

# Autoreferat

---

(Załącznik 2a)

Bogumiła Kupcewicz



Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

**Bydgoszcz 2016**

## SPIS TREŚCI

<b>1. INFORMACJE O KANDYDACIE .....</b>	<b>3</b>
1.1 IMIĘ I NAZWISKO: .....	3
1.2 POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE.....	3
1.3 INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.....	3
<b>2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.) .....</b>	<b>4</b>
2.1 TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO .....	4
2.2 WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO .....	4
2.3 OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z WNIOSKAMI NAUKOWYMI .....	5
2.3.1 <i>Wprowadzenie</i> .....	5
2.3.2 <i>Określenie wpływu struktury badanych związków na aktywność cytotoksyczną in vitro</i> .....	9
2.3.3 <i>Analiza właściwości fluorescencyjnych badanych związków</i> .....	21
2.3.4 <i>Podsumowanie wyników badań</i> .....	29
<i>Ze względu na interdyscyplinarny charakter badania były przeprowadzone we współpracy: .....</i>	<i>31</i>
<b>3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH .....</b>	<b>32</b>
3.1 PRZED UZYSKANIEM STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA.....	32
3.2 PO UZYSKANIU STOPNIA NAUKOWEGO DOKTORA.....	32

## 1. INFORMACJE O KANDYDACIE

### 1.1 Imię i nazwisko:

Bogumiła Kupcewicz

### 1.2 Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

Wrzesień 1991      **Dyplom magistra chemii** uzyskany na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, Promotor: dr hab. Brunon Dembiński

Styczeń 2000      **Stopień doktora nauk farmaceutycznych** w specjalności chemia analityczna uzyskany na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Promotor: Prof. dr hab. Zenon Kokot

### 1.3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1991 – 2000      Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Studium Farmaceutyczne w Bydgoszczy, asystent

2000 – 2011      Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy, adiunkt

2002 – 2011      Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, adiunkt

2011 – obecnie      Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, starszy wykładowca

2012 – 2016      Prodziekan ds. Studenckich Wydziału Farmaceutycznego CM UMK

## 2. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

### 2.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

#### Wpływ struktury pochodnych chalconu, chromonu i chromanonu na aktywność cytotoksyczną *in vitro* i właściwości fluorescencyjne

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem powiązanych tematycznie prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports (JCR)* w latach 2011-2016. Sumaryczny współczynnik oddziaływania IF wynosi **16.166** a łączna liczba punktów wg punktacji MNiSW to **180**.

### 2.2 Wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

**H1. B. Kupcewicz** (✉), A. A. Jarzęcki, M. Małecka, U. Krajewska, M. Rozalski. Cytotoxic activity of substituted chalcones in terms of molecular electronic properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 4260-4265.

IF(2014) = 2.420, Punktacja MNiSW: 30

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i koordynowaniu badań, wykonaniu obliczeń chemometrycznych i analizie wyników, napisaniu manuskryptu i jego korekcie zgodnie z uwagami recenzentów, korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

**H2. B. Kupcewicz** (✉), G. Balcerowska-Czerniak, M. Małecka, P. Paneth, U. Krajewska, M. Rozalski, Structure-cytotoxic activity relationship of 3-arylidene flavanone and chromanone (*E,Z* isomers) and 3-arylflavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 4102-4106.

IF(2013) = 2.331, Punktacja MNiSW: 25

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i koordynowaniu badań, udziale w analizie wyników, napisaniu manuskryptu i jego korekcie zgodnie z uwagami recenzentów, korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H3. B. Kupcewicz** (✉), M. Zapadka, M. Małecka, U. Krajewska, M. Rozalski, E. Budzisz; Quantitative relationships between structure and cytotoxic activity of flavonoid derivatives. An application of Hirshfeld surface derived descriptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 3336-3341.

IF(2016) = 2.420, Punktacja MNiSW: 25

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu i koordynowaniu badań, analizie wyników, wykonaniu obliczeń QSAR, napisaniu manuskryptu*

*i jego korekcie zgodnie z uwagami recenzentów, korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

**H4. B. Kupcewicz**, M. Grazul, I.-P. Lorenz, P. Mayer, E. Budzisz. The synthesis, spectroscopic properties and X-ray structure of Zn(II) complexes with amino derivatives of chromone. *Polyhedron* **2011**, 30, 1177-1184.

IF(2011) = 2.057; Punktacja MNiSW: 30

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu pomiarów potencjometrycznych i spektrofotometrycznych, wyznaczeniu stałych protonowania i ich opisie, wykonaniu pomiarów fluorescencji i ich opisie, korekcie manuskryptu zgodnie z uwagami recenzentów. Mój wkład szacuję procentowy na 40%.*

**H5. B. Kupcewicz** (✉), A. Kaczmarek-Kędziera, K. Lux, P. Mayer, E. Budzisz, Novel bright-blue luminescent complex of Zn(II) with 7-amino-methylchromen-4-one: Synthesis, photophysical properties and DFT calculations. *Polyhedron* **2013**, 55, 259-269.

IF(2013) = 2.047; Punktacja MNiSW: 30

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu pomiarów fluorescencji, analizie otrzymanych wyników, napisaniu manuskryptu i jego korekcie po recenzji, korespondencji z edytorem. Mój udział procentowy szacuję na 65%.*

**H6. B. Kupcewicz**, M. Małecka, Role of crystal packing and weak intermolecular interactions in the solid state fluorescence of *N*-methylpyrazoline derivatives. *Cryst. Growth Des.* **2015**, 15, 3893-3904.

IF(2015) = 4.891; Punktacja MNiSW: 40

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu badań fluorescencji, analizie otrzymanych wyników, wykonaniu części analizy powierzchni Hirshfelda, napisaniu manuskryptu (oprócz opisu struktur krystalicznych) i jego korekcie zgodnie z uwagami recenzentów. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

(✉) – publikacje, w których byłem autorem korespondencyjnym.

Oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach włączonych do powyższego cyklu umieszczono w **Załączniku 5**.

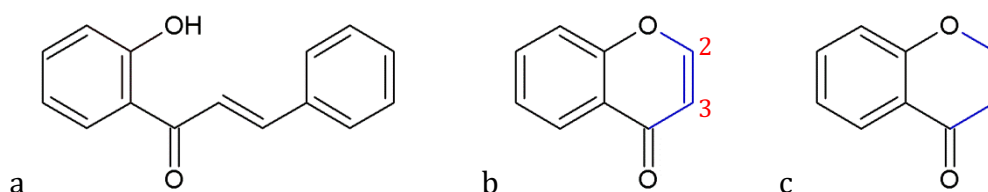
## 2.3 Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z wnioskami naukowymi

### 2.3.1 Wprowadzenie

Od wielu lat, produkty i substancje występujące w naturze odgrywają znaczącą rolę w poszukiwaniu i projektowaniu nowych związków o pożądanym właściwościach fizykochemicznych i farmakologicznych. Doskonałym dowodem na to mogą być prace Newmana i Cragga, zawierające przegląd (ostatni z 2016 roku) nowych leków, których

źródłem lub inspiracją były produkty naturalne.<sup>1,2</sup> Wśród 1211 nowych małowcząsteczkowych leków, zarejestrowanych w latach 1981–2014, tylko 40% to związki w pełni syntetyczne, natomiast 33% związków zostało sklasyfikowanych jako produkty naturalne lub ich pochodne, a kolejne 27% jako naśladowe związki naturalne (ang. mimic of natural product). Do najczęściej poszukiwanych i projektowanych leków należą związki o działaniu przeciwnowotworowym, co jest spowodowane rosnącą liczbą przypadków wykrywania nowotworów, a tym samym farmakologicznym wyzwaniem jakim jest ich skuteczne leczenie. We wspomnianym zestawieniu leki przeciwnowotworowe stanowią najliczniejszą grupę (174), a wśród nich 56% należy do leków pochodzenia naturalnego.

Współcześnie, jedną z intensywnie badanych grup związków naturalnych są flawonoidy, strukturalnie zróżnicowane i licznie występujące w wielu roślinach związki polifenolowe. Dwa podstawowe szkielety występujące w strukturze flawonoidów, różniące się obecnością wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla C2 i C3, to układ chromonu (1-benzopirany-4-onu) oraz chromanonu (2,3-dihydro-1-benzopirany-4-onu) (Ryc.1). Chromon i chromanon z pierścieniem fenylovym przyłączonym do atomu węgla C2 stanowią podstawową strukturę, odpowiednio flawonu i flawanonu. Do grupy flawonoidów zalicza się także chalkony (Ryc. 1a), traktowane jako ich prekursorzy.



**Ryc. 1** Szkielet chalkonu (a), chromonu (b) i chromanonu (c). Podstawienie pierścienia fenylovego w pozycji C2 chromonu i chromanonu daje odpowiednio strukturę flawonu i flawanonu.

Ze względu na wielokierunkową aktywność biologiczną naturalnych flawonoidów, związki należące do tej grupy, a także ich substruktury (chromon i chromanon) stanowią przedmiot szeregu modyfikacji strukturalnych oraz badań pod kątem ich zastosowania jako potencjalnych leków. O szerokim zainteresowaniu związkami z grupy pochodnych chalkonu, chromonu, chromanonu oraz naturalnych flawonoidów mogą świadczyć liczne w ostatnich latach prace dotyczące kierunków syntezy, właściwości farmakologicznych oraz patenty.<sup>3,4</sup> Wiele związków było badanych pod kątem właściwości cytotoksycznych<sup>5</sup> i przeciwnowotworowych,<sup>6,7</sup> a także potencjalnego zastosowania w obrazowaniu choroby

<sup>1</sup> Newman D. J.; Cragg G. M. *J Nat Prod* **2012**, 75, 311-335

<sup>2</sup> Newman D. J.; Cragg G. M. *J Nat Prod* **2016**, 79, 629-661

<sup>3</sup> João Matos M., Vazquez-Rodriguez S., Uriarte E., Santana L., *Exp. Opin. Ther. Patents*, **2015**, 25, 351-366

<sup>4</sup> João Matos M., Vazquez-Rodriguez S., Uriarte E., Santana L., Borges F., *Exp. Opin. Ther. Patents*, **2015**, 25, 1285-1304

<sup>5</sup> Orlikova B.; Menezes J. C. J. M. D. S.; Ji S.; Kamat S. P.; Cavaleiro J. A. S.; Diederich M. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84, 173-180

<sup>6</sup> Batra P.; Sharma A.K. *3 Biotech.* **2013**, 3, 439-459

<sup>7</sup> Mahapatra D.K.; Bharti S.K.; Asati V. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 98, 69-114

Alzheimerera.<sup>8</sup> Opisano szereg pochodnych chromonów<sup>9,10</sup>, chromanonów<sup>11</sup> i flawonów<sup>12</sup> o różnej aktywności biologicznej, wśród których można wymienić liczną grupę związków o właściwościach cytotoksycznych. Pochodne chromonu badane były także jako związki o selektywnej cytotoksyczności wobec wielolekoopornych komórek białaczki HL60/MX2.<sup>13</sup>

Jednym ze wstępnych badań niezbędnych do określenia prawidłowego działania oraz bezpieczeństwa potencjalnego leku są badania cytotoksyczności z wykorzystaniem hodowli komórkowych *in vitro*. Mimo, iż w porównaniu z modelami zwierzęcymi, konwencjonalne metody *in vitro* stosowane do oznaczenia cytotoksyczności mają mniejszą specyficzność czy zdolność oceny mechanizmu działania, jest to powszechnie stosowane i bardzo użyteczne narzędzie do badań przesiewowych nowych związków. Niewątpliwą zaletą stosowania modeli komórkowych jest możliwość pracy na komórkach ludzkich, prawidłowych i nowotworowych, ale także szybkość i łatwość badania procesów komórkowych i molekularnych. Testowanie *in vitro* nowych związków pozwala na:

- i. selekcję substancji do dalszych badań na modelach zwierzęcych (*in vivo*),
- ii. wykorzystanie puli związków (zazwyczaj o zróżnicowanej sile działania) do analizy zależności struktura-aktywność (ang. structure-activity relationships, SAR),
- iii. ilościowe modelowanie wpływu struktury na aktywność biologiczną (ang. quantitative structure-activity relationships, QSAR).

