

Załącznik nr 3



Mariola Barbara Napiórkowska

AUTOREFERAT

Katedra i Zakład Biochemii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Warszawa 2025

Spis treści

1. Dane personalne.....	4
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	4
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	4
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.).....	5
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	5
4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	5
4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	7
4.3.1. Wprowadzenie i cel naukowy prowadzonych badań.....	7
4.3.2. Omówienie wyników badań.....	10
4.3.3. Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac (wnioski)..	37
4.4. Piśmiennictwo.....	39
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	45
5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora..	45
5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora.....	46
6. Pozostałe publikacje oryginalne.....	49
7. Prace poglądowe opublikowane po doktoracie.....	53
8. Patenty i zgłoszenia patentowe.....	53
9. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych.....	54
10. Współpraca naukowa.....	58
10.1. Krajowe ośrodki naukowe.....	58
10.2. Zagraniczne ośrodki naukowe.....	59
11. Udział w projektach badawczych.....	59
12. Nagrody i stypendia za działalność naukową i dydaktyczną.....	59
13. Kursy i szkolenia.....	61
14. Działalność organizacyjna.....	61
15. Recenzje prac naukowych.....	61
16. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych.....	61
17. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę.....	61

17.1. Działalność dydaktyczna.....	61
17.2. Działalność popularyzująca naukę.....	62

1. Dane personalne:

Imię i nazwisko

Mariola Barbara Napiórkowska (nazwisko panieńskie: Krawiecka)

ORCID: 0000-0002-1174-2208

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

1999 r. – dyplom magistra nauk chemicznych, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii, Pracownia Peptydów, tytuł pracy magisterskiej: „Próby otrzymania pochodnych agmatyny”, promotor: Prof. dr hab. Jan Izdebski

2005 r. – stopień doktora nauk farmaceutycznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny, tytuł rozprawy doktorskiej: „Synteza -N-podstawionych pochodnych wybranych izoindoli o spodziewanym działaniu farmakologicznym”, promotor: Prof. dr hab. Jerzy Kossakowski

2011 r. – dyplom ukończenia studiów podyplomowych w zakresie prowadzenia i monitorowania badań klinicznych, Akademia Leona Koźmińskiego w Warszawie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 10.2013 - adiunkt, Katedra i Zakład Biochemii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

09.2013 – 03.2011 – adiunkt, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

09.2011 – 10.2006 – starszy wykładowca, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny)

09.2006 – 10.2003 – wykładowca, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

09.2003 – 10.2001 – specjalista chemik, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

09.2001 – 10.1999 – asystent, Katedra i Zakład Chemii Medycznej, I Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Warszawie

Sumaryczny Impact Factor wszystkich publikacji wg listy Journal Citation Reports JCR zgodnie z rokiem opublikowania: **103.287**

Sumaryczna punktacja MEiN (dawniej MNiSW) wszystkich publikacji: **2421 pkt**

Liczba cytowań (wg bazy Web of Science) z dnia 02.09.2025: **272**, bez autocytowań: **196**

Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science) z dnia 02.09.2025: **9**

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

„Synteza i aktywność biologiczna wybranych pochodnych benzofuranów”

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

H1. Kossakowski J., **Krawiecka M.***, Kuran B., Stefańska J.Z., Wolska I. Synthesis and preliminary evaluation of the antimicrobial activity of selected 3-benzofurancarboxylic acid derivatives. *Molecules*. 2010; 15(7): 4737-4749.

IF = 1.988, Punkty MNSiW = 20, Q2

H2. **Krawiecka M.***, Kuran B. J., Kossakowski J., Wolska I., Kierzkowska M., Młynarczyk G. A. Synthesis and characterization of selected methyl 5-methoxy-2-methyl-1-benzofuran-3-carboxylate derivatives with potential antimicrobial activity. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2012; 69(6): 1055-1065.

IF = 0.665, Punkty MNSiW = 15, Q4

H3. **Krawiecka M. ***, Kuran B., Kossakowski J., Cieślak M., Kazmierczak-Barańska J., Królewska K., Nawrot B. Synthesis and cytotoxic properties of halogen and aryl-/heteroarylpiperazinyl derivatives of benzofurans. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 2015, 15(1), 115-121.

IF = 2.722, Punkty MNSiW = 30, Q2

H4. Napiórkowska M.*, Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska-Golińska K., Nawrot B. Synthesis of new derivatives of benzofuran as potential anticancer agents. *Molecules* 2019, 24(8), 1-16.

IF = 3.267, Punkty MNSiW= 140, Q2

H5. Napiórkowska M.*, Kumaravel P., Amboo Mahentheran M., Kiernożek-Kalińska E. Grosicka-Maciąg E. New derivatives of 1-(3-methyl-1-benzofuran-2-yl)ethan-1-one: synthesis and preliminary studies of biological activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 7, 25(4), 1999.

IF = 4.9, Punkty MNSiW = 140, Q1

H6. Napiórkowska M.*, Otto – Ślusarczyk D., Kurpios-Piec D., Stukan I., Gryzik M., Wojda U. BM7, a derivative of benzofuran, effectively fights cancer by promoting cancer cell apoptosis and impacting IL-6 levels. *European Journal of Pharmacology*, 2024, 978, 1-11.

IF=4.7, Punkty MNSiW = 100, Q1

H7. Napiórkowska M.*, Grosicka-Maciąg E., Podsadni P., Otto-Ślusarczyk D. Anticancer potential of halogen derivatives of methyl 6-acetyl-5-hydroxy-2-methyl-1-benzofuran-3-carboxylate. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26 (12), 1-20.

IF = 4.9, Punkty MNSiW = 140, Q1

Obecny sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) artykułów naukowych (H1-H7) wchodzących w skład cyklu w postępowaniu habilitacyjnym wynosi **23.142**, co odpowiada **585** punktom MNiSW.

* – prace, w których występowałam w roli autora korespondencyjnego

Wyniki badań składających się na osiągnięcie naukowe są przedmiotem poniższych patentów:

P1. Patent przyznany przez Europejski Urząd Patentowy- zgoda wydana 12.11.2014 roku, numer wynalazku: C07D307/80; C07D307/85; A61K31/343; A61P35/00

“ Halogen derivatives of benzo[b]furans useful as anti-neoplastic or anti-proliferative drugs”

Krawiecka M., Kuran B., Kossakowski J., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Nawrot B.

P2. Patent przyznany przez UPRP- zgoda wydana 27.10.2016 roku, numer wynalazku: 223225

“ Halogen derivatives of benzo[b]furans useful as anti-neoplastic or anti-proliferative drugs”

Krawiecka M., Kuran B., Kossakowski J., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Nawrot B.

4.3. Omówienie celu naukowego w/w prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie i cel naukowy prowadzonych badań

Związki heterocykliczne zajmują centralną pozycję w chemii organicznej, odgrywając ważną rolę w projektowaniu i odkrywaniu nowych aktywnych farmakologicznie cząsteczek [1-3]. Wiele leków dostępnych na rynku, pochodzenia zarówno naturalnego, jak i syntetycznego, zawiera w swojej budowie rdzeń heterocykliczny [4, 5]. Substancje te wykazują często dobrą rozpuszczalność w wodzie oraz zdolność do tworzenia soli, co znacząco wpływa na ich biodostępność oraz możliwość podania drogą doustną [6]. Obszerną grupę biologicznie ważnych cząsteczek stanowią związki zawierające w swej strukturze szkielet benzofuranu [7-9]. Do najbardziej rozpoznawalnych benzofuranów zaliczane są ailanthoidol, amiodaron, bufuralol, citalopram czy też benzbromaron. Ailanthoidol, neolignan z 2-arylobenzofuranowym szkieletem, wykazuje szereg właściwości biologicznych, takich jak: przeciwnowotworowe, przeciwwirusowe, immunosupresyjne, przeciwutleniające, przeciwgrzybicze i przeciw pasożytnicze [10]. Amiodaron jest lekiem przeciwaritmicznym stosowanym w profilaktyce i leczeniu zaburzeń rytmu serca [11]. Bufuralol jest nieselektywnym antagonistą receptorów β -adrenergicznych. Jest on substratem cytochromu P450 (CYP) oraz ulega enancjoselektywnemu i regioselektywnemu utlenianiu w wątrobie [12]. Citalopram to lek przeciwdepresyjny z grupy selektywnych inhibitorów wychwyty zwrotnego serotoniny (SSRI), stosowany w leczeniu depresji – zwłaszcza w fazie początkowej i w leczeniu podtrzymującym. Jest jednym z najbardziej selektywnych leków z tej grupy [13]. Benzbromaron natomiast to lek urykozuryczny i niekompetycyjny inhibitor oksydazy ksantynowej stosowany w leczeniu dna moczanowej [14, 15].

Benzofurany przyciągnęły znaczną uwagę naukowców z całego świata ze względu na ich różnorodne właściwości biologiczne, obejmujące działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwutleniające, przeciwzapalne, przeciwdrgawkowe i przeciwwirusowe

[7, 8, 16]. Udokumentowano, że wiele pochodnych benzofuranu, zarówno małych cząsteczek, jak i dużych koniugatów, wykazuje działanie cytotoksyczne [17-21]. Godną uwagi podgrupą benzofuranów o potencjale przeciwnowotworowym są związki zawierające w swojej strukturze atom chlorowca. Badania wykazały, że wprowadzenie halogenu do macierzystego pierścienia powoduje znaczny wzrost aktywności przeciwnowotworowej [19, 22-24]. Jest to prawdopodobnie wynik tworzenia ukierunkowanych, bliskich oddziaływań typu R-X----Y-R', gdzie halogen działa jak kwas Lewisa, a Y może być dowolnym ugrupowaniem donorowym elektronów. Interakcja ta od 1978 roku jest nazywana „wiązaniami halogenowymi”, i jak wskazują liczne doniesienia oraz badania, odgrywa ona ważną rolę w stabilizacji interakcji ligand-białko [25-28].

Należy tutaj wspomnieć o małych cząsteczkach zawierających atom halogenu podstawiony do grupy alkilowej, bezpośrednio przyłączonej do szkieletu benzofuranu. Przykładem jest ester etylowy kwasu 3-bromometylo-benzofuran-2-karboksylowego (MCC1019), który został opisany jako selektywny inhibitor kinazy PLK1 (Polo-like kinase 1), ukierunkowany na domenę PBD (Polo box domain) [22]. Związek ten wykazał działanie przeciwnowotworowe zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Analiza mechanizmu działania w komórkach gruczolakoraka płuc A549 wykazała, że MCC1019 hamował proliferację poprzez inaktywację szlaku sygnałowego AKT (serynowo-treoninowa kinaza białkowa), a także powodował przedłużone zatrzymanie mitozy — tzw. katastrofę mitotyczną — po której następowała szybka śmierć komórek na drodze apoptozy lub nekrotozy. W badaniach *in vivo* MCC1019 znacząco hamował wzrost guza w mysim modelu raka płuca, nie wpływając ani na masę ciała, ani na wielkość istotnych narządów wewnętrznych, a także ograniczał rozwój przerzutów w płucach. Co więcej, obiecującą aktywność cytotoksyczną wykazały związki zawierające atom chlorowca bezpośrednio podstawiony do pierścienia benzofuranu, do podstawnika fenyłowego, czy do układu arylopierazynowego połączonego ze szkieletem benzofuranu. Przykładowo, Li i współpracownicy wyselekcjonowali w swych badaniach pochodną, N-(2-(4-fluorobenzoyl)-benzofuran-3-yl)-3,4,5-trimetoksybenzamid, o wysokiej cytotoksyczności, która istotnie hamowała wzrost komórek MDA-MB-231 (rak piersi), HCT-116 i HT-29 (rak jelita grubego), HeLa (rak szyjki macicy), a jednocześnie pozostawała nietoksyczna wobec prawidłowych linii komórkowych HEK-293 [29]. Co ciekawe, badania nad mechanizmem toksycznego działania wykazały, że związek ten zwiększał odsetek komórek HeLa w fazie G2/M w sposób zależny od stężenia, jak również hamował polimeryzację tubulin. Warto również wspomnieć o grupie arylopiiperazynowych pochodnych z obiecującym potencjałem przeciwnowotworowym [30]. W wyniku przeprowadzonych badań Schumacher i współpracownicy wytypowali

dichloropochodną benzofuran-2-yl(4-(piperazyn-1-ylo)fenylo)metanonu, wykazującą wysoką cytotoksyczność wobec wszystkich badanych linii komórkowych, w tym raka piersi (MDA-MB-231, MCF7, 4T1, 67NR), raka trzustki (MIAPaCa-2), jak również raka jelita grubego (WiDr). Analiza badań *in vitro*, obejmująca apoptozę oraz cykl komórkowy, wykazała, że związek ten wywołuje nekrozę. Co więcej, jego potencjał przeciwnowotworowy został potwierdzony także w badaniach *in vivo* na myszach z ksenoprzeszczepem MDA-MB-231.

Reasumując, halogenopochodne benzofuranów stanowią ciekawą i obiecującą grupę pochodnych jako potencjalnych związków o aktywności biologicznej, w szczególności przeciwnowotworowej.

Mechanizmy, za pomocą których związki przeciwnowotworowe indukują śmierć komórek nowotworowych, są różne, a apoptoza odgrywa istotną rolę w działaniu leków przeciwnowotworowych [31]. Jest ona niezbędna do utrzymania homeostazy zdrowych tkanek, a jej indukcja może przebiegać poprzez różne ścieżki [32]. Zaburzenie równowagi mechanizmów regulujących przeżycie komórek nowotworowych może prowadzić do progresji nowotworu oraz rozwoju oporności na leczenie [33]. Przywrócenie apoptozy w komórkach nowotworowych stanowi kluczową strategię farmakologiczną. Do celów przeciwnowotworowych zalicza się hamowanie angiogenezy, syntezy DNA, aktywności enzymów i tworzenia mikrotubul, interkalację do struktury DNA, regulację białek pro- i antyapoptotycznych, modyfikacje cyklu komórkowego, kontrolę poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) oraz stężenia interleukiny-6 (IL-6) [34-39].

Opublikowane w literaturze badania aktywności benzofuranów wykazały, że pochodne tej grupy mogą indukować apoptozę w różnych liniach komórek nowotworowych [7, 9, 18]. Ich aktywność cytotoksyczna zależy od rodzaju podstawnika i może zachodzić poprzez różne mechanizmy, takie jak indukcja stresu oksydacyjnego i zmniejszenie potencjału błony mitochondrialnej [40, 41], regulacja ekspresji białek apoptotycznych [20, 24, 42], aktywacja katastrofy mitotycznej [43], hamowanie kinaz fosfatydyloinozytolu-3 (PI3K) [44] i receptora czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego-2 (VEGFR-2) [45], hamowanie polimeryzacji tubuliny [29], blokowanie sygnalizacji STAT3 [46], hamowanie szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B [47] oraz regulacja ekspresji genu p21Cip/WAF1 [42].

Biorąc pod uwagę to szerokie spektrum właściwości farmakologicznych benzofuranów oraz możliwość wielokierunkowej modyfikacji ich struktury, rozpoczęłam w tej grupie poszukiwania struktur chemicznych, które mogą wykazywać aktywność biologiczną i znaleźć zastosowanie w farmakologii. W tym celu zaplanowałam i przeprowadziłam syntezę wybranych pochodnych kwasu 2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowego i 1-(3-metylo-1-

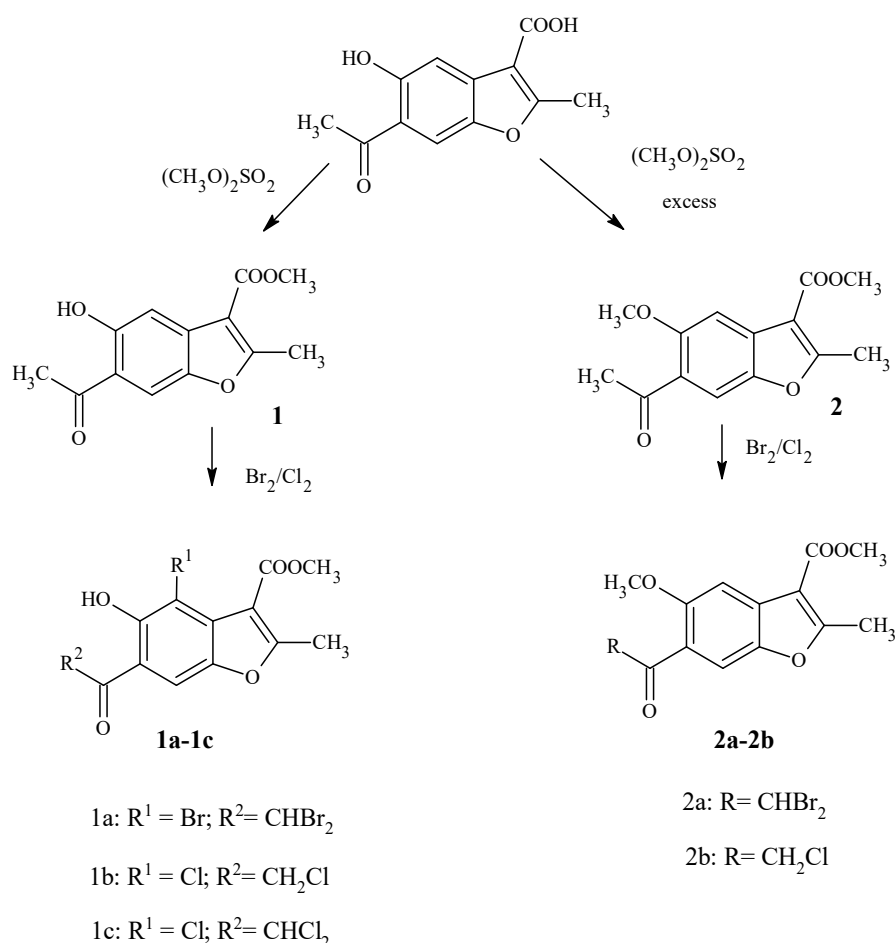
benzofuran-2-ylo)etan-1-onu. Następnie, zmodyfikowałam strukturę najbardziej aktywnych pochodnych, tworząc w efekcie bibliotekę ponad 50 związków, w tym 33 halogenopochodnych benzofuranu. Równolegle koordynowałam wielośrodkowe badania aktywności otrzymanych związków. Dla najbardziej obiecujących wykonano poszerzone analizy, które miały na celu ustalenie mechanizmu ich działania. Uzyskane wyniki pozwoliły na wstępną ocenę wpływu zmian strukturalnych pochodnych na ich aktywność *in vitro*. Skuteczność jednego z najbardziej aktywnych związków jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego została potwierdzona zarówno w mysim modelu przewlekłej białaczki szpikowej *in vivo*, jak i w badaniach *in vitro* na kilku ludzkich liniach nowotworowych. Przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe obejmuje cykl 7 prac opublikowanych w latach 2010-2025.

4.3.2. Omówienie wyników badań

Moje pierwsze prace eksperymentalne, dotyczące poszukiwania biologicznie aktywnych pochodnych benzofuranów, rozpocząłam od zaprojektowania i syntezy pochodnych kwasu 6-acetylo-5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowego [H1]. Zainspirowana doniesieniami literaturowymi na temat aktywności halogenowych pochodnych benzofuranów [14, 48-52] oraz wynikami badań prowadzonych przez nasz zespół [53-55], podjęłam się syntezy bromo- i chloropochodnych tego kwasu (Rys. 1). W pierwszym etapie syntezy uzyskałam estry wyjściowego kwasu (1, 2), stosując siarczan dimetylu, które następnie poddałam halogenowaniu przy użyciu cząsteczkowego bromu lub chloru. W przypadku estru zawierającego grupę hydroksylową w pierścieniu benzofuranowym, uzyskałam produkty, w których halogen podstawiony został zarówno do pierścienia aromatycznego, jak i do grupy acetylowej (1a-1c). Dla metoksyłowej pochodnej wyizolowałam produkty, w których podstawienie dotyczyło tylko grupy acetylowej (2a-2b). Ostatecznie otrzymałam siedem pochodnych, w tym pięć halogenopochodnych, których struktury zostały potwierdzone za pomocą widm spektralnych oraz analizy elementarnej. Dodatkowo, dla jednej z chloropochodnych: 4-chloro-6-(dichloroacetylo)-5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylanu metylu (1c), wykonano badania krystalograficzne, dzięki współpracy z prof. dr hab. Ireną Wolską z Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, które ostatecznie potwierdziły strukturę tego związku.

