

## WYBRANE ASPEKTY DZIAŁANIA BIOLOGICZNEGO POCHODNYCH 5-HYDROKSYKUMARYNY

Paulina Jeleniewicz, Zuzanna Czarnocka, Dawid Grzeszczuk, Kinga Ostrowska\*

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

\* autorka korespondująca, tel: +48 22 572 0699, e-mail: [kostrowska@wum.edu.pl](mailto:kostrowska@wum.edu.pl)

Otrzymano 24.04.2018, zaakceptowany 1.06.2018, zamieszczony 21.07.2018

### STRESZCZENIE

Kumaryna i jej pochodne są ważnymi obiektami w badaniach chemii medycznej. Przegląd najnowszej literatury naukowej pokazuje, że oprócz działania przeciwnowotworowego, przeciwbakteryjnego, przeciwgrzybiczego i przeciwzapalnego, związki te wykazują działanie przeciwzakrzepowe oraz antyoksydacyjne. Niniejsza praca zawiera przegląd doniesień literaturowych dotyczących aktywności pochodnych 5-hydroksykumaryny jako cennego, ale wciąż mało zbadanego źródła struktur wiodących do poszukiwania nowych substancji leczniczych.

**SŁOWA KLUCZOWE:** pochodne 5-hydroksykumaryny, aktywność biologiczna.

### ABSTRACT

#### SELECTED ASPECTS OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF 5-HYDROXYCOUMARIN DERIVATIVES

Coumarin and its derivatives constitute an important research topic in medicinal chemistry. A review of the latest scientific literature indicates that in addition to anticancer, antibacterial, antifungal and anti-inflammatory activities, these compounds have also anticoagulant and antioxidant effects. In this paper, a review of literature reports is presented on the activity of 5-hydroxycoumarin derivatives as a valuable, but still inadequately explored, source of lead structures in the search for new therapeutic substances.

**KEYWORDS:** 5-hydroxycoumarin derivatives, biological activity.

### 1. Wstęp

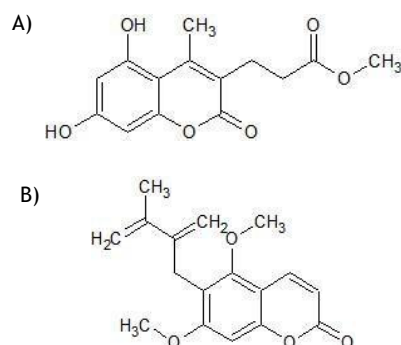
Najlepszym i najbogatszym źródłem nowych substancji leczniczych jest natura, a dokładniej produkty wtórnego metabolizmu organizmów roślinnych. Kumaryny są związkami naturalnymi, które występują w roślinach w postaci glikozydów. Naukowe bazy danych zawierają wiele doniesień na temat działania biologicznego pochodnych kumaryny. Można w nich znaleźć informacje dotyczące zarówno działania przeciwzakrzepowego, jak i potencjału przeciwnowotworowego czy przeciwnowotworowego 4- i 7-hydroksykumaryny. Tylko niewielki odsetek wszystkich dotychczasowych prac dotyczy pochodnych 5-hydroksykumaryny, prawdopodobnie ze względu na ich małe rozpowszechnienie w przyrodzie. Są więc one niezbadanym jeszcze źródłem struktur wiodących do poszukiwaniu nowych substancji o działaniu biologicznym. Związki te wykazują między innymi właściwości przeciwzakrzepowe, przeciwnowotworowe, cytotoksyczne, wazodylatacyjne, agonistyczne w stosunku do receptorów kannabinoidowych, neuroprotektoryjne, przeciwwirusowe, antymutagenne oraz oddziałują z białkami i układami enzymatycznymi.

### 2. Działanie biologiczne pochodnych 5-hydroksykumaryny

#### 2.1. Właściwości przeciwzakrzepowe

Kumaryny wykazują aktywność przeciwzakrzepową, co dobrze ilustruje obecność na polskim rynku dwunastu leków zawierających jako substancję czynną acenokumarol lub warfarynę (pochodne kumaryny). W 2015 roku czescy badacze, po przeprowadzeniu badań in vitro związanych z

działaniem pochodnych 5-hydroksykumaryny na układ krzepnięcia stwierdzili, iż pochodna 5,7-dihydroksy-4-metylokumaryny (ryc. 1A) wpływa hamująco na proagregacyjną aktywność kwasu arachidonowego w stosunku do preparatów pochodzących z krwi królika w stężeniu poniżej 10  $\mu\text{M}$  [1]. Zaobserwowano również, że podobne związki posiadające ugrupowanie metoksyłowe zamiast grupy hydroksylowej (ryc. 1B) wykazują tego typu działanie, ale przy wyższych stężeniach, rzędu 50-100  $\mu\text{M}$ .



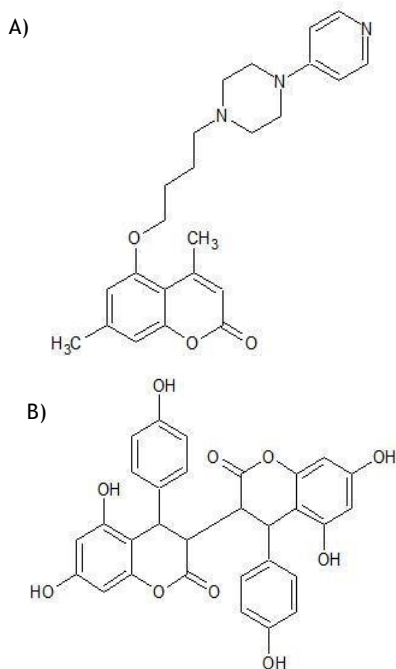
Ryc. 1. A) Pochodna 5,7-dihydroksykumaryny o właściwościach inhibitora krzepnięcia; B) pochodna 5,7-dimetoksylokumaryny hamująca agregację płytek krwi.

Oceniono, że efekt antykoagulacyjny po zastosowaniu pochodnych 4-hydroksykumaryny i 5-hydroksykumaryny jest taki sam, ale mechanizm działania tych związków jest inny. W pierwszym przypadku dochodzi do zahamowania agregacji poprzez blokadę tworzenia aktywnej formy wi-

taminy K, w drugim związane jest to z obecnością kolagenu i czynnika aktywującego płytki.

## 2.2. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Do roku 2015 opisano wiele właściwości przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych związków kumarynowych, jednak dotyczą one głównie 4- i 7-hydroksypochodnych. Na Wydziale Farmaceutycznym WUM w Zakładzie Chemii Organicznej w 2015 roku powstała praca, w której zaprezentowano wyniki badań biologicznych dla 5-hydroksypochodnych kumaryn [2]. Dla przedstawionej na ryc. 2A 4,7-dimetylo-5-[4-(pirydyn-4-ylo)butoksy]kumaryny stężenie bakteriobójcze mierzone względem szczepu *Micrococcus luteus* ATCC 10240 było równe 15 µg/cm<sup>3</sup>. Badania in vitro biflawonoidów wyekstrahowanych z *Ormocarpum trichocarpum*, posiadających w cząsteczce fragment 5-hydroksykumaryny również dowiodły, że 5-hydroksypochodne kumaryny wykazują potencjał przeciwdrobnoustrojowy [3]. W teście płytkowym, który jest wykorzystywany do określenia wartości MIC (minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii) użyto etanolowych roztworów wyizolowanych flawonoidów w zakresie stężeń 1,25-0,00245 mg/cm<sup>3</sup>, a ich działanie porównano z neomycyną w stężeniu 100 µg/cm<sup>3</sup>. Do badania zostały wykorzystane szczepy *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* i *K. pneumoniae*.



Ryc. 2. A) Budowa 4,7-dimetylo-5-[4-(pirydyn-4-ylo)butoksy]kumaryny, skutecznie zwalczającej szczep *M. luteus*. B) Wzór chemiczny biflawonoidu wyekstrahowanego z *Ormocarpum trichocarpum*, który posiada ugrupowanie 5-hydroksykumaryny.

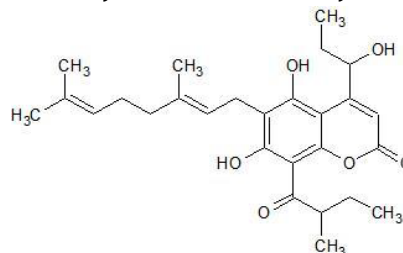
Związek zaprezentowany na ryc. 2B hamował wzrost *S. aureus*, jednak w znacznie słabszym stopniu niż neomycyna, stosowana jako związek porównawczy. Aktywność antybakteryjna neomycyny była większa prawie 4-krotnie (MIC = 4,0 µM, MIC neomycyna = 1,3 µM).

## 2.3. Działanie cytotoksyczne

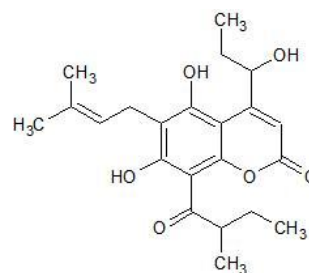
Grupa tajlandzkich naukowców zbadała pochodne kumaryn pod kątem możliwości zwalczania ludzkich komórek nowotworowych [4]. Źródłem związków służących do badań były nasiona *Mammea siamensis*, tradycyjnie stosowane w Azji południowowschodniej jako środek wspomagający pra-

cę serca i układu krążenia. Badanie przeprowadzono na czterech liniach komórkowych wobec kamptotecyny, jako kontroli [4]. Spośród badanych kumaryn wyłonione zostały dwie: surangina C (ryc. 3) i terapina B (ryc. 4), wykazujące najlepsze działanie przeciwnowotworowe w badanej grupie związków (tabela 1).

Na podstawie analizy zmian w budowie strukturalnej związków badacze doszli do wniosku, iż występowanie ugrupowania geranylowego w pozycji C6 pierścienia kumarynowego w suranginie C ma istotne znaczenie dla działania cytotoksycznego. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że badania zostały przeprowadzone jedynie na komórkach zmienionych patologicznie, brak w tym przypadku wyników badań porównawczych dla komórek zdrowych.



Ryc. 3. Surangina C.



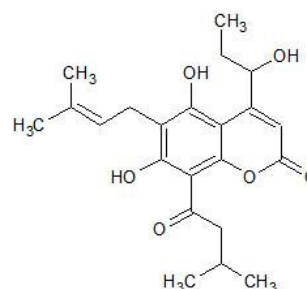
Ryc. 4. Terapina B.

Tabela 1. Podsumowanie aktywności cytotoksycznej dla suranginy C i terapiny B wobec kamptotecyny, jako kontroli [4].

Związek	IC <sub>50</sub> [µg/cm <sup>3</sup> ]			
	MCF-7	HeLa	HT-29	KB
Surangina	1,33	2,56	0,78	1,33
Terapina B	4,64	3,52	4,06	4,06
Kamptotecyna	0,20-2,00			

MCF-7 - komórki gruczolakoraka piersi, HeLa - komórki raka szyjki macicy, HT-29 - komórki raka jelita grubego i odbytnicy, KB - komórki raka jamy ustnej

W 2010 roku, trzy lata po odkryciu tajlandzkich naukowców, wietnamska grupa opublikowała podobną pracę, potwierdzającą działanie cytotoksyczne suranginy C oraz terapiny B [5]. Do listy kumaryn aktywnych biologicznie, wchodzących w skład rośliny *Mammea siamensis* dodano także m.in. terapinę C (ryc. 5).



Ryc. 5. Terapina C.

Wartość  $IC_{50}$  dla terapii C wobec wcześniej już testowanych linii komórkowych wynosiła 1-10  $\mu M$ . Wietnamscy naukowcy doszli także do wniosku, iż proces metylowania nie ma wpływu na działanie cytotoksyczne [5].

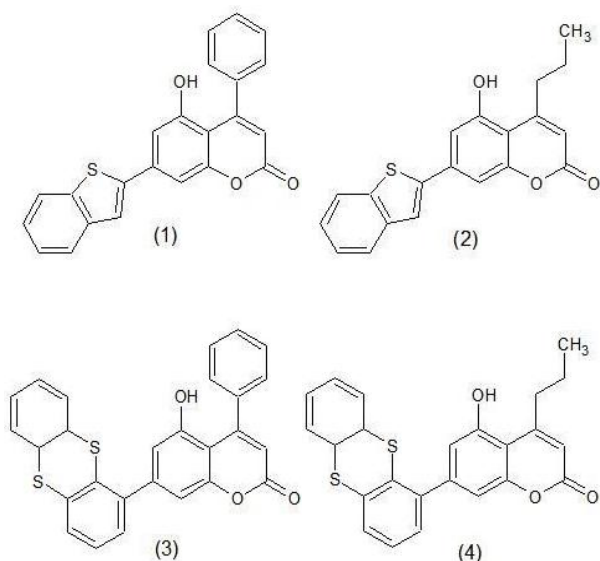
Właściwości terapii A-D badano także w Stanach Zjednoczonych [6]. Do badań wykorzystano inne linie komórkowe: KB - rak jamy ustnej, Lu1 - komórki raka płuc, LNCaP - hormonozależny rak gruczołu krokowego oraz Col2 - komórki raka jelita grubego. We wszystkich przypadkach terapia A okazała się najskuteczniejsza w stosunku do komórek nowotworowych (tabela 2). Powyższe związki zostały także przebadane w kierunku aktywności przeciwpiernikowej z zastosowaniem *Plasmodium falciparum*, w zestawieniu z chlorochiną stanowiącą pozytywną kontrolę. Jednakże stężenia zatrzymujące wzrost pierwotniaków były wyższe niż stężenia chlorochiny wywołujące analogiczny efekt, od 2 do 5 rzędów wielkości [6].

Tabela 2. Podsumowanie aktywności cytotoksycznej terapii A-D [6].

Związek	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]			
	Lu1	Col2	KB	LNCaP
Terapia A	7,5	7,2	3,5	3,5
Terapia B	16,2	7,2	5,7	5,4
Terapia C	42,8	13,1	6,2	6,4
Terapia D	>53,8	>53,8	52,2	53,8

Lu1 - komórki raka płuc, Col2 - komórki raka jelita grubego, KB - komórki raka jamy ustnej, LNCaP - hormonozależny rak gruczołu krokowego

W 2009 roku przeprowadzono także analizę cytotoksycznego działania pochodnych kumaryn zawierających wolną grupę hydroksylową w pozycji 5. Badano wpływ związków na hamowanie rozwoju raka piersi MCF-7 oraz MDA-MB-231. Badania wykazały, że spośród 21 przeanalizowanych związków największą aktywnością charakteryzowały się 5-hydroksypochodne (ryc. 6). Wartości  $IC_{50}$  dla tych związków wahały się między 7,6 - 22,3  $\mu M$  dla linii komórkowej MCF-7 oraz między 7,9 - 50  $\mu M$  dla linii MDA-MB-231 (tabela 3) [7].



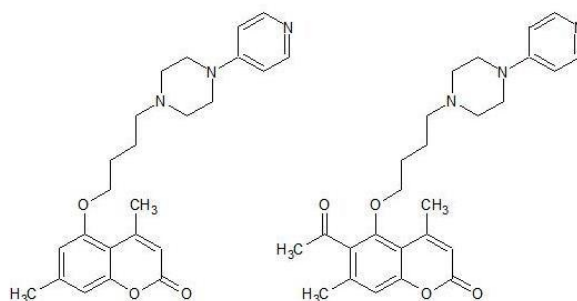
Ryc. 6. Pochodne 5-hydroksykumaryny o właściwościach przeciwnowotworowych.

Badania działania cytotoksycznego pochodnych 5-hydroksykumaryn prowadzono także w Zakładzie Chemii Organicznej WUM. Opublikowano wyniki analiz wykonanych na dwóch liniach komórkowych: raka szyjki macicy HeLa oraz mysich fibroblastach NIH3T3 [2]. Procent przeżywalności komórek określono po ich 48-godzinnej inkubacji z roztworami analizowanych związków o stężeniu 100  $\mu M$ . Wyłoniono dwa związki o najwyższej aktywności: 4,7-dimetylo-5-[4-(pirydyn-4-ylo)butoksy]kumarynę oraz 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-(pirydyn-4-ylo)butoksy]kumarynę (ryc. 7). Oba związki zawierały ugrupowanie pirydylopieryazyńowe, różniły się jedynie obecnością grupy acetylowej w położeniu 6 pierścienia kumaryny. 4,7-Dimetylo-5-[4-(pirydyn-4-ylo)butoksy]kumaryna pozostawiła 3% żywych komórek nowotworowych oraz 2% zdrowych komórek, natomiast 6-acetylo-4,7-dimetylo-5-[4-(pirydyn-4-ylo)butoksy]kumaryna 22% żywych komórek nowotworowych i 21% zdrowych. Oznacza to, że związki były cytotoksyczne w porównywalnym stopniu zarówno dla badanych zdrowych, jak i nowotworowych komórek.

Tabela 3. Wartości  $IC_{50}$  pochodnych 5-hydroksykumaryny względem komórek raka piersi [7]. Numeracja związków odpowiada ryc. 6.

Związek	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]	
	MCF-7	MDA-MB-231
(1)	7,6	10,6
(2)	14,2	9,3
(3)	22,3	50,0
(4)	14,4	7,9

MCF-7 i MDA-MB-231 - różne linie komórkowe raka piersi

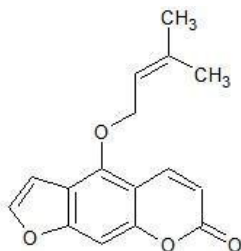


Ryc. 7. Pochodne 5-hydroksykumaryny zsyntetyzowane w Zakładzie Chemii Organicznej WUM.

## 2.4. Właściwości wazodylatacyjne

W 2015 roku zostały wykonane badania *in vitro* określające wpływ związków kumarynowych na zjawisko wazodylatacji [1]. Wazodylatacja oznacza zdolność rozszerzania się mięśniówki gładkiej naczyń w reakcji na skurcz spowodowany różnymi substancjami, takimi jak np. sympatykomimetyki (norepinefryna, fenylefryna), pochodne prostaglandyny  $H_2$ , endotelina-1 oraz duże dawki roztworu chloru potasu. Izoimperatoryna - (5-(3-metylobut-2-enoksy) psoralen (ryc. 8), jako jedyna wśród badanych substancji posiadała fragment *O*-alkilowanej 5-hydroksykumaryny, a jej reakcja przeciw skurczowi naczyń krwionośnych była najmocniejsza, gdy skurcz wywołano sympatykomimetykami. Znaczącą wazodylatację zaobserwowano w przedziale stężeń 50-100  $\mu M$ . Zdaniem autorów rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń, który został zauważony po podaniu testowanych kumaryn, nie był spowodowany wpływem na recep-

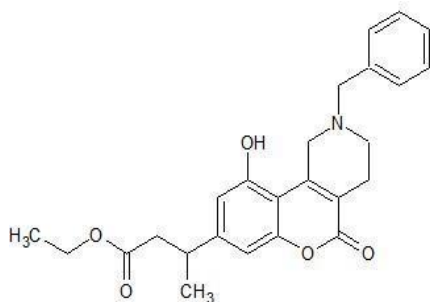
tory muskarynowe, ATP-zależne kanały potasowe, ani na receptory adrenergiczne. Najprawdopodobniej związki te hamowały potencjałozależne kanały wapniowe obecne w błonie komórkowej, a ponadto redukowały wyrzut jonów wapnia z siateczki endoplazmatycznej. Chociaż zróżnicowanie struktur analizowanych związków (m.in. pochodnych 5-hydroksykumaryny) było bardzo duże, autorzy badań podkreślają wspólny mechanizm działania bazujący na regulowaniu stężenia jonów wapnia. Z punktu widzenia budowy związków, za działanie wazodylatacyjne głównie odpowiadało położenie i długość łańcucha bocznego. Wydłużenie, skrócenie, jak również zmiana pozycji łańcucha osłabiały właściwości rozkurczowe w powyższym badaniu.



Ryc. 8. Budowa izoimperatoryny (5-(3-metylobut-2-enoksy)psoralenu) o działaniu wazodylatacyjnym.

## 2.5. Właściwości agonistyczne w stosunku do receptorów kannabinoidowych

Ze względu na zdolność zmniejszania ciśnienia wewnątrzgałkowego, pochodne kumaryny będące strukturalnie tożsame ze związkami z grupy kannabinoidów, potencjalnie mogą być stosowane w przebiegu jaskry [8]. Amerykańscy badacze, opierając się na analizie zależności struktura-aktywność, zsyntetyzowali związki posiadające szkielet 5-hydroksykumaryny i poddali je badaniom *in vivo* oceny ciśnienia wewnątrz obu gałek ocznych u królików [9]. Badania wykazały, że najskuteczniejsza pochodna (ryc. 9), po podaniu dożylnym, przyczyniła się do zredukowania ciśnienia w gałce ocznej o 18%, w stosunku do poprawy rzędu 24-38% przy użyciu stosowanych dotychczas kannabinoidów [10].



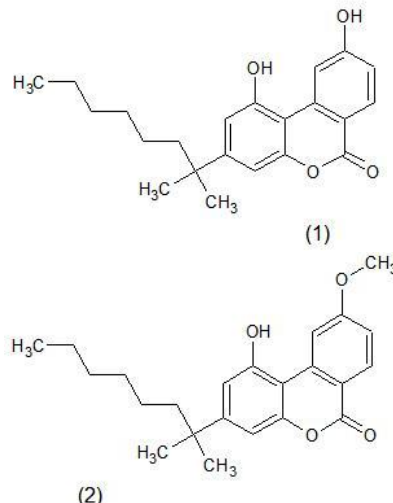
Ryc. 9. Budowa pochodnej 5-hydroksykumaryny zmniejszającej ciśnienie wewnątrzgałkowe.

Pochodne 5-hydroksykumaryny zostały uwzględnione również w badaniu, w którym porównywano ich wpływ na ludzkie i szczurze receptory kannabinoidowe CB2 [11]. Oceniano działanie związków jako potencjalnych agonistów receptorów CB2 przez pomiary cAMP (cyklicznego monofosforanu adenozy) w embrionalnych komórkach nerkowych z linii HEK po kontakcie z badanym związkiem oraz pomiary stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w komórce przy pomocy metody FLIPR. Dzięki obu metodom dla każdego z badanych związków można było określić stężenia, które powodowały po-

budzenie 50% receptorów w próbce badanej. Wybrano dwa związki posiadające właściwości silnego agonisty, które jednocześnie zawierały ugrupowanie 5-hydroksykumaryny (ryc. 10). Związki różniły się jedynie obecnością grupy metylowej w pozycji C5 pierścienia kumaryny. Obecność ugrupowania eterowego spowodowała dodatkowe wzmocnienie działania względem ludzkich receptorów, a na receptory szczurze efektywniej oddziaływała pochodna z wolną grupą hydroksylową. Podsumowanie właściwości obu związków prezentuje tabela 4.

## 2.6. Właściwości neuroprotektoryjne

Udary mózgu są częstą przyczyną zgonów, a wśród nich większość stanowią udary niedokrwienne. Dlatego też istotne stały się badania w kierunku poszukiwania substancji czynnych, które zwiększają odporność układu nerwowego na niedotlenienie. Ze względu na właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające, wśród substancji badanych w tym kierunku znalazły się także naturalnie występujące hydroksykumaryny oraz ich syntetyczne pochodne, np. 5,7-dihydroksy-4-metylo-3-(4-metylopiperazyn-1-ylo)kumaryna (ryc. 11) o silnym działaniu przeciwzapalnym, związanym z hamowaniem czynnika chemokinopodobnego CKLF-1.

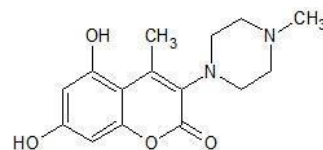


Ryc. 10. Związki zawierające ugrupowanie 5-hydroksykumaryny o charakterze agonistów receptora kannabinoidowego CB2.

Tabela 4. Zestawienie wartości  $EC_{50}$  dla agonistów ludzkich i szczurzych receptorów CB2 oceniane metodami cAMP i FLIPR [11]. Budowę związków przedstawiono na ryc. 10.

Związek	$EC_{50}$ [nM]			
	Metoda cAMP		Metoda FLIPR	
	hCB2	rCB2	hCB2	rCB2
(1)	70	13	>10 $\mu$ M	56
(2)	49	25	>3 $\mu$ M	66

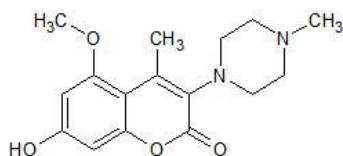
hCB2 - ludzki receptor CB2; rCB2 - szczurzy receptor CB2



Ryc. 11. Budowa 5,7-dihydroksy-4-metylo-3-(4-metylopiperazyn-1-ylo)kumaryny o działaniu przeciwzapalnym.



Związek przedstawiony na ryc. 11 oraz szereg jego pochodnych poddano ocenie w odniesieniu do zmniejszenia wrażliwości komórek na niedostateczne odżywianie [12]. Badania *in vitro* wykonano na guzie chromochłonnym rdzenia nadnerczy pochodzącym z linii komórkowej PC12, po uprzednim ograniczeniu dostępu tlenu i glukozy. Dzięki wykonanej analizie badaczom udało się wyłonić związek o najlepszym, według nich, działaniu neuroprotektoryjnym, który jednocześnie nie wpływa na proliferację komórek (ryc. 12).

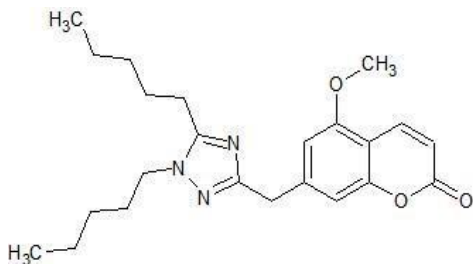


Ryc. 12. Wzór 7-hydroksy-5-metoksy-3-(4-metylopiperazyn-1-yl)kumaryny o potencjale neuroprotektoryjnym.

Wyniki badań *in vivo* wykazały, że podanie dożylnie roztworu alkoholowego roztworu 7-hydroksy-5-metoksy-3-(4-metylopiperazyn-1-yl)kumaryny, po wcześniejszym zamknięciu tętnicy środkowej mózgu, zmniejsza obszar niedokrwienia, obrzęk mózgu oraz tempo mechanizmów apoptycznych przebiegających w korze mózgowej względem próby kontrolnej. Podsumowując, naukowcy doszli do wniosku, że alkiłowanie grupy hydroksylowej w położeniu 5 pierścienia kumarynowego miało istotny wpływ na właściwości neuroprotektoryjne. Próby zmiany położenia lub charakteru części alkoksylowej powodowały spadek wywieranego efektu biologicznego.

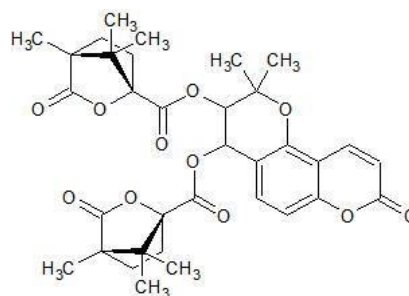
## 2.7. Działanie przeciw wirusowi HIV

W publikacji z 2005 roku opisano złożone związki chemiczne posiadające O-alkilowaną 5-hydroksykumarynę, które miały zdolność hamowania replikacji materiału genetycznego w komórkach zarażonych wirusem HIV-1 i HIV-2 [13]. W badaniach oznaczano stężenia różnych związków niezbędne do zmniejszenia o połowę liczby komórek z linii MT-4 patologicznie zmienionych wirusem. Limfocyty MT-4 zostały pobrane od pacjenta chorego na białaczkę limfocytarną. Za związek o największym potencjale przeciwwirusowym uznano pochodną, która zawierała szkielet 5-hydroksykumaryny (ryc. 13).



Ryc. 13. Pochodna 5-metoksykumaryny o wysokim potencjale przeciw wirusowi HIV.

Wartość  $EC_{50}$  (efektywne stężenie potrzebne do ochrony połowy komórek przed patologicznym wpływem wirusa) wynosiła dla tej pochodnej:  $0,17 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (HIV-1) i  $0,30 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (HIV-2). Dalsze badania wykazały jednak wysoką toksyczność związku, przez co jego zastosowanie w potencjalnej terapii stało się niemożliwe.

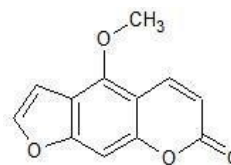


Ryc. 14. Budowa alloksantyletyny, związku wykazującego działanie przeciwko wirusowi HIV.

Pomimo tego japońscy badacze po 5 latach postanowili powrócić do zagadnienia walki z wirusem HIV przy użyciu substancji otrzymanych z hydroksykumaryn [14]. Nie zmienili oni metodyki badań: materiałem pozostała linia komórkowa MT-4, a celem - określenie  $EC_{50}$ . Alloksantyletyna - pochodna zawierająca fragment 5-hydroksykumaryny (ryc. 14), okazała się być najbardziej aktywna spośród puli badanych związków, jednak działała dopiero w stężeniu  $4,3 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  - w odróżnieniu od wcześniej wymienionej pochodnej 5-metoksykumaryny (ryc. 13), która działała w stężeniu  $0,17 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ .

## 2.8. Działanie antymutagenne

W 1997 roku zaprezentowano wyniki badań dotyczące zapobieganiu rozwojowi i rozprzestrzenianiu mutacji powstających w organizmie pod wpływem działania nitropochodnych, takich jak: 3-nitrofluoranten, 1-nitropiren oraz 2-nitrofluoren. Jako materiał do badań wykorzystano komórki bakteryjne *Salmonella typhimurium* [15]. Przeanalizowano 110 związków, zarówno syntetycznych, jak i pochodzenia naturalnego, pod kątem działania antymutagennego. Spośród nich aż 32 należały do grupy kumaryn, a 4 były pochodnymi 5-hydroksykumaryny. Związkiem, który okazał się najaktywniejszy, był bergapten (5-metoksy-psolaren - ryc. 15). Przy stężeniu do  $10 \mu\text{mol}/\text{płytkę}$  hamował on proces mutagenyzy odpowiednio dla: 3-nitrofluorantenu w 63,7%, 2-nitrofluorenu w 14,6%, 1-nitropirenu w 69,3%. Zaś wartość  $ID_{50}$  (dawka w 50% zatrzymująca proces mutagenyzy) wynosiła dla 3-nitrofluorantenu  $5,8 \mu\text{mol}/\text{płytkę}$ , a dla 1-nitropirenu  $7,1 \mu\text{mol}/\text{płytkę}$ . Wyniki te potwierdzają, że 5-hydroksykumaryny mogą mieć działanie przeciwmutagenne.



Ryc. 15. Wzór bergaptenu (5-metoksy-psolarenu).

## 2.9. Białka i układy enzymatyczne

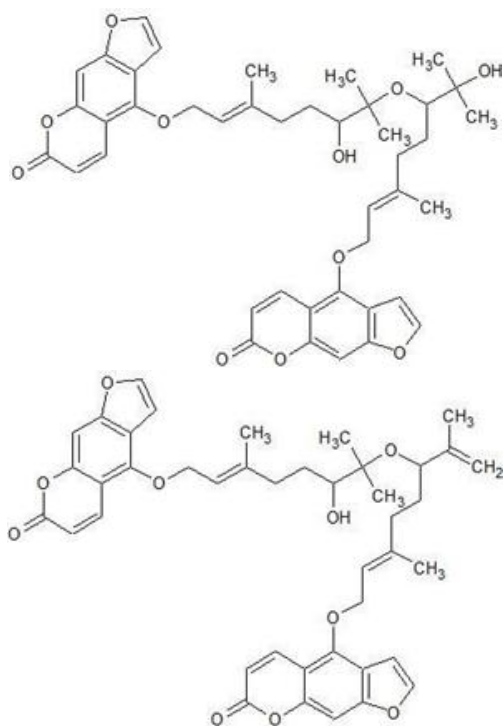
### 2.9.1. Cytochrom P450

Nadrodzina cytochromu P450 (CYP) jest grupą białek wykazujących aktywność monoooksygenaz. Pomimo iż są one obecne we wszystkich tkankach, to jako enzymy mikrosomalne charakteryzują się największą aktywnością w rdzeniu nadnerczy oraz wątrobie. Fizjologicznie biorą udział m.in. w przemianach kwasów tłuszczowych, hormonów steroidowych i eikozanoidów [16]. Enzymy te ułatwiają usuwanie z ustroju licznych ksenobiotyków, głównie hy-

drofobowych, poprzez katalizowanie ich hydroksylacji. Do grupy ksenobiotyków należy wiele substancji leczniczych, toteż w wielu przypadkach aktywność CYP odpowiada pośrednio za skuteczność stosowanej farmakoterapii wpływając na osiągnięte stężenie leku w tkankach i osoczu. Z tego powodu nadrodzina cytochromu P450 jest najdokładniej analizowaną grupą białek katalizujących metabolizm ksenobiotyków [17]. Niekiedy aktywność niektórych izoform CYP oznacza się rutynowo w badaniach laboratoryjnych przed rozpoczęciem farmakoterapii.

#### 2.9.1.1. CYP3A4

W metabolizmie ponad połowy leków stosowanych klinicznie udział bierze enzym izoenzym CYP3A4 [18]. Od aktywności tego enzymu, istotnej przy projektowaniu leków, zależy wybór strategii leczenia, ponadto jego działanie wpływa na wiele interakcji lek-żywność oraz lek-lek. Jedną z najbardziej znanych interakcji lek-żywność jest wpływ spożywania soku grejpfrutowego na spadek aktywności CYP3A4. Wśród licznych związków biologicznie czynnych obecnych w grejpfrucie, pochodne benzofuranu (paradisyna A i B) najintensywniej hamują CYP3A4 (ryc. 16). Zmierzane dla powyższych struktur wartości  $IC_{50}$  względem CYP3A4 znajdowały się w zakresie 0,07-0,15  $\mu M$  [19].

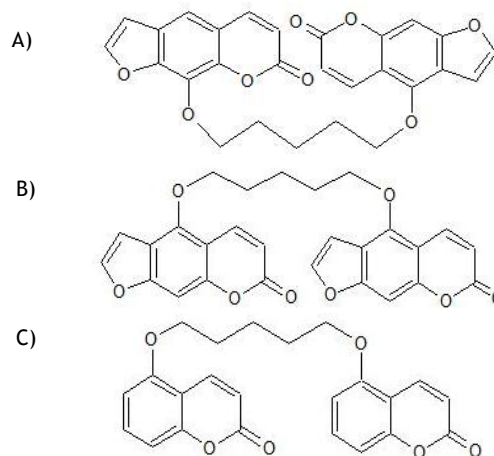


Ryc. 16. Wzory chemiczne paradisyny A (u góry) i paradisyny B, silnych inhibitorów CYP3A4 obecnych w soku grejpfrutowym.

W 2007 roku japońscy badacze opublikowali pracę opisującą hamujące właściwości dimericznych kumaryn i furanokumaryn na CYP3A4 [19]. Chcieli stworzyć prostsze niż paradisyna struktury, równocześnie zachowując silne działanie hamujące. Wśród badanych związków były dimery składające się z dwóch cząsteczek 5-hydroksykumaryny. Ryc. 17 prezentuje niektóre z omawianych struktur.

Autorzy przedstawili działanie analizowanych związków przy pomocy wartości  $IC_{50}$  (stężenie niezbędne do zahamowania w 50% cytochomalnej hydroksylacji testosteronu). Dimery furanokumarynowe wykazały największą aktywność, z wartościami  $IC_{50}$  do trzech rzędów wielkości niż-

szymi niż kumarynowe odpowiedniki (tabela 5). Według autorów odpowiedzialny za to był dodatkowy pierścień furanowy, który otwierał się podczas oddziaływania z cytochromem i tworzył epoksyd, który wspomagał kowalencyjne przyłączenie cząsteczki do enzymu (jego części białkowej), co powodowało jego unieczynnienie.



Ryc. 17. Budowa homodimerycznej furanokumaryny hamującej CYP3A4 (A), heterodimerycznej furanokumaryny hamującej CYP3A4 (B) i homodimerycznej 5-hydroksykumaryny hamującej CYP3A4 (C).

Tabela 5. Zestawienie wartości  $IC_{50}$  w procesie hamowania 6 $\beta$ -hydroksylacji testosteronu dla homo- i heterodimerycznej furanokumaryny oraz homodimerycznej 5-hydroksykumaryny.

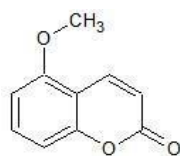
Związek	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]
(A)	0,13
(B)	0,03
(C)	>10

(A) homodimeryczna furanokumaryna hamująca CYP3A4, (B) heterodimeryczna furanokumaryna hamująca CYP3A4; (C) homodimeryczna 5-hydroksykumaryna hamująca CYP3A4 (ryc. 17)

#### 2.9.1.2. CYP2A6

W 2013 roku ten sam zespół opublikował działanie pochodnych kumaryny na izoenzym CYP2A6. Cytochrom CYP2A6 nie ma tak istotnego znaczenia jak CYP3A4 w metabolizmie leków, jednak substratami dla tego enzymu mogą być związki silnie kancerogenne, takie jak aflatoksyna B1 lub nitrozoaminy występujące w dymie tytoniowym [20,21]. Nikotyna jest silnym induktorem CYP2A6, dlatego też selektywne inhibitory są dużą szansą na zmniejszenie ryzyka nowotworów wynikających z palenia tytoniu i nadaktywności CYP2A6 [20]. Autorzy badań podkreślili dodatkową korzyść, jaką była mniejsza chęć palenia tytoniu spowodowana wolniejszym usuwaniem nikotyny z ustroju. Różnice w stężeniach  $IC_{50}$  dla CYP2A6 oraz CYP3A4 i CYP2D6 wahały się w granicach jednego rzędu wielkości, co pociągało za sobą potencjalne ryzyko zmiany farmakokinetiki licznych związków leczniczych. W opisanym badaniu selektywnym i niezwykle skutecznym inhibitorem CYP2A6 okazała się 5-metoksykumaryna, zaprezentowana na ryc. 18.

Dla 5-metoksykumaryny różnice w stężeniach hamujących aktywność enzymatyczną CYP2A6 oraz CYP3A4 i CYP2D6 sięgały dwóch rzędów wielkości. Wyniki badania działania 5-metoksykumaryny na CYP w odniesieniu do metoksalenu, który jest inhibitorem CYP2A6, prezentuje tabela 6.



Ryc. 18. Wzór 5-metoksykumaryny silnie i selektywnie hamującej CYP2A6.

Tabela 6. Porównanie wartości  $IC_{50}$  metoksalenu i 5-metoksykumaryny względem różnych izoform CYP [20].

Związek	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]		
	CYP2A6	CYP3A4	CYP2D6
Metoksalen	0,47	5,46	>50
5-Metoksykumaryna	0,13	>50	>50

Analiza wpływu miejsca przyłączenia do pierścienia kumaryny podstawnika metoksykowego wykazała, iż substytucja w położeniu 5 bądź 6 podnosi efektywność działania substancji, jako inhibitora enzymów cytochromalnych, a podstawienie w położeniu 4 lub 8 powoduje wyraźne osłabienie tej efektywności. Opisywaną zależność przedstawiono w tabeli 7.

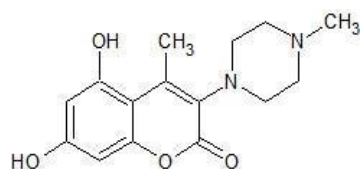
Tabela 7. Porównanie aktywności hamującej względem CYP2A6 dla różnych metoksykumaryn (wartości  $IC_{50}$ ) [20].

Związek	$IC_{50}$ [ $\mu M$ ]
4-Metoksykumaryna	>10
5-Metoksykumaryna	0,13
6-Metoksykumaryna	0,64
8-Metoksykumaryna	4,5

5-Metoksykumaryna, poza rolą inhibitora CYP2A6, jest także jego substratem. CYP2A6 bierze udział w metabolizmie 75% kumaryn, powodując 7-hydroksylację i ułatwiając wydalanie tych związków z ustroju.

### 2.9.2. Czynn timer chemokinopodobny CKLF-1

Chemokiny są białkami o silnym działaniu chemotaktycznym i biorą udział w hematopoezie i angiogenezie [22]. Liczne choroby przewlekłe takie jak astma, stwardnienie rozsiane czy reumatoidalne zapalenie stawów związane są z dysfunkcją chemokin, a także receptorów dla nich specyficznych, np. receptora CCR4 umiejscowionego na limfocytach T. Czynn timer chemokinopodobny CKLF-1 jest ligandem receptora CCR4, który uczestniczy w procesach regeneracji mięśni szkieletowych i wzrostu, jak również jest chemotatraktantem komórek w układzie odpornościowym [23]. Nadekspresja CKLF-1 u szczurów chorych na astmę powodowała wzrost aktywacji receptora CCR4, co zapoczątkowało poszukiwania nowych leków przeciwastmatycznych [22]. W 2009 roku pekińscy naukowcy opublikowali pracę dotyczącą pochodnych kumaryn, które mogłyby być antagonistami CKLF-1. Po dogłębnej analizie wszystkich badanych związków, wybrano ten o najsilniejszym działaniu hamującym (ryc. 19).

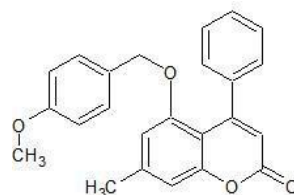


Ryc. 19. Budowa antagonisty CKLF-1, pochodnej 5-hydroksykumaryny.

Jako materiału do badań użyto embrionalnych komórek nerki HEK293, które były transfekowane receptorami CCR4. Aktywność badanych związków mierzono za pomocą wartości  $IC_{50}$  (stężenie, przy którym o połowę cofa się efekt wywołany przez wcześniejszą ekspozycję na CKLF-1). Wartość  $IC_{50}$  dla najaktywniejszej struktury wynosiła 21,2 nM. Autorzy zaproponowali mechanizm działania oparty na redukcji ekspresji czynn timer NF- $\kappa B$  o charakterze prozapalnym w wyniku blokowania połączenia receptora CCR4 z CKLF-1, co prowadzi do redukcji napływu komórek układu odpornościowego i osłabienia lub zaniku symptomów zapalenia tkanek.

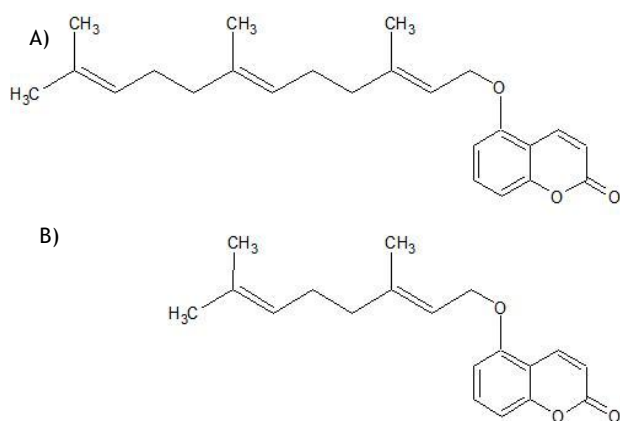
### 2.9.3. Lipooksygenazy

Lipooksygenazy (LOX) katalizują proces peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, które zawierają fragment *cis,cis*-1,4-pentadienowy, np. kwasu linolowego i arachidonowego. Enzymy z tej grupy mają istotne znaczenie przede wszystkim w kaskadzie przemian kwasu arachidonowego oraz w syntezie leukotrienów (lipidy związane z układem odpornościowym) [24]. Choroby przewlekłe takie jak astma, przewlekła obturacyjna choroba płuc czy nowotwory mogą mieć związek z patologicznymi stanami lipooksygenaz, z czego wynika potrzeba poszukiwania nowych substancji leczniczych. W 2006 roku po raz pierwszy pojawiły się doniesienia na temat hamowania LOX przez pochodne 5-hydroksykumaryn, jednak badania nie dały obiecujących wyników [25]. Dla wybranej pochodnej kumaryny (ryc. 20) wartości  $IC_{50}$  były wyższe niż 100  $\mu M$  względem retikulocytarnej 15-LOX oraz ludzkiej płytkowej 12-LOX.



Ryc. 20. Budowa pierwszej zaproponowanej pochodnej 5-hydroksykumaryny potencjalnie hamującej enzym lipooksygenazę.

W 2012 roku naukowcom z Iranu udało się uzyskać znacznie lepsze wyniki w badaniach prenylowych pochodnych hydroksykumaryn [26]. Analizowali oni efektywność zsyntetyzowanych związków w blokowaniu rekombinowanej ludzkiej 15-LOX. Wartości  $IC_{50}$ , które otrzymali, wynosiły odpowiednio: dla pochodnej 5-O-farnezylowej 3,6  $\mu M$ , podczas gdy mniej aktywna okazała się pochodna geranylowa:  $IC_{50}$  wynosiło 12,8  $\mu M$ . Obie struktury zostały przedstawione na ryc. 21.



Ryc. 21. Pochodne 5-hydroksykumaryny z podstawnikiem farnesylowym (A) i geranylowym (B), hamujące ludzką lipooksygenazę.

Dodatkowe badania *in silico* wykazały, że skuteczność opisywanych związków, jako inhibitorów 15-LOX, bazuje głównie na wiązaniu wodorowym pomiędzy tlenem z grupy alkoksylowej w położeniu C5 a grupą hydroksylową związaną z atomem żelaza enzymu.

### 3. Podsumowanie

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania pochodnymi 5-hydroksykumaryny, które, obok dobrze znanych i zbadanych pochodnych 4- i 7-hydroksykumaryny, stanowią obiecującą grupę związków wykazujących wielokierunkowe działanie biologiczne, takie jak aktywność przeciwmikrobowa, a także oddziaływania z białkami i układami enzymatycznymi. Jak wynika z przedstawionego przeglądu, związki te mogą stanowić cenne źródło struktur wiodących w dalszych badaniach [27].

### 4. Wykaz skrótów

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine triphosphate, adenozy-5'-trifosforan
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate, cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan
CB2	Cannabinoid receptor type 2, receptor kannabinoidowy typu 2
CCR4	C-C chemokine receptor type 4, receptor C-C chemokin typu 4
CKLF-1	Chemokine-like factor 1, czynnik chemokinopodobny typu 1
Col2	Colorectal cancer cell line, linia komórek raka jelita grubego
CYP	Cytochrome P450, cytochrom P450
EC <sub>50</sub>	Half maximal effective concentration, medialne stężenie skuteczne
FDA	Food and Drug Administration, Agencja Żywności i Leków
FLIPR	Fluorescent Imaging Plate Reader
HEK	Human embryonic kidney cell line, linia embrionalnych komórek nerki
HeLa	Human cervical carcinoma cell line, linia komórek raka szyjki macicy
HIV	Human immunodeficiency virus, ludzki wirus niedoboru odporności

HT-29	Colorectal adenocarcinoma cell line, linia komórek gruczolakoraka jelita grubego i odbytnicy
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration, medialne stężenie hamujące
KB	Oral carcinoma cell line, linia komórek raka jamy ustnej
LNCaP	Androgen-sensitive human prostate adenocarcinoma cells, linia komórek hormonozależnego raka gruczołu krokowego
LOX	Lipoxygenase, lipooksygenaza
Lu1	Lung carcinoma cell line, linia komórek raka płuc
MCF-7	Breast adenocarcinoma cell line, linia komórek gruczolakoraka piersi
MDA-MB-231	Breast adenocarcinoma cell line, linia komórek gruczolakoraka piersi
MIC	Minimal inhibitory concentration, najmniejsze stężenie hamujące
MT-4	Adult lymphoblastic leukemia T-cell line, linia limfocytów pobranych od pacjenta z białaczką limfocytarną
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, jądrowy czynnik transkrypcyjny
NIH3T3	Mouse fibroblast cells, Linia fibroblastów pochodzenia mysiego
PC12	Adrenal pheochromocytoma cell line, linia komórek guza chromochłonnego rdzenia nadnerczy

### 5. Bibliografia

- Najmanova I., Dosedel M., Hrdina R., Cardiovascular Effects of Coumarins Besides their Antioxidant Activity, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2015, 15, 830-849.
- Ostrowska K., Grzeszczuk D., Maciejewska D., Synthesis and biological screening of a new series of 5-[4-(4-aryl-1-piperazinyl) butoxy]coumarins, *Monatshefte für Chemie*, 2016, 147, 1615-1627.
- Chukwujekwu J.C., De Kock C.A., Smith P.J., Antiplasmodial and Antibacterial Activity of Compounds Isolated from *Ormocarpum trichocarpum*, *Planta Medica*, 2012, 78, 1857-1860.
- Joshi B.S., Kamat V.N., Govindachari T.R., Isolation and structure of surangin A and surangin B, two new coumarins from *Mammea longifolia* (wight), *Tetrahedron*, 1969, 25, 1453-1458.
- Ngo N.T.N., Nguyen V.T., Vo H.V., Cytotoxic Coumarins from the Bark of *Mammea siamensis*, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, 58(11), 1487-1491.
- Lee K.H., Chai H.B., Tamez P.A., Biologically active alkylated coumarins from *Kayea assamica*, *Phytochemistry*, 2003, 64, 535-541.
- Mao W., Wang T., Zeng H., Synthesis and evaluation of novel substituted 5-hydroxycoumarin and pyranocoumarin derivatives exhibiting significant antiproliferative activity against breast cancer cell lines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19, 4570-4573.
- Tomida I., Pertwee R.G., Azura-Blanco A., Cannabinoids and glaucoma, *British Journal of Ophthalmology*, 2004, 88(5), 708-713.
- Buchwald A., Derendorf J., Nagaraja W., Soft cannabinoid analogues as potential anti-glaucoma agents, *Pharmazie*, 2002, 57(2), 108-114.
- Green K., Symonds C., Oliver N.W., Intraocular pressure following systemic administration of cannabinoids, *Current Eye Research*, 1982, 2, 247-253.
- Mukherjee S., Adams M., Whiteaker K., Daza A., Kage K., Cassar S., Meyer M., Yao B.B., Species comparison and pharmacological characterization of rat and human CB2 cannabinoid receptors, *European Journal of Pharmacology*, 2004, 505, 1-9.



12. Mingna S., Jinfeng H., Xiuyun S., Coumarin derivatives protect against ischemic brain injury in rats, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 67, 39-53.
13. Al-Soud Y.A., Al-Masoudi I.A., Saeed B., Synthesis of New 1H-1,2,4-Triazolylcoumarins and Their Antitumor and Anti-HIV Activities, *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2006, 42(5), 583-590.
14. Nishioka H., Uesugi K., Ueda N., Synthesis and Anti-human Immunodeficiency Virus Activity of the Skeleton Isomers of 3',4'-Di-(O)-(-)-camphanoyl-(+)-khellactone, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2011, 59(8), 1075-1076.
15. Edenharder R., Tang X., Inhibition of the Mutagenicity of 2-Nitrofluorene, 3-Nitrofluoranthene and 1-Nitropyrene by Flavonoids, Coumarins, Quinones and Other Phenolic Compounds, *Food and Chemical Toxicology*, 1997, 35, 357-372.
16. Danielson P.B., The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans, *Current Drug Metabolism*, 2002, 3(6), 561-97.
17. Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L., *Farmakologia Goodmana & Gilmana*, wyd. Czelej, Lublin 2007, wydanie I, tom 1, 78.
18. Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L., *Farmakologia Goodmana & Gilmana*, wyd. Czelej, Lublin 2007, wydanie I, tom 1, 79.
19. Oda K., Yamaguchi Y., Yoshimura T., Synthetic Models Related to Furanocoumarin-CYP3A4 Interactions. Comparison of Furanocoumarin, Coumarin, and Benzofuran Dimers as Potent Inhibitors of CYP3A4 Activity, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 55(9), 1419-1421.
20. Yamaguchi Y., Akimoto I., Motegi K., Synthetic Models Related to Methoxalen and Menthofuran-Cytochrome P450 (CYP) 2A6 Interactions. Benzofuran and Coumarin Derivatives as Potent and Selective Inhibitors of CYP2A6, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 61(10), 997-1001.
21. Akopyan G., Bonavida B., Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis, *International Journal of Oncology*, 2006, 29(4), 745-752.
22. Li G., Wang D.M., Sun M.N., Discovery and Optimization of Novel 3-Piperazinylcoumarin Antagonist of Chemokine-like Factor 1 with Oral Antiasthma Activity in Mice, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53, 1741-1754.
23. The National Center for Biotechnology Information, CKLF chemokine like factor, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=51192> (dostęp 11.12.2016).
24. Kuhn H., Banthiya S., van Leyen K., Mammalian lipoxygenases and their biological relevance, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2015, 1851(4), 308-330.
25. Kenyon V., Chorny I., Carvajal W.J., Novel Human Lipoxygenase Inhibitors Discovered Using Virtual Screening with Homology Models, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49, 1356-1363.
26. Iranshahi M., Jabbari A., Orafaie A., Synthesis and SAR studies of mono O-prenylated coumarins as potent 15-lipoxygenase inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 57, 134-142.
27. Grzeszczuk D., Nowe pochodne 5-[4-(4-arylopiiperazyn-1-yl)-butoksy]kumaryny - synteza i wstępna ocena aktywności biologicznej *in vitro*, Praca magisterska wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa 2017.