Głównym celem analizy SAR jest określenie jakie, i w jaki sposób, zmiany w strukturze wpływają na określoną aktywność biologiczną związku (ang. endpoint), a uzyskane informacje mogą następnie zostać wykorzystane przy projektowaniu leków metodą opartą o strukturę farmakoforu lub wykorzystującej model miejsca wiążącego. Coraz częściej w procesie optymalizacji tzw. struktury wiodącej wykorzystuje się modelowanie ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR), pozwalających na ustalenie związku między budową i właściwościami z niej wynikającymi a działaniem biologicznym związków oraz prognozowanie ich aktywności (w tym toksyczności). Metodyka QSAR ma już ugruntowaną pozycję w chemii medycznej jako narzędzie wspomagające projektowanie nowych leków, a ponadto znalazła szerokie zastosowanie do oceny wpływu substancji chemicznych, materiałów i nanomateriałów na ludzkie zdrowie i środowisko.<sup>14</sup>

Szczególnie istotnym elementem w modelowaniu zależności struktura-aktywność jest wybór deskryptorów – cech strukturalnych lub fizykochemicznych opisujących badane związki. Zdecydowana większość z bardzo szerokiego spektrum deskryptorów

<sup>8</sup> Fosso M.Y.; McCarty K.; Head E.; Garneau-Tsodikova S.; LeVine III H. *ACS Chem. Neurosci.* **2016**, 7, 171-176

<sup>9</sup> Keri R.S.; Budagumpi S.; Pai R. K.; Balajrishna R. G. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 78, 340-374

<sup>10</sup> Gaspar A.; João Matos M.; Garrido J.; Uriarte E.; Borges F. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4960-4992

<sup>11</sup> Emami S.; Ghanbarimasir Z. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 93, 539-563

<sup>12</sup> Singh M.; Kaur M.; Silakari O. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 84, 206-239

<sup>13</sup> Puppala M.; Zhao X.; Casemore D.; Zhou B.; Aridoss G.; Narayanapillai S.; Xing C. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24, 1292-1297

<sup>14</sup> Cherkasov A. et al., *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 4977-5010.

molekularnych<sup>15</sup> to deskryptory obliczone z użyciem narzędzi chemoinformatycznych, jak np. deskryptory topologiczne, elektronowe czy geometryczne. Rolę deskryptorów mogą pełnić także wyznaczone eksperymentalnie parametry, jak chociażby  $\log P$  będący miarą lipofilowości związku.

Do eksperymentalnych źródeł informacji o strukturze związku oraz rodzaju oddziaływań międzycząsteczkowych należą badania krystalograficzne. Kluczową rolę w wielu procesach chemicznych i biologicznych, jak tworzenie struktur krystalicznych czy kompleksów pomiędzy białkowym receptorem i ligandem odgrywają oddziaływania niekowalencyjne (ang. non-covalent interactions), które, jakościowo i ilościowo, można opisać wykorzystując m.in. analizę powierzchni Hirshfelda.<sup>16</sup> Dobrym przykładem literaturowym może być analiza oddziaływań pomiędzy lekiem (sunitynib) i celem terapeutycznym przeprowadzona z wykorzystaniem analizy powierzchni Hirshfelda, która wykazała podobny schemat oddziaływań występujących pomiędzy cząsteczkami sunitynibu w kryształach jabłczanu jak i cząsteczką leku w kieszeni aktywnej enzymu.<sup>17</sup> Jednak stosunkowo nieliczne są prace gdzie rodzaj i udział słabych oddziaływań międzycząsteczkowych wynikający z analizy powierzchni Hirshfelda odnosi się do aktywności biologicznej związku. W prezentowanych badaniach podjęłam próbę zastosowania wyników dekompozycji powierzchni Hirshfelda czyli procentowych udziałów różnych słabych oddziaływań międzycząsteczkowych jako deskryptorów w modelowaniu zależności struktura-aktywność cytotoksyczna (**H3**) oraz określenia ich wpływu na lipofilowość związków (**H6**).

Analizę powierzchni Hirshfelda wykorzystałam również w opisie zależności struktura-fluorescencja w stanie stałym (**H6**). Pochodne chalkonu czy chromonu stanowią interesującą grupę związków zarówno ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznych, jak i możliwość emisji fluorescencji w roztworze i stanie stałym. Z powodu szerokiego wykorzystania zjawiska fluorescencji w wielu dziedzinach (diagnostyce medycznej, biologii molekularnej, analityce środowiskowej czy optoelektronice) poszukiwanie nowych organicznych związków o odpowiednich właściwościach jest ciągle aktualne. Wiele związków organicznych wykazuje intensywną fluorescencję w roztworze rozcieńczonym, natomiast w roztworze stężonym czy w ciele stałym następuje osłabienie lub całkowite wygaszenie fluorescencji, głównie ze względu na tendencję organicznych luminoforów do agregacji cząsteczek wraz ze wzrostem stężenia. Stąd też wartościowe jest zsyntezowanie i przebadanie związków wykazujących intensywną i wydajną fluorescencję zarówno w ciele stałym jak i w roztworze.

Innym obszarem wykorzystania związków organicznych, szczególnie tych wykazujących fluorescencję, jest projektowanie selektywnych sensorów jonów metali.<sup>18</sup> Fluorescencyjne sensory powinny posiadać dwie zasadnicze funkcje: zdolność wiązania

<sup>15</sup> Todeschini, R.; Consoni V., *Handbook of Molecular Descriptors*, **2009**, Wiley-VCH, Weinheim

<sup>16</sup> McKinnon J. J., Spackman M. A., Mitchel A. S. *Acta Cryst.* **2004**, B60, 627-668

<sup>17</sup> Malińska, M. et al., *Acta Cryst.*, **2014**, D70, 1257-1270

<sup>18</sup> Carter K.P., Young A. M., Palmer A.E. *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4564-4601



jonów metalu oraz co najmniej jeden fluorofor zdolny do absorpcji i emisji promieniowania. Wiązanie jonów metalu musi zmieniać strukturę elektronową lub molekularną sensora co prowadzi do zmiany intensywności i/lub długości fali absorbowanego czy emitowanego promieniowania albo wpływa na odległość lub orientację pomiędzy donorem i akceptorem. Priorytetową cechą jaką musi wykazywać potencjalny sensor jest wysoka selektywność wiązania jonów do oznaczania, których jest dedykowany.<sup>19</sup>

Ze względu na opisane wyżej cechy związków z grupy flawonoidów równolegle realizowałam dwa wątki badawcze czyli badania aktywności cytotoksycznej *in vitro* oraz analizę właściwości fluorescencyjnych otrzymanych pochodnych. Wyniki badań zostały zawarte w sześciu publikacjach (**H1 – H6**) stanowiących prezentowane osiągnięcie naukowe.

W omawianych badaniach pochodnych chalkonu, chromonu i chromanonu można wyróżnić **dwa główne cele:**

1. jakościową i ilościową analizę wpływu struktury badanych związków na ich aktywność cytotoksyczną *in vitro* względem linii komórkowych białaczki promielocytowej (HL-60) i limfoblastycznej (NALM-6) oraz czerniaka (WM115) (**H1, H2, H3**),
2. analizę właściwości fluorescencyjnych wybranych związków, w tym:
  - i. określenie zależności właściwości fluorescencyjnych w stanie stałym od struktury krystalicznej związków (**H5, H6**),
  - ii. wykorzystanie wybranych aminowych pochodnych chromonu i 2-fenylchromonu do poszukiwania potencjalnych fluorescencyjnych sensorów jonów Zn(II) (**H4, H5**).

### 2.3.2 Określenie wpływu struktury badanych związków na aktywność cytotoksyczną *in vitro*

Realizacja pierwszego celu głównego obejmowała szereg szczegółowych zadań:

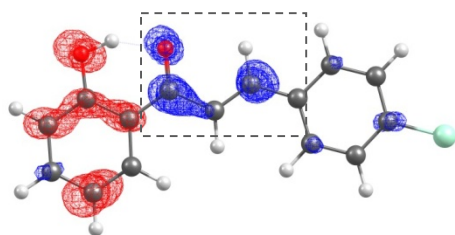
- i. analizę zależności struktura-aktywność cytotoksyczna *in vitro* (SAR) pochodnych chalkonu, chromonu i chromanonu;
- ii. określenie cytotoksyczności wyselekcjonowanych związków w stosunku do komórek prawidłowych;
- iii. zbudowanie modeli regresyjnych QSAR, opisujących ilościowe zależności aktywności cytotoksycznej *in vitro* od struktury i **opartych o zestaw interpretowalnych deskryptorów**,
- iv. **wykorzystanie analizy powierzchni Hirshfelda** (w oparciu o strukturę krystaliczną) jako narzędzia wspomagającego wyjaśnienie aktywności cytotoksycznej związków w świetle słabych niekwalencyjnych oddziaływań międzycząsteczkowych;

<sup>19</sup> Li J., Yin C., Huo F. *Dyes and Pigments*, **2016**, 131, 100-133



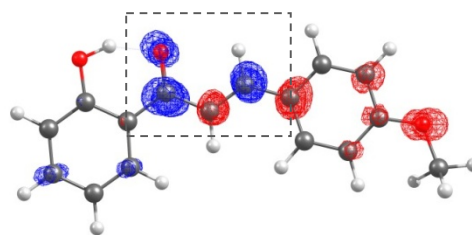
Wobec tego analizę zależności aktywności cytotoksycznej grupy podstawionych 2'-hydroksychalkonów od struktury przeprowadzono w oparciu o teorię miękkich i twardych kwasów i zasad (ang. Hard and Soft Acid and Base, HSAB) wykorzystując deskryptory reaktywności całej cząsteczki (globalne), reprezentowane przez właściwości elektronowe cząsteczki. Do opisu właściwości związków wykorzystano chemiczny potencjał elektronowy ( $\mu$ ), twardość chemiczną ( $\eta$ ) oraz definiowane w ich funkcji miękkość chemiczną ( $\sigma = 1-\eta$ ) oraz elektrofilowość ( $\omega = \mu^2/2\eta$ ). Wartości tych parametrów zostały obliczone na podstawie energii orbitali molekularnych HOMO i LUMO ( $\epsilon_{\text{HOMO}}$  i  $\epsilon_{\text{LUMO}}$ ). Względne różnice elektrofilowości badanych chalkonów są determinowane rodzajem i położeniem podstawników. Najłagodniejszy charakter elektrofilowy posiada niepodstawiony 2'-hydroksychalkon, natomiast najwyższą elektrofilowość wykazuje związek **9** z silnie elektronoakceptorową grupą  $\text{NO}_2$  w pozycji 4 pierścienia B.

Z punktu widzenia aktywności cytotoksycznej, istotny jest wpływ podstawników na gęstość elektronową w  $\alpha,\beta$ -nienasyconym karbonylowym fragmencie cząsteczki. Wizualizacja redystrybucji gęstości elektronowej związanej z przeniesieniem elektronów z orbitalu HOMO na LUMO pokazuje, że badane związki można podzielić na dwie grupy z wyraźnie różniącym się układem obszarów o elektrofilowym i nukleofilowym charakterze (Ryc. 3). Układ I, zaobserwowany dla siedmiu badanych chalkonów, charakteryzuje zmniejszenie gęstości elektronowej w pierścieniu A i jej zwiększenie w centralnej części cząsteczki, co wskazuje na elektrofilowy charakter ugrupowania  $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ . Dla pozostałych chalkonów (układ II) obserwuje się przeniesienie elektronów z pierścienia B oraz niejednorodny rozkład gęstości elektronowej w  $\alpha,\beta$ -nienasyconym karbonylowym fragmencie. Widoczny jest wzrost gęstości elektronowej tylko w obrębie grupy karbonylowej i atomu  $\text{C}_\beta$  oraz wyraźny deficyt elektronów na atomie  $\text{C}_\alpha$  (Ryc. 3b).



a) układ I (związki 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9)

$\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$  (HL-60, NALM-6)



b) układ II (związki 1, 5, 10, 11)

$\text{IC}_{50} \approx 18 - 70 \mu\text{M}$  (HL-60, NALM-6)

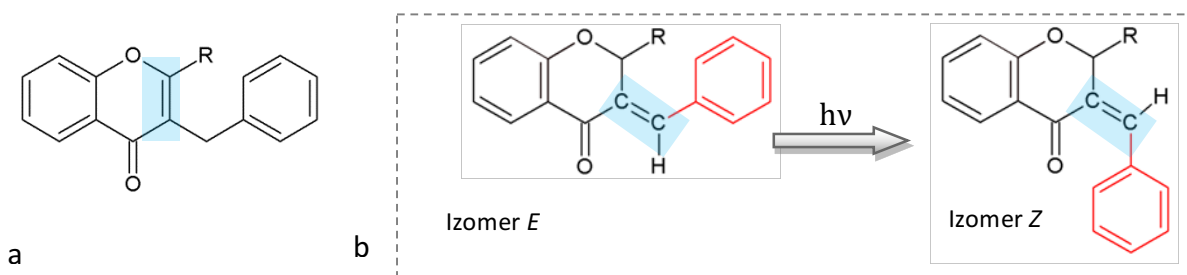
**Ryc. 3.** Dwa charakterystyczne układy redystrybucji gęstości elektronowej orbitali molekularnych LUMO i HOMO ( $|\Psi_{\text{LUMO}}|^2 - |\Psi_{\text{HOMO}}|^2$ ) pochodnych chalkonu. **Czerwonym** kolorem zaznaczono obszar cząsteczki o deficycie elektronów związanym z przeniesieniem elektronu, natomiast **niebieski** kolor oznacza obszar o zwiększonej gęstości elektronowej (fragment Tabeli 5 z pracy **H1**).

Badania potwierdziły dostępną wiedzę, że różny rozkład gęstości elektronowej w cząsteczce związany jest z położeniem i charakterem podstawników. Determinuje to podział chalkonów na dwie grupy i koreluje z ich cytotoksycznością względem linii komórkowych

białaczki (Ryc. 3). Związki, w których najbardziej bogatym w elektrony obszarem jest pierścień A, a cały  $\alpha,\beta$ -nienasycony karbonylowy fragment ma charakter elektrofilowy, wykazują wyższą aktywność cytotoksyczną (niższe wartości  $IC_{50}$ ). Taki układ można osiągnąć przez umieszczenie elektronodonorowego podstawnika OH w pierścieniu A lub grup elektroakceptorowych, jak Cl, Br,  $NO_2$ , w pierścieniu B. Stwierdzone zależności wskazują, że wykorzystanie parametrów globalnej reaktywności do opisu/przewidywania cytotoksyczności pochodnych chalkonu wydaje się uzasadnione.

Wykonana w kolejnym etapie badań analiza ilościowych zależności struktura-aktywność (QSAR) z wykorzystaniem regresji wielokrotnej (ang. multilinear regression, MLR) potwierdziła to przypuszczenie (szczegółowy opis umieszczono w rozdziale Ilościowe zależności struktura-cytotoksyczność in vitro (QSAR)).

W dalszych badaniach zależności aktywności cytotoksycznej *in vitro* od struktury wykorzystano grupę pochodnych 2-fenylochromanonu (seria **1**), chromanonu (seria **2**) oraz 2-fenylochromanonu (seria **3**), których cechą wspólną jest podstawnik aryldenowy w pozycji C3 (publikacja **H2**). Związki te charakteryzują się większą masą molową oraz lipofilowością (wyższe log P) w porównaniu do chalkonów. Seria **3** to 3-arylopo pochodne flawonu z podwójnym wiązaniem C2=C3 (Ryc. 4a). Z kolei wprowadzenie do cząsteczki (seria **1** i **2**) nienasyconego fragmentu aryldenowego może mieć pewne konsekwencje, przede wszystkim może powodować występowanie izomerii *E,Z* (Ryc. 4b), ale także prowadzić do wzrostu toksyczności, wywołać zmianę gęstości elektronowej czy umożliwić aktywację w wyniku koniugacji.<sup>21</sup>



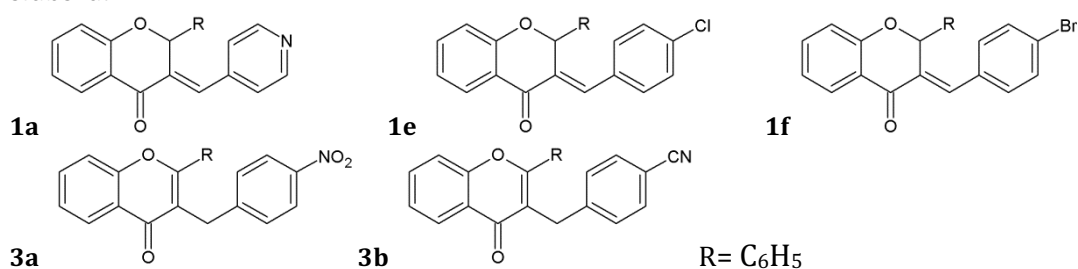
**Ryc. 4.** Wzór ogólny 3-arylo-2-fenylochromanonu ( $R = C_6H_5$ ) – a oraz izomeria *E,Z* pochodnych 3-arylideno-chromanonu i 3-arylideno-2-fenylochromanonu ( $R = H, C_6H_5$ ) – b.

Znaczący wpływ rodzaju izomeru na cytotoksyczność związków względem linii komórkowej HL-60 stwierdzono tylko w przypadku chloro- i bromo-pochodnych (**1e** i **1f**, Ryc. 5), dla których izomery *Z* wykazują brak aktywności cytotoksycznej ( $IC_{50} > 1000 \mu M$ ) podczas gdy dla izomerów *E* wartość  $IC_{50}$  wynosi ok.  $6 \mu M$ . Dla drugiej linii komórkowej białaczki (NALM-6) izomery *Z* większości związków straciły aktywność lub uległa ona znacznemu obniżeniu. Z kolei wobec komórek czerniaka (WM115) to izomer *Z* w kilku przypadkach wykazuje korzystniejszą cytotoksyczność. Należy zwrócić uwagę, że (i) związek **1a** (pochodna

<sup>21</sup> Wermuth, C. G. (Ed.) The practice of medicinal Chemistry, **2008**, Elsevier Inc

flawanonu z podstawnikiem pirydylowym) wykazuje wysoką ( $IC_{50} \approx 1 \mu M$ ) i niezależną od izomerii aktywność wobec obu linii komórek białaczkowych, (ii) związki **3a** i **3b** wykazują wysoką i porównywalną cytotoksyczność względem wszystkich trzech linii komórkowych. Zarówno w przypadku 3-arylidenopochodnych flawanonu jak i 3-arylopochoodnych flawanu korzystny wpływ na cytotoksyczność związku mają elektronoakceptorowe podstawniki Cl, Br,  $NO_2$  i CN (związki **1e**, **1f**, **3a** i **3b**).

Trzecia grupa związków to pochodne flawanu zawierające skondensowany pierścień 2-pirazoliny, które otrzymano w reakcji 3-arylidenoflawanonów z metylohydrazyną (**H3**). Badania wykonane na linii komórkowej białaczki (HL-60) wykazały, że większość związków charakteryzuje przeciętna aktywność cytotoksyczna (wartość  $IC_{50}$  ok. 20-100  $\mu M$ ) i w porównaniu do odpowiednich 3-arylidenoflawanonów lub 3-aryloflawonów jest ona słabsza.



**Ryc. 5.** Wybrane pochodne 3-arylidenoflawanonu oraz 3-aryloflawonu (publikacja **H2**)

Jedynie związki z podstawnikiem halogenowym, Cl lub Br, wykazują cytotoksyczność na porównywalnym, niskim poziomie jak ich odpowiedniki w grupie 3-arylidenoflawanonów. Ten fakt jak również wyniki badania na komórkach prawidłowych mogą wskazywać na dominującą rolę atomu chloru i bromu oraz oddziaływań z ich udziałem w aktywności cytotoksycznej, co zostało przedyskutowane w kolejnym rozdziale.

### Cytotoksyczność *in vitro* względem komórek prawidłowych (HUVEC)

W celu oceny selektywności działania cytotoksycznego związków niezbędne jest wykonanie testów na komórkach prawidłowych. W opisywanych badaniach zostały wykorzystane ludzkie komórki śródbłonna żyły pępowinowej (ang. human umbilical vein endothelial cells, HUVEC). Badania przeprowadzono dla wybranych pochodnych. Wyselekcjonowano związki z podstawnikiem Cl i Br (**7**, **1e**, **1f** oraz **1k**, **1l**), a także najbardziej aktywne związki z grupy 3-arylidenoflawanonów (**1a**, izomery *Z* i *E*) i z grupy 3-aryloflawonów (**3a**). Związek **1f** z grupy 3-arylidenoflawanonów oprócz tego, że posiada atom halogenu (Br) jako podstawnik, reprezentuje przypadek gdzie aktywny jest tylko izomer *E*. Badania z udziałem komórek HUVEC przyniosły następujące rezultaty:

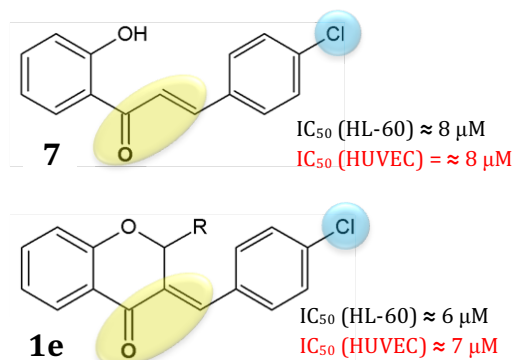
- i. związek **1a** wykazuje ok. 5-krotnie niższą cytotoksyczność wobec komórek zdrowych niż komórek nowotworowych, ale jest to nadal aktywność zbyt wysoka ( $IC_{50} \approx 5 \mu M$ ),
- ii. związek **3a** ma ok. 2-krotnie niższą cytotoksyczność względem komórek zdrowych niż wobec HL-60. Natomiast aktywność cytotoksyczna **3a** względem

komórek HUVEC oraz linii nowotworowych NALM-6 i WM115 jest porównywalna,

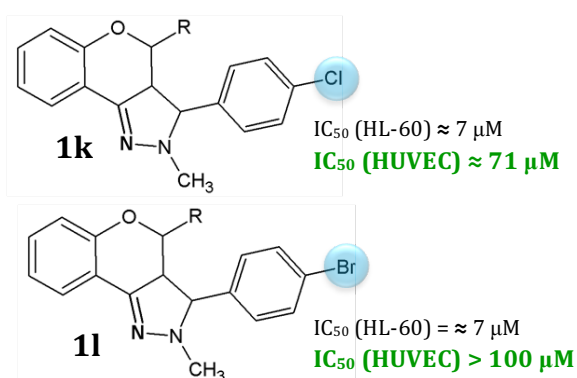
- iii. zaskakująco, izomer Z związku **1f** jest bardziej cytotoksyczny w stosunku do komórek zdrowych niż białaczki (HL-60).

Na szczególną uwagę zasługują związki posiadające jako podstawnik atom Cl lub Br. Badania przeprowadzone na komórkach prawidłowych, których wyniki podsumowano na Ryc. 6, wykazały brak selektywnego działania cytotoksycznego w przypadku chalkonu i 3-arylideno-flawanonu z podstawnikiem Cl. Cytotoksyczność tych związków wobec komórek zdrowych jest niestety na podobnym poziomie jak wobec komórek nowotworowych (HL-60). Na podkreślenie zasługuje fakt, że **pochodne 2-pyrazoliny (1k i 1l)** okazały się mało lub praktycznie nietoksyczne dla komórek prawidłowych.

#### Toksyczne dla komórek prawidłowych



#### Niska lub brak aktywności w stosunku do komórek prawidłowych



**Ryc. 6.** Porównanie cytotoksyczności pochodnych halogenowych chalkonu, 3-arylideno-flawanonu oraz związków z pierścieniem 2-pyrazoliny względem linii komórkowej białaczki HL-60 i komórek prawidłowych HUVEC ( $R=C_6H_5$ ).

Analiza SAR grupy pochodnych chalkonów oraz dane literaturowe sugerują udział elektrofilowego układu: wiązania  $C_\alpha=C_\beta$  sprzężonego z grupą karbonylową w aktywności cytotoksycznej. Podobny układ można wskazać w cząsteczce 3-arylideno-pochodnych (zaznaczony żółtym kolorem na Ryc. 6), natomiast w trzeciej grupie związków został on „zablokowany” przez pierścień 2-pyrazoliny (związki **1k** i **1l**). Pozbawienie związku wolnej grupy karbonylowej oraz wiązania podwójnego ( $C_\alpha=C_\beta$ ) przy jednoczesnym zachowaniu podstawnika halogenowego wydaje się być przyczyną selektywnej cytotoksyczności pochodnych pirazoliny a jednocześnie wskazuje na atom halogenu jako odpowiedzialnego za aktywność wobec komórek nowotworowych.

Atomy Cl i Br mogą tworzyć wiązania halogenowe a oddziaływania tego typu można wyjaśnić na gruncie koncepcji tzw. dziury  $\sigma$  (ang.  $\sigma$ -hole) wprowadzonej przez Politzera.<sup>22,23</sup> Powstanie dziury  $\sigma$  tłumaczy się anizotropią rozkładu gęstości elektronowej wokół atomu

<sup>22</sup> P. Politzer, P. Lane, M.C. Concha, Y. Ma, J.S. Murray, *J. Mol. Mod.*, **2007**, 13, 305

<sup>23</sup> P. Politzer, J.S. Murray, T. Clark, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, 12, 7748

chlorowca, która skutkuje nadmiarem ładunku ujemnego w kierunku prostopadłym do wiązania C-X, natomiast niedoborem elektronów (czyli nadmiarem ładunku dodatniego) wzdłuż wiązania C-X. Dlatego też związki posiadające wiązanie C-X mają unikalne właściwości, mianowicie zgodnie z kierunkiem wiązania mogą oddziaływać jako kwasy Lewisa, a w kierunku prostopadłym jako zasady Lewisa. Z analizy map potencjału elektrostatycznego dla pochodnych halogenowych, których struktury pokazano na Ryc. 6 wynika, że wzdłuż wiązania C-X (X = Cl, Br) potencjał wykazuje bardziej dodatni charakter, tzw. dziurę  $\sigma$ , który zdecydowanie wzrasta w szeregu  $7 < 1e < 1k < 1l$  (Ryc. 8S, w publikacji **H3**). Obecność w strukturze związku wiązań halogenowych potwierdza także analiza danych krystalograficznych. W strukturze krystalicznej związku **1k** występują wiązania dihalogenowe C-Cl...Cl, o długości 3,232 Å. Połączenia typu X...X to szczególny przypadek wiązań halogenowych. Tego typu wiązania możliwe są ponieważ atom chlorowca może pełnić zarówno rolę centrum kwasu jak i zasady Lewisa. Z kolei dla związku **1l** charakterystyczne są wiązania C-H...Br.

### Ilościowe zależności struktura-cytotoksyczność *in vitro* (QSAR)

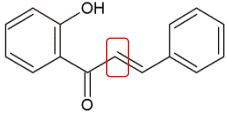
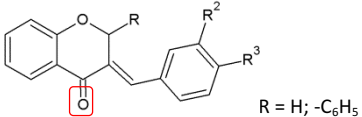
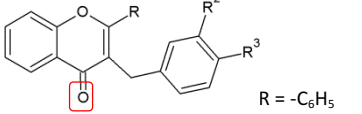
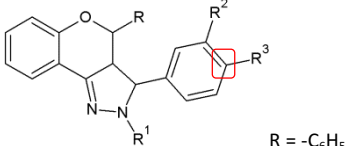
Według zaleceń OECD (ang. Organization for Economic Cooperation and Development),<sup>24</sup> dobry model QSAR powinien spełniać pięć kryteriów: (i) mieć jednoznacznie zdefiniowaną modelowaną własność (aktywność biologiczną lub właściwość fizykochemiczną), (ii) być wyrażony w postaci jednoznacznego algorytmu/równania, (iii) mieć zdefiniowaną dziedzinę zastosowania, (iv) być odpowiednio zwalidowany oraz (v) jeśli to możliwe, być związany z mechanistyczną interpretacją. Spełnienie tych wymagań jest obligatoryjne w przypadku modeli przedstawianych do oceny organom regulacyjnym, np. w systemie REACH (ang. Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals). W omawianych badaniach modele konstruowano, w miarę możliwości, według powyższych zaleceń traktując je jako dobrą praktykę modelowania QSAR.

W Tabeli 1 umieszczono zestawienie istotnych deskryptorów wchodzących do równań QSAR wyznaczonych dla badanych grup związków metodą regresji wielokrotnej (ang. Multilinear Regression, MLR). W konstruowanych modelach, przy wyborze istotnych zmiennych zastosowano metodę krokową postępującą w przypadku chalkonów oraz związków z pierścieniem 2-pirazoliny, natomiast dla 3-arylidenochromanonów i 3-arylochromanonów wykorzystano algorytm genetyczny. Dla pochodnych chalkonu do równania reprezentującego Model 1 (dla linii komórkowej HL-60) weszły dwa istotne deskryptory: potencjał chemiczny  $\mu$  i ładunek cząstkowy na atomie  $C_{\alpha}$ . Pozostałe dwa modele zostały zbudowane w oparciu o pojedyncze parametry tj. indeks elektrofilowości  $\omega$  (Model 2) i potencjał chemiczny  $\mu$  (Model 3), odpowiednio dla linii komórkowych białaczki NALM-6 i czerniaka WM115. Jednocześnie warto zaznaczyć, że dla grupy chalkonów stwierdzono brak istotnej korelacji pomiędzy cytotoksycznością a lipofilowością związków

<sup>24</sup> OECD Guidance document on the validation of (Quantitative)Structure-Activity Relationships [Q(SAR)] models, ENV/JM/MONO(2007)2

wyrażoną jako wartość  $\log P$  (wyznaczoną eksperymentalnie dla układu oktanol-woda). Jest to zgodne z modelami QSAR opisanymi dla pochodnych chalkonu z prostymi podstawnikami, jak atomy halogenu, grupa  $\text{CH}_3$  lub  $\text{OCH}_3$ , przez Katsori i Hadjipavlou-Litina<sup>25</sup>. Jednak już w przypadku analogów chalkonów o bardziej złożonej strukturze, z dodatkowym pierścieniem czy z rozgałęzionymi podstawnikami lipofilowość nabiera znaczenia i w równaniach modeli QSAR jako deskryptor występuje wartość  $\text{clog}P$ <sup>18, 26</sup>.

**Tabela 1.** Podsumowanie istotnych deskryptorów wchodzących do równań QSAR wyznaczonych metodą regresji wielokrotnej (MLR)

Grupa związków	Deskryptory w modelu MLR dla linii komórkowych		
	HL-60	NALM-6	WM115
	HL-60 $\mu$ - potencjał chemiczny $\delta C_\alpha$ – cząstkowy ładunek na atomie węgla $\alpha$	NALM-6 $\omega$ – elektrofilowość	WM115 $\mu$ - potencjał chemiczny
	HL-60 $\log P_{\text{exp}}$ $E_{\text{LUMO}}$	NALM-6 $\log P_{\text{exp}}$ $E_{\text{LUMO}}$ $\delta O2$	WM115 $\log P_{\text{exp}}$ $E_{\text{LUMO}}$ $\delta O2$
	$(\log P_{\text{exp}})^2$ , $(E_{\text{LUMO}})^2$ , $\log P_{\text{exp}} \cdot E_{\text{LUMO}}^*$	$\log P_{\text{exp}} \cdot \delta O2$	$(\log P_{\text{exp}})^2$ , $\log P_{\text{exp}} \cdot \delta O2$
	HL-60 $\delta C35$ – cząstkowy ładunek na atomie węgla przy podstawniku R3 <b>Mor04v</b> – wagowany objętością van der Waalsa		

\* – na niebiesko zaznaczono dodatkowe efekty uwzględnione w równaniach,

□ – zaznaczono atomy, na których ładunki cząstkowe stanowią deskryptory w modelach

W przypadku badanych chalkonów modele regresyjne zawierały wyłącznie parametry związane z właściwościami elektronowymi związków. Natomiast dla pochodnych 3-arylidenochromanonu i 3-arylidenochromonu wykazano, że ich cytotoksyczność zależy zarówno od właściwości elektronowych, jak i lipofilowości cząsteczki. Związki te charakteryzują się większą masą molową oraz wyższymi wartościami  $\log P$  (większą lipofilowością) w porównaniu do chalkonów. W równaniach reprezentujących wszystkie trzy modele (dla trzech linii komórkowych: HL-60, NALM-6 i WM115) jako deskryptory występują energia orbitalu LUMO ( $E_{\text{LUMO}}$ ) oraz wartość  $\log P$  (wyznaczona eksperymentalnie), natomiast w modelach dla linii komórkowych NALM-6 oraz WM115 dodatkową zmienną jest ładunek cząstkowy na atomie tlenu grupy karbonylowej ( $\delta O2$ ) (Tabela 1). Należy zaznaczyć, że model dla cytotoksyczności względem linii komórkowej NALM-6 jest modelem regresji czynnikowej, która uwzględnia interakcję deskryptorów

<sup>25</sup> A.-M. Katsori, D. Hadjipavlou-Litina, *Curr. Med. Chem.*, **2009**, 16, 1062-1081

<sup>26</sup> A. Repanas, A.-M. Katsori, D. Hadjipavlou-Litina, *Mini Rev Med Chem.*, **2013**, 13, 952-70



( $\log P_{\text{exp}} \cdot E_{\text{LUMO}}$ ). Dwa kolejne modele (dla HL-60 i WM115) reprezentowane są przez równania wielomianowe z efektem interakcji, a dokładniej są modelami kwadratowej regresji powierzchni odpowiedzi. Pierwszy z modeli jest kompletny, zawiera kwadraty obu deskryptorów oraz wyrażenie iloczynowe  $\log P_{\text{exp}} \cdot E_{\text{LUMO}}$ , natomiast drugi ma charakter frakcyjny, tylko dla  $\log P$  został uwzględniony wyraz kwadratowy oraz tylko jedna interakcja  $\log P_{\text{exp}} \cdot \delta O_2$ .

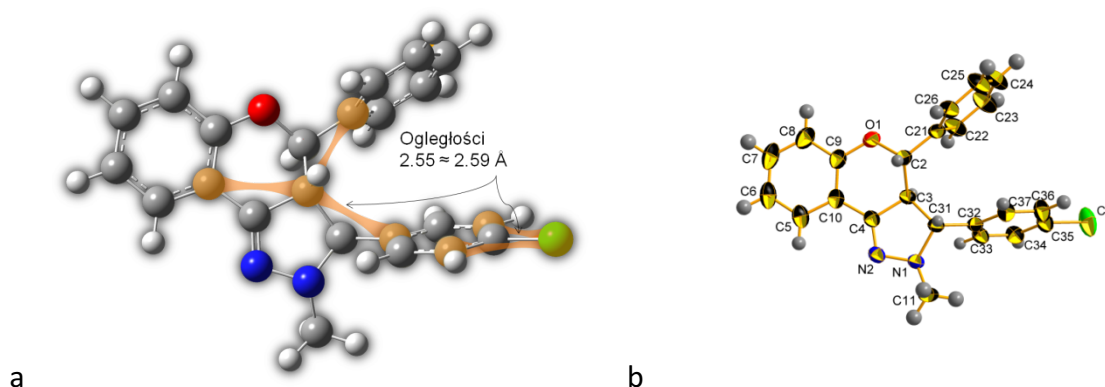
Energia orbitalu LUMO oraz lipofilowość należą do parametrów często wykorzystywanych w analizie QSAR do modelowania toksyczności związków o potencjalnie kowalencyjnym jak również niekowalencyjnym mechanizmie działania. Uznaje się, że kowalencyjny mechanizm działania toksycznego wymaga właściwości elektrofilowych aktywnego związku. Zgodnie z teorią miękkich i twardych kwasów i zasad (HSAB) związek o charakterze miękkiego elektrofila posiada niskie wartości  $E_{\text{LUMO}}$  i może łatwo oddziaływać z energetycznie zbliżonym orbitalem HOMO miękkiego nukleofila.<sup>27</sup> W grupie pochodnych 3-arylidenochromanonu i 3-arylidenochromonu wysokie wartości indeksu elektrofilowości (obliczone na podstawie energii orbitali HOMO i LUMO) korelują z wysoką cytotoxycnością. Z drugiej strony efektywne cytotoxyczne działanie związków wymaga odpowiedniej lipofilowości i tutaj wraz ze wzrostem  $\log P$  obserwuje się redukcję aktywności. Najbardziej aktywny związek **1a** (struktura związku na Ryc. 5) charakteryzuje się względnie niskim  $\log P$  (ok. 2,9) oraz stosunkowo wysoką elektrofilowością.

Trzecia badana grupa związków to pochodne 3-arylidenoflawanonów ze skondensowanym pierścieniem 2-pirazoliny. Próby modelowania ilościowych zależności struktura – aktywność, w oparciu o globalne i lokalne deskryptory reaktywności oraz  $\log P$ , dla tej serii związków okazały się nieudane. Fakt ten skłonił do poszukiwania innych istotnych, ale jednocześnie możliwie dobrze zdefiniowanych i interpretowalnych deskryptorów. Doprowadziło do uzyskania modelu z udziałem dwóch deskryptorów: Mor04v oraz  $\delta C_{35}$ . Pierwszy z nich, Mor04v, należy do grupy deskryptorów 3D-MoRSE (ang. **M**olecular **R**epresentation of **S**tructures based on **E**lectron dyfraction) obliczanych na podstawie trójwymiarowej struktury cząsteczki a drugi to cząstkowy ładunek na atomie węgla przy podstawniku R3 (Tabela 1).

Zastosowanie deskryptora z grupy 3D-MoRSE umożliwia jednoznaczne powiązanie jego wartości z określonymi elementami struktury (odległościami pomiędzy atomami) i wyróżnienia fragmentów cząsteczki mających największy wkład w aktywność cytotoxyczną. Wizualizacja przebiegu radialnej funkcji bazowej od odległości międzyatomowej wskazuje, że największy wpływ na wartość (dodatnią) deskryptora mają odległości rzędu 2,5 Å pomiędzy atomami Cl i C oraz dwoma atomami węgla. W strukturze związku w takiej odległości znaleziono trzy pary atomów węgla, ze wspólnym atomem C3 (odpowiednie odległości zaznaczono na Ryc. 7).

<sup>27</sup> S. J. Enoch w *Recent Advances in QSAR Studies. Methods and Applications*. (Ed. T. Puzyn, J. Leszczynski, M. T. D. Cronin), **2010**, Springer, str. 15, 20

Przyczyną krótkich odległości między atomami C3 i C21 oraz C3 i C32 jest odchylenie od planarności trójcyklicznego fragmentu cząsteczki, determinowane brakiem wiązania podwójnego pomiędzy atomami C2 i C3, oraz odpowiednie ułożenie fenylowych podstawników. Struktura molekularna związku **1k** potwierdza odległości między atomami węgla zidentyfikowane na podstawie wartości Mor04v (Ryc. 7b). Graficzna interpretacja deskryptora Mor04v wskazuje, że na cytotoksyczność badanych związków, oprócz deformacji układu chromanu skondensowanego z 2-pirazoliną, wpływa także obecność atomu chloru. Optymalna odległość międzyatomowa (rzędu 2,5 Å) występuje również pomiędzy atomami Cl i C34 oraz Cl i C36. W związku z tym, obecność w równaniu modelu cząstkowego ładunku na atomie C przy podstawniku R3, jako drugiego deskryptora, wydaje się uzasadniona.



**Ryc. 7.** Struktura związku **1k** z zaznaczonymi odległościami 2,5 -2,6 Å: C3-C10, C3-C21 i C3-C32 oraz Cl-C34 i Cl-C36 (a) i struktura molekularna z numeracją atomów (b).

### Walidacja uzyskanych modeli QSAR

QSAR to model matematyczny odnoszący parametry wyprowadzone ze struktury chemicznej związków do ilościowej miary danej ich właściwości lub aktywności. Wykorzystanie modelu QSAR w celach prognostycznych wymaga oceny jego ważności oraz sprawdzenia, czy substancja mieści się w dziedzinie zastosowania danego modelu.<sup>28</sup> To dopiero pozwala przewidywane wyniki uznać za wiarygodne. Stąd ogromną wagę przywiązuje się do walidacji budowanych modeli. Specyfika modeli QSAR powoduje, że ich walidacja wymaga stosowania różnych parametrów (ang. validation metrics), z czego ocena dopasowania za pomocą współczynnika determinacji  $R^2$  (kwadratu współczynnika korelacji liniowej  $r$ ) lub pierwiastka średniego błędu kwadratowego RMSE (ang. root mean square error) stanowi niezbędne minimum. W ostatnich dwóch latach ukazało się szereg publikacji zawierających zarówno krytyczną dyskusję przydatności różnych parametrów statystycznych stosowanych do walidacji modeli jak i propozycje ich modyfikacji.<sup>28,29,30</sup>

<sup>28</sup> K. Roy, S. Kar, P. Ambure, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, 145, 22-29

<sup>29</sup> D. L. Alexander, A. Tropsha, D. A. Winkler, *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, 55, 1316-1322

<sup>30</sup> P. Gramatica, A. Sangion, *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00088

Wszystkie zbudowane modele zostały poddane walidacji wewnętrznej, przeprowadzanej na zbiorze uczącym/kalibracyjnym, której celem jest ocena dopasowania modelu oraz uniknięcie modelu będącego wynikiem przypadkowej korelacji. W tym celu zastosowano walidację krzyżową metodą „wyrzuć jeden” (LOO, leave-one-out). Natomiast walidację zewnętrzną realizuje się przez wykorzystanie zbioru testowego, zawierającego nowe związki, co wykonano dla związków opublikowanych w pracach **H2** i **H3**. Dla grupy chalkonów, ze względu na stosunkowo niewielką liczbę związków, nie wyłączono zbioru testowego i wykonano tylko walidację krzyżową. Natomiast w celu wykluczenia modeli przeuczonych zastosowano randomizację zmiennej zależnej Y (ang. Y-randomization), wykonując 10-krotną losową permutację wartości zmiennej zależnej ( $\log 1/IC_{50}$ ) przy zachowaniu stałego układu zmiennych niezależnych (**H1**, **H3**). Porównanie parametrów modelu oryginalnego i modeli utworzonych dla każdej permutacji wskazało znacząco większą wiarygodność tego pierwszego (Tabele 5 i 3, odpowiednio w **H1** i **H3**).

Wiarygodność prognozowania aktywności na podstawie modelu QSAR, zależy przede wszystkim od tego czy związek należy do dziedziny zastosowania danego modelu (ang. applicability domain, AD). Koncepcja dziedziny modelu pozwala ocenić prawdopodobieństwo przynależności związku do zbioru uczącego (kalibracyjnego) oraz wskazać wyniki nietypowe (ang. outliers), które posiadają niepasujące do modelu wartości zmiennej zależnej lub nietypowe wartości deskryptorów. W omawianych pracach, do określenia dziedziny modelu, wykorzystano wykresy Williama czyli zależność studentyzowanych reszt modelu od tzw. dźwigni (ang. leverage) każdego wyniku wyrażonej jako wartość  $h_i$  (ang. hat-value). Graficzna forma, jaką jest wykres Williama, pozwala na szybką diagnostykę przypadków odstających ze względu na nietypową wartość  $IC_{50}$  i/lub nietypową wartość dźwigni. W modelu 2 dla grupy chalkonów (publ. **H1**) wykluczono związek **9** (z podstawnikiem  $NO_2$ ) z powodu nietypowej (zbyt wysokiej) elektrofilowości, a tym samym wysokiej wartości dźwigni. Z kolei związek **7** wykazywał 10-krotnie wyższą aktywność względem linii komórkowej czerniaka niż pozostałe związki i został zidentyfikowany jako tzw. activity outlier. Opisane w publikacji **H2** związki, mimo strukturalnego zróżnicowania, wszystkie należały do dziedziny modelu. Podobnie w przypadku modelu 2 w publikacji **H3** opartego o deskryptory pochodzące z analizy powierzchni Hirshfelda (model szczegółowo omówiono w kolejnym rozdziale). Natomiast w modelu 1 z tej samej pracy nie uwzględniono związków **1g** i **1h** zidentyfikowanych jako odstające w zakresie zmiennej zależnej (dla obu związków  $IC_{50} > 100 \mu M$ ) oraz związek **1r**, za wykluczenie którego najprawdopodobniej odpowiada obecność podstawnika  $COCH_3$  przy atomie azotu w pierścieniu 2-pirazoliny.

### **Wykorzystanie analizy powierzchni Hirshfelda w modelowaniu QSAR**

W pracy **H3** podjęto próbę wykorzystania ilościowej informacji o różnych międzycząsteczkowych oddziaływaniach, jaką daje analiza powierzchni Hirshfelda, w modelowaniu aktywności cytotoksycznej. **Do równania modelu weszły dwa istotne statystycznie deskryptory: udziały oddziaływań typu H...H ( $f_{H...H}$ ) oraz interakcji**

**angażujących atom halogenu, Cl lub Br ( $f_{hal}$ ).** Model został skonstruowany dla 14 związków o rozwiązanej strukturze krystalicznej. Warto zwrócić uwagę, że zbiór stanowiły związki z różnych grup: trzy chalkony, jeden 3-arylidenoflawanon, siedem pochodnych z pierścieniem 2-pirazoliny oraz trzy związki z pierścieniem 1-pirazoliny. Pomimo różnorodności strukturalnej, żaden nie został wykluczony z dziedziny modelu, co świadczy o pewnej uniwersalności tego modelu. Przynależność do dziedziny zastosowania modelu oceniono na podstawie wykresu Williama oraz nowego podejścia zaproponowanego przez Roya i in.<sup>31</sup> wykorzystującego standaryzację deskryptorów (ang. standardization approach). Opisany algorytm definiuje kryteria wykluczenia związku z dziedziny modelu w oparciu o zakres rozrzutu wartości deskryptorów dla związków w zbiorze uczącym (średnia  $\pm$  3·odch. stand), stąd wartość deskryptora po standaryzacji nie powinna przekraczać 3).

Zaproponowany model został poddany także rygorystycznej walidacji. Oprócz walidacji wewnętrznej metodą LOO, randomizacji zmiennej zależnej, wykonano walidację zewnętrzną z wykorzystaniem 4-elementowego zbioru testowego (pozostałe 10 związków włączono do zbioru uczącego). Weryfikacja zdolności predykcyjnych modelu została oparta o dwie miary bazujące na resztach prognozy: pierwiastek błędu kwadratowego predykcji (ang. Root Mean Square Error of Prediction, RSMEP) oraz średni błąd bezwzględny (ang. Mean Absolute Error, MAE). RMSEP uwzględnia kwadraty różnic między wartościami rzeczywistymi  $IC_{50}$  a prognozowanymi, natomiast MAE różnice bezwzględne. Ze względu na arbitralne podejście do oceny wartości MAE, niedawno Roy i in.<sup>32</sup> zaproponowali dwa kryteria akceptacji oparte o zakres wartości modelowanej własności w zbiorze uczącym (wyrażonej w skali logarytmicznej). Takie podejście wymaga jednak włączenia do zbioru testowego co najmniej 10 związków (*mimo tego ograniczenia zostało ono zastosowane w publikacji H3, zgodnie z sugestią recenzenta*). Omawiany model spełnia jedno z dwóch nowych kryteriów akceptacji (drugie przekracza tylko nieznacznie) co oznacza, że model posiada co najmniej przeciętną zdolność prognostyczną. Z kolei wartość RMSEP = 0,135 jest tego samego rzędu co błąd walidacji krzyżowej (RMSECV = 0,135) i niespełna dwukrotnie wyższy niż błąd kalibracji (RMSEC = 0,084). Zastosowanie obu tych miar wpisuje się pozytywnie w aktualną dyskusję na temat przydatności statystycznych parametrów walidacji. Gramatica i Sangion,<sup>33</sup> sugerują, że nie można RMSE i MAE traktować równoważnie, a najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie zarówno jednego jak i drugiego parametru.

Wyniki walidacji zewnętrznej mogą wskazywać na przydatność tego modelu do celów predykcyjnych, jednak należy wyraźnie zaznaczyć, że w perspektywicznych badaniach potwierdzenie tego faktu oraz sugerowanej wcześniej uniwersalności modelu będzie wymagało znacznie liczniejszego zbioru związków.

<sup>31</sup> K. Roy, S. Kar, P. Ambure, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**, 145, 22-29

<sup>32</sup> K. Roy, R. N. Das, P. Ambure, R. B. Aher, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2016**, 152, 18-33

<sup>33</sup> P. Gramatica, A. Sangion, *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00088

### 2.3.3 Analiza właściwości fluorescencyjnych badanych związków

Równoległe z badaniami biologicznymi prowadzona była analiza właściwości fluorescencyjnych pochodnych chromonu i chromanonu zarówno w stanie stałym jak i w roztworze. W tych badaniach wykorzystano pochodne 3-arylideno-2-fenylchromanonu skondensowane z pierścieniem 2-pirazoliny oraz pochodne aminowe chromonu i ich związki kompleksowe z jonami Zn(II).

Realizacja drugiego głównego celu badań obejmowała:

- analizę **zależności właściwości fluorescencyjnych związków w stanie stałym od struktury krystalicznej** z wykorzystaniem analizy powierzchni Hirshfelda,
- wskazania rodzaju słabych oddziaływań międzycząsteczkowych odpowiedzialnych za lipofilowość ( $\log P$ ) pochodnych 3-arylideno-2-fenylchromanonu skondensowanych z pierścieniem 2-pirazoliny,
- znalezienia korelacji pomiędzy procentowymi udziałami poszczególnych oddziaływań międzycząsteczkowych w powierzchni Hirshfelda a parametrami charakteryzującymi właściwości fluorescencyjne tych związków: czasem zaniku fluorescencji i stałymi szybkości procesów promienistych i bezpromienistych,
- określenie właściwości fluorescencyjnych w roztworze oraz charakterystykę analityczną 7-amino-2-metylo-chromonu jako potencjalnego fluorescencyjnego sensora jonów Zn(II).

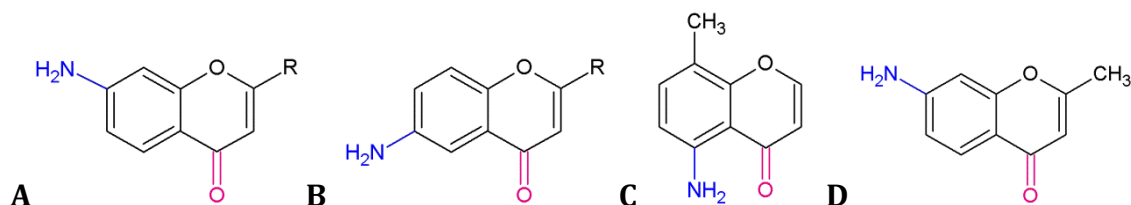
Wyniki przeprowadzonych badań, będących realizacją drugiego celu głównego, zostały opublikowane w pracach **H4 – H6**:

**H4.** B. Kupcewicz, M. Grażul, I.-P. Lorenz, P. Mayer, E. Budzisz. *Polyhedron* **2011**, 30, 1177-1184.

**H5.** B. Kupcewicz, A. Kaczmarek-Kędziera, K. Lux, P. Mayer, E. Budzisz, *Polyhedron* **2013**, 55, 259-269.

**H6.** B. Kupcewicz, M. Małecka, *Cryst. Growth Des.* **2015**, 15, 3893-3904.

Badania właściwości fluorescencyjnych związków pochodnych chromonu rozpoczęłam podczas realizacji projektu mającego na celu otrzymanie związków kompleksowych w reakcji aminowych pochodnych chromonu z jonami Zn(II) (związki **A**, **B** i **C** na Ryc. 8, publikacja **H4**).



**Ryc. 8.** Aminowe pochodne 2-fenylchromonu (A i B) oraz chromonu (C i D); R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

Na podstawie analizy właściwości fluorescencyjnych ligandów **A**, **B** i **C** przedstawionych na Ryc. 8 oraz ich związków koordynacyjnych z jonami cynku stwierdzono, że (i) 7-amino- oraz 6-amino-2-fenylchromon (związki **A** i **B**) oraz ich kompleksy z Zn(II) charakteryzują się intensywną fluorescencją w metanolu i 10% wodnym roztworze DMSO,

(ii) 5-amino-8-metylochromon (**C**) i jego kompleks z jonami Zn(II) nie wykazują fluorescencji w żadnym rozpuszczalniku oraz (iii) wszystkie trzy ligandy nie posiadały właściwości fluorescencyjnych w stanie stałym. Stwierdzono także, że położenie grupy aminowej wpływa na charakterystykę spektroskopową związków **A** i **B**. Maksimum długości fali wzbudzenia (w roztworze DMSO-H<sub>2</sub>O) dla związku z grupą aminową w pozycji 7 (**A**) to 418 nm, a dla związku z grupą aminową w pozycji 6 (**B**) wynosi 445 nm. Z kolei maksimum emisji występuje, odpowiednio, przy długości fali 505 nm i 555 nm. Przesunięcie Stokes'a wynosi dla 87 nm dla 7-amino pochodnej oraz 110 nm dla 6-amino-2-fenlochromonu. Koordynacja jonów cynku powoduje nieznaczne przesunięcie długości fali wzbudzenia i nie wpływa na położenie pasma emisji względem tych parametrów dla wolnych ligandów, natomiast skutkuje znacznym wzmocnieniem fluorescencji w roztworze. Takie zachowanie się związków **A** i **B** mogło sugerować ich potencjalne zastosowanie jako fluorescencyjnych sensorów dla jonów cynku; niestety nie wykazywały one wystarczającej selektywności jonowej. Jednak badania opisane w publikacji **H4** stanowiły inspirację do kontynuacji tego wątku. Przedmiotem dalszych badań, opublikowanych w **H5**, były właściwości fluorescencyjne oraz kompleksujące 7-amino-2-metylochromonu (**D** na Ryc. 8), co przedstawiono w kolejnym rozdziale.

Związek **C** nie wykazuje fluorescencji, ale chętnie tworzy związki kompleksowe z innymi jonami metali jak Cu(II)<sup>34</sup> oraz Pd(II) i Co(II).<sup>35</sup> Z kolei w innych pracach<sup>36, 37</sup> opisano związki kompleksowe ligandów **A-D** z jonami Ru(III) oraz ich właściwości cytotoksyczne.

### 7-amino-2-metylochromon jako potencjalny sensor jonów Zn<sup>2+</sup>

Związek **D**, 7-amino-2-metylochromon, jest dwufunkcyjną cząsteczką posiadającą silną elektronodonorową grupę aminową oraz elektronoakceptorową grupę karbonylową. Obecność obu tych grup i ich wzajemne położenie umożliwia proces wewnętrznego przeniesienia ładunku (ang. internal charge transfer, ICT) w stanie wzbudzonym. Fluorescencja związku **D** w roztworze jest silnie uzależniona od zastosowanego rozpuszczalnika (solwatochromizm). W rozpuszczalnikach protycznych (metanol, woda) związek **D** wykazuje intensywną fluorescencję, natomiast w aprotycznym acetonitrylu jego fluorescencja jest bardzo słaba ( $\lambda_{wzb} = 342$  nm,  $\lambda_{em} = 391$  nm). Koordynacja jonów metalu przez grupę karbonylową powinna skutkować wzrostem właściwości elektronoakceptorowych tej grupy oraz batochromowym przesunięciem pasm absorpcji i emisji. Dodanie jonów Zn(II) do roztworu liganda w acetonitrylu skutkuje silnym wzrostem intensywności fluorescencji oraz przesunięciem pasma emisji z 391 nm dla wolnego liganda do 440 nm dla kompleksu. Liniową zależność intensywności fluorescencji od stężenia jonów

<sup>34</sup> Grażul M., Kufelnicki A., Wozniczka M., Lorenz I-P., Mayer P., Józwiak A., Czyż M., Budzisz E., *Polyhedron* **2012**, 31, 150-158

<sup>35</sup> Grażul M., Sigel R., Maake C., Besic-Gyenge E., Lorenz I-P., Mayer P., Czyż M., Budzisz E. *Polyhedron*, **2014**, 67, 136-144

<sup>36</sup> Pastuszko A., Niewinna K., Czyż M., Józwiak A., Małeczka M., Budzisz E., *J. Organomet. Chem.* **2013**, 745-746, 64-70

<sup>37</sup> Pastuszko A., Majchrzak K., Czyż M., Kupcewicz B., Budzisz E., *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 159, 133-141

cynku uzyskano w zakresie 0–1,7  $\mu\text{M}$ . W celu oceny przydatności 7-amino-2-metylochromonu jako potencjalnego sensora jonów  $\text{Zn(II)}$  sprawdzono jego selektywność jonową względem  $\text{Mg(II)}$ ,  $\text{Ca(II)}$  oraz  $\text{Cu(II)}$  – jonów o znaczeniu biologicznym, mogących działać konkurencyjnie w wiązaniu liganda. Obecność jonów wapnia i magnezu w stężeniach 0,5–3  $\mu\text{M}$  nie powoduje istotnych zmian w intensywności fluorescencji, z kolei obecność jonów miedzi(II) w podobnych stężeniach w niewielkim stopniu obniża intensywność fluorescencji.

Wyznaczono wydajność kwantową fluorescencji liganda i kompleksu w wodzie oraz w acetonitrylu. Związek kompleksowy wykazuje wartości  $\Phi = 0,21$  oraz  $\Phi = 0,32$  odpowiednio w roztworze wodnym i acetonitrylu, natomiast ligand **D**  $\Phi$  równe 0,18 w wodzie i 0,005 w roztworze acetonitrylu. Wynika z tego, że kwantowa wydajność fluorescencji związku kompleksowego w acetonitrylu jest ok. 63 razy wyższa niż 7-amino-2-metylochromonu.

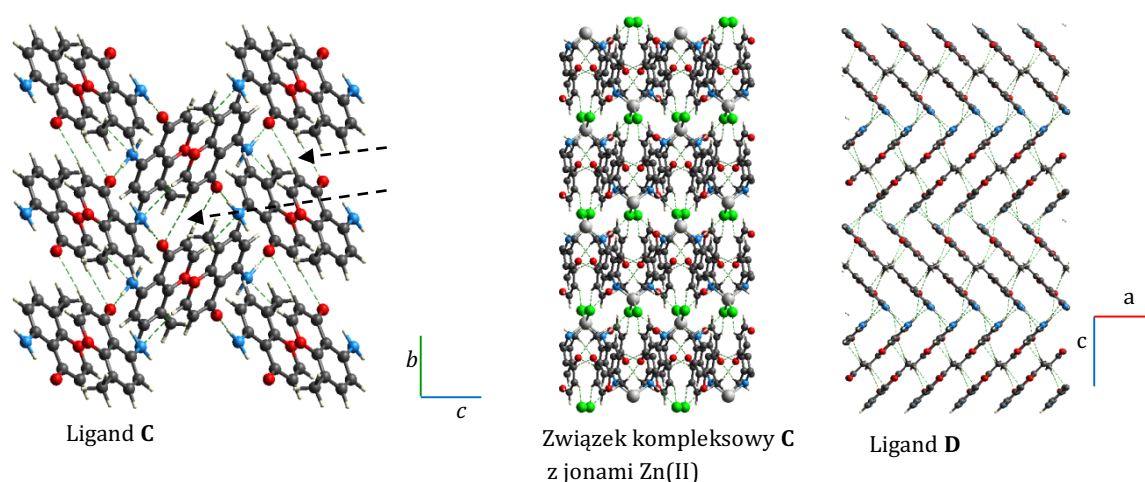
### Właściwości fluorescencyjne w ciele stałym a struktura krystaliczna związków

Dla liganda **D** oraz związków kompleksowych  $\text{Zn(II)}$  z ligandami **C** (5-amino-8-metylochromon) i **D** (7-amino-2-metylochromon) wykonano badania rentgenostrukturalne i rozwiązano ich struktury krystaliczne, co daje możliwość analizy wpływu budowy krystalicznej związków na ich właściwości fluorescencyjne. Dodatkowo, celem porównania, w opisie wykorzystano dane z bazy CCDC (795611) dotyczące budowy krystalicznej 5-amino-8-metylochromonu (liganda **C**).<sup>38</sup> Ligand **C** i jego kompleks z jonami cynku nie wykazują fluorescencji w stanie stałym. Natomiast ligand **D** charakteryzuje się znikomą fluorescencją. W widmie konturowym 3D związku **D** można wyróżnić dwa pasma emisji o porównywalnej intensywności, odpowiednio przy długości fali promieniowania 380 nm i 500 nm. Z kolei związek kompleksowy **D** z jonami cynku wzbudzany promieniowaniem o długości fali 365 nm emituje intensywną niebieską fluorescencją z maksimum przy 420 nm.

Na Ryc. 9 przedstawione jest upakowanie cząsteczek w kryształach dla obu ligandów (**C** i **D**) oraz kompleksu **C** z jonami  $\text{Zn(II)}$ . W sieci krystalicznej związku **C** można wyróżnić zygzakowate łańcuchy rozciągające się wzdłuż osi *b*, w których cząsteczki połączone są przez wiązania wodorowe typu  $\text{N-H}\cdots\text{O}$  angażujące atom tlenu grupy karbonylowej jako akceptora wiązania wodorowego. Ponadto atom tlenu grupy  $\text{C=O}$  bierze udział w wewnątrzcząsteczkowym wiązaniu wodorowym z grupą aminową w pozycji 5. Jednocześnie widoczne są motywy pierścieniowe typu  $R_2^2(8)$  również z udziałem grupy karbonylowej. W sieci krystalicznej związku **D**, cząsteczki zorganizowane są w dwa prostopadłe względem siebie szeregi, które tworzą również zygzakowaty łańcuch (ułożony wzdłuż osi *c*), a trójwymiarową sieć stabilizują głównie wiązania wodorowe  $\text{C-H}\cdots\text{O}$ ,  $\text{N-H}\cdots\text{O}$  oraz  $\text{N-H}\cdots\text{N}$ .

<sup>38</sup> Grażul M., Kufelnicki A., Wozniczka M., Lorenz I-P., Mayer P., Józwiak A., Czyż M., Budzisz E., *Polyhedron* **2012**, 31, 150-158

Planarność cząsteczek obu ligandów sugeruje możliwość występowania silnych oddziaływań typu  $\pi\cdots\pi$ , co może być przyczyną gaszenia fluorescencji.<sup>39</sup> Oddziaływania tego typu, pomiędzy równoległymi (w odległości ok. 3,43 Å) przesuniętymi względem siebie pierścieniami (ang. offset face-to-face), obecne są w sieci krystalicznej niefluoryzującego 5-amino-8-metylochromonu (**C**) a także jego kompleksu z jonami Zn(II). Z kolei w strukturze krystalicznej 7-amino-2metylochromonu (**D**), który wykazuje bardzo słabą fluorescencję stwierdzono obecność oddziaływań typu C-H $\cdots$  $\pi$ .



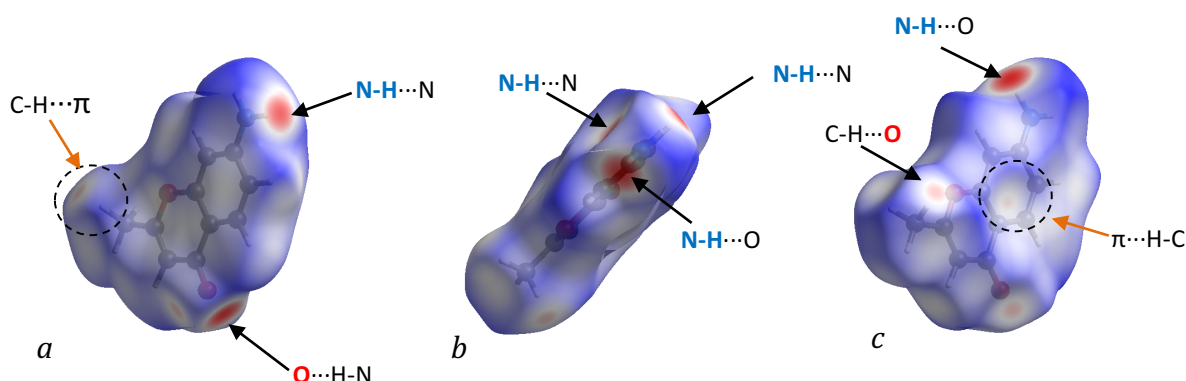
**Ryc. 9.** Upakowanie cząsteczek w kryształach liganda **C** i jego związku kompleksowego z jonami Zn(II) (widok wzdłuż osi *a*) oraz liganda **D** (widok wzdłuż osi *b*). Strzałkami zaznaczono motywy pierścieniowe  $R_2^2(8)$ . (upakowanie dla związku **C** wygenerowano na podstawie CCDC 795611)

Na Ryc. 10 pokazano znormalizowaną powierzchnię Hirshfelda ( $d_{\text{norm}}$ ) związku **D**. Wielkość i kształt powierzchni Hirshfelda są ściśle związane z chemicznym otoczeniem cząsteczki, co czyni ją idealnym narzędziem dla porównania różnych struktur krystalicznych. Jedną z własności wykorzystywanych do mapowania powierzchni Hirshfelda jest odległość kontaktu – odległość dowolnego punktu powierzchni do najbliższego atomu wewnątrz oraz na zewnątrz powierzchni oznaczane odpowiednio jako  $d_i$  oraz  $d_e$ . Łącząc obie wartości  $d_i$  i  $d_e$  oraz normalizując je w stosunku do promieni van der Waalsa odpowiednich atomów uzyskuje się znormalizowaną powierzchnię Hirshfelda ( $d_{\text{norm}}$ ). Czerwonym kolorem na powierzchni wyróżnione są obszary gdzie odległość kontaktu jest krótsza niż suma promieni van der Waalsa, a odległości kontaktu równe sumie promieni van der Waalsa lub dłuższe, odpowiednio kolorem białym i niebieskim. Wyraźne czerwone punkty na Ryc. 10 reprezentują miejsca najsilniejszych oddziaływań. W każdej cząsteczce grupa  $\text{NH}_2$  jest donorem trzech wiązań wodorowych N-H $\cdots$ N, a atom tlenu akceptorem dwóch rodzajów

<sup>39</sup> Y. Ooyama, K. Yoshida, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2564-2570.

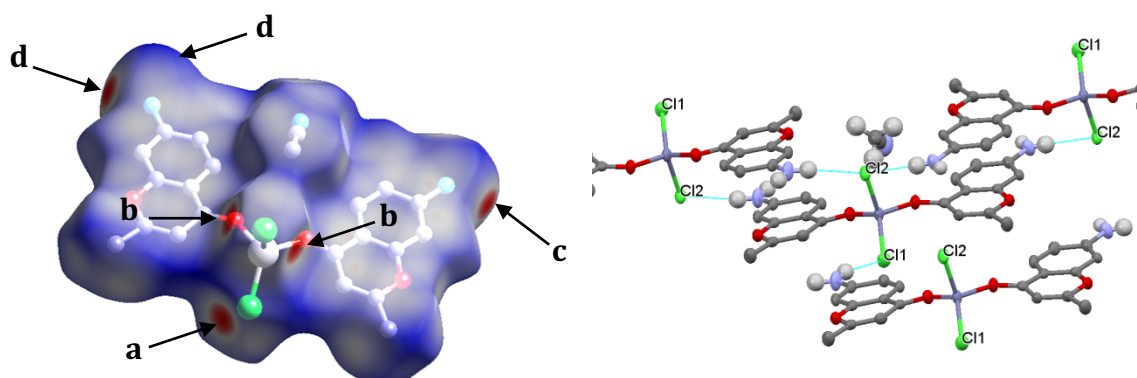


wiązań wodorowych: N-H...O (atom O w grupie karbonylowej) oraz C-H...O (atom O w pierścieniu).



**Ryc. 10.** Wizualizacja powierzchni Hirshfelda ( $d_{\text{norm}}$ ) dla 7-amino-2-metylochromonu (**D**) wzdłuż trzech osi *a*, *b* oraz *c*. Strzałkami oznaczono najsilniejsze oddziaływania, trzy typy wiązań wodorowych, a kółkami miejsca oddziaływań międzycząsteczkowych typu C-H... $\pi$  (powierzchnie Hirshfelda wygenerowano na podstawie danych z publikacji **H5**).

W związku kompleksowym jon cynku skoordynowany jest z dwiema cząsteczkami liganda (**D**) poprzez grupę karbonylową oraz dwoma jonami chlorkowymi. W upakowaniu cząsteczek kompleksu wyróżnić można dwie warstwy obrócone względem siebie o 180°. Sieć krystaliczna kompleksu stabilizowana jest głównie dzięki trzem wiązaniom wodorowym z udziałem grup aminowych i atomów chloru N-H...Cl. Należy zwrócić uwagę, że oba atomy chloru są w różny sposób angażowane, co jest dobrze zwizualizowane na powierzchni Hirshfelda na ryc. 11.



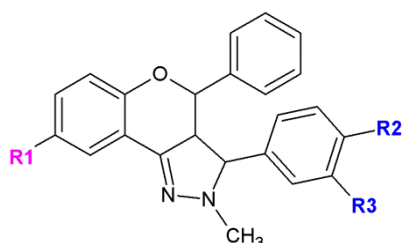
**Ryc. 11.** Wizualizacja powierzchni Hirshfelda ( $d_{\text{norm}}$ ) związku kompleksowego 7-amino-2-metylochromonu z jonami Zn(II) oraz upakowanie cząsteczek w kryształ z wyróżnionymi wiązaniami wodorowymi z udziałem atomów Cl (powierzchnię Hirshfelda wygenerowano na podstawie danych z publikacji **H5**).

Atom oznaczony w strukturze krystalicznej jako Cl1 tworzy jedno wiązanie wodorowe – między cząsteczkami w dwóch warstwach (a), natomiast drugi atom chloru Cl2 bierze udział w dwóch wiązaniach wodorowych, jedno łączy sąsiadujące cząsteczki w jednej

warstwie a drugie podobnie jak atom Cl1 (b). Analogicznie, jedna z grup aminowych jest angażowana w dwa wiązania wodorowe (d), a druga tylko w jedno (c). Taki układ wiązań stabilizuje dwuniciowy łańcuch wzdłuż przekątnej komórki elementarnej z warstwowo ułożonymi cząsteczkami.

Do czynników sprzyjających intensywnej fluorescencji związku kompleksowego można zaliczyć: (i) sieć słabszych wiązań wodorowych niż występujące w strukturze krystalicznej liganda, (ii) zniekształcony układ tetraedryczny jonu cynku i układ ligandów zapobiegający tworzeniu silnych oddziaływań typu  $\pi$ -stacking. Spośród pozostałych związków kompleksowych tylko połączenie Zn(II) z ligandem **A** emituje fluorescencję w stanie stałym, nie udało się jednak uzyskać odpowiedniego kryształu do badań rentgenograficznych.

Subtelne zmiany w cząsteczce, jak wprowadzenie prostego podstawnika, mogą powodować istotną zmianę w strukturze krystalicznej i elektronowej związku, a w konsekwencji modyfikować jego właściwości fotofizyczne. Zatem badania zależności struktura-fluorescencja mogą dostarczyć cennych informacji przydatnych przy projektowaniu związków o pożądanym właściwościach fluorescencyjnych. W publikacji **H6** opisano serię związków z grupy pochodnych 3-arylideno-flawanonu zawierających skondensowany pierścień 2-pyrazoliny (Ryc. 12). Związek **I** nie wykazuje fluorescencji, natomiast pozostałe pięć emitują fluorescencję w stanie stałym (**II – VI**) w niebieskim obszarze widma widzialnego, w zakresie od 400 do 460 nm. Emisja fluorescencji jest wynikiem absorpcji promieniowania UV w zakresie 280-380 nm.



Oznaczenie	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>
Podstawnik	(1m)	(1a)	(1l)	(1k)	(1i)	(1b)
<b>R1</b>	<b>OH</b>	H	H	H	H	H
<b>R2</b>	H	H	<b>Br</b>	<b>Cl</b>	<b>OH</b>	H
<b>R3</b>	H	H	H	H	H	<b>CN</b>

**Ryc. 12.** Wzór ogólny i oznaczenia związków krystalicznych opisanych w **H4**; w nawiasach podano oznaczenia tych związków stosowane w publikacji **H3**

Na podstawie analizy możliwych oddziaływań międzycząsteczkowych można przedstawić charakterystyczne typy interakcji odpowiedzialnych za upakowanie cząsteczek w kryształach badanych związków:

- międzycząsteczkowe motywy:** niepodstawione cząsteczki związku **II** stabilizowane są wiązaniami wodorowymi C-H...O i tworzą motyw łańcuchowy C(7).<sup>40,41</sup> Z kolei w upakowaniu cząsteczek związku **V** można wyróżnić motyw łańcuchowy C(11), dzięki wiązaniami wodorowym z udziałem cząsteczki wody O-H...N.

<sup>40</sup> J. Bernstein, R. E. Davis, L. Shimoni, N.-L. Chang, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1555-1573.

<sup>41</sup> M. C. Etter, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23, 120-125.

W strukturach pięciu związków (oprócz **II**) tworzą się motywy pierścieniowe, z dwoma atomami donorowymi i dwoma akceptorami  $R_2^2$ . Liczba atomów w powtarzającej się jednostce dla związku **I** i **V** wynosi 8, dla **III** i **IV** – 14 oraz dla związku **VI** – 11 i 12.

- ii. **typy oddziaływań:** dla żadnego związku nie obserwuje się wyraźnych oddziaływań typu  $\pi \cdots \pi$ . Dominujące wiązania wodorowe dla związków **I** i **II** to C-H $\cdots$ O. Wiązania wodorowe z udziałem atomu N odpowiedzialne są natomiast za motywy pierścieniowe w kryształach związków **III**, **IV** i **VI** i motyw łańcuchowy w kryształach związku **V**.

W związkach posiadających atom Br lub Cl (**III** i **IV**) można się spodziewać różnego rodzaju oddziaływań angażujących atom halogenu (X), jak X $\cdots$ H, X $\cdots$ X czy X $\cdots$  $\pi$ . Stwierdzono obecność oddziaływań typu Cl $\cdots$ Cl w związku **IV** oraz C-Br $\cdots$ H w związku **III**, które przytrzymują cząsteczki w warstwie.

- iii. **struktura warstwowa:** związki z grupą OH (**I** i **V**) nie mają struktury warstwowej, jednak