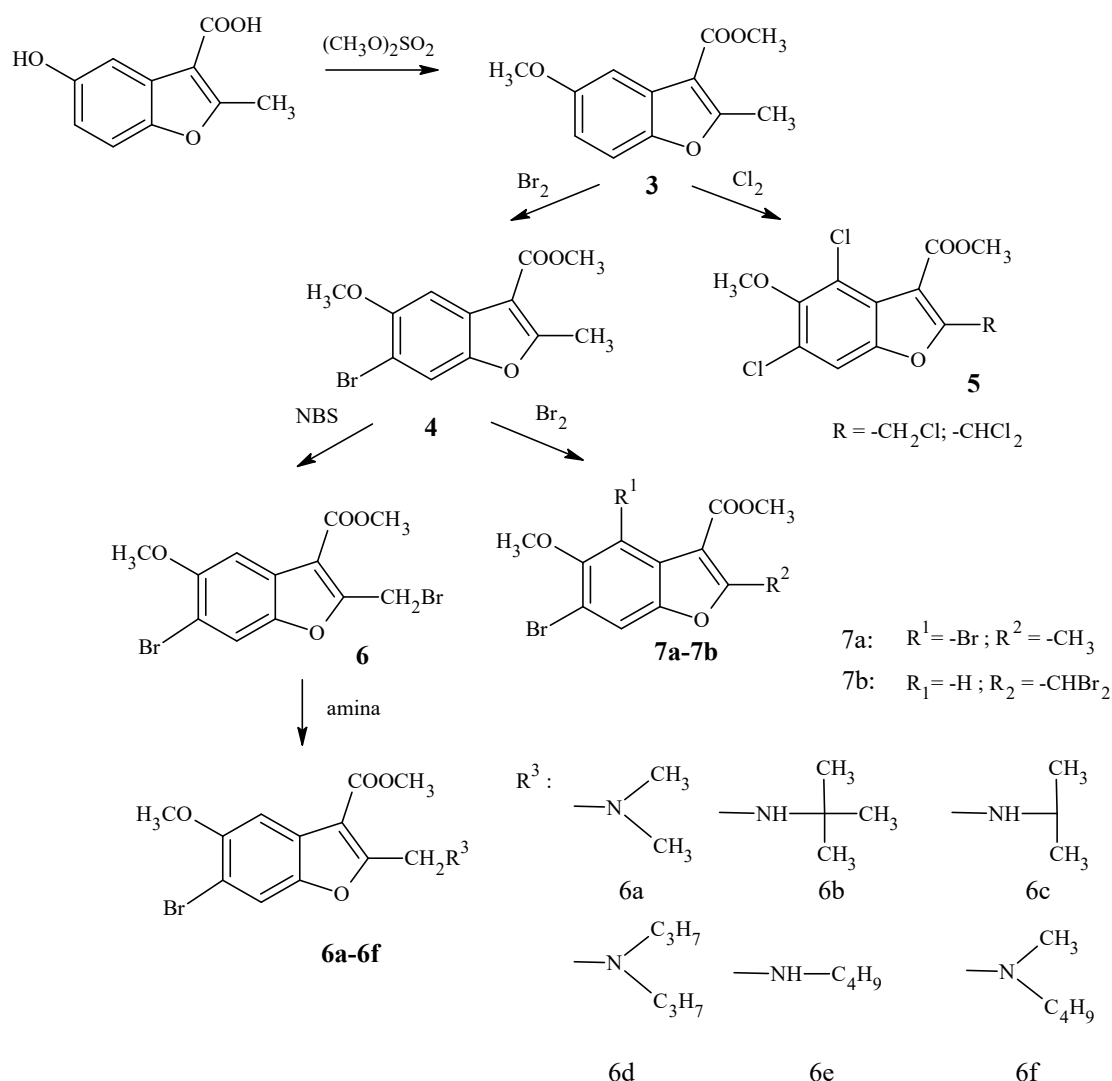
Celem niniejszej pracy była synteza i zbadanie aktywności mikrobiologicznej otrzymanych związków. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzono we współpracy z dr hab. Joanną Stefańską z Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM. Wszystkie

zsyntetyzowane związki poddano badaniom *in vitro* na standardowych szczepach bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych oraz grzybów. Uzyskane wyniki wskazywały na ich umiarkowaną i słabą aktywność mikrobiologiczną w porównaniu do ciprofloksacyny, zastosowanej jako lek referencyjny. Analizując budowę związków, można zauważyć interesującą tendencję zmian aktywności wynikającą z modyfikacji ich struktury. Po pierwsze, pochodne kwasu, które nie zawierały w swojej budowie halogenu, nie wykazywały aktywności mikrobiologicznej. Wprowadzenie fluorowca powodowało wzrost aktywności, a najbardziej widoczna zmiana wystąpiła w przypadku dihalogenoacetylopochodnych. Pochodne te wykazywały najsilniejszy wpływ hamujący względem standardowych szczepów bakterii Gram-dodatnich. Należy również zaznaczyć, że analogi zawierające dodatkowo halogen w pierścieniu benzenowym układu benzofuranowego wykazywały aktywność przeciwgrzybiczą.



Rys. 1. Synteza halogenopochodnych kwasu 6-acetylo-5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowego.

Uzyskane wyniki sugerowały, że halogenowe pochodne stanowią interesującą grupę do poszukiwania związków o potencjalnym działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Mając to na uwadze, postanowiłam kontynuować badania w tej grupie pochodnych benzofuranów, wykorzystując jako związek wyjściowy kwas 5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowy [**H2**]. Dodatkowo, analizując strukturę biologicznie aktywnych benzofuranów, takich jak Bufuralol i jego aminoalkilowe pochodne [12, 56-59], zdecydowałam się na wprowadzenie do struktury nowych pochodnych fragmentów aminoalkilowych (**Rys. 2**).



Rys. 2. Synteza halogenopochodnych kwasu 5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowego.

W pierwszym etapie syntezy, stosując nadmiar siarczanu dimetylu, uzyskałam ester (**3**), który następnie poddałam bromowaniu oraz chlorowaniu. W reakcji z cząsteczkowym chlorem

doszło do podstawienia atomów wodoru przez atomy chloru w pozycjach 4 i 6 pierścienia benzenowego oraz w grupie metylowej. W efekcie otrzymałam i wyizolowałam dwie chloropochodne (**5a,5b**).

Syntezę bromopochodnych przeprowadziłam w dwóch etapach. W pierwszym etapie, stosując równomolową ilość bromu cząsteczkowego, uzyskałam pochodną z podstawionym atomem bromu w pozycji 6 pierścienia benzenowego (**4**). Następnie, w celu wprowadzenia podstawienia w grupie metylowej, przeprowadziłam reakcję z N-bromosukcynoimidem (NBS), uzyskując z wysoką wydajnością pożądaný produkt: 6-bromo-2-(bromometylo)-5-metoksy-1-benzofuran-3-karboksylan metylu (**6**). Otrzymany związek następnie sprzęgałam z wybranymi aminami alifatycznymi.

Aby uzyskać podstawienie w pozycji 4 pierścienia benzenowego, zastosowałam nadmiar bromu cząsteczkowego, co doprowadziło do powstania mieszaniny dwóch związków: oczekiwanego 4,6-dibromo-2-metylo-5-metoksy-1-benzofuran-3-karboksylanu metylu (**7a**) oraz produktu ubocznego – 6-bromo-2-(dibromometylo)-5-metoksy-1-benzofuran-3-karboksylanu metylu (**7b**).

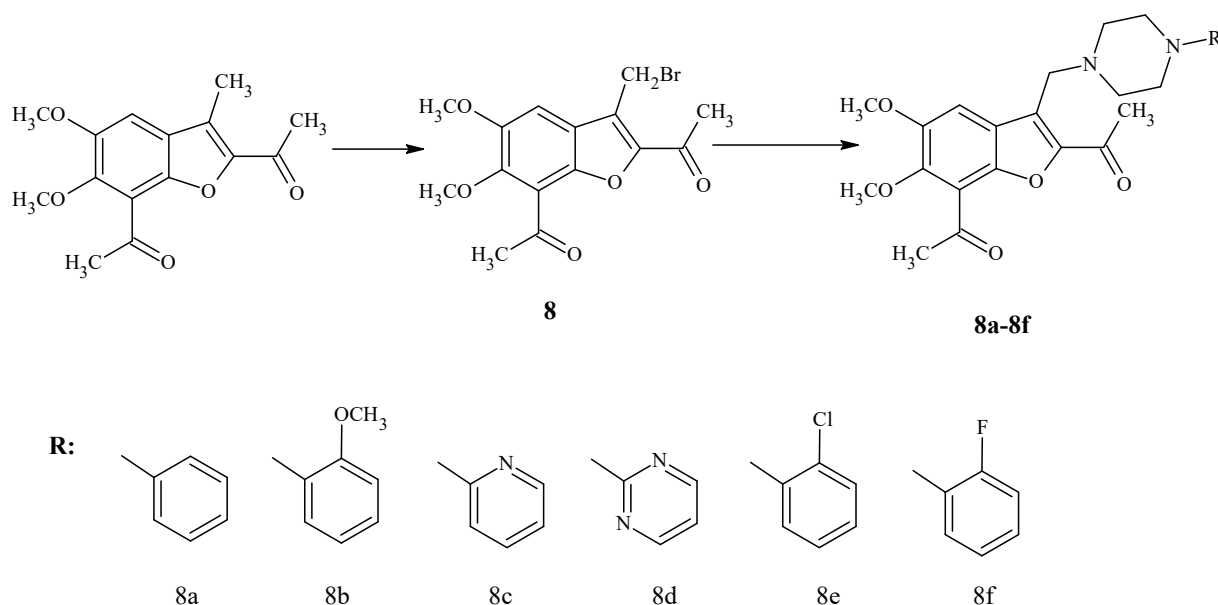
W wyniku przeprowadzonej syntezy otrzymałam grupę 12 pochodnych, których struktury zostały potwierdzone za pomocą widm spektralnych i analizy elementarnej. Dodatkowo, dzięki współpracy z prof. dr hab. Ireną Wolską z Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, wykonano badania krystalograficzne dla dwóch pochodnych: 5-metoksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylanu metylu (**3**) oraz 6-bromo-5-metoksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylanu metylu (**4**), co ostatecznie potwierdziło ich struktury.

Kolejnym etapem prac były badania mikrobiologiczne otrzymanych pochodnych, przeprowadzone we współpracy z grupą badawczą Prof. Grażyny A. Młynarczyk z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej WUM. Wszystkie halogenopochodne zostały przetestowane *in vitro* na czterech szczepach bakterii: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Stenotrophomonas maltophilia* oraz *Candida albicans*. Wybrane szczepy stanowią dobry model do przesiewowych badań nowo zsyntezowanych związków pod kątem ich aktywności mikrobiologicznej. Pomimo że badane związki zawierały atom halogenu, którego obecność – zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami – miała istotne znaczenie dla aktywności mikrobiologicznej pochodnych benzofuranu, żaden z nich nie wykazał działania antybakteryjnego w przeprowadzonych testach. Również wprowadzenie fragmentu aminoalkilowego nie wpłynęło korzystnie na aktywność mikrobiologiczną wobec analizowanych szczepów.

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, wskazujące na słabą aktywność mikrobiologiczną halogenopochodnych benzofuranów, postanowiłam poszerzyć obszar badań dla nowo zsyntezowanych związków. Z uwagi na liczne doniesienia literaturowe, wskazujące na wysoką aktywność przeciwnowotworową pochodnych zawierających szkielet benzofuranu [43, 60-78], zdecydowałam się kontynuować badania w tym kierunku.

Pierwsze wyniki badań cytotoksyczności przedstawiłam w pracy opublikowanej w 2015 roku na łamach *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry* (**H3**). W pracy tej opisałam syntezę i badania arylo-/heteroarylopiperazynowych pochodnych 1,1'-(5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2,7-diyl)dietanonu. Decyzję o wprowadzeniu fragmentu piperazynowego podjęłam w świetle licznych doniesień o aktywności przeciwnowotworowej arylopiperazynowych pochodnych [79-84]. Łącząc te dwa strategiczne fragmenty strukturalne, miałam nadzieję uzyskać związki o wysokiej aktywności biologicznej.

Związkiem wyjściowym w opisanych badaniach był 1,1'-(5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2,7-diyl)dietanon. Syntezę zaplanowanych pochodnych przeprowadziłam dwuetapowo (**Rys. 3**). W pierwszym etapie otrzymałam bromometylową pochodną (**8**) w reakcji bromowania przy użyciu N-bromosukcynoimidu (NBS). Następnie, otrzymany produkt poddałam reakcji sprzęgania z wybranymi arylo-/heteroarylopiperazynami. W wyniku przeprowadzonej syntezy uzyskałam siedem nowych pochodnych 1,1'-(5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2,7-diyl)dietanonu (**8a-8f**) (**Rys. 3**). Struktury otrzymanych pochodnych potwierdzono za pomocą widm spektralnych i analizy elementarnej.



Rys. 3. Synteza pochodnych 1,1'-(5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2,7-diyl)dietanonu.

W kolejnym etapie badań oceniono ich potencjał cytotoksyczny. Badania te przeprowadzono we współpracy z grupą badawczą Prof. Barbary Nawrot z Zakładu Chemii Bioorganicznej, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Do badań włączyłam także trzy halogenopochodne 6-acetylo-5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylanu metylu (**1a**, **2a**, **1c**; **Rys. 1**), których syntezę i wstępne badania mikrobiologiczne opisałam w pierwszej pracy z cyklu habilitacyjnego (**H1**).

Wstępny przesiewowy test cytotoksyczności przeprowadzono metodą MTT, opartą na ocenie aktywności oksydacyjnej mitochondriów poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. Aktywność cytotoksyczna badanych związków jest wyrażana w tym teście jako wartość IC_{50} , czyli stężenie badanego związku, przy którym żywotność komórek spada do 50% w porównaniu do kontroli.

Badania przesiewowe wykonano na liniach komórkowych raka szyjki macicy (HeLa), przewlekłej białaczki szpikowej (K562) i prawidłowych komórkach śródbłónka (HUVEC). Spośród dziesięciu testowanych związków, cztery halogenopochodne - **1a**, **2a**, **1c** i **8** (**Rys. 1** i **Rys. 3**)- wykazywały najsilniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek K562 i/lub HeLa z wartościami IC_{50} poniżej 10 μM . Następnie związki te poddano dalszym badaniom pod kątem ich cytotoksyczności wobec komórek ostrej białaczki szpikowej (HL60). Otrzymane wyniki wskazały, że bromopochodna wyjściowego benzofuranu (**8**) charakteryzuje się wysoką toksycznością wobec komórek K562 i HL60 (IC_{50} odpowiednio 5 μM i 0,1 μM), nie wykazując jednocześnie cytotoksyczności względem komórek HeLa i HUVEC. Wyniki te sugerują, że związek ten jest selektywnie cytotoksyczny wobec obu typów komórek białaczkowych, jednocześnie bezpieczny dla komórek prawidłowych oraz HeLa.

Tymczasem bromopochodne 6-acetylo-5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylanu metylu (**1a** i **2a**) wykazywały toksyczność względem wszystkich badanych linii nowotworowych (HeLa, K562, HL60), natomiast nie wykazywały aktywności wobec komórek prawidłowych HUVEC. Z kolei chloropochodna **1c** wykazywała selektywny potencjał przeciwnowotworowy wobec komórek HeLa (IC_{50} 10 μM) i HL60 (IC_{50} 3 μM), z jednoczesnym brakiem działania wobec komórek K562 i prawidłowych.

W kolejnym kroku skupiłam się na badaniach mechanizmów cytotoksycznego działania najbardziej obiecujących pochodnych. Jednym z możliwych wyjaśnień zaobserwowanej cytotoksyczności testowanych związków może być ich interakcja z dwuniciowym DNA. Doniesienia literaturowe wskazują, że związki interkalujące do DNA mają potencjał do

indukowania apoptozy komórek nowotworowych poprzez bezpośrednie uszkodzenie struktury DNA, stres oksydacyjny oraz modyfikację ścieżek sygnałowych, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki [85-87]. Aby zweryfikować tę hipotezę, przeprowadzono badanie wpływu najaktywniejszych benzofuranów (**1a**, **2a**, **1c** i **8**) na trawienie plazmidowego DNA (pcDNA3.1 HisC) przez endonukleazę BamH1. Plazmidowe DNA zawiera unikalne miejsce restrykcyjne BamH1, umożliwiające jego linearyzację. Podczas eksperymentu plazmidowe DNA inkubowano z badanym związkiem, a następnie poddawano trawieniu enzymem BamH1. Niestrawione plazmidowe DNA występowało w formach liniowych, nadspiralnych oraz kołowych, natomiast po pełnym trawieniu przez BamH1 plazmid przekształcał się całkowicie do formy liniowej. Jako kontrolę zastosowano daunorubicynę, silny interkalator DNA, która znacząco hamuje tworzenie liniowego plazmidowego DNA. Wyniki wykazały, że trawienie DNA zostało zahamowane jedynie w obecności związku **8**. Sugeruje to, że pochodna ta może wchodzić w interakcję z DNA poprzez interkalację lub alkilację, co prowadzi do zahamowania działania endonukleazy BamH1.

W dalszym etapie badań pochodną **8** przetestowano pod kątem zdolności do indukowania apoptozy w ludzkich komórkach białaczki K562. Wykorzystano do tego test aktywacji kaspaz 3/7, które są markerami zaprogramowanej śmierci komórki. W tym teście aktywność kaspaz była mierzona za pomocą znakowanego fluorescencyjnie substratu peptydowego. Zwiększona aktywność kaspaz jest charakterystyczna dla apoptozy, co oznacza, że komórki o wyższej fluorescencji wykazują większą aktywność kaspaz, a tym samym indukcję apoptozy. Jako kontrolę pozytywną zastosowano komórki traktowane staurosporyną, silnym induktorem programowanej śmierci. Uzyskane wyniki wykazały, że inkubacja komórek K562 ze związkiem **8** prowadziła do zwiększenia aktywności kaspazy 3 i kaspazy 7. Jest to silny dowód na to, że pochodna ta indukuje apoptozę w komórkach rakowych. Selektywność wobec komórek przewlekłej i ostrej białaczki szpikowej oraz działanie proapoptyczne przy jednoczesnym braku toksyczności wobec komórek prawidłowych wskazują na to, że związek **8** jest dobrym kandydatem dla rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych.

Analiza zależności struktura-aktywność (SAR) dla badanej grupy związków, pozwala przypuszczać, że obecność atomu halogenu w budowie badanych pochodnych benzofuranu jest kluczowym czynnikiem warunkującym ich toksyczność. Założenie to potwierdziły wyniki uzyskane dla serii pochodnych 1,1'-(5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2,7-diylo)-dietanonu. Spośród tej grupy jedynie związek **8**, zawierający atom bromu w podstawniku metylowym w pozycji C3, wykazywał znaczną toksyczność wobec testowanych linii

komórkowych. Brak halogenu lub jego zastąpienie podstawnikiem piperazynowym całkowicie eliminowało aktywność przeciwnowotworową.

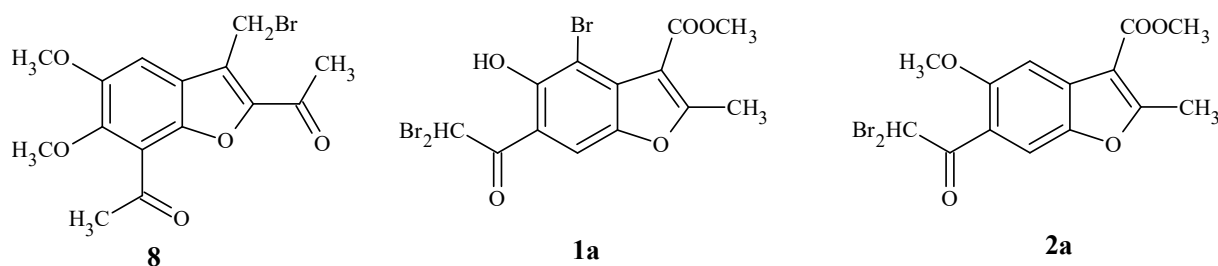
Obecność halogenów w strukturach pochodnych **1a**, **2a** i **1c** również zdaje się decydować o ich właściwościach cytotoksycznych. Widoczny wpływ ma także miejsce położenia atomu chlorowca. Podstawienie halogenu do pierścienia aromatycznego w pozycji C4, jak w związku **1a**, powoduje zmniejszenie toksyczności w stosunku do komórek HeLa, w porównaniu do pochodnej **2a**, nieposiadającej halogenu w pierścieniu aromatycznym, podczas gdy poziom toksyczności w stosunku do komórek K562 i HL60 pozostaje taki sam.

Analiza SAR bromopochodnej **1a** i jej analogu **1c**, zawierającego atom chloru wskazuje, że rodzaj atomu halogenu nie ma istotnego wpływu na właściwości cytotoksyczne wobec komórek HeLa i HL60, co potwierdzają zbliżone wartości IC₅₀ dla obu tych związków, natomiast ma istotny wpływ na toksyczność wobec komórek K562 (obecność chloru znosi cytotoksyczność).

Podsumowując, w wyniku przeprowadzonej syntezy i wstępnych badań wyselekcjonowałam aktywne halogenopochodne benzofuranów, wykazujące cytotoksyczne właściwości wobec komórek nowotworowych. Co istotne, związki te były bezpieczne wobec prawidłowych komórek. Wstępne badania mechanizmu działania wykazały, że halogenopochodne benzofuranów mogą indukować apoptozę, a niektóre z nich wchodziły w interakcję z DNA. Uzyskane dane wykazały, że zarówno charakter atomu halogenu, jak i jego położenie w strukturze pochodnych benzofuranu wpływają na aktywność i selektywność badanych związków w wybranych modelach komórkowych.

Rezultaty opisane w pracy **H3**, które wskazały na wysoki potencjał terapeutyczny halogenopochodnych wybranych benzofuranów, stanowiły bodziec do dalszych poszukiwań aktywnych związków w tej grupie pochodnych. Wyniki tych poszukiwań zaprezentowałam w 2019 roku na łamach czasopisma *Molecules* w publikacji **H4** z cyklu. W ramach tych badań, wyselekcjonowane w poprzednich pracach aktywne bromopochodne **8**, **1a**, **2a** (Rys. 4), zostały wskazane jako związki wiodące i stanowiły punkt wyjścia do dalszych poszukiwań. Na podstawie ich struktury zaprojektowałam syntezę nowej grupy pochodnych, której celem było uzyskanie serii związków o lepszej rozpuszczalności i biodostępności, co miało na celu zwiększenie ich potencjału terapeutycznego. Następnie, dla otrzymanych pochodnych zastosowałam podobny model badawczy jak dla związków wiodących, który obejmował między innymi testy cytotoksyczności wobec wybranych linii komórkowych, takich jak K562 i MOLT-4 (komórki ostrej białaczki limfoblastycznej), HeLa oraz prawidłowych komórek HUVEC, badania zdolności do indukcji apoptozy oraz interakcji z DNA. Synteza i badania

biologiczne były realizowane w ramach projektu naukowego NCN (UMO-2014/15/B/NZ7/00966, „Nowe leki przeciwbiałaczkowe - zaawansowane badania przedkliniczne”) we współpracy z Prof. Urszulą Wojdą z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie i Prof. Barbarą Nawrot z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi.



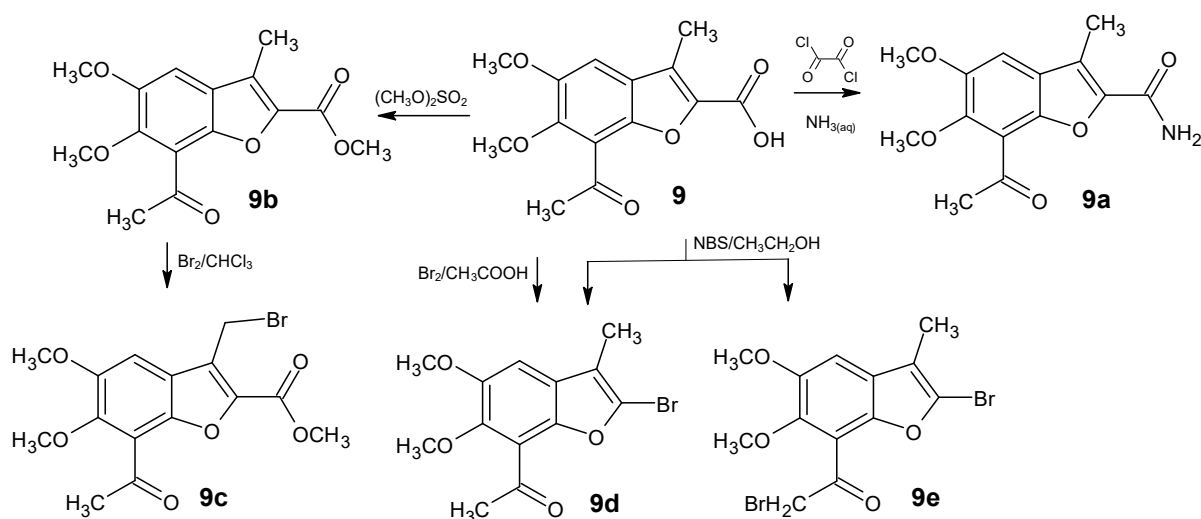
Rys. 4. Struktury związków wiodących **8**, **1a** i **2a**

W celu zwiększenie hydrofilowości pochodnych benzofuranu, przeprowadziłam wieloetapową i wielokierunkową syntezę obejmującą wprowadzenie grup funkcyjnych takich jak: amidowa, karboksylowa i hydroksylowa do struktury związków macierzystych **8**, **1a** i **2a**. Otrzymane związki poddawałam następnie reakcjom bromowania, prowadzonymi dwiema metodami, z użyciem bromu cząsteczkowego oraz NBS, przy czym warunki reakcji (rozpuszczalnik, temperatura, czas) były każdorazowo optymalizowane w zależności od substratu. Warto podkreślić, że reakcje bromowania otrzymanych benzofuranów okazały się procesami dosyć trudnymi, pracochłonnymi i złożonymi, co wynikało w dużej mierze z charakteru podstawników przyłączonych do układu benzofuranu.

Modyfikację struktury związku **8** rozpoczęłam od syntezy kwasu 7-acetylo-5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofurano-2-karboksylowego (**9**), który następnie przeprowadziłam w amid (**9a**), w reakcji z chlorkiem oksalilu i amoniakiem oraz w ester (**9b**) w reakcji z siarczanem dimetylu (**Rys. 4**). W dalszej kolejności zarówno kwas **9**, jak i jego pochodną estrową **9b**, poddałam reakcjom bromowania. W przypadku estru **9b**, bromowanie z użyciem bromu cząsteczkowego prowadzone w chloroformie umożliwiło otrzymanie planowanej pochodnej bromometylowej (**9c**), różniącej się od związku wiodącego **8** wyłącznie podstawnikiem w pozycji C2.

Bromowanie kwasu **9**, prowadzone w chloroformie z bromem cząsteczkowym oraz w CCl_4 z wykorzystaniem NBS, dawało mieszaniny poreakcyjne trudne do rozdzielenia. Wobec powyższego przeprowadziłam modyfikację warunków reakcji, wprowadzając rozpuszczalniki

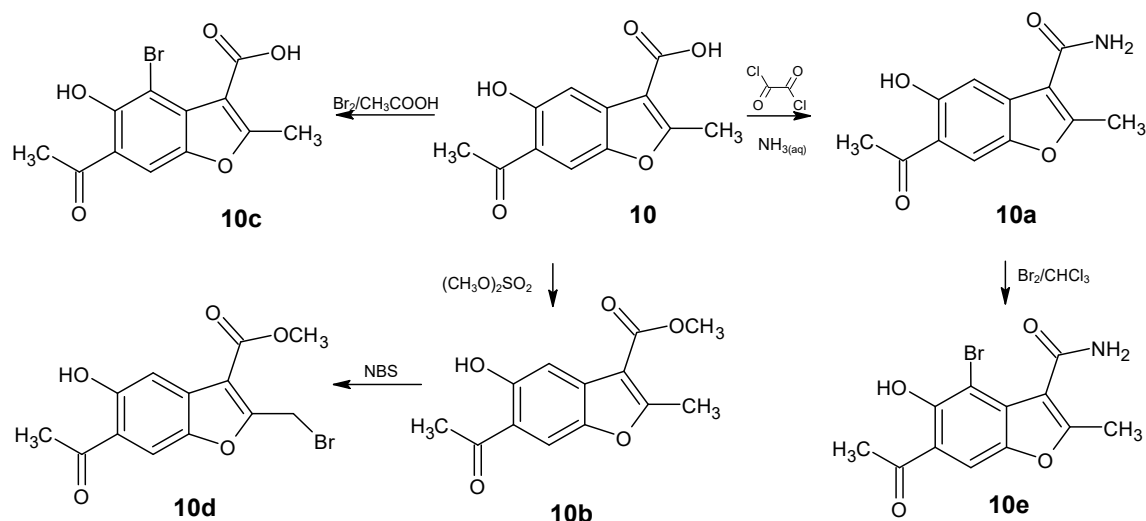
polarne protonowe – etanol w przypadku reakcji z NBS oraz kwas octowy dla bromu cząsteczkowego. W wyniku tych modyfikacji udało się wyizolować z satysfakcjonującą wydajnością pochodne **9d** i **9e** (Rys. 5). Analizy widm magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H NMR i ^{13}C NMR), widm masowych oraz analizy elementarnej wykazały, że struktury otrzymanych związków różniły się od zakładanych. Celem wstępnym przeprowadzonej syntezy było bowiem bromowanie grupy metylowej w pozycji C3 wyjściowego kwasu. Zamiast tego wyizolowałam pochodne, w których grupa karboksylowa została podstawiona atomem bromu w pozycji C2 układu furanowego (związki **9d** i **9e**). Tego typu transformacja może być tłumaczona wpływem warunków reakcji, w szczególności obecnością polarnych, proteolitycznych rozpuszczalników, które mogły sprzyjać reakcji dekarboksylacji użytego kwasu. Próby analogicznego bromowania amidowej pochodnej **9a**, pomimo wielokrotnych modyfikacji warunków, nie doprowadziły do otrzymania oczekiwanej bromopochodnej. Analiza teoretycznie obliczonych wartości logP wykazała, iż otrzymany kwas i amid (odpowiednio **9** i **9a**) wykazują niższą lipofilowość w porównaniu do związku wiodącego **8**. Z kolei pochodne estrowe (**9b**, **9c**) charakteryzują się wartościami logP zbliżonymi do pierwowzoru, natomiast obecność atomu bromu w pozycji C2 prowadzi do istotnego wzrostu hydrofobowości całego układu.



Rys. 5 Synteza analogów związku wiodącego **8**

W przypadku syntezy analogów związków **1a** i **2a**, substratem wyjściowym był kwas 6-acetylo-5-hydroksy-2-metylobenzofurano-3-karboksylowy (**10**) (Rys. 6). Związek ten, w warunkach analogicznych do opisanych powyżej, został przekształcony w pochodną amidową (**10a**) oraz estrową (**10b**). Następnie, wyjściowy kwas oraz jego amid poddałam reakcji z bromem

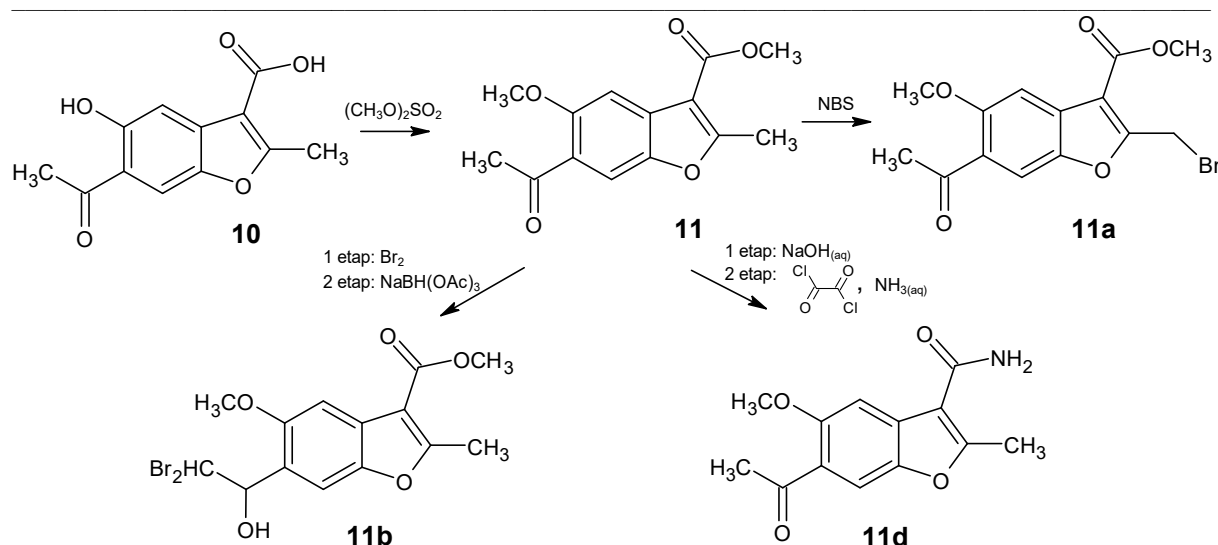
cząsteczkowym w kwasie octowym, otrzymując dla obu związków podstawienie elektrofilowe w pierścieniu benzenowym w pozycji C4 (**10c**, **10e**), ukierunkowane przez obecność elektronodonorowej grupy -OH obecnej w pozycji C5. Ester **10b** poddałam natomiast reakcji bromowania przy użyciu NBS w CCl₄, otrzymując założoną bromometylową pochodną **10d**.



Rys. 6 Synteza analogów związku wiodącego **1a**

W celu otrzymania analogów związku **2a**, wyjściowy kwas **10** poddałam metylacji z wykorzystaniem nadmiaru siarczanu dimetylu, otrzymując pochodną **11**. Następnie pochodną tę poddałam trzem różnym modyfikacjom strukturalnym (**Rys. 7**). W pierwszej, brom podstawiałam do grupy metylowej w reakcji z NBS w CCl₄, otrzymując związek **11a**. W drugiej, w reakcji związku **11** z bromem w kwasie octowym otrzymałam związek macierzysty **2a**, który następnie zredukowałam do pochodnej hydroksylowej **11b**. Trzeci wariant modyfikacji obejmował zasadową hydrolizę estru **11** do kwasu **11c**, a następnie jego amidację do związku **11d**.

Analiza obliczonych wartości logP wskazała, że wszystkie uzyskane pochodne kwasu wykazują niższą hydrofobowość w porównaniu ze związkami wiodącymi **1a** i **2a**, co koreluje z ich wyższą rozpuszczalnością w wodzie.



Rys. 7 Synteza analogów związku wiodącego **2a**

W kolejnym etapie badań postanowiłam odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób dokonane modyfikacje wpływają na aktywność cytotoksyczną i selektywność otrzymanych pochodnych. W tym celu czternaście nowych pochodnych benzofuranu przebadano pod kątem ich właściwości cytotoksycznych wobec linii komórkowych K562, MOLT-4, HeLa i prawidłowej linii komórek śródbłónka (HUVEC), z zastosowaniem metody MTT. Następnie dla najbardziej aktywnych związków sprawdzono ich zdolność do interkalacji z DNA i indukcji apoptozy.

Wstępne badania żywotności komórek nowotworowych, po 48-godzinnej inkubacji z danym związkiem w stężeniu $100\ \mu\text{M}$, pozwoliły wyselekcjonować pięć najaktywniejszych halogenopochodnych: **9c**, **9e**, **10d**, **11a** i **11b**. Związki podane w tym stężeniu obniżyły żywotność wszystkich badanych linii komórkowych o ponad 50%. Dalsze analizy oraz obliczone wartości IC_{50} wykazały, że wybrane pochodne były podobnie toksyczne zarówno dla komórek nowotworowych, jak i dla komórek prawidłowych, z wartościami IC_{50} w zakresie $20\text{--}85\ \mu\text{M}$. Wyjątek stanowiły związki **9c** i **11a**, dla których wartości IC_{50} znajdowały się poza tym zakresem (odpowiednio $180\ \mu\text{M}$ dla MOLT-4 i $6\ \mu\text{M}$ dla HUVEC).

Podsumowując, wybrane związki cechowały się słabszą bioaktywnością niż związki wyjściowe, jednocześnie nie wykazywały selektywności wobec komórek białaczkowych, a ponadto cechowały się znaczną toksycznością wobec prawidłowych komórek śródbłónka.

W kontekście wcześniejszych obserwacji dotyczących mechanizmu działania związków wiodących, przeprowadzono dalsze badania w celu ustalenia, czy cytotoksyczność wybranych pochodnych może być związana z ich interakcją z DNA. W tym celu przeanalizowano wpływ

testowanych benzofuranów na trawienie plazmidowego DNA (pcDNA3.1 HisC) przez endonukleazę BamHI. Wyniki wykazały, że inkubacja badanych związków z plazmidowym DNA hamowała jego rozszczepienie przez wybraną endonukleazę, co sugeruje, że benzofurany te mogą interkalować z DNA lub wiązać się z nim w inny sposób. Efekt ten był jednak znacznie słabszy w porównaniu z działaniem daunorubicyny, co wskazuje na ograniczoną zdolność badanych związków do interkalacji.

W kolejnych eksperymentach zbadano zdolność testowanych benzofuranów do indukcji apoptozy. W tym celu dla bromopochodnych **9c**, **9e**, **10d** i **11a**, wykazujących najwyższą toksyczność wobec komórek białaczkowych K562 (IC_{50} poniżej 50 μ M), oznaczono aktywność wykonawczych kaspaz 3 i 7. Uzyskane wyniki wykazały, że inkubacja komórek ze związkiem **9e** skutkowała blisko pięciokrotnym wzrostem aktywności kaspaz 3/7, podczas gdy związki **9c** i **10d** powodowały około dwukrotny wzrost aktywności. W przypadku związku **11a** aktywacja kaspaz była minimalna. Wyniki te sugerują, że cytotoksyczność wybranych benzofuranów **9c**, **9e** i **10d** w komórkach K562 może być związana z indukcją apoptozy.

Analiza zależności struktura–aktywność (SAR) ujawniła, że obecność atomu bromu jest ważnym, lecz niewystarczającym czynnikiem determinującym aktywność cytotoksyczną oraz selektywność pochodnych benzofuranu. Kluczowe znaczenie ma nie tylko sam obecny halogen, ale również jego lokalizacja w cząsteczce. Dla pochodnych **9c**, **10d** i **11a** obecność grupy bromometylowej przy pierścieniu furanowym wydaje się warunkować ich aktywność, natomiast w przypadku związku **9e** decydująca jest obecność podstawnika bromoacetylowego w pierścieniu benzenowym. Brak wyraźnej aktywności widoczny jest w przypadku pochodnych, w których atom bromu był obecny wyłącznie w jednym z pierścieni – furanowym (**10c**) lub benzenowym (**9d**, **10e**).

Związki nieposiadające atomu bromu, takie jak amidy (**9a**, **10a**, **11d**), estry (**9b**, **11**) oraz wolne kwasy karboksylowe (**9**, **10**, **11b**), nie wykazywały istotnej aktywności cytotoksycznej wobec badanych linii komórkowych.

Porównanie aktywnych pochodnych **10d** i **11a** ze związkami bazowymi **1a** i **2a** wykazało, że obecność grupy bromoacetylowej zwiększa toksyczność i selektywność względem analogów zawierających grupę bromometylową. Natomiast w przypadku pochodnej **9c** stwierdzono istotny spadek aktywności oraz selektywności względem związku wiodącego **8**, co może wynikać z zastąpienia grupy acetylowej w pozycji C2 pierścienia furanowego grupą estrową.

Redukcja grupy ketonowej w związku **2a** do hydroksylowej pochodnej (**11b**), również skutkowała obniżeniem selektywności, prawdopodobnie na skutek zwiększenia hydrofilowości oraz możliwości tworzenia dodatkowych wiązań wodorowych, co mogło wpłynąć na sposób oddziaływania cząsteczki z docelowymi strukturami komórkowymi.

Podsumowując, przeprowadzona synteza oraz analiza nowych pochodnych benzofuranu umożliwiła identyfikację związków o umiarkowanej aktywności biologicznej. Wstępne badania wskazują, że obecność halogenu w grupie alkilowej lub acylowej determinuje cytotoksyczność badanych pochodnych, natomiast ich selektywność zależna jest od rozmieszczenia i typu pozostałych podstawników w cząsteczce. Uzyskane wyniki sugerują, że mechanizm działania może obejmować indukcję apoptozy, a potencjalnym elementem mechanizmu molekularnego może być interakcja z DNA.

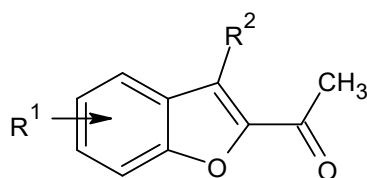
Wyniki badań dotyczące pochodnej 1,1'-[3-(bromometylo)-5,6-dimetoksy-1-benzofuran-2,7-diylo]dietanonu (związek **8**) oraz analiza wpływu modyfikacji strukturalnych na cytotoksyczność i selektywność jego pochodnych wskazują, że obecność grupy bromometylowej i grupy acetylowej w pozycjach C2 i C3 układu benzofuranowego, mogą odgrywać kluczową rolę w determinowaniu aktywności biologicznej oraz selektywności tych związków. W związku z tym zaprojektowałam kolejną serię pochodnych, które zachowują wskazane rozmieszczenie podstawników w pierścieniu furanowym, lecz różnią się rodzajem oraz pozycją grup obecnych w pierścieniu benzenowym. Celem tych modyfikacji było określenie wpływu zmian strukturalnych na aktywność i selektywność uzyskanych pochodnych, w porównaniu do związku wiodącego oraz sprawdzenie czy zachowanie pierwotnego układu grup bromometylowej i acetylowej jest czynnikiem kluczowym dla cytotoksyczności tych związków. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w pracy **H5** cyklu habilitacyjnego.

W pierwszym etapie badań, przeprowadzając reakcję chloroacetonu z wybraną pochodną o-hydroksyaceto-fenonu, otrzymałam wyjściowe benzofurany zawierające grupy alkoksylowe (-OCH₃ i -OCH₂CH₃) w ściśle określonych pozycjach pierścienia benzenowego. Rodzaj oraz rozmieszczenie podstawników wpływały istotnie na właściwości fizykochemiczne cząsteczek, w tym na ich objętość, lipofilowość oraz potencjalną aktywność biologiczną, dostarczając tym samym cennych danych dotyczących zależności typu struktura–aktywność (SAR).

W kolejnym etapie wyjściowe związki poddałam reakcjom bromowania z zastosowaniem NBS w czterochlorku węgla, w celu selektywnego wprowadzenia atomu bromu do grupy metylowej.

Dla wszystkich badanych związków udało się otrzymać planowane pochodne bromometylowe. Co istotne, w przypadku 1-(4,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2-yl)etanonu dodatkowo wyizolowałam produkt zawierający dwa atomy bromu: jeden podstawiony do grupy metylowej, a drugi zlokalizowany bezpośrednio w pierścieniu benzenowym (**Rys. 8**). Rezultat ten jest zapewne związany z obecnością elektronodonorowych grup -OCH₃ w pozycjach 4 i 6 układu benzofuranu, które ułatwiają elektrofilowe podstawienie w pierścieniu aromatycznym, szczególnie w zastosowanych warunkach reakcji.

Strukturę otrzymanych związków potwierdzono za pomocą spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H NMR, ¹³C NMR) oraz spektrometrii mas (MS).



Nr związku	R ¹	R ²
12 a	5 -OCH ₃	-CH ₃
12 b	4 -OCH ₃ ; 6 -OCH ₃	-CH ₃
12 c	4 -OCH ₂ CH ₃	-CH ₃
12 d	6 -OCH ₂ CH ₃	-CH ₃
12 e	5 -OCH ₃	-CH ₂ Br
12 f	4 -OCH ₃ ; 6 -OCH ₃	-CH ₂ Br
12 g	4 -OCH ₃ ; 5 -Br; 6 -OCH ₃	-CH ₂ Br
12 h	4 -OCH ₂ CH ₃	-CH ₂ Br
12 i	6 -OCH ₂ CH ₃	-CH ₂ Br

Rys. 8 Struktura nowych pochodnych 1-[3-(bromometylo)-1-benzofuran-2-yl]etan-1-onu

Dla otrzymanych pochodnych została przeprowadzona wstępna ocena ich cytotoksyczności. Dla najbardziej obiecujących związków zaplanowałam również rozszerzoną analizę ich aktywności biologicznej, obejmującą: test żywotności komórek metodą wybarwiania trypan blue (TB), ocenę zdolności do generowania reaktywnych form tlenu (ROS), analizę wydzielania interleukiny 6 (IL-6) oraz badanie aktywności proapoptotycznej. Ponadto

postanowiłam sprawdzić potencjalną aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych związków, wykorzystując szczepy bakteryjne zarówno standardowe, jak i kliniczne.

Badania cytotoksyczności otrzymanych związków (**12a-12i**) przeprowadzono na czterech liniach komórek nowotworowych. Ze względu na wcześniejsze wyniki wskazujące na wysoką wrażliwość komórek przewlekłej białaczki szpikowej (K562) na halogenopochodne, badania obejmowały tę linię oraz dodatkowo ludzkie komórki raka prostaty (PC3), raka jelita grubego (SW620) i raka nerkowokomórkowego (Caki-1). Jako kontrolę wykorzystano prawidłowe ludzkie keratynocyty (HaCaT). Ocenę cytotoksyczności przeprowadzono metodą przesiewową MTT dla wszystkich otrzymanych pochodnych, zarówno wyjściowych benzofuranów, jak i ich bromopochodnych. W celu określenia profilu bezpieczeństwa badanych związków obliczono ich indeks selektywności (SI), będący stosunkiem wartości IC_{50} uzyskanych dla komórek HaCaT do wartości IC_{50} dla komórek nowotworowych K562. Jako leki referencyjne wykorzystano doksorubicynę oraz bortezomib, które są szeroko stosowane w terapiach przeciwnowotworowych, m.in. w leczeniu ostrej białaczki szpikowej [88-90].

Porównanie wartości IC_{50} dla wyjściowych benzofuranów i ich halogenopochodnych jednoznacznie wykazało, że wprowadzenie atomu bromu do podstawnika metylowego zwiększyło cytotoksyczność badanych związków zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i zdrowych. Wyjątek stanowiły komórki linii Caki-1, które okazały się niewrażliwe na wszystkie badane pochodne ($IC_{50} > 100 \mu M$). Wyjściowe benzofurany (**12a-12d**) wykazywały niższą toksyczność wobec komórek HaCaT (IC_{50} w zakresie 50–100 μM) w porównaniu do ich bromopochodnych (**12e-12i**) (IC_{50} w zakresie 5–24 μM). Niemniej jednak, nie stwierdzono dla nich znaczącej aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych.

Analiza wartości IC_{50} dla halogenopochodnych wykazała istotny wpływ rodzaju i położenia podstawników w pierścieniu benzenowym na selektywność badanych związków. Związek **12e**, zawierający grupę $-OCH_3$ w pozycji C5 pierścienia benzenowego, wykazywał wysoką toksyczność zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i zdrowych (IC_{50} w zakresie 10-18 μM). Natomiast związek **12f**, posiadający dwie grupy $-OCH_3$ w pozycjach 4 i 6, wykazywał większą selektywność wobec komórek nowotworowych, charakteryzując się silnym działaniem toksycznym wobec K562 ($IC_{50} = 3,83 \pm 0,6 \mu M$) oraz umiarkowaną toksycznością względem HaCaT ($IC_{50} = 12,44 \pm 1,27 \mu M$), co przełożyło się na korzystny indeks selektywności $SI = 3,248$.

Związek **12g**, zawierający dodatkowy atom bromu w pozycji 5 pierścienia aromatycznego w porównaniu do związku **12f**, wykazał istotnie mniejszą cytotoksyczność wobec komórek

nowotworowych (IC_{50} w zakresie 40-50 μM), i jednocześnie większą toksyczność wobec komórek HaCaT ($5.69 \pm 5.67 \mu M$). Związek **12h** natomiast, z podstawnikiem $-OCH_2CH_3$ w pozycji 4 pierścienia benzenowego, podobnie jak związek **12f**, wykazywał wysoką selektywność wobec komórek K562 ($IC_{50} = 2,59 \pm 0,88 \mu M$), przy umiarkowanej toksyczności względem HaCaT ($IC_{50} = 23,57 \pm 10,7 \mu M$), co skutkowało najwyższą wartością indeksu selektywności $SI = 9,100$. Zmiana położenia grupy etoksyłowej do pozycji C6 w strukturze związku **12i** skutkowała obniżeniem jego aktywności cytotoksycznej wobec komórek nowotworowych, przy jednoczesnym zwiększeniu cytotoksyczności względem komórek prawidłowych w porównaniu z analogiem **12h**. Analiza aktywności wszystkich otrzymanych pochodnych wykazała, że charakteryzowały się one niższą cytotoksycznością wobec linii komórkowej K562, niż związki referencyjne zastosowane w badaniu.

Podsumowując, halogenopochodne benzofuranów wykazywały wysoką cytotoksyczność zarówno wobec komórek nowotworowych, jak i zdrowych. Jednak analiza uzyskanych wyników pozwoliła na wyselekcjonowanie dwóch najbardziej obiecujących związków – metoksyłowej pochodnej **12f** i pochodnej etoksyłowej **12h** – do dalszych badań nad mechanizmami ich cytotoksyczności. Pochodne te charakteryzowały się najwyższą cytotoksycznością względem komórek K562 oraz korzystnymi wartościami indeksu selektywności, co sugeruje ich potencjalne zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej.

Test MTT ocenia aktywność enzymów mitochondrialnych, ale nie pozwala na określenie całkowitej liczby komórek. Dlatego w kolejnym etapie przeprowadzono test trypan blue (TB) na komórkach K562 i HaCaT, analizując zarówno ich liczbę, jak i żywotność po ekspozycji na związki **12f** i **12h** w stężeniach IC_{50} . Wyniki wykazały, że żaden z badanych związków nie wpływał istotnie na żywotność komórek K562. Związek **12h** nie wykazywał działania przeciwproliferacyjnego, podczas gdy **12f** zmniejszał liczbę komórek nowotworowych o 13%, co może wynikać z jego większej lipofilowości i lepszego transportu przez błony komórkowe. W komórkach HaCaT oba związki wykazywały niską cytotoksyczność, jednak zmiany nie były istotne statystycznie (żywotność $>80\%$). Większa wrażliwość komórek HaCaT może wynikać z ich mniejszej zdolności adaptacyjnej w porównaniu z nowotworowymi K562, które posiadają rozwinięte mechanizmy obronne.

Weześniejsze badania wykazały, że związek wiodący 1,1'-[3-(bromometylo)-5,6-dimetoksy-1-benzofuran-2,7-dylo]dietanon może indukować apoptozę w komórkach białaczkowych. W związku z tym postanowiono ocenić potencjał proapoptotyczny wyselekcjonowanych związków **12f** i **12h**. W tym celu przeanalizowano dystrybucję fosfatydyloseryny (PS) na powierzchni komórek K562, wykorzystując test Annexin V-FITC oraz cytometrię

przepływową. Wyniki wykazały, że związki **12f** i **12h** indukowały wczesną, jak i późną apoptozę, odpowiednio w 22% i 60% komórek K562. Wyraźniejszy sygnał aneksyny po traktowaniu związkiem **12h** sugeruje, że indukcja apoptozy w tych komórkach jest silniejsza, niż w przypadku **12f**. Etoksylova pochodna **12h** wykazywała również wyższą cytotoksyczność w teście MTT, co wskazuje na potencjalnie silniejszy wpływ jej na metabolizm mitochondrialny lub potencjalne uszkodzenie funkcji mitochondriów. Jednak analiza aktywności kaspaz 3/7 wykazała, że pochodna metoksylova **12f** była silniejszym aktywatorem tych enzymów – powodowała ponad dwukrotny wzrost aktywności kaspaz, podczas gdy **12h** zwiększał ich aktywność tylko o 13%. Może to sugerować, że obie pochodne inicjują apoptozę różnymi szlakami – etoksylova **12h** poprzez intensywniejsze zmiany w strukturze błony komórkowej, a metoksylova **12f** przez silniejszą aktywację kaspaz.

Jak wcześniej wspominałam, aktywność przeciwnowotworowa benzofuranów może zachodzić na drodze różnych mechanizmów, w tym poprzez indukcję stresu oksydacyjnego oraz zmniejszenie potencjału błony mitochondrialnej [40, 41]. Wyniki licznych badań sugerują, że reaktywne formy tlenu (ROS) pełnią w komórkach nowotworowych rolę "miecza obosiecznego". W niskich lub umiarkowanych stężeniach działają jako przekaźniki sygnałowe, stymulując proliferację komórek rakowych, ich migrację, inwazję, angiogenezę oraz oporność na leki. Natomiast wysoki poziom ROS może zaburzać homeostazę, strukturę i funkcje komórek nowotworowych, prowadząc ostatecznie do ich śmierci [91-94]. Przypuszcza się zatem, że komórki rakowe wymagają precyzyjnej równowagi w metabolizmie ROS, co sprawia, że terapie indukujące stres oksydacyjny stanowią obiecujący kierunek w poszukiwaniu skutecznych metod leczenia nowotworów [95].

Dane literaturowe wskazują, na to że pochodne benzofuranów mogą indukować stres oksydacyjny w różnych rodzajach linii komórkowych, takich jak chrząstniakomięsak JJ012 i SW1353 [96], komórki raka żołądka AGS i SNU-1 [34] oraz komórki płuc A549 i PC9 [97]. Mając na uwadze te doniesienia, postanowiłam zbadać, czy wybrane pochodne wykazują aktywność prooksydacyjną w najbardziej wrażliwej na te związki linii komórkowej K562. W celu oceny poziomu ROS zastosowano metodę opartą na zależnym od stężenia ROS powstawaniu fluorescencyjnych znaczników: rodaminy 123 (GHR123) oraz dichlorofluoresceiny (DCF-DA), po traktowaniu badanymi związkami w stężeniach równych IC_{50} .

Dla obu badanych pochodnych zaobserwowano podwyższony poziom ROS, przy czym wykazywały one różnice w potencjale oksydacyjnym. Metoksylova pochodna **12f** wykazywała silniejsze działanie prooksydacyjne w komórkach K562 w porównaniu do etoksylowej

pochodnej **12h**, indukując dwukrotny wzrost intensywności fluorescencji w stosunku do komórek kontrolnych.

Innym potencjalnym celem molekularnym dla środków przeciwnowotworowych jest obniżenie poziomu interleukiny-6 (IL-6), cytokiny o plejotropowym działaniu, biorącej udział w regulacji stanu zapalnego, odpowiedzi immunologicznej i hematopoezy [98, 99]. IL-6 jest syntetyzowana we wczesnych fazach odpowiedzi zapalnej; co istotne, jej wysoki poziom wykazano w tkankach nowotworowych, takich jak rak okrężnicy, rak piersi, rak jajnika oraz rak prostaty. Ponadto, ostatnie badania potwierdziły obecność IL-6 w osoczu oraz mikrośrodowisku nowotworowym pacjentów z przewlekłą i ostrą białaczką limfatyczną [100-103]. Wysoki poziom IL-6 we krwi osób chorych na raka wiąże się z gorszym rokowaniem rozwoju choroby i szansami na przeżycie chorego. Im niższe stężenie tej interleukiny u pacjentów leczonych cytostatykami, tym lepsza odpowiedź na zastosowaną terapię przeciwnowotworową.

Biorąc powyższe pod uwagę, przeprowadzono analizę wpływu badanych pochodnych na wydzielanie IL-6 przez komórki K562. Uzyskane wyniki wykazały, że oba związki znacząco obniżyły poziom IL-6 w badanym medium hodowlanym. Silniejszy efekt zaobserwowano po traktowaniu związkiem **12f**, który zmniejszył poziom IL-6 o 50%, podczas gdy związek **12h** obniżył go o 40%. Otrzymane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje dotyczące właściwości biologicznych testowanych pochodnych. Wykazaliśmy, że związek **12f** wykazuje silniejsze działanie prooksydacyjne w komórkach K562, co może przyczyniać się do redukcji poziomu IL-6.

Ostatnim etapem prac było określenie wstępnego profilu aktywności przeciwdrobnoustrojowej otrzymanych związków. Wszystkie uzyskane pochodne zostały przetestowane *in vitro* na wybranych szczepach bakterii, w tym na reprezentatywnych, standardowych pałeczkach bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Spośród przetestowanych pochodnych, tylko związek **12g** wykazał umiarkowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową w stosunku do szczepów Gram-dodatnich, z wartościami MIC w zakresie od 16 do 64 µg/ml. Należy podkreślić, że aktywność tej pochodnej wydaje się być determinowana obecnością atomu bromu w pierścieniu benzenowym. Jednakże w badaniach przeprowadzonych na szczepach klinicznych, testowana pochodna nie wykazała aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Podsumowując, przeprowadzone badania pozwoliły mi na wyłonienie dwóch aktywnych związków o wysokiej cytotoksyczności wobec komórek K562. Co istotne, oba związki

wykazywały niższą toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych (HaCaT), co przełożyło się na korzystny indeks selektywności. Wstępne badania mechanizmu ich działania wykazały, że związki te indukują apoptozę komórek nowotworowych poprzez aktywację kaspaz 3/7. Ponadto, wyniki badań sugerują, że ich potencjał przeciwnowotworowy może być powiązany ze zwiększoną produkcją ROS (nadtlenku wodoru) oraz hamowaniem wydzielania interleukiny-6 (IL-6). Z kolei badania mikrobiologiczne wykazały brak lub jedynie słabą aktywność przeciwdrobnoustrojową testowanych pochodnych. Zaobserwowane różnice w aktywności benzofuranów i ich bromopochodnych potwierdziły moje wcześniejsze przypuszczenia, że obecność określonych podstawników, takich jak grupy bromometylowe i acetylowe, może determinować cytotoksyczność uzyskanych związków. Jednocześnie nawet niewielkie zmiany w strukturze chemicznej, zwłaszcza w obrębie pierścienia benzenowego, mogą wpływać na selektywność działania tych pochodnych.

Kontynuując prace nad halogenopochodnymi benzofuranów, postanowiłam poszerzyć badania dla bromopochodnej: 4-bromo-6-(dibromoacetylo)-5-hydroksy-2-metyl-1-benzofurano-3-karboksylationu metylu (związek wiodący **1a**, **Rys. 4**). Impulsem do tych działań były wyniki badań przedstawione w wymienionych powyżej dwóch pracach z cyklu habilitacyjnego **H3** i **H4**, a także rezultaty badań prowadzonych we współpracy z Profesorem Barbarą Nawrot i jej zespołem [104]. Wyniki wspomnianych badań pokazały, że związek ten wykazuje wysoką cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych białaczki (K562, HL-60) oraz raka szyjki macicy (HeLa) (IC_{50} 1–5 μ M), przy jednoczesnej marginalnej toksyczności wobec komórek MOLT-4 (ostra białaczka limfoblastyczna) oraz ludzkich komórek raka trzustki (CFPAC). Co istotne, wcześniejsze badania wykazały brak cytotoksyczności tej pochodnej wobec prawidłowych komórek HUVEC. Badania mechanizmu cytotoksyczności ujawniły, że pochodna ta indukuje apoptozę w komórkach białaczkowych poprzez aktywację zarówno receptorów, jak i szlaków mitochondrialnych. Wykorzystując biotynylowaną pochodną, zidentyfikowano tubulinę jako cel molekularny badanego związku.

Bazując na obiecujących wynikach badań *in vitro* dla tego związku w komórkach przewlekłej białaczki szpikowej (CML), we współpracy z Profesorem Ursulą Wojdą z Instytutu Nenckiego w Warszawie, zaplanowaliśmy ocenę potencjału przeciwnowotworowego tego związku *in vivo*, wykorzystując myszy z ksenoprzeszczepem CML. Dodatkowo zaplanowałam wielomodelowe badanie obejmujące analizę wpływu tej pochodnej na żywotność komórek, cykl komórkowy, indukcję apoptozy, poziom IL-6 oraz produkcję ROS, w panelu siedmiu ludzkich linii komórek nowotworowych, w tym komórek raka okrężnicy (pierwotne HCT116, SW480 i przerzutowe

SW620), prostaty (PC3), wątroby (HEPG2), płuc (A549) oraz raka piersi (MDA-MB-231). Badania te zostały przeprowadzone w naszym zespole w Katedrze i Zakładzie Biochemii WUM.

Aby zweryfikować, czy obserwowana cytotoksyczność *in vitro* przełoży się na warunki *in vivo*, w pierwszej kolejności oceniono skuteczność związku **1a** przeciwko komórkom K562 (CML) w mysim modelu ksenogenicznym. Ustalono, że pochodna ta jest stabilna w nietoksycznych układach rozpuszczalnikowych, takich jak 10% Solutol HS, 15% lub 10% etanol w wodzie oraz 0,9% NaCl. Optymalną drogą podania okazało się wstrzyknięcie dootrzewnowe w dawce 5 mg/kg, gdyż wyższe dawki (10 i 20 mg/kg) oraz podanie dożylnie, powodowały stan zapalny i objawy toksyczności. W celu oceny skuteczności przeciwnowotworowej, żywotne komórki K562 wprowadzono do myszy NSG. Jako kontrole pozytywne zastosowano imatynib oraz hydroksymocznik – standardowe leki stosowane w leczeniu CML.

Analiza wyników wykazała, że myszy poddane terapii związkiem **1a** oraz lekami referencyjnymi nie wykazywały zmian w morfologii ani masie narządów wewnętrznych, takich jak wątroba, śledziona, nerki, płuca czy serce. Parametry hematologiczne pozostały w zakresie normy, z wyjątkiem niewielkiego wzrostu liczby monocytów i limfocytów, co mogło wynikać z inokulacji komórkami K562 – efekt ten zaobserwowano także w grupie kontrolnej z guzem. We wszystkich grupach leczenie prowadziło do istotnego zmniejszenia masy guza, porównywalnego do działania imatynibu i hydroksymocznika. Istotnym aspektem była stabilność masy ciała zwierząt, co sugerowało niską toksyczność badanej pochodnej. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami *in vitro*, które wskazują, że związek **1a** wykazuje wysoką cytotoksyczność wobec komórek białaczkowych, jednocześnie oszczędzając zdrowe tkanki [104, 105].

W dalszych badaniach, aktywność cytotoksyczną badanego związku oceniono analogicznie do wcześniejszych eksperymentów, wykorzystując test MTT i wyrażając wyniki jako wartość IC_{50} . Jako leki wzorcowe zastosowano doksorubicynę (DOX) i cisplatynę (CP). Wyniki analiz wykazały, że związek **1a** wykazuje wysoki potencjał przeciwnowotworowy wobec większości badanych linii komórkowych, w niskim zakresie stężeń mikromolowych ($IC_{50} = 1,0\text{--}4,5\ \mu\text{M}$), z wyjątkiem komórek A549 i PC3. Szczególną wrażliwość na jego działanie zaobserwowano w liniach HepG2 i MDA-MB-231, dla których wartości IC_{50} wynosiły odpowiednio $1,0 \pm 0,1\ \mu\text{M}$ oraz $1,1 \pm 0,1\ \mu\text{M}$. Wśród badanych ludzkich linii raka jelita grubego, linia przerzutowa SW620 wykazywała większą wrażliwość na działanie tej pochodnej ($IC_{50} = 1,2 \pm 0,1\ \mu\text{M}$), niż

linie pierwotne SW480 i HCT-116 ($IC_{50} = 4,5 \mu M$). Porównując działanie badanego związku z lekami referencyjnymi, stwierdzono, że był on mniej cytotoksyczny niż doksorubicyna, ale wykazywał wyższą aktywność niż cisplatyna wobec komórek SW480, SW620, HepG2 oraz MDA-MB-231. Warto również podkreślić, że w świetle wcześniejszych badań, które wykazały brak cytotoksyczności związku **1a** wobec prawidłowych komórek HUVEC, jego selektywność wobec większości testowanych linii komórkowych (z wyjątkiem PC3 i A549) była wyższa niż w przypadku doksorubicyny i cisplatyny. Uzyskane wyniki cytotoksyczności potwierdzono za pomocą testu żywotności z użyciem błękitu trypanu (TB). Analiza wykazała, że związek **1a** znacząco hamował proliferację i zmniejszał żywotność wszystkich badanych linii komórkowych, przy czym najsilniejszy efekt zaobserwowano w komórkach HepG2 i HCT-116.

Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań nad mechanizmami działania cytotoksycznego wytypowano najbardziej wrażliwe na działanie związków linie komórkowe SW480, SW620, HCT-116, HepG2 oraz MDA-MB-231, dla których wartości IC_{50} były niższe niż $5 \mu M$.

Indukcję apoptozy i/lub nekrozy w wybranych liniach komórkowych oceniono przy użyciu analizy cytometrii przepływowej. Wyniki wykazały, że odsetek komórek we wczesnej i/lub późnej fazie apoptozy bądź nekrozy był istotnie wyższy we wszystkich liniach nowotworowych traktowanych związkiem **1a**, w porównaniu z grupą kontrolną. Najwyższy odsetek apoptotycznych komórek stwierdzono w liniach SW480 i MDA-MB-231.

W kolejnym etapie zbadano udział kaspaz wykonawczych 3/7 w procesie apoptozy, stosując test Caspase-Glo 3/7. Analiza wykazała, że badana pochodna benzofuranu istotnie zwiększała aktywność kaspaz 3/7 w komórkach SW620, HepG2 i MDA-MB-231, co wskazuje na mechanizm apoptozy zależnej od kaspaz. Odkrycie to jest zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że związek **1a** indukuje zarówno wczesną, jak i późną apoptozę w komórkach K562 [104]. Proces ten został poprzednio potwierdzony przez zwiększoną aktywność kaspaz efektorowych 3 i 7 wraz z kaspazami inicjującymi 8 i 9, co sugerowało, że pochodna ta indukuje apoptozę poprzez aktywację zarówno zewnątrzpochodnego szlaku zależnego od „receptorów śmierci”, jak i wewnątrzpochodnego szlaku mitochondrialnego.

Co istotne, chociaż komórki apoptotyczne wykryto również w liniach SW480 i HCT-116 traktowanych badaniem związkiem, aktywność kaspaz 3/7 nie uległa w nich istotnej zmianie w porównaniu z kontrolą. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na różnice w czasie aktywacji kaspaz 3/7, zależnych od typu komórki i rodzaju bodźca. Alternatywnie, badana pochodna

benzofuranu może indukować apoptozę w komórkach SW480 i HCT-116 w sposób niezależny od kaspaz.

Ponieważ aktywacja apoptozy często koreluje ze zmianami w dystrybucji cyklu komórkowego, oceniono wpływ związku **1a** na progresję cyklu komórkowego w stężeniu równym IC_{50} . Regulacja progresji cyklu komórkowego jest kluczowa dla utrzymania homeostazy w prawidłowych komórkach [33, 106], dlatego zatrzymanie cyklu komórkowego w komórkach nowotworowych stanowi obiecującą strategię w opracowywaniu leków przeciwnowotworowych [37, 107]. Analiza wyników dla komórek SW480, HCT-116 i MDA-MB-231 wykazała, że związek **1a** znacząco zwiększył populację komórek w fazie sub-G1. W przypadku komórek SW620, inkubacja z badanym związkiem spowodowała znaczny wzrost populacji komórek w fazach sub-G1 oraz G2/M. Natomiast ekspozycja komórek HepG2 na badany związek doprowadziła do najwyższego procentowego wzrostu komórek w fazie G2/M. Zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M można wytłumaczyć zdolnością związku **1a** do silnego hamowania polimeryzacji tubulin. Ten mechanizm działania został zaobserwowany w badaniu przeprowadzonym przez Królewską i współpracowników [104], które wykazało, że związek ten, podobnie jak winblastyna, jest silnym inhibitorem polimeryzacji tubuliny w komórkach K562. Ponadto, badania dokowania opisane w tej pracy wykazały, że związek **1a** prawidłowo mieści się w kieszeni wiążącej kolchicynę w β -tubulinie. Mikrotubule (MT) odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu i utrzymaniu struktury komórki, w podziale komórki, transporcie oraz transdukcji sygnałów. Z tego względu stanowią ważny cel dla leków przeciwnowotworowych. W normalnych warunkach istnieje równowaga między polimeryzacją a depolimeryzacją mikrotubul [47]. Zakłócenie tej równowagi upośledza formowanie wrzeciona mitotycznego, co jest uważane za kluczowe dla prawidłowego przebiegu mitozy. Komórki pozostają wtedy zablokowane w fazie mitotycznej, co prowadzi do zahamowania proliferacji, a nawet zaprogramowanej śmierci komórki [48]. W związku z tym, można wnioskować, że testowana pochodna hamuje polimeryzację tubuliny w badanych liniach komórkowych, co prowadzi do zakłócenia tworzenia wrzeciona mitotycznego, zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G2/M oraz apoptozy, objawiającej się zwiększoną populacją komórek w fazie sub-G1.

Aby wyjaśnić potencjalny mechanizm cytotoksyczności związku **1a**, oceniono jego wpływ na produkcję wolnych rodników tlenowych. Analiza wykazała, że indukcja ROS była zależna od linii komórkowej – największy wzrost ich produkcji odnotowano w komórkach HepG2 i HCT-

116, podczas gdy w komórkach MDA-MB-231 obserwowano umiarkowane zwiększenie syntezy. W liniach SW480 i SW620 poziom ROS nie różnił się istotnie od kontroli.

Jedną z konsekwencji uszkodzenia komórek wynikającego ze zwiększonego poziomu ROS jest peroksydacja lipidów wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Proces ten generuje wysoce reaktywne aldehydy, które dzięki swojej polarności mogą swobodnie przemieszczać się w obrębie komórki, a nawet międzykomórkowo, tworząc kowalencyjne modyfikacje odległych biomolekuł [108-110]. Udowodniono, że te produkty peroksydacji lipidów mają działanie przeciwnowotworowe, a także nasilają cytotoksyczność leków przeciwnowotworowych i radioterapii [110]. Zgodnie z tymi danymi zbadano, czy poziom TBARS (thiobarbituric acid reactive substances, substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym) będzie podwyższony w liniach komórkowych ze zwiększonym poziomem ROS. Produkty peroksydacji lipidów mierzono za pomocą testu kwasu tiobarbiturowego (TBA). Wyniki wykazały, że zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu wiązała się ze wzrostem poziomu TBARS, przy czym najwyższy poziom produktów utleniania lipidów zaobserwowano w komórkach HepG2. Tymczasem linie HCT-116 i MDA-MB-231 były bardziej odporne na działanie ROS. Wydaje się, że wytwarzanie ROS przez pochodną **1a** może być jednym z mechanizmów cytotoksyczności w komórkach HepG2, HCT-116 i MDA-MB-231, prowadzącym do apoptozy lub nekrozy tych komórek.

Wyniki analizy wpływu pochodnej **1a** na produkcję IL-6 wykazały jej hamujące działanie w komórkach HepG2 i MDA-MB-231, podczas gdy w liniach SW480 i SW620 poziom IL-6 pozostawał niezmienny. Wydaje się, że wpływ pochodnej benzofuranu na poziom IL-6 jest specyficzny dla danej linii komórkowej. Ponadto mechanizm cytotoksyczności może być różny w pierwotnym i przerzutowym raku jelita grubego.

Podsumowując, wyniki te podkreślają potencjał pochodnej **1a** jako obiecującego środka przeciwnowotworowego, którego skuteczność została potwierdzona zarówno w mysim modelu przewlekłej białaczki szpikowej *in vivo*, jak i w badaniach *in vitro* na liniach komórkowych nowotworów. W badaniach *in vitro* na panelu siedmiu ludzkich linii komórkowych nowotworów, związek wykazał działanie cytotoksyczne wobec pięciu z nich: SW480, SW620, HCT-116, MDA-MB-231 i HepG2. Szczególnie warto podkreślić jego skuteczność w stosunku do komórek MDA-MB-231, reprezentujących agresywną, inwazyjną formę potrójnie ujemnego raka piersi. Badany związek podnosił poziom ROS, hamował uwalnianie IL-6 i indukował apoptozę, co czyni go interesującym obiektem dalszych badań w onkologii eksperymentalnej.

Zainspirowana powyższymi wynikami, postanowiłam przeprowadzić multimodelowe badania również dla dwóch kolejnych halogenopochodnych 6-acetylo-5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylanu metylu: **2a** (bromopochodnej) i **1c** (chloropochodnej) (**Rys. 1**). Związki te, zidentyfikowane we wcześniejszych badaniach, wykazywały wysoką toksyczność wobec ludzkich komórek białaczkowych (K562 i HL60) oraz raka szyjki macicy (HeLa), przy jednoczesnym braku toksyczności w stosunku do pierwotnych komórek śródbłónka [105]. Zastosowałam podobny model badań jak dla pochodnej **1a**, obejmujący analizę cytotoksyczności w siedmiu liniach komórek nowotworowych: SW480, SW620, HCT-116, HepG2, PC3, A549 i MDA. Następnie, aby wyjaśnić mechanizm bioaktywności, oceniono wpływ tych związków na żywotność komórek, progresję cyklu komórkowego, apoptozę, poziomy IL-6, produkcję ROS oraz polimeryzację tubulin. Wszystkie badania zostały przeprowadzone przez nasz zespół w Katedrze i Zakładzie Biochemii, a ich wyniki przedstawiłam w ostatniej pracy z cyklu habilitacyjnego **H7**.

Badane pochodne zsyntezowałam zgodnie z metodami opracowanymi i opisanymi przeze mnie w pracy **H1** [111]. Otrzymane widma spektralne ^1H , ^{13}C NMR i HRMS potwierdziły strukturę otrzymanych związków.

Analiza wyników testu MTT wykazała, że linie komórkowe HepG2 i A549 były najbardziej wrażliwe na działanie związku **2a**, z wartościami IC_{50} wynoszącymi odpowiednio $3,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$ oraz $3,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$. Związek **1c** natomiast wykazał najwyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek A549 ($\text{IC}_{50} = 6,3 \pm 2,5 \mu\text{M}$). W porównaniu z wynikami uzyskanymi dla bromopochodnej **1a**, opisywanej wcześniej, dane te wyraźnie wskazują, że na aktywność związku wpływa rodzaj halogenu wprowadzonego do struktury benzofuranu. Podstawienie atomu chloru zamiast bromu w tych samych pozycjach układu benzofuranu znacząco obniżyło cytotoksyczność związku **1c** wobec większości badanych linii komórek nowotworowych, z wyjątkiem linii PC3, w porównaniu do związku **1a**. Jednak chloropochodna **1c** wykazała wyższą selektywność i cytotoksyczność wobec A549 w porównaniu z bromowanym odpowiednikiem. Może to wynikać z różnic w elektroujemności, rozmiarach promieni atomowych oraz polarności badanych cząsteczek. Porównanie cytotoksyczności badanych związków z lekami referencyjnymi, doksorubicyną i cisplatyną, wykazało, że były one mniej toksyczne niż doksorubicyna we wszystkich testowanych liniach komórkowych. Jednak wobec A549 oba związki przewyższały cytotoksycznością cisplatynę, a **2a** wykazywał także większą aktywność wobec komórek HepG2. Co istotne, wskaźnik selektywności dla badanych

pochodnych był wyższy niż dla leków referencyjnych. Na podstawie uzyskanych wyników, do dalszych badań nad mechanizmem działania tych pochodnych, wybrałam dwie linie komórkowe – A549 oraz HepG2, które okazały się najbardziej wrażliwe na testowane związki.

W pierwszym etapie badań, uzyskane wyniki cytotoksyczności potwierdzono za pomocą testu żywotności TB. Analiza otrzymanych danych wskazuje na cytotoksyczne działanie związku **2a**, ponieważ, znacząco zmniejszał on żywotność, jak i liczbę komórek. Związek **1c** natomiast silnie redukował liczbę komórek, mając jednocześnie minimalny wpływ na ich żywotność, co sugeruje jego cytostatyczne właściwości.

W drugim etapie badań oceniono zdolność związków do indukcji apoptozy i nekrozy za pomocą analizy cytometrii przepływowej, a wyniki skorelowano z wpływem związków na aktywność kaspaz 3/7. Uzyskane dane wykazały, że bromopochodna **2a** znacząco indukowała późną apoptozę i nekrozę w komórkach HepG2 i A549, ale bez istotnego wzrostu aktywności kaspaz 3/7, co sugeruje działanie poprzez szlak niezależny od kaspaz. Z kolei chloropochodna **1c** wykazywała podobne efekty proapoptotyczne, ale z wyraźnym wzrostem aktywności kaspaz, co wskazuje na ich kluczową rolę w tym procesie. W kolejnej fazie określono wpływ związków **2a** i **1c**, w stężeniach IC₅₀, na cykl komórkowy w testowanych liniach komórek nowotworowych. Analiza cyklu w komórkach HepG2 wykazała, że analizowane związki znacznie zwiększyły odsetek komórek w fazie G2/M. Natomiast ekspozycja komórek A549 na badane pochodne dała najwyższy procentowy wzrost komórek w fazie S/G2/M. Wyniki te, łącznie z opisywanymi wcześniej rezultatami, sugerują potencjalną rolę terapeutyczną pochodnych benzofuranu w modulowaniu dynamiki cyklu komórkowego w określonych typach nowotworów.

Analiza stresu oksydacyjnego wykazała, że obie badane pochodne zwiększały poziom reaktywnych form tlenu. Produkcja ROS zależała zarówno od rodzaju linii komórkowej, co potwierdzają również wyniki uzyskane dla pochodnej **1a**, jak i od rodzaju halogenu obecnego w strukturze związku. Wydaje się, że komórki HepG2 wykazują największą wrażliwość na uszkodzenia indukowane przez ROS, przy czym bromopochodna **2a** charakteryzowała się silniejszym działaniem prooksydacyjnym niż chloropochodna **1c**. Co więcej, wzrost wytwarzania ROS indukował odpowiedni wzrost tworzenia TBARS w obu badanych liniach komórek nowotworowych. Jednak stężenie TBARS było istotnie wyższe w komórkach HepG2 w porównaniu z komórkami A549, osiągając dziewięciokrotny wzrost dla związku **2a** i czterokrotny dla związku **1c**. W komórkach A549 poziom TBARS wzrósł odpowiednio dwukrotnie dla związku **2a** i 1,5-krotnie dla związku **1c**. Uzyskane wyniki sugerują, że

generowanie ROS przez badane związki w komórkach HepG2 może stanowić jeden z mechanizmów ich cytotoksycznego działania, potencjalnie prowadząc do indukcji apoptozy lub nekrozy.

W kolejnym kroku zbadano zdolność opisywanych pochodnych do hamowania wytwarzania IL-6. Wyniki pokazały, że największy hamujący wpływ badanych związków na produkcję IL-6 zaobserwowano w komórkach HepG2. Związek **2a** zmniejszył produkcję IL-6 o 87%, podczas gdy związek **1c** o 67% w porównaniu z kontrolą. Co ciekawe, związek **2a** nie wpływał na poziom IL-6 w liniach komórkowych A549, a wpływ związku **1c** był mniejszy niż w HepG2, przy 50% obniżeniu poziomu IL-6. Wyniki te sugerują, że wpływ badanych związków na produkcję IL-6 jest specyficzny w zależności od rodzaju komórek.

Na koniec oceniono wpływ związków na polimeryzację tubulin. Obie pochodne hamowały ten proces, lecz w mniejszym stopniu niż kolchicina, co sugeruje, że ich aktywność proapoptotyczna wynika z innych mechanizmów.

Podsumowując, wyniki opisanych badań wskazują na potencjał cytotoksyczny opisanych halogenopochodnych wobec komórek HepG2 i A549. Ocena właściwości biologicznych wykazała, że bromopochodna wydaje się być bardziej bioaktywna niż chloropochodna. Zwiększona efektywność działania tej pochodnej może także wynikać z obecności grupy metoksylowej w jej strukturze, która wpływa na polarność i jej biodostępność. Mechanizm aktywności biologicznej badanych związków opiera się na generowaniu ROS i indukcji stresu oksydacyjnego wyrażanego jako peroksydacja lipidów. W konsekwencji zaburzenia komórkowego układu antyoksydacyjnego, obserwowaliśmy śmierć komórek na szlaku późnej apoptozy i/lub nekrozy. Ponadto związki zmniejszały wydzielanie IL6 w komórkach i modulowały cykl komórkowy.

4.3.3. Najważniejsze osiągnięcia prowadzonych przeze mnie prac (wnioski)

1. Zaplanowanie i synteza serii pochodnych kwasu 2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowego, kwasu 5-hydroksy-2-metylo-1-benzofurano-3-karboksylowego i 1,1'-(5,6-dimetoksy-3-metylo-1-benzofuran-2,7-diyl)dietanonu o zróżnicowanej aktywności biologicznej, w zależności od charakteru podstawników w układzie benzofuranowym.
2. Wyselekcjonowanie, na podstawie analizy cytotoksyczności, związków wiodących o wysokim potencjale przeciwnowotworowym, szczególnie względem komórek białaczki,

jednocześnie wykazujących brak toksyczności względem komórek zdrowych. Część z tych związków została wytypowana do dalszych badań.

3. Zaplanowanie i synteza analogów związków wiodących o zwiększonej rozpuszczalności w wodzie oraz biodostępności, a także zróżnicowanej aktywności cytotoksycznej, zależnej od wprowadzonych modyfikacji strukturalnych.

4. Wykazanie, że podstawowym elementem strukturalnym, decydującym o aktywności biologicznej badanych benzofuranów, jest wprowadzenie atomu halogenu do podstawnika alkilowego i/lub acetylowego.

5. Udowodnienie, że komórki nowotworowe białaczki K562 wykazują największą wrażliwość na działanie halogenopochodnych benzofuranów, co sugeruje ich potencjalne zastosowanie w leczeniu tego typu nowotworu.

6. Identyfikacja potencjału cytotoksycznego wybranych halogenopochodnych benzofuranów wobec szerokiego panelu komórek nowotworowych. Najlepsze wyniki uzyskano w liniach komórkowych raka piersi oraz wątroby, co potwierdza ich szerokie spektrum działania.

7. Wykazanie, że cytotoksyczność związków aktywnych związana jest z indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych, zarówno na szlaku receptorowym, jak i mitochondrialnym.

8. Potwierdzenie, że właściwości proapoptyczne halogenopochodnych mogą być związane z ich zdolnością do zwiększania produkcji reaktywnych form tlenu i TBARS, hamowaniem uwalniania IL-6 i zdolnością do interakcji z DNA, przy czym efekty te zależne są od rodzaju linii komórkowej.

9. Udowodnienie skuteczności pochodnej **1a** jako środka przeciwnowotworowego zarówno w mysim modelu przewlekłej białaczki szpikowej *in vivo*, jak i w badaniach *in vitro* na ludzkich liniach komórek nowotworowych. Związek ten, podawany dootrzewnowo w badaniu *in vivo*, nie wykazywał znaczącej cytotoksyczności względem prawidłowych komórek, a jednocześnie znacząco zmniejszał rozmiar guza, do poziomu porównywalnego z powszechnie stosowanymi lekami, takimi jak imatynib czy hydroksymocznik.

10. Wykazanie, że aktywność przeciwnowotworowa pochodnej **1a** jest związana z generowaniem wolnych rodników, obniżaniem poziomu IL-6, zatrzymaniem cyklu komórkowego oraz hamowaniem polimeryzacji tubulin. Efekty te prowadzą do apoptozy lub nekrozy, a ich nasilenie zależne jest od typu komórki.

Przedstawiona tematyka ma charakter interdyscyplinarny i łączy kompetencje wielu zespołów badawczych. Przeprowadzone badania pozwoliły wyłonić halogenopochodne benzofuranów, które dzięki wieloaspektowemu działaniu są obiecującymi kandydatami do dalszych badań nad ich potencjalnym zastosowaniem w terapii nowotworowej. Uzyskane wyniki mają istotny wpływ na rozwój chemii i biologii medycznej oraz farmakologii, szczególnie w kontekście poszukiwania biologicznie aktywnych związków o selektywnym działaniu przeciwnowotworowym. Przedstawione osiągnięcie wnosi znaczący wkład w rozwój nowych leków przeciwnowotworowych, dostarczając cennych informacji na temat ich syntezy, właściwości fizykochemicznych oraz mechanizmów działania

4.4. Piśmiennictwo:

- [1] V. Polshettiwar, R.S. Varma, Greener and sustainable approaches to the synthesis of pharmaceutically active heterocycles, *Curr Opin Drug Discov Devel* 10(6) (2007) 723-37.
- [2] A. Padwa, S.K. Bur, The Domino Way to Heterocycles, *Tetrahedron* 63(25) (2007) 5341-5378.
- [3] D.M. D'Souza, T.J. Muller, Multi-component syntheses of heterocycles by transition-metal catalysis, *Chem Soc Rev* 36(7) (2007) 1095-108.
- [4] G. Eren, S. Unlu, M.T. Nunez, L. Labeaga, F. Ledo, A. Entrena, E. Banoglu, G. Costantino, M.F. Sahin, Synthesis, biological evaluation, and docking studies of novel heterocyclic diaryl compounds as selective COX-2 inhibitors, *Bioorg Med Chem* 18(17) (2010) 6367-76.
- [5] E.M. Gordon, R.W. Barrett, W.J. Dower, S.P. Fodor, M.A. Gallop, Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Combinatorial organic synthesis, library screening strategies, and future directions, *J Med Chem* 37(10) (1994) 1385-401.
- [6] P.D. Leeson, B. Springthorpe, The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry, *Nat Rev Drug Discov* 6(11) (2007) 881-90.
- [7] H. Khanam, Shamsuzzaman, Bioactive Benzofuran derivatives: A review, *Eur J Med Chem* 97 (2015) 483-504.
- [8] R.J. Nevagi, S.N. Dighe, S.N. Dighe, Biological and medicinal significance of benzofuran, *Eur J Med Chem* 97 (2015) 561-81.
- [9] A.A. Abbas, K.M. Dawood, Anticancer therapeutic potential of benzofuran scaffolds, *RSC Adv* 13(16) (2023) 11096-11120.
- [10] C.L. Kao, J.N. Chern, A convenient synthesis of naturally occurring benzofuran aianthoidol, *Tetrahedron Lett* 42(6) (2001) 1111-1113.
- [11] M. Spaniol, R. Bracher, H.R. Ha, F. Follath, S. Krähenbühl, Toxicity of amiodarone and amiodarone analogues on isolated rat liver mitochondria, *J Hepatol* 35(5) (2001) 628-636.
- [12] S. Narimatsu, C. Takemi, S. Kuramoto, D. Tsuzuki, H. Hichiya, K. Tamagake, S. Yamamoto, Stereoselectivity in the oxidation of bufuralol, a chiral substrate, by human cytochrome P450s, *Chirality* 15(4) (2003) 333-9.
- [13] B.G. Pollock, Citalopram: a comprehensive review, *Expert Opin Pharmacother* 2(4) (2001) 681-98.
- [14] R.C. Heel, R.N. Brogden, T.M. Speight, G.S. Avery, Benzbromarone: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in gout and hyperuricaemia, *Drugs* 14(5) (1977) 349-66.
- [15] M.A. Hummel, C.W. Locuson, P.M. Gannett, D.A. Rock, C.M. Mosher, A.E. Rettie, T.S. Tracy, CYP2C9 genotype-dependent effects on in vitro drug-drug interactions: switching of

benzbromarone effect from inhibition to activation in the CYP2C9.3 variant, *Mol Pharmacol* 68(3) (2005) 644-51.

[16] Y.H. Miao, Y.H. Hu, J. Yang, T. Liu, J. Sun, X.J. Wang, Natural source, bioactivity and synthesis of benzofuran derivatives, *RSC Adv* 9(47) (2019) 27510-27540.

[17] P. Asadi, G. Khodarahmi, A. Jahanian-Najafabadi, L. Saghaie, F. Hassanzadeh, Biologically Active Heterocyclic Hybrids Based on Quinazolinone, Benzofuran and Imidazolium Moieties: Synthesis, Characterization, Cytotoxic and Antibacterial Evaluation, *Chem Biodivers* 14(4) (2017).

[18] J. Farhat, L. Alzyoud, M. Alwahsh, B. Al-Omari, Structure-Activity Relationship of Benzofuran Derivatives with Potential Anticancer Activity, *Cancers (Basel)* 14(9) (2022).

[19] Y. Ma, X. Zheng, H. Gao, C. Wan, G. Rao, Z. Mao, Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Benzofuran Derivatives Bearing N-Aryl Piperazine Moiety, *Molecules* 21(12) (2016).

[20] M.A. Vaali-Mohammed, M.H. Abdulla, S. Matou-Nasri, W.M. Eldehna, M. Meeramaideen, E.B. Elkaeed, M. El-Watidy, N.S. Alhassan, K. Alkhaya, O. Al Obeed, The Anticancer Effects of the Pro-Apoptotic Benzofuran-Isatin Conjugate (5a) Are Associated With p53 Upregulation and Enhancement of Conventional Chemotherapeutic Drug Efficiency in Colorectal Cancer Cell Lines, *Front Pharmacol* 13 (2022) 923398.

[21] X.D. Yang, W.C. Wan, X.Y. Deng, Y. Li, L.J. Yang, L. Li, H.B. Zhang, Design, synthesis and cytotoxic activities of novel hybrid compounds between 2-phenylbenzofuran and imidazole, *Bioorg Med Chem Lett* 22(8) (2012) 2726-9.

[22] S. Abdelfatah, A. Berg, Q. Huang, L.J. Yang, S. Hamdoun, A. Klinger, H.J. Greten, E. Fleischer, T. Berg, V.K.W. Wong, T. Efferth, MCC1019, a selective inhibitor of the Polo-box domain of Polo-like kinase 1 as novel, potent anticancer candidate, *Acta Pharm Sin B* 9(5) (2019) 1021-1034.

[23] K.M. Amin, Y.M. Syam, M.M. Anwar, H.I. Ali, T.M. Abdel-Ghani, A.M. Serry, Synthesis and molecular docking study of new benzofuran and furo[3,2-g]chromone-based cytotoxic agents against breast cancer and p38alpha MAP kinase inhibitors, *Bioorg Chem* 76 (2018) 487-500.

[24] B.G.M. Youssif, A.M. Mohamed, E.E.A. Osman, O.F. Abou-Ghadi, D.H. Elnaggar, M.H. Abdelrahman, L. Treamblu, H.A.M. Gomaa, 5-Chlorobenzofuran-2-carboxamides: From allosteric CB1 modulators to potential apoptotic antitumor agents, *Eur J Med Chem* 177 (2019) 1-11.

[25] R. Wilcken, M.O. Zimmermann, A. Lange, A.C. Joerger, F.M. Boeckler, Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology, *J Med Chem* 56(4) (2013) 1363-88.

[26] T. Clark, M. Hennemann, J.S. Murray, P. Politzer, Halogen bonding: the sigma-hole. Proceedings of "Modeling interactions in biomolecules II", Prague, September 5th-9th, 2005, *J Mol Model* 13(2) (2007) 291-6.

[27] Y. Lu, Y. Wang, W. Zhu, Nonbonding interactions of organic halogens in biological systems: implications for drug discovery and biomolecular design, *Phys Chem Chem Phys* 12(18) (2010) 4543-51.

[28] P. Auffinger, F.A. Hays, E. Westhof, P.S. Ho, Halogen bonds in biological molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(48) (2004) 16789-94.

[29] Q. Li, X.E. Jian, Z.R. Chen, L. Chen, X.S. Huo, Z.H. Li, W.W. You, J.J. Rao, P.L. Zhao, Synthesis and biological evaluation of benzofuran-based 3,4,5-trimethoxybenzamide derivatives as novel tubulin polymerization inhibitors, *Bioorg Chem* 102 (2020) 104076.

[30] T.J. Schumacher, N. Sah, K. Palle, J. Rumbley, V.R. Mereddy, Synthesis and biological evaluation of benzofuran piperazine derivatives as potential anticancer agents, *Bioorg Med Chem Lett* 93 (2023) 129425.

[31] M.S. Nafie, A.I. Khodair, H.A.Y. Hassan, N.M.A. El-Fadeal, H.A. Bogari, S.S. Elhady, S.A. Ahmed, Evaluation of 2-Thioxoimidazolidin-4-one Derivatives as Potent Anti-Cancer Agents through Apoptosis Induction and Antioxidant Activation: In Vitro and In Vivo Approaches, *Molecules* 27(1) (2021).

- [32] J. Plati, O. Bucur, R. Khosravi-Far, Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities, *J Cell Biochem* 104(4) (2008) 1124-49.
- [33] E. Dogan, H.G. Kara, B. Kosova, V.B. Cetintas, Targeting Apoptosis to Overcome Chemotherapy Resistance, in: C.M. Sergi (Ed.), *Metastasis*, Brisbane (AU), 2022.
- [34] K. Kumar, J.P.N. Mishra, R.P. Singh, Usnic acid induces apoptosis in human gastric cancer cells through ROS generation and DNA damage and causes up-regulation of DNA-PKcs and gamma-H2A.X phosphorylation, *Chem Biol Interact* 315 (2020) 108898.
- [35] N. Kumari, B.S. Dwarakanath, A. Das, A.N. Bhatt, Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance, *Tumour Biol* 37(9) (2016) 11553-11572.
- [36] B. Perillo, M. Di Donato, A. Pezone, E. Di Zazzo, P. Giovannelli, G. Galasso, G. Castoria, A. Migliaccio, ROS in cancer therapy: the bright side of the moon, *Exp Mol Med* 52(2) (2020) 192-203.
- [37] G.I. Shapiro, J.W. Harper, Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control, *J Clin Invest* 104(12) (1999) 1645-53.
- [38] P. Singh, K. Rathinasamy, R. Mohan, D. Panda, Microtubule assembly dynamics: An attractive target for anticancer drugs, *lubmb Life* 60(6) (2008) 368-375.
- [39] S. Kumar, Drug Targets for Cancer Treatment: An Overview, *Medicinal Chemistry* 5 (2015) 9.
- [40] D. Coskun, M. Erkisa, E. Ulukaya, M.F. Coskun, F. Ari, Novel 1-(7-ethoxy-1-benzofuran-2-yl) substituted chalcone derivatives: Synthesis, characterization and anticancer activity, *Eur J Med Chem* 136 (2017) 212-222.
- [41] T. Sithara, K.B. Arun, H.P. Syama, T.R. Reshmitha, P. Nisha, Morin Inhibits Proliferation of SW480 Colorectal Cancer Cells by Inducing Apoptosis Mediated by Reactive Oxygen Species Formation and Uncoupling of Warburg Effect, *Front Pharmacol* 8 (2017) 640.
- [42] C. Giordano, D. Rovito, I. Barone, R. Mancuso, D. Bonofiglio, F. Giordano, S. Catalano, B. Gabriele, S. Ando, Benzofuran-2-acetic ester derivatives induce apoptosis in breast cancer cells by upregulating p21(Cip/WAF1) gene expression in p53-independent manner, *DNA Repair (Amst)* 51 (2017) 20-30.
- [43] M. Hranjec, I. Sovic, I. Ratkaj, G. Pavlovic, N. Ilic, L. Valjalo, K. Pavelic, S. Kraljevic Pavelic, G. Karminski-Zamola, Antiproliferative potency of novel benzofuran-2-carboxamides on tumour cell lines: cell death mechanisms and determination of crystal structure, *Eur J Med Chem* 59 (2013) 111-9.
- [44] O.A. El-Khouly, M.A. Henen, M.A. El-Sayed, M.I. Shabaan, S.M. El-Messery, Synthesis, anticancer and antimicrobial evaluation of new benzofuran based derivatives: PI3K inhibition, quorum sensing and molecular modeling study, *Bioorg Med Chem* 31 (2021) 115976.
- [45] O.A. El-Khouly, M.A. Henen, M.A. El-Sayed, S.M. El-Messery, Design, synthesis and computational study of new benzofuran hybrids as dual PI3K/VEGFR2 inhibitors targeting cancer, *Sci Rep* 12(1) (2022) 17104.
- [46] F. Wang, K.R. Feng, J.Y. Zhao, J.W. Zhang, X.W. Shi, J. Zhou, D. Gao, G.Q. Lin, P. Tian, Identification of novel STAT3 inhibitors bearing 2-acetyl-7-phenylamino benzofuran scaffold for antitumour study, *Bioorg Med Chem* 28(24) (2020) 115822.
- [47] S. Mokenapelli, G. Thalari, N. Vadiyaala, J.R. Yerrabelli, V.K. Irlapati, N. Gorityala, S.R. Sagurthi, P.R. Chitneni, Synthesis, cytotoxicity, and molecular docking of substituted 3-(2-methylbenzofuran-3-yl)-5-(phenoxyethyl)-1,2,4-oxadiazoles, *Arch Pharm (Weinheim)* 353(6) (2020) e2000006.
- [48] I. Kodama, K. Kamiya, J. Toyama, Amiodarone: ionic and cellular mechanisms of action of the most promising class III agent, *Am J Cardiol* 84(9A) (1999) 20R-28R.
- [49] W.E. Courchesne, Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone, *J Pharmacol Exp Ther* 300(1) (2002) 195-9.
- [50] W.E. Courchesne, S. Ozturk, Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-depedent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Microbiol* 47(1) (2003) 223-34.
- [51] J. Gill, R.C. Heel, A. Fitton, Amiodarone. An overview of its pharmacological properties, and review of its therapeutic use in cardiac arrhythmias, *Drugs* 43(1) (1992) 69-110.

- [52] A. Masbernard, C.P. Giudicelli, Ten years' experience with benzbromarone in the management of gout and hyperuricaemia, *S Afr Med J* 59(20) (1981) 701-6.
- [53] J. Kossakowski, Synthesis of new derivatives of 2,2-dimethyl-2,3-dihydro-7-benzo[b]furanol with potential antimicrobial activity, *Medicinal Chemistry Research* 18 (2008) 555-565.
- [54] J. Kossakowski, K. Ostrowska, Synthesis of new derivatives of 2,3-dihydro-7-benzo[b]furanol with potential pharmacological activity, *Acta Pol Pharm* 63(4) (2006) 271-5.
- [55] J. Kossakowski, K. Ostrowska, E. Hejchman, I. Wolska, Synthesis and structural characterization of derivatives of 2- and 3-benzo[b]furan carboxylic acids with potential cytotoxic activity, *Farmaco* 60(6-7) (2005) 519-27.
- [56] T.H. Pringle, R.J. Francis, P.B. East, R.G. Shanks, Pharmacodynamic and pharmacokinetic studies on bufuralol in man, *Br J Clin Pharmacol* 22(5) (1986) 527-34.
- [57] W.E.H. Courchesne, E.; Maciejewska, D. et al.: , *Antifungal Compounds*, 2009.
- [58] H. Ebiike, M. Masubuchi, P. Liu, K. Kawasaki, K. Morikami, S. Sogabe, M. Hayase, T. Fujii, K. Sakata, H. Shindoh, Y. Shiratori, Y. Aoki, T. Ohtsuka, N. Shimma, Design and synthesis of novel benzofurans as a new class of antifungal agents targeting fungal N-myristoyltransferase. Part 2, *Bioorg Med Chem Lett* 12(4) (2002) 607-10.
- [59] B.P. Bandgar, S.A. Patil, B.L. Korbadi, S.C. Biradar, S.N. Nile, C.N. Khobragade, Synthesis and biological evaluation of a novel series of 2,2-bisaminomethylated aurone analogues as anti-inflammatory and antimicrobial agents, *Eur J Med Chem* 45(7) (2010) 3223-7.
- [60] S. Van Miert, S. Van Dyck, T.J. Schmidt, R. Brun, A. Vlietinck, G. Lemiere, L. Pieters, Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans, *Bioorg Med Chem* 13(3) (2005) 661-9.
- [61] K. Asoh, M. Kohchi, I. Hyoudoh, T. Ohtsuka, M. Masubuchi, K. Kawasaki, H. Ebiike, Y. Shiratori, T.A. Fukami, O. Kondoh, T. Tsukaguchi, N. Ishii, Y. Aoki, N. Shimma, M. Sakaitani, Synthesis and structure-activity relationships of novel benzofuran farnesyltransferase inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* 19(6) (2009) 1753-7.
- [62] S. Apers, D. Paper, J. Burgermeister, S. Baronikova, S. Van Dyck, G. Lemiere, A. Vlietinck, L. Pieters, Antiangiogenic activity of synthetic dihydrobenzofuran lignans, *J Nat Prod* 65(5) (2002) 718-20.
- [63] H. Ogura, T. Nakanishi-Ueda, T. Ueda, S. Iwai, S. Uchida, Y. Saito, Y. Taguchi, H. Yasuhara, D. Armstrong, K. Oguchi, R. Koide, Effect of a dihydrobenzofuran derivative on lipid hydroperoxide-induced rabbit corneal neovascularization, *J Pharmacol Sci* 103(2) (2007) 234-40.
- [64] Y. Chen, S. Chen, X. Lu, H. Cheng, Y. Ou, H. Cheng, G.C. Zhou, Synthesis, discovery and preliminary SAR study of benzofuran derivatives as angiogenesis inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* 19(7) (2009) 1851-4.
- [65] Y. Xiang, B. Hirth, G. Asmussen, H.P. Biemann, K.A. Bishop, A. Good, M. Fitzgerald, T. Gladysheva, A. Jain, K. Jancsics, J. Liu, M. Metz, A. Papoulis, R. Skerlj, J.D. Stepp, R.R. Wei, The discovery of novel benzofuran-2-carboxylic acids as potent Pim-1 inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* 21(10) (2011) 3050-6.
- [66] X.Y. Li, B.F. He, H.J. Luo, N.Y. Huang, W.Q. Deng, 3-Acyl-5-hydroxybenzofuran derivatives as potential anti-estrogen breast cancer agents: a combined experimental and theoretical investigation, *Bioorg Med Chem Lett* 23(16) (2013) 4617-21.
- [67] R. Romagnoli, P.G. Baraldi, M.D. Carrion, C.L. Cara, O. Cruz-Lopez, M. Tolomeo, S. Grimaudo, A. Di Cristina, M.R. Pipitone, J. Balzarini, N. Zonta, A. Brancale, E. Hamel, Design, synthesis and structure-activity relationship of 2-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-benzo[b]furan derivatives as a novel class of inhibitors of tubulin polymerization, *Bioorg Med Chem* 17(19) (2009) 6862-71.
- [68] L. Pieters, S. Van Dyck, M. Gao, R. Bai, E. Hamel, A. Vlietinck, G. Lemiere, Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization, *J Med Chem* 42(26) (1999) 5475-81.
- [69] I.N. Gaisina, F. Gallier, A.V. Ougolkov, K.H. Kim, T. Kurome, S. Guo, D. Holzle, D.N. Luchini, S.Y. Blond, D.D. Billadeau, A.P. Kozikowski, From a natural product lead to the identification of potent

and selective benzofuran-3-yl-(indol-3-yl)maleimides as glycogen synthase kinase 3 β inhibitors that suppress proliferation and survival of pancreatic cancer cells, *J Med Chem* 52(7) (2009) 1853-63.

[70] G. Ecker, P. Chiba, M. Hitzler, D. Schmid, K. Visser, H.P. Cordes, J. Csollej, J.K. Seydel, K.J. Schaper, Structure-activity relationship studies on benzofuran analogs of propafenone-type modulators of tumor cell multidrug resistance, *J Med Chem* 39(24) (1996) 4767-74.

[71] S. Parekh, D. Bhavsar, M. Savant, S. Thakrar, A. Bavishi, M. Parmar, H. Vala, A. Radadiya, N. Pandya, J. Serly, J. Molnar, A. Shah, Synthesis of some novel benzofuran-2-yl(4,5-dihydro-3,5-substituted diphenylpyrazol-1-yl) methanones and studies on the antiproliferative effects and reversal of multidrug resistance of human MDR1-gene transfected mouse lymphoma cells in vitro, *Eur J Med Chem* 46(5) (2011) 1942-8.

[72] C. Antczak, D. Shum, B. Bassit, M.G. Frattini, Y. Li, E. de Stanchina, D.A. Scheinberg, H. Djaballah, Identification of benzofuran-4,5-diones as novel and selective non-hydroxamic acid, non-peptidomimetic based inhibitors of human peptide deformylase, *Bioorg Med Chem Lett* 21(15) (2011) 4528-32.

[73] C. Salome, V. Narbonne, N. Ribeiro, F. Thuaud, M. Serova, A. de Gramont, S. Faivre, E. Raymond, L. Desaubry, Benzofuran derivatives as a novel class of inhibitors of mTOR signaling, *Eur J Med Chem* 74 (2014) 41-9.

[74] C. Salome, N. Ribeiro, T. Chavagnan, F. Thuaud, M. Serova, A. de Gramont, S. Faivre, E. Raymond, L. Desaubry, Benzofuran derivatives as anticancer inhibitors of mTOR signaling, *Eur J Med Chem* 81 (2014) 181-91.

[75] R. Romagnoli, P.G. Baraldi, T. Sarkar, C.L. Cara, O.C. Lopez, M.D. Carrion, D. Preti, M. Tolomeo, J. Balzarini, E. Hamel, Synthesis and biological evaluation of 2-aryl-4-phenyl-5-hydroxybenzofurans as a new class of antitubulin agents, *Med Chem* 4(6) (2008) 558-64.

[76] A. Kamal, N.V. Reddy, V.L. Nayak, V.S. Reddy, B. Prasad, V.D. Nimbarte, V. Srinivasulu, M.V. Vishnuvardhan, C.S. Reddy, Synthesis and biological evaluation of benzo[b]furans as inhibitors of tubulin polymerization and inducers of apoptosis, *ChemMedChem* 9(1) (2014) 117-28.

[77] L. Lv, Design, Synthesis and Biological Evaluation of the Novel Antitumor Agent 5-Bromobenzofuran-3(2H)-One and its Derivatives., *Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012)* (2012) 7.

[78] B.L. Flynn, E. Hamel, M.K. Jung, One-pot synthesis of benzo[b]furan and indole inhibitors of tubulin polymerization, *J Med Chem* 45(12) (2002) 2670-3.

[79] M.K.Y. Akkoc, M.Y. Durmaz, I.; Atalay, R.C. , Design, synthesis, and biological evaluation of indole-based 1,4-disubstituted piperazines as cytotoxic agents, *Turk. J. Chem.* 36 (2012) 10.

[80] C.A.L. Lipinski, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. , Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings., *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 12.

[81] Y.B. Lee, Y.D. Gong, H. Yoon, C.H. Ahn, M.K. Jeon, J.Y. Kong, Synthesis and anticancer activity of new 1-[(5 or 6-substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives, *Bioorg Med Chem* 18(22) (2010) 7966-74.

[82] A. Chrzanowska, P. Roszkowski, A. Bielenica, W. Olejarz, K. Stepień, M. Struga, Anticancer and antimicrobial effects of novel ciprofloxacin fatty acids conjugates, *Eur J Med Chem* 185 (2020) 111810.

[83] M. Yarim, M. Koksall, I. Durmaz, R. Atalay, Cancer cell cytotoxicities of 1-(4-substitutedbenzoyl)-4-(4-chlorobenzhydryl)piperazine derivatives, *Int J Mol Sci* 13(7) (2012) 8071-8085.

[84] Y.B. Lee, Y.D. Gong, D.J. Kim, C.H. Ahn, J.Y. Kong, N.S. Kang, Synthesis, anticancer activity and pharmacokinetic analysis of 1-[(substituted 2-alkoxyquinoxalin-3-yl)aminocarbonyl]-4-(hetero)arylpiperazine derivatives, *Bioorg Med Chem* 20(3) (2012) 1303-9.

[85] A. Mukherjee, W.D. Sasikala, Drug-DNA intercalation: from discovery to the molecular mechanism, *Adv Protein Chem Struct Biol* 92 (2013) 1-62.

- [86] N.J. Wheate, C.R. Brodie, J.G. Collins, S. Kemp, J.R. Aldrich-Wright, DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis, *Mini Rev Med Chem* 7(6) (2007) 627-48.
- [87] J.M. Mates, F.M. Sanchez-Jimenez, Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy, *Int J Biochem Cell Biol* 32(2) (2000) 157-70.
- [88] E. Irvine, C. Williams, Treatment-, patient-, and disease-related factors and the emergence of adverse events with tyrosine kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukemia, *Pharmacotherapy* 33(8) (2013) 868-81.
- [89] H. Cortes-Funes, C. Coronado, Role of anthracyclines in the era of targeted therapy, *Cardiovasc Toxicol* 7(2) (2007) 56-60.
- [90] K. Fraczewska, M. Bacia, M. Przybyło, D. Drabik, A. Kaczorowska, J. Rybka, E. Stefanko, S. Drobczynski, J. Masajada, H. Podbielska, T. Wrobel, M. Kopaczynska, Alterations of biomechanics in cancer and normal cells induced by doxorubicin, *Biomed Pharmacother* 97 (2018) 1195-1203.
- [91] I.S. Okon, M.-H. Zou, Mitochondrial ROS and cancer drug resistance: Implications for therapy, *Pharmacological Research* 100 (2015) 170-174.
- [92] Laura A. Sena, Navdeep S. Chandel, Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species, *Molecular Cell* 48(2) (2012) 158-167.
- [93] H. Wiseman, B. Halliwell, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer, *Biochemical Journal* 313(1) (1996) 17-29.
- [94] C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak, Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy, *Nature Reviews Drug Discovery* 12(12) (2013) 931-947.
- [95] A.J. Montero, J. Jassem, Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer, *Drugs* 71(11) (2011) 1385-96.
- [96] J.-F. Liu, C.-Y. Chen, H.-T. Chen, C.-S. Chang, C.-H. Tang, BL-038, a Benzofuran Derivative, Induces Cell Apoptosis in Human Chondrosarcoma Cells through Reactive Oxygen Species/Mitochondrial Dysfunction and the Caspases Dependent Pathway, *International Journal of Molecular Sciences* 17(9) (2016) 1491.
- [97] C.C. Gao, X. Sun, Z.P. Wu, H.H. Yuan, H.T. Han, H.L. Huang, Y.H. Shu, M.T. Xu, R.L. Gao, S.X. Li, J.B. Zhang, J.K. Tian, A Novel Benzofuran Derivative Moracin N Induces Autophagy and Apoptosis Through ROS Generation in Lung Cancer, *Front Pharmacol* 11 (2020).
- [98] T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, IL-6 in inflammation, immunity, and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10) (2014) a016295.
- [99] H. Antosz, K. Wojciechowska, J. Sajewicz, D. Choroszyńska, B. Marzec-Kotarska, M. Osiak, N. Pająk, W. Tomczak, M. Jargiełło-Baszak, J. Baszak, IL-6, IL-10, c-Jun and STAT3 expression in B-CLL, *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 54(3) (2015) 258-265.
- [100] Q. Liu, S. Yu, A. Li, H. Xu, X. Han, K. Wu, Targeting interleukin-6 to relieve immunosuppression in tumor microenvironment, *Tumour Biol* 39(6) (2017) 1010428317712445.
- [101] H.Q. Wang, L. Jia, Y.T. Li, T. Farren, S.G. Agrawal, F.T. Liu, Increased autocrine interleukin-6 production is significantly associated with worse clinical outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia, *Journal of Cellular Physiology* 234(8) (2019) 13994-14006.
- [102] A.F. Nursal, M. Pehlivan, H.H. Sahin, S. Pehlivan, The Associations of IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, and TGF- β 1 Functional Variants with Acute Myeloid Leukemia in Turkish Patients, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* 20(9) (2016) 544-551.
- [103] B. Sanchez-Correa, J.M. Bergua, C. Campos, I. Gayoso, M.J. Arcos, H. Bañas, S. Morgado, J.G. Casado, R. Solana, R. Tarazona, Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: Survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels, *Cytokine* 61(3) (2013) 885-891.
- [104] K. Krolewska-Golinska, M.J. Cieslak, M. Sobczak, R. Dolot, E. Radzikowska-Cieciura, M. Napiórkowska, I. Wybranska, B. Nawrot, Novel Benzo[B]Furans with Anti-Microtubule Activity Upregulate Expression of Apoptotic Genes and Arrest Leukemia Cells in G2/M Phase, *Anticancer Agents Med Chem* 19(3) (2019) 375-388.

- [105] M. Krawiecka, B. Kuran, J. Kossakowski, M. Cieslak, J. Kazmierczak-Baranska, K. Krolewska, B. Nawrot, Synthesis and Cytotoxic Properties of Halogen and Aryl-/Heteroarylpiperazinyl Derivatives of Benzofurans, *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 15(1) (2015) 115-21.
- [106] J. Zhang, L. Wang, Y. Zhang, Downregulation of NIMA-related kinase-7 inhibits cell proliferation by inducing cell cycle arrest in human retinoblastoma cells, *Exp Ther Med* 15(2) (2018) 1360-1366.
- [107] C. Dominguez-Brauer, K.L. Thu, J.M. Mason, H. Blaser, M.R. Bray, T.W. Mak, Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies, *Mol Cell* 60(4) (2015) 524-36.
- [108] G. Barrera, Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy, *ISRN Oncol* 2012 (2012) 137289.
- [109] S.M. Clemente, O.H. Martinez-Costa, M. Monsalve, A.K. Samhan-Arias, Targeting Lipid Peroxidation for Cancer Treatment, *Molecules* 25(21) (2020).
- [110] O.O. Erejuwa, S.A. Sulaiman, M.S. Ab Wahab, Evidence in support of potential applications of lipid peroxidation products in cancer treatment, *Oxid Med Cell Longev* 2013 (2013) 931251.
- [111] J. Kossakowski, M. Krawiecka, B. Kuran, J. Stefanska, I. Wolska, Synthesis and preliminary evaluation of the antimicrobial activity of selected 3-benzofurancarboxylic acid derivatives, *Molecules* 15(7) (2010) 4737-49.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

5.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Działalność naukową rozpoczęłam na czwartym roku studiów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W Pracowni Peptydów, pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Izdebskiego, prowadziłam badania nad syntezą pochodnych agmatyny, stanowiących temat mojej pracy magisterskiej. Realizacja projektu zakończyła się sukcesem – otrzymałam dwie nowe pochodne agmatyny, które mogły być wykorzystane jako substraty do syntezy peptydów. Pracę magisterską obroniłam w czerwcu 1999 roku, uzyskując tytuł magistra nauk chemicznych. W październiku 1999 roku podjęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Medycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, kierowanej przez Prof. dr hab. Jerzego Kossakowskiego. Badania, które rozpoczęłam, dotyczyły syntezy aminoalkilowych pochodnych wybranych dikarboksyimidów o działaniu ukierunkowanym na układ nerwowy. Planowałam i przeprowadzałam syntezę nowych związków o potencjalnej aktywności biologicznej, inspirowanych strukturą wiodących wówczas leków przeciwdepresyjnych i przeciwlękowych (m.in. buspiron, tandospiron) oraz β -adrenolitycznych (np. pindolol). Wyjściowe dikarboksyimidy otrzymywałam w reakcji kondensacji Dielsa–Aldera, a poprzez dobór odpowiednich dienów modyfikowałam ich objętość oraz polarność. Następnie, związki te poddawałam alkiłowaniu i sprzęganiu z wybranymi aminami, modyfikując zarówno długość i giętkość łańcucha węglowego, jak i podstawnik aminowy. Wprowadzałam m.in. arylo- i heteroarylopiperazyny oraz krótkie aminy alifatyczne.

Przeprowadzone syntezy pozwoliły mi stworzyć dużą bazę związków o potencjalnej aktywności farmakologicznej.

Synteza oraz analiza strukturalna 80 związków, spośród otrzymanych przeze mnie pochodnych, stała się podstawą mojej rozprawy doktorskiej. Elementy strukturalne opisanych w rozprawie pochodnych pozwalały przypuszczać, w oparciu o budowę stosowanych leków, że związki te mogą wykazywać aktywność przeciwdepresyjną lub/i przeciwlękową. W związku z powyższym, trzy pochodne, zawierające w swej strukturze metoksyfenylopiperazynę, zostały poddane wstępnym badaniom farmakologicznym w kierunku działania sedatywnego, anksjolitycznego i przeciwdepresyjnego. Przeprowadzone testy pozwoliły wyłonić jedną z pochodnych jako potencjalny związek o aktywności przeciwdepresyjnej.

Ponadto, pięć pochodnych z fragmentem metoksyfenylopiperazynowym, połączonym z różnymi układami imidowymi poprzez łańcuch butylowy lub propoksyłowy, przekazałam do Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie w celu określenia powinowactwa do receptorów serotoninowych 5-HT_{1A} oraz zbadania wpływu terminalnego imidu na wartość powinowactwa.

Wśród układów imidowych poszukiwałam także takich, które mogłyby wykazywać działanie przeciwwirusowe. W związku z tym, 40 wybranych pochodnych zostało przekazanych do Instytutu Biologii Eksperymentalnej Uniwersytetu Cagliari we Włoszech na badania przeciwwirusowe, w tym przeciw wirusowi HIV. Uzyskane wyniki wskazały na brak lub niską aktywność przeciwwirusową.

Efektom wspomnianych prac badawczych były trzy publikacje oryginalne (**O1-O3**) i szesnaście komunikatów konferencyjnych (**K1-K16**).

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora obejmuje łącznie trzy publikacje oryginalne oraz 16 komunikatów prezentowanych na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych.

5.2. Działalność naukowa po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych kontynuowałam badania nad N-podstawionymi pochodnymi dikarboksyimidów o potencjalnej aktywności biologicznej. Jednocześnie rozpoczęłam poszukiwania aktywnych pochodnych w grupie benzofuranów. Pracę naukową prowadziłam zatem równolegle w dwóch grupach związków heterocyklicznych, planując i przeprowadzając ich syntezę oraz przygotowując zakres i koordynując badaniami biologicznymi wybranych pochodnych.

W grupie dikarboksyimidów początkowo koncentrowałam się na dwóch kierunkach badań. Otrzymane N-arylo- i heteroarylopiperazynowe pochodne oceniano jako ligandy receptorów serotoninowych 5-HT, we współpracy z Prof. Jackiem Bojarskim (Instytut Farmakologii PAN, Kraków), natomiast N-alkiloaminowe pochodne badano pod kątem aktywności przeciwbakteryjnej we współpracy z Prof. Grażyną Młynarczyk (Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, WUM). Wyniki tych prac zaowocowały publikacjami **O4–O7**, **O10–O14**, **O20** oraz komunikatami konferencyjnymi **K17–K21** i **K26**.

W świetle doniesień literaturowych wskazujących na potencjał przeciwnowotworowy układów imidowych, rozszerzyłam badania o poszukiwanie pochodnych o działaniu cytotoksycznym. We współpracy z Prof. Barbarą Nawrot (Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Łódź) przeprowadzono badania przesiewowe, które pozwoliły wyselekcjonować aminoalkilowe pochodne 1,7-dietylo-8,9-difenylo-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5,10-trionu oraz pochodną 1,7,8,9-tetrafenylo-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5-dionu o interesujących właściwościach przeciwnowotworowych. Związki te wykazywały selektywną toksyczność wobec komórek białaczek CML (K562), ALL (MOLT-4) i AML (HL-60), przy jednoczesnym braku toksyczności wobec prawidłowych komórek śródbłónka (HUVEC) i niektórych komórek nowotworowych (HeLa, CFPAC). Wykazano również ich ukierunkowanie na białko ABC50, aktywność immunomodulacyjną oraz zdolność indukowania apoptozy w komórkach białaczkowych. Odkrycie to objęto ochroną patentową (**P3**).

Równolegle prowadziłam również badania w obszarze pochodnych benzofuranów. Planowałam i przeprowadzałam syntezę nowych pochodnych, w tym halogenopochodnych, wybranych układów benzofuranu. Następnie otrzymane pochodne były badane pod kątem aktywności mikrobiologicznej we współpracy z dr hab. Joanną Stefańską z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM oraz Prof. Grażyną Młynarczyk z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej WUM. Otrzymane wyniki wchodzą w skład przedstawionego do oceny osiągnięcia naukowego (**H1**, **H2**) oraz stały się tematem komunikatów zjazdowych (**K22–K25**, **K27**) i prac oryginalnych (**O8–O9**). Niska aktywność mikrobiologiczna tych pochodnych oraz doniesienia literaturowe wskazujące na potencjał przeciwnowotworowy tej klasy związków, skłoniły mnie do podjęcia badań przesiewowych w kierunku ich aktywności cytotoksycznej. Badania te zostały wykonane we współpracy z Prof. Paolo La Colla z Uniwersytetu w Caligari oraz z Prof. Barbarą Nawrot z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Otrzymane wyniki pozwoliły wyłonić aktywne halogenopochodne benzofuranów o wysokiej cytotoksyczności względem wybranych komórek

nowotworowych. Część tych badań stanowi przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe (**H3** i **H4**), a ich wynikiem są także doniesienia zjazdowe **K28-K29** i artykuły naukowe **O15-O16**.

Uzyskane wyniki wskazywały na wysoki potencjał farmakologiczny wybranych pochodnych dikarboksyimidów jak i benzofuranów, co stanowiło bodziec do kontynuowania i poszerzenia badań w tych grupach związków. W latach 2015-2021 realizowałam projekt NCN OPUS 8 pt. „Nowe leki przeciwbiałaczkowe – zaawansowane badania przedkliniczne” (UMO-2014/15/B/NZ7/00966) we współpracy z Prof. Barbarą Nawrot (CBMiM PAN, Łódź) i Prof. Urszulą Wojdą (Instytut Nenckiego PAN, Warszawa). W ramach tego projektu zaplanowałam i przeprowadziłam wielokierunkową syntezę, dzięki której stworzyłam bazę 41 nowych związków (14 pochodnych benzofuranów i 27 pochodnych dikarboksyimidów) o aktywności cytotoksycznej wobec różnych typów komórek białaczkowych. Analiza zależności struktura-aktywność pozwoliła mi zrozumieć wpływ modyfikacji strukturalnych na aktywność i mechanizm działania badanych grup związków.

W wyniku przeprowadzonych badań cytotoksyczności, wyselekcjonowano najbardziej aktywne związki jako potencjalne nowe leki przeciwbiałaczkowe. W kolejnym etapie badań przeprowadzono analizę mechanizmu ich działania przeciwnowotworowego na poziomie molekularnym.

Zrealizowane badania przedkliniczne z wykorzystaniem modeli zwierzęcych pozwoliły opracować formulację dla dwóch najbardziej aktywnych związków, umożliwiając ich podawanie do organizmu. Ustalono również drogę podania i parametry okna terapeutycznego, w tym terapeutyczne dawki hamujące wzrost komórek białaczkowych przy braku objawów toksyczności. Wyniki tych badań dostarczyły cennych informacji na temat systemowego działania badanych związków oraz umożliwiły dalsze badania tych substancji jako nowych leków przeciwbiałaczkowych.

Dla jednego z najbardziej efektywnych dikarboksyimidów, wykazano wysoką aktywność wobec hematopoetycznych komórek macierzystych krwi (komórki inicjujące nowotworzenie), uzyskiwanych bezpośrednio od pacjentów z białaczką. Dodatkowo wykazano dla niego także wysoką aktywność wobec komórek białaczkowych z opornością wielolekową.

Wyniki uzyskane w ramach projektu stały się podstawą do zgłoszenia patentowego do UPRP (**P4**) oraz zostały zaprezentowane, w przypadku dikarboksyimidów, w postaci komunikatów zjazdowych **K29**, **K31**, **K33-K36** i opisane w pracach oryginalnych **O11**, **O14**, **O17-O18**, **O21**, **O26**, **O29**, **O32**. Z kolei rezultaty eksperymentów w grupie benzofuranów zostały zaprezentowane w postaci komunikatów zjazdowych **K30**, **K32**, jak również opisane w pracy oryginalnej **O25**. Uzyskane wyniki stały się podstawą do rozszerzenia badań nad wybranymi

aktywnymi benzofuranami i ich pochodnymi, czego rezultatem są prace składające się na przedstawione do oceny osiągnięcie naukowe (**H4**, **H5**, **H6** i **H7**).

W trakcie realizacji projektu nawiązałam także współpracę z dr hab. Błażem Grodnerem z Katedry i Zakładu Biochemii i Farmakogenomiki, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w zakresie metod separacji stereoizomerów otrzymanych aktywnych pochodnych dikarboksyimidów. Rezultatem tej współpracy są prace oryginalne **O22**, **O23**, **O28**, **O30**, **O31**, **O33**, **O34**.

Nawiązałam również współpracę z dr Jamie Cabrera-Pardo z Uniwersytetu w Chile w zakresie badań nad benzofuranami jako związkami neuroprotekcijnymi, czego efektem są artykuły naukowe **PP1** i **O35**.

Obecnie kontynuuję poszukiwania bioaktywnych pochodnych dikarboksyimidów i benzofuranów. Nawiązaniem do tej tematyki jest rozpoczęta w ostatnich latach współpraca z dr Anną Leśniak z Katedry Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego, w ramach której zostały wykonane badania powinowactwa do receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, H₁ i M nowych pochodnych 8,9-difenylo-4-azatrycyclo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5,10-trionu. Część wyników, wraz z badaniami cytotoksyczności została przedstawiona w pracy **O36**, opublikowanej w 2023 r. W ramach wspomnianej współpracy planowane są dalsze badania nad kolejną serią pochodnych dikarboksyimidów.

6. Pozostałe publikacje oryginalne

O1. Kossakowski J., **Krawiecka M.** Synthesis of new N-substituted cyclic imides with an expected anxiolytic activity. **XIII.** Derivatives of 1-methoxybicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide. *Acta Polon. Pharm. – Drug Research*. 2000; 57 (Suppl.): 53-56.

O2. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Perliński M. Synthesis of new N-substituted cyclic imides with expected anxiolytic activity. **XXI.** Derivatives of 1,4-dibromo-dibenzo[e.h]bicyclo[2.2.2]octane-2,3-dicarboximide. *Acta Poloniae Pharm. – Drug Research*. 2002; 59(1): 37-43.

O3. Kossakowski J., **Krawiecka M.** Synthesis of N-substituted cyclic imides with an expected anxiolytic activity. **XXIV.** Derivatives of N-hydroxy-1-methoxybicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2003; 60(3): 177-182.

O4. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of conformationally constrained aryl- or heteroarylpiperazinyl derivatives of selected imides as 5-HT_{1A} receptor ligands. *Molecules*.

2006; 11(8): 615-625.

O5. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of aryl- and heteroaryl piperazinyl derivatives of azatricycloundecane system as potential 5-HT receptor ligands. *Annals of Polish Chemical Society*. 2007; 1:244-24837.

O6. Struga M., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Stefańska J.Z., Mirosław B. , Kozioł A E. Synthesis and structural characterization of derivatives of tricyclo[5.2.1.0.2.6]dec-8-ene-3,5-dione with an expected antimicrobial activity. *Journal Of The Chinese Chemical Society*. 2008; 55(6): 1258-1265.

O7. Kossakowski J., Kuran B., **Krawiecka M.** Synthesis of new N-substituted derivatives of 2-hydroxy-4,9-diphenyl-3a,4,9,9a-tetrahydro-1h-4,9-epoxybenzo[f]isoindole-1,3-dione and 2-hydroxy-5,8-dimethyl-3a,6,7,8,9,9b-hexahydro-4,9a-epoxybenzo[e]isoindole-1,3(4h)-dione with an expected anxiolytic activity. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DDD, Pharmacia*, 2009; 22(1): 31-37.

O8. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B.. Synthesis of halogen derivatives of selected furobenzopiran-4-one and benzo[b]furan-2-carboxylic acid with an expected biological activity. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DDD, Pharmacia*, 2009; 22(1): 39-43.

O9. **Krawiecka M.**, Kuran B., Szulczyk D., Kossakowski J., Szymanek-Majchrzak K. E., Młynarczyk G.A. Synthesis and preliminary evaluation of antimicrobial activity of selected derivatives of 2-benzofurancarboxylic acid. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DDD, Pharmacia*, 2010; 23(4): 11-18.

O10. Kuran B. J., **Krawiecka M.**, Rosołowski Sz., Kossakowski J., Szymanek-Majchrzak K. E., Młynarczyk G. A. Synthesis and biological activity of derivatives of 1-bromo-17-azapentacyclo[6.6.5.0^{2,7}.0^{9,14}.0^{15,19}]nonadeca-2,4,6,9,11,13-hexaen-16,18-dione. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DDD, Pharmacia*,. 2010, 23(4): 11-18.

O11. Kuran B. J., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Pindel Ł. , Młynarczyk G. A., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J. , Królewska K. Synthesis and biological activity of a novel series of 6,7-dimethoxyquinazoline-2,4(1H,3H)-dione derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2012; 69(1): 145-148.

O12. Kuran B. J., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Szymanek-Majchrzak K. E., Kierzkowska M., Młynarczyk G. A. Synthesis and biological activity of a novel series of 17-azapentacyclo[6.6.5.0(2.7).0(9.14).0(15,19)]nonadeca-2,4,6,9,11,13-hexaen-16,18-dione derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2012; 69(5): 901-910.

- O13.** Kuran B. J., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Szymanek-Majchrzak K. E., Kierzkowska M., Młynarczyk G. A. Synthesis and antimicrobial activity of derivatives of 1H-benzo[de]isoguinoline-1,3(2H)-dione. *Heterocyclic Communications*. 2012; 18(5-6): 275-278.
- O14.** Kuran B., Kossakowski J., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Cyrański M. K., Stępień D. K., **Krawiecka M.** Synthesis and biological activity of novel series of heterocyclic compounds containing succinimide moiety. *Heterocyclic Communications*. 2013; 19(4): 287-296.
- O15.** **Krawiecka M.**, Kuran B. J., Kossakowski J., Kierzkowska M., Młynarczyk G. A., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Dobrowolski M. A.. Synthesis and biological activity of novel series of 1,3-benzoxazol-2(3H)-one derivatives. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2013; 70(2): 245-253.
- O16.** **Krawiecka M.**, Kuran B., Kossakowski J., Kierzkowska M., Młynarczyk G. A., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Cieślak M. Synthesis and biological activity of 6-substituted 5-acetyl-4,7-dimethoxybenzofuran derivatives. *Heterocyclic Communications*. 2013; 19(4): 281-286.
- O17.** Kuran B., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Koronkiewicz M., Chilmończyk Z. Proapoptotic activity of heterocyclic compounds containing succinimide moiety in the promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2013; 70(3): 459-468.
- O18.** Szulczyk D., Bielenica A. M., Dobrowolski M., Dobrzycki Ł., **Krawiecka M.**, Kuran B., Struga M. K.. Synthesis and structure evaluation of new complex butylarylpiiperazin-1-yl derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 2014;23(3): 1519-1536.
- O19.** Grodner B., Łukaszewicz J., Kuran B., **Krawiecka M.** Capillary electrophoresis separation of aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0]dec-8-ene-3,5,10-trione as potential anticancer drugs. *Journal Of Separation Science*. 2014; 37(23): 3564-3570.
- O20.** **Krawiecka M.***, Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Czapla A., Kuran B. Synthesis and preliminary studies of biological activity of amino derivatives of 4-azatricyclo- [5.2.1.0_{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione with silicon in the structure. *Heterocyclic Communications*. 2015; 21(1): 19-24.
- O21.** Kuran B. J., **Napiórkowska M.***, Kossakowski J., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Nawrot B. New, substituted derivatives of dicarboximides and their cytotoxic properties. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2016; 16(7): 852-864.

O22. Grodner B., Łukaszewicz J., **Napiórkowska M.** Determination of the stereoisomers in aqueous medium and serum and validation studies of racemic aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-ene-3,5,10-trione, potential new anticancer drugs, by capillary electrophoresis. *Journal Of Separation Science*. 2016; 39(16): 3246-32-53.

O23. Grodner B., **Napiórkowska M.** Characterization and inhibition studies of tissue nonspecific alkaline phosphatase by aminoalkanol derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-ene-3,5,10-trione, new competitive and non-competitive inhibitors, by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017; 143: 285-290.

O24. **Napiórkowska M.***, Madeddu S., Giliberti G. and Sanna G. Cytotoxic Properties of selected derivatives of benzofurans – preliminary studies. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2018; 75(1): 255-263.

O25 Królewska-Golińska K , Cieślak M. J., Sobczak M., Dolot R., Radzikowska-Cieciura E., **Napiórkowska M.**, Wybrańska I. , Nawrot B. Novel benzo[b]furans with anti-microtubule activity upregulate expression of apoptotic genes and arrest leukemia cells in G2/M phase. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2019; 19(3): 375-388.

O26. Cieślak M. , Kaźmierczak-Barańska J. , Królewska-Golińska K , **Napiórkowska M.**, Stukan I., Wojda U., Nawrot B. New thalidomide-resembling dicarboximides target ABC50 protein and show antileukemic and immunomodulatory activities. *Biomolecules*. 2019; 9(9): 1-29.

O27. Szulczyk D., Bielenica A. M., Roszkowski P., Dobrowolski M., Olejars W., **Napiórkowska M.**, Struga M. K. Cytotoxicity evaluation of novel bis(2-aminoethyl)amine derivatives. *Molecules*. 2020; 25(12): 1-15.

O28. Grodner B., **Napiórkowska M.** Capillary electrophoresis for the investigation of two novel aminoalkanol derivatives of 1,7-diethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0(2,6)]dec-8-ene-3,5,10-trione as potential anticancer drugs in water solution and serum. *Journal of Separation Science*. 2020; 43(3): 648-656.

O29. Cieślak M., **Napiórkowska M.***, Kaźmierczak-Barańska J., Królewska-Golińska K., Hawrył A., Wybrańska I., Nawrot B. New succinimides with potent anticancer activity: synthesis, activation of stress signaling pathways and characterization of apoptosis in leukemia and cervical cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(9): 1-23.

O30. Grodner B., **Napiórkowska M.**, Pisklak D. M. Kinetic studies of newly patented aminoalkanol derivatives with potential anticancer activity as competitive inhibitors of prostate acid phosphatase. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(21): 1-16.

O31. Grodner B., **Napiórkowska M.** Dual 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and 5,10,15,20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin system as a novel chiral-achiral selector complex for enantioseparation of aminoalkanol derivatives with anticancer activity in capillary electrophoresis. *Molecules*. 2021; 26(4): 1-15.

O32. Stukan I. , Gryzik M. , Hoser G. , Want A., Grabowska-Pyrzewicz W. , Zdioruk M., **Napiórkowska M.**, Cieślak M. , Królewska-Golińska K., Nawrot B., Basak G., Wojda U. Novel dicarboximide BK124.1 breaks multidrug resistance and shows anticancer efficacy in chronic myeloid leukemia preclinical models and patients' CD34+ /CD38– leukemia stem cells. *Cancers*. 2022; 14(15): 1-18.

O33. Grodner B., **Napiórkowska M.**, Pisklak D. M. In vitro and in silico kinetic studies of patented 1,7-diethyl and 1,7-dimethyl aminoalkanol derivatives as new inhibitors of acetylcholinesterase. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(1): 1-19.

O34. Grodner B., **Napiórkowska M.**, Pisklak D. M. Catalase inhibition by aminoalkanol derivatives with potential anti-cancer activity—in vitro and in silico studies using capillary electrophoresis method. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(13): 1-17.

O35. Castillo C., Bravo-Arrepol G., Wendt A., Saez-Orellana F., Millar C., Burgos C. F., Gavián J., Pacheco C., Ahumada-Rudolph R., **Napiórkowska M.**, Pérez C., Becerra J., Fuentealba J., Cabrera-Pardo J. R.: Neuroprotective properties of Eudesmin on a cellular model of amyloid- β peptide toxicity; *J Alzheimers Dis*. 2023; 94: S97-S108.

O36. **Napiórkowska M.***, Kurpios-Piec D., Kiernozek-Kalińska E., Leśniak A., Klawikowska M., Bujalska-Zadrozny M. New aryl-/heteroaryl piperazine derivatives of 1,7-dimethyl-8,9-diphenyl-4-azatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5,10-trione: Synthesis and preliminary studies of biological activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2023; 96: 1-14.

* – prace, w których występowałam w roli autora korespondencyjnego

7. Prace poglądowe opublikowane po doktoracie

PP1. Cabrera-Pardo J. R., Fuentealba J., Gavián J., Cajas D., Becerra J., **Napiórkowska M.** Exploring the multi-target neuroprotective chemical space of benzofuran scaffolds: a new strategy in drug development for Alzheimer's disease. *Frontiers in Pharmacology*. 2020; 10:1-7.

8. Patenty i zgłoszenia patentowe

P3. Patent przyznany przez UPRP – zgoda wydana 24.05.2018 numer patentu: 228995

„Nowe podstawione pochodne dikarboksyimidów, ewentualnie w postaci farmaceutycznie dopuszczalnej soli oraz ich zastosowanie”

Mariola Krawiecka, Bożena Kuran, Jerzy Kossakowski, Marcin Cieślak, Julia Kaźmierczak-Barańska, Karolina Królewska, Barbara Nawrot

P4. Zgłoszenie patentowe do UPRP, numer zgłoszenia P-437038

„Pochodna dikarboksyimidu do zastosowania w leczeniu nowotworów”

Urszula Wojda, Marek Gryzik, Grażyna Hoser, Mykola Zdioruk, Iga Stukan, Marcin Cieślak, Karolina Królewska-Golińska, Barbara Nawrot, **Mariola Napiórkowska**

Data zgłoszenia 17.02.2021

9. Udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych

K1. Kossakowski J., Jarocka M., **Krawiecka M.** Synthesis of new N-substituted derivatives of 5-carboxy-1-ethoxybicyclo[2.2.2]oct-2,3-dicarboximide possessing an expected anxiolytic activity. The Second Multidisciplinary Conference on Drug Research, Jelenia Góra-Cieplice 5-7.04.2000.

K2. Kossakowski J., **Krawiecka M.** Synthesis of some N-substituted derivatives of 1-methoxybicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide possessing an expected anxiolytic activity. The Second Multidisciplinary Conference on Drug Research, Jelenia Góra-Cieplice 5-7.04.2000.

K3. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Perliński M. Synthesis of new compounds with an expected β -adrenolytic activity. 1. Derivatives of 1,9-ibromodibenzo[e.h]bicyclo[2.2.2]octane-2,3-dicarboximide. The 1st International Medical Congress, Warsaw 6-7.04.2001.

K4. Kossakowski J., Jarocka M., **Krawiecka M.** Synthesis of new compounds with an expected β -adrenolytic activity. 3. Derivatives of 1-hydroxymethyl-dibenzo[e.h] bicyclo[2.2.2] octane-2,3-dicarboximide. The 1st International Medical Congress, Warsaw 6-7.04.2001.

K5. Kossakowski J., Jarocka M., **Krawiecka M.** Synthesis of new compounds with an expected β -adrenolytic activity. 4. Derivatives of 1-methoxybicyclo[2.2.2]oct-5-ene-2,3-dicarboximide. The 1st International Medical Congress, Warsaw 6-7.04.2001.

- K6.** Kossakowski J., Perliński M., **Krawiecka M.** Synthesis of new N-substituted cyclic imides with potential anxiolytic activity. Derivatives of 1- bromo-dibenzo[e.h]bicyclo[2.2.2] octane-2,3-dicarboximide. The 1st International Medical Congress, Warsaw 6-7.04.2001.
- K7.** Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Perliński M. Synthesis of new N-{4-((4-aryl)-1-piperazinyl)alkyl} derivatives of dibenzo [e.h] bicyclo [2.2.2] octane-2,3-dicarboximide with an expected activity on Central Nervous System. Hungarian-German-Italian Polish Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Budapest, Hungary 2-6.09.2001.
- K8.** Kossakowski J., Jarocka-Wierzba M., **Krawiecka M.**, Sawicka E. Evaluation of biological activity of dibenzo[e.h]bicyclo[2.2.2]octane-2,3-dicarboximide derivatives. XVII th International Symposium on Medicinal Chemistry, Barcelona, Spain 1-5.09.2002.
- K9.** Kossakowski J., Perliński M., **Krawiecka M.** Synthesis of new N-substituted cyclic imides with potential anxiolytic activity. Derivatives of 1- chlorodibenzo [e.h.]bicyclo [2.2.2]octane-2,3-dicarboximide. XLIV Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego I Stowarzyszenia Inżynierów I Techników Przemysłu Chemicznego, Katowice, 9-13.09.2001.
- K10.** Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of new N-substituted cyclic imides with an expected anxiolytic activity. Derivatives of N-Hydroxy-1-methoxybicyclo[2.2.2]oct-5-en-2,3-dicarboximide. Multidyscyplinarna Konferencja Nauki o Leku, MKNOL, Piła 13-16.05.2002.
- K11.** Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Struga M. Synthesis of new N-substituted derivatives of 1-Formyl-4-methyldibenzo [e.h] bicyclo[2.2.2] octane-2,3-dicarboximide with an expected anxiolytic activity. XIV Zjazd PTChem Kraków 9-13.09.2002.
- K12.** Kossakowski J., Struga M., **Krawiecka M.** Synthesis of series N-substituted derivatives of exo-7-oxabicyclo[2.2.2]-hept-5-ene-2,3-dicarboximide and 7-isopropyl-6-methylbicyclo[2.2.2]-oct-5-ene-2,3-dicarboximide with potential activity on CNS. XIV Zjazd PTChem Kraków 9-13.09. 2002.
- K13.** Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of new N-substituted derivatives of 8,9-dihydroxy-4,7-ethano-3a,4,7,7a-tetrahydro-1H-isoindole-1,3(2H)dione. XLVI Zjazd PTCh i SITPCh Lublin , 15-18.09.2003.
- K14.** Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of new N-substituted derivatives of 5a-methyl-4,9a-ethane-octahydro-1H-benzo[e]isoindole-1,3,6,11(2H,7H)-tetrones with an expected activity on central nervous system. Polish-Austrian-German-Hungarian-Italian , Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Kraków, 15-18.10. 2003.
- K15.** Gałązka A., Koziół A.E., Kossakowski J., Struga M., **Krawiecka M.** Influence of substituents and crystal structures of cyclic imides.XVI International School on Physics and

Chemistry of Condensed Matter Structural Aspects of Solids , Białowieża , Poland 1-10.07.2004.

K16. Kossakowski J., Kuran B., **Krawiecka M.**, Nędzka K. Synteza nowych arylo- i heteroarylo piperazynyloalkilowych pochodnych wybranych układów azatricykloundekanu o spodziewanym działaniu na OUN. XLVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego Poznań 18-22.09.2005.

K17. Kuran B., Kossakowski J., **Krawiecka M.** Synthesis of conformationally constrained aryl- or heteroarylpiperazinyl derivatives of selection imides as 5 HT receptor ligands. The Fifth Multidisciplinary Conference on Drug Research, Darłówko Wschodnie, 15-17.06.2006.

K18. Kossakowski J., Struga M., **Krawiecka M.**, Grudniewicz A., Stefańska J. Przeciwdrobnoustrojowe właściwości bezwodników, imidów i pochodnych imidów tricyklodekanów. XLIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Gdańsk, 18-22.09.2006.

K19. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B., Pakosińska-Parys M., Wojciechowska A. Synteza arylo- i heteroarylopiperazynowych pochodnych układów azatricykloundekanu jako potencjalnych ligandów receptorów 5HT. XLIX Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego , Gdańsk, 18-22.09.2006

K20. Mirosław B., Pakosińska-Parys M., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Kozioł A. E. Wpływ konformacji podstawników hydroksyalkilowych na sposób asocjacji w pochodnych 10-oksa-4-azatricyklo[5.2.1.0^{2,6}]dek-8-en-3,5-dionu. 48 Konwersatorium Krystalograficzne Wrocław 29-30.06.2006.

K21. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B., Pakosińska-Parys M. Synteza arylo-lub heteroarylopiperazynowych pochodnych wybranego azatricykloundekanu jako ligandów receptora 5-HT. 50 Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Toruń 9-12.09.2007.

K22. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B., Stefańska J., Wolska I. Synthesis and preliminary evaluation of antimicrobial activity of selected derivatives of 3-benzofuranocarboxylic acid. 51 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Opole 7-11.09.2008.

K23. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of halogen derivatives of 2,7-dimethylfurobenzofuran-4-one with potencial antimicrobial activity. 51 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego oraz Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Opole 7-11.09.2008.

K24. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Synthesis of halogen derivatives of selected furobenzopiran-4-one and benzo[b]furan-2-carboxylic acid with an expected biological activity. I Konwersatorium Chemii Medycznej Lublin 19-20.09.2008.

K25. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Kuran B. Wolska I. Synthesis of new derivatives of 5-methoxy-2-methyl-benzo[b]furan-3-carboxylic acid with an expected biological activity. I Konwersatorium Chemii Medycznej Lublin 19-20.09.2008

K26. Kossakowski J., Kuran B., **Krawiecka M.** Synthesis of new N-substituted derivatives of 2-hydroxy-4,9-diphenyl-4,9-epoxy-3a-tetrahydro-1H-benzo[f]isoindole-1,3(2H)-dione and 2-hydroxy-5,8-dimethyl-3b,9-epoxy-3a,4,5,6,7,8,9,9a-octahydro-1H-benzo[e]isoindole-1,3(2H)-dione with an expected anxiolytic activity. I Konwersatorium Chemii Medycznej Lublin 19-20.09.2008.

K27. Kossakowski J., **Krawiecka M.**, Szulczyk D, Szymanek K. Synthesis and preliminary evaluation of antimicrobial activity of selected derivatives of 2-benzofuran carboxylic acid. II Konwersatorium Chemii Medycznej Lublin 08-10.09.2009.

K28. **Krawiecka M.**, Kuran B., Kossakowski J., Cieślak M., Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Nawrot B. Halogen Derivatives of benzofurans, possibly in the form of pharmaceutically acceptable salts, and use of halogen derivatives of benzo[b]furans. International Innovation and Technology Exhibition, Kuala Lumpur, Malezja, 9-11.05.2013.

K29. Królewska K., Cieślak M., Kuran B., **Krawiecka M.**, Kossakowski J., Wybranska I., Nawrot B. New benzo[b]furane and dicarboximide derivatives with anticancer activity - studies on the mechanism of action in human cells. FEBS EMBO Conference, Paris, France 30.08-04.09.2014.

K30. Cieślak M.J., Królewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Sobczak M., Kuran B., **Napiórkowska M.**, Kossakowski J., Wybranska I., Nawrot B. Novel benzo[b]furan derivatives – biological activity and protein target identification in leukemic cells. – prezentacja ustna. 10-th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Dubrownik, Chorwacja, 25-28.06. 2017.

K31. Kaźmierczak-Barańska J., Królewska K., Cieślak M.J., Sobczak M., Kuran B., **Napiórkowska M.**, Kossakowski J., Nawrot B. New dicarboximide derivatives – anticancer activity and mechanism of action. 10-th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Dubrownik, Chorwacja, 25-28.06. 2017.

K32. **Napiórkowska M.**, Cieślak M., Królewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Nawrot B. Synthesis and cytotoxic properties of new derivatives of benzofurans. 10-th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Dubrownik, Chorwacja, 25-28.06. 2017.

K33. Napiórkowska M., Cieślak M., Królewska K., Kaźmierczak-Barańska J., Nawrot B. Synthesis and cytotoxic properties of new derivatives of dicarboximides. 60 Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Wrocław, 17-21.09.2017.

K34. Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Cieślak M., Stukan I., Wojda U., **Napiórkowska M.**, Nawrot B. Thalidomide-resembling new dicarboximides show anticancer and immunomodulatory activity via targeting abcf1 protein. VIII EFMC International Symposium on Advances in Synthetic and Medicinal Chemistry, Ateny, Grecja, 1-5.09.2019.

K35. Stukan I., Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Cieślak M., **Napiórkowska M.**, Nawrot B., Wojda U. Proapoptotic activity of novel dicarboximides in leukemia cells. 11th International Conference of Contemporary Oncology, Poznań, 13–15 March 2019.

K36. Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Cieślak M., Stukan I., Wojda U., **Napiórkowska M.**, Nawrot B. New dicarboximides targeting abcf1 protein show potent anticancer and immunomodulatory activities. Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Praga, 27-30.06.2019.

K37. Ziaja K., **Napiórkowska M.**, Struga M. New furanochromone derivatives – synthesis and preliminary studies. X Konwersatorium Chemii Medycznej, Lublin 3-5.09.2021.

K38. Mahentheran M.A., Otto-Ślusarczyk D., **Napiórkowska M.** Cytotoxic activity of halogen derivatives of methyl 6-acetyl-5-hydroxy-2-methyl-1-benzofuran-3-carboxylate. 9th Lublin International Medical Congress For Students And Young Doctors Lublin, 17-19.11.2022.

K39. Kumaravel P., **Napiórkowska M.**, Lim G.Y., Kaddura S.M., Grosicka-Maciąg E. The synthesis and anticancer activity of the novel benzofurans derivatives – Preliminary study. 9th Lublin International Medical Congress For Students And Young Doctors Lublin, 17-19.11.2022.

10. Współpraca naukowa

10.1. Krajowe ośrodki naukowe

- Zakład Krystalografii, Wydział Chemii, Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu; Prof. Irena Wolska – w zakresie badań strukturalnych zsyntetyzowanych pochodnych benzofuranów
- Zakład Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Marii Curie – Skłodowskiej w Lublinie; Prof. Anna E. Kozioł – w zakresie badań strukturalnych zsyntetyzowanych pochodnych dikarboksyimidów

- Pracownia Krystalografii Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego; dr Michał A. Dobrowolski - w zakresie badań strukturalnych zsyntetyzowanych dikarboksyimidów
- Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM; dr hab. Joanna Stefańska – w zakresie badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zsyntetyzowanych pochodnych benzofuranów
- Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego WUM; Prof. Grażyna A. Młynarczyk – w zakresie badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej zsyntetyzowanych pochodnych benzofuranów
- Instytut Farmakologii PAN, Zakład Chemii Leków w Krakowie; Prof. Jacek Bojarski – w zakresie badań receptorowych 5HT_{1A}, 5-HT_{2A} zsyntetyzowanych związków, pochodnych dikarboksyimidów
- Katedra i Zakład Biochemii i Farmakogenomiki, Warszawski Uniwersytet Medyczny; dr hab. Błażej Grodner – w zakresie metod separacji stereoizomerów otrzymanych pochodnych dikarboksyimidów
- Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi, Zakład Chemii Bioorganicznej; Prof. Barbara Nawrot – w zakresie badań cytotoksyczności zsyntetyzowanych związków
- Instytut Biologii Doświadczalnej im. Marcelego Nenckiego PAN w Warszawie; Prof. Urszula Wojda – w zakresie badań aktywności przeciwnowotworowej zsyntetyzowanych pochodnych benzofuranów *in vivo* na myszach

10.2. Zagraniczne ośrodki naukowe

- Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia e Virologia, Università degli Studi di Cagliari, Monserrato, Włochy; Prof. Paolo La Colla, dr Gabriele Giliberti, dr Giuseppina Sanna – w zakresie określenia aktywności cytotoksycznej, przeciwproliferacyjnej i przeciwwirusowej pochodnych benzofuranów.
- National Cancer Institute, Bethesda, Maryland USA - w zakresie badań aktywności przeciwrakowej dikarboksyimidów
- Laboratorio de Química Aplicada y Sustentable (LabQAS), Departamento de Química, Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile; Jaime R. Cabrera-Pardo – w zakresie badań benzofuranów jako związków o działaniu neuroprotektoryjnym.

11. Udział w projektach badawczych

- 2008-2009, praca własna WUM pt. „Synteza halogenopochodnych podstawionych benzo[b]furanów o potencjalnej aktywności biologicznej”
Nr projektu: 1M8/W1/08
Rola: kierownik merytoryczny, wykonawca
- 2015-2021, projekt NCN przyznany w ramach OPUS 8. Umowa numer UMO-2014/15/B/NZ7/00966, Nowe leki przeciwbiałaczkowe - zaawansowane badania przedkliniczne”, badania w ramach konsorcjum naukowego
Rola: kierownik i wykonawca z ramienia WUM

12. Nagrody i stypendia za działalność naukową i dydaktyczną

Jestem laureatką Nagród Naukowych JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w latach:

- 2001 - nagroda zespołowa naukowa II-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy N-podstawionych cyklicznych imidów o spodziewanym działaniu anksjolitycznym,
- 2003 - nagroda zespołowa naukowa III-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy pochodnych benzofuranów i cyklicznych imidów o spodziewanym działaniu anksjolitycznym;
- 2004 - nagroda zespołowa naukowa III-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy cyklicznych imidów o spodziewanym działaniu na OUN,
- 2007 - nagroda zespołowa naukowa III-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy i badania lipofilowości aminoalkilowych pochodnych azatricykloundekanu oraz triazoli;
- 2013 - nagroda zespołowa naukowa I-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy związków biologicznie czynnych;
- 2015 - nagroda naukowa II-ego stopnia za współautorstwo pracy pt.: 'Synthesis and cytotoxic properties of halogen and aryl-/heteroaryl piperazinyl derivatives of benzofurans"
- 2018 - nagroda zespołowa naukowa III-ego stopnia za osiągnięcia naukowe
- 2020 - nagroda zespołowa naukowa III-ego stopnia za osiągnięcia naukowe
- 2022 - dwie nagrody:

- nagroda zespołowa za osiągnięcia naukowe III-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących syntezy nowych pochodnych dikarboksyimidów o aktywności cytotoksycznej;

- nagroda zespołowa za osiągnięcia naukowe III-ego stopnia za współautorstwo cyklu prac dotyczących badań kinetycznych pochodnych aminoalkanoli jako nowych inhibitorów kwaśnej fosfatazy sterczowej;

- 2023 rok nagroda zespołowa naukowa III-ego stopnia za osiągnięcia naukowe

Dodatkowo w 2010 roku zostałam odznaczona przez Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Brązowym Krzyżem Zasługi oraz w 2012 roku otrzymałam nagrodę indywidualną dydaktyczną drugiego stopnia.

13. Kursy i szkolenia

- czerwiec 2004 - ukończenie kursu pedagogicznego dla nauczycieli akademickich Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie WUM)

14. Działalność organizacyjna

- czerwiec 2016 - pełnienie funkcji Kierownika Komisji Egzaminacyjnej Uczelnianego Egzaminu Wstępnego
- od 1 października 2019 roku do grudnia 2024 roku - członek Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z grupy niesamodzielných pracowników naukowych.

15. Recenzje prac naukowych

Od marca 2022 występowałam w roli recenzenta prac oryginalnych i poglądowych złożonych do publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Life*, *International Journal of Molecular Science*, *Molecules*, *Membranes*, *Cancers*

16. Podsumowanie osiągnięć naukowo-badawczych

Mój dorobek naukowy obejmuje:

- 43 prace oryginalne i 1 praca poglądową (41 po uzyskaniu stopnia doktora) w tym 35 w czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR). W 15 pracach byłam autorem pierwszym i/lub korespondencyjnym
- 39 doniesień/komunikatów prezentowanych na zjazdach międzynarodowych lub krajowych)
- 3 patenty (2 przyznane przez UPRP i 1 przyznany przez EUP)

- 1 zgłoszenie patentowe do UPRP
- udział w 2 projektach badawczych finansowanych przez WUM/NCN
- sumaryczny współczynnik *Impact Factor* według listy *JCR* zgodnie z rokiem opublikowania: **103,287**; łączna punktacja MNiSW: **2421** pkt
- liczba wszystkich cytowań publikacji według bazy *Web of ScienceTM Core Collection*: **272**; *Scopus*: **295**
- Liczba cytowań (bez autocytowań) według bazy *Web of ScienceTM Core Collection*: **196**; *Scopus*: **222**
- index Hirscha (*h-index*) według *Web of ScienceTM Core Collection*: **9**

17. Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę

17.1. Działalność dydaktyczna

- w roku akademickim 2022/2023 uczestnictwo w tygodniowym wyjeździe dydaktycznym w ramach programu ERASMUS+ do Università degli Studi di Napoli Federico II we Włoszech
- od 2014 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych i seminaryjnych z przedmiotu „Biochemia z elementami chemii” dla studentów II roku I Wydziału Lekarskiego i Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- w latach 1999 - 2013 prowadzenie zajęć ćwiczeniowych, seminaryjnych i wykładowych z przedmiotu „Chemia medyczna” dla studentów I roku I Wydziału Lekarskiego, II Wydziału Lekarskiego oraz Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- w latach 2010 - 2012 funkcja przedstawiciela Katedry i Zakładu Chemii Medycznej na posiedzeniach Rady Pedagogicznej Wydziału Lekarsko-Dentystycznego
- w latach 2015-2023 pełnienie roli recenzenta 6 prac magisterskich, w tym 5 wykonanych w Zakładzie Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego WUM i 1 wykonanej w Zakładzie Biochemii i Chemii Klinicznej WUM z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej.

17.2. Działalność popularyzująca naukę

- od roku 2001 prowadzenie wykładów z chemii na kursach przygotowawczych do egzaminu maturalnego.