferencja Naukowa Mała Wielka Nauka Innowacje i Idee Przyszłości Politechnika Łódzka. Prezentacja ustna wyników: *Możliwości wykorzystania liposomów do modyfikacji nanowłókien wykorzystywanych w farmakologii i kosmetologii.* Adamus-Grabicka A.

15-16.04.2015 - II Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Nowoczesne Technologie i Zabiegi w Kosmetologii w Lublinie. Prelekcja: *Liposomy jako nowe formy aplikacji substancji czynnych stosowanych w kosmetologii i farmakologii.* Adamus-Grabicka A.

04-05.12.2014 – I Konferencja Naukowa Mała Wielka Nauka Politechnika Łódzka

05-06.04.2014 – Międzynarodowy Kongres i Targi Kosmetologiczne LNE SPA Kraków

21-22.11.2013 - I Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Nowoczesne Technologie i Zabiegi w Kosmetologii Lublin. Prezentacja plakatu: *Zastosowanie komórek macierzystych i osocza bogatopłytkowego w dermatologii i kosmetologii.* Adamus-Grabicka A., Mucha P. Budzisz E.

09-12.07.2013 - VI Krajowa Konferencja Nanotechnologii w Szczecinie. Prezentacja plakatu: *Synteza i badania strukturalne nanolipopolimerosomów.* Adamus-Grabicka A., Miksa B., Potrzebowski M., Kudzin Z., Budzisz E.

Projekty:

1. Przygotowanie i realizacja projektów: *Synteza liposomów oraz enkapsulowanie związków czynnych stosowanych w kosmetologii. Opracowanie receptury kosmetyków z wykorzystaniem wcześniej otrzymanych liposomów oraz Projektowanie nowego składnika aktywnego dla skóry problemowej* w ramach „FARM@BIO – zintegrowany system rozwoju kompetencji studentów Wydziału Farmaceutycznego oraz Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia

Podypłomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w odpowiedzi na potrzeby społeczeństwa, rynku pracy oraz gospodarki opartej na wiedzy” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej – Europejski Fundusz Społeczny w ramach Programu Operacyjnego Wiedza, Edukacja, Rozwój.

2. Inkubator Innowacyjności +MNISW/2017/DIR/76/II+ kierownik projektu: ***Bizuteria ze środkiem przeciw owadom.***
3. Projekt: ***Żywność jutra – zdrowie dzisiaj. Żywność funkcjonalna. Regionalny Program Operacyjny Województwa Łódzkiego na lata 2014-2020.***

Najważniejsze szkolenia i kursy:

1. Szkolenie „Możliwości doktorantów we współpracy uczelni z biznesem. Aspekty prawne” realizowane przez Stowarzyszenie Rozwoju Karier Doktorantów i Doktorantów PolDoc
2. Kurs „Tworzenie biznes planu i wybór modelu biznesowego przedsiębiorstwa akademickiego – w tym spin-off i spin-out” Centrum Innowacji Akcelerator Technologii
3. Certyfikowany kurs pierwszej pomocy
4. Kurs „I Ty możesz zostać przedsiębiorcą”
5. Kurs „Zasady sporządzania biznes planów” dla łódzkich przedsiębiorców oraz osób planujących rozpoczęcie działalności gospodarczej

Działalność dydaktyczna

W czasie trwania studiów doktoranckich prowadziłam następujące zajęcia dydaktyczne:

1. Chemia Kosmetyczna
2. Chemia Ogólna
3. Receptura Preparatów Kosmetycznych
4. Perfumeria
5. Zajęcia fakultatywne: Zastosowanie liposomów jako nośników substancji czynnych
6. Surowce Kosmetyczne

Prowadziłam zajęcia w ramach studiów podyplomowych *Nowe kierunki we współczesnej kosmologii* z tematyki: *Promotory przejścia przeskórnego.*

Pełniłam rolę opiekuna **4 prac licencjackich** oraz **7 prac magisterskich.**

Publikacje

1. Magdalena Małecka, Joachim Kusz, Lars Eriksson, **Angelika Adamus-Grabicka**, Elżbieta Budzisz. *The relationship between the Hirshfeld potential and the cytotoxic activity: a study along a series of flavonoids and chromanones derivatives*. Acta Crystallographica Section C. **2020 (przyjęta do druku)**
2. **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Magdalena Markowicz-Piasecka, Marcin Cieślak, Karolina Królewska-Golińska, Paweł Hikisz, Joachim Kusz, Magdalena Małecka, Elżbieta Budzisz. *Biological Evaluation of 3-Benzylidenechromanones and Their Spiropyrrolines-based Analogues*. Molecules. **2020**, 25(7), 1613-1638.
3. Julia Kaźmierczak-Barańska, Karolina Boguszevska, **Angelika Adamus-Grabicka**, Bolesław T. Karwowski. *Two Faces of Vitamin C—Antioxidative and Pro-Oxidative Agent*. Nutrients **2020**, 12(5), 1501.
4. **Angelika Adamus-Grabicka**. *Perfumeria. Kosmetologia Tom 2*. PZWL Warszawa Wyd. 1, **2020**: 183 – 212.
5. Kamil Suchojad, Anna Dołęga, **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Elżbieta Budzisz, Magdalena Małecka. *Crystal structures of (E)-3-(4-hydroxybenzylidene)chroman-4-one and (E)-3-(3-hydroxybenzylidene)-2-phenylchroman-4-one*. Acta Crystallographica Section E. **2019**, E75, 1907–1913.
6. **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Magdalena Markowicz-Piasecka, Michał B Ponczek, Joachim Kusz, Magdalena Małecka, Urszula Krajewska, Elżbieta Budzisz. *Interaction of arylidenechromanone/flavanone derivatives with biological macromolecules studied as human serum albumin binding, cytotoxic effect, biocompatibility towards red blood cells*. Molecules **2018**, 23, 3172–3187.
7. **Adamus-Grabicka Angelika**, Kasperkiewicz Kinga, Budzisz Elżbieta, *Nanocząstki jako nośniki związków biologicznie aktywnych*. Najnowsze doniesienia z zakresu nanotechnologii **2018**: 42-53.
8. **Adamus-Grabicka Angelika**, Namiecińska Ewelina, Kasperkiewicz Kinga, Budzisz Elżbieta, *Aktywność biologiczna związków flawonowych. Część I Właściwości przeciwnowotworowe flawonoidów*. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze. Cz. 8, Rośliny i ochrona środowiska. Poznań: Młodzi Naukowcy, **2018**, 8: 7-12.
9. Namiecińska Ewelina, **Adamus-Grabicka Angelika**, Kasperkiewicz Kinga, Budzisz Elżbieta, *Aktywność biologiczna związków flawonowych. Część II Właściwości przeciwdrobnoustrojowe flawonoidów*. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze. Cz. 8, Rośliny i ochrona środowiska. Poznań: Młodzi Naukowcy, **2018**, 8: 13-17.

10. **Angelika Adamus-Grabicka**, Kinga Kasperkiewicz, Elżbieta Budzisz. *Liposomy jako nośniki substancji czynnych stosowane w farmakologii i kosmetologii*. Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze. Część VI Poznań : Młodzi Naukowcy, **2017**: 7-12.
11. **Angelika Adamus-Grabicka**, Kinga Kasperkiewicz, Elżbieta Budzisz. *Otrzymywanie liposomów wybranymi metodami*. Badanie i rozwój młodych naukowców w Polsce. Nauki przyrodnicze. Część VI. Poznań : Młodzi Naukowcy, **2017**: 13-18.
12. Mirella Batory, **Angelika Adamus-Grabicka**, Anna Sobczyk-Guzenda, Nina Bartoszek, Piotr Komorowski, Lucie Vyslouzilova, Zbigniew Rozek, Elżbieta Budzisz, *The use of liposomes in the modification of polycaprolactone fibers*, Journal of Applied Polymer Science **2016**, 133, 43299.
13. **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Ewa Głowacka, Ewa Trznadel-Grodzka, Helena Rotsztejn, Elżbieta Budzisz *Skóra a komórki macierzyste w świetle obecnej wiedzy*. Dermatologia Estetyczna **2016**, 18, 1: 14-19.
14. **Angelika A. Adamus-Grabicka**, Mirella Batory, Angelika Duszyńska, Elżbieta Budzisz *Liposomy jako nowe formy aplikacji substancji czynnych stosowanych w kosmetologii i farmakologii*. Zabiegi i nowoczesne technologie w kosmetologii; Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Monografia Pokonferencyjna. Red. Naukowa M. Gorzel, A. Kiełtyka – Dadasiewicz. Wyd. WSSP Lublin **2016**.
15. **Adamus A.**, Mucha P., Budzisz E. *Zastosowanie komórek macierzystych oraz osocza bogatopłytkowego w dermatologii i kosmetologii*. Nowoczesne Technologie i Zabiegi w Kosmetologii; Ogólnopolska Konferencja Naukowo-Szkoleniowa Monografia Pokonferencyjna. Red. Naukowa M. Gorzel, A. Kiełtyka – Dadasiewicz. Wyd. WSSP Lublin **2014**, 113-128.
16. Chomiczewska-Skóra D., **Adamus A.**, Trznadel-Grodzka E., Rotsztejn H. *Effects of ultraviolet radiation on Langerhans cells*. Central European Journal of Immunology **2013**, 38: 393-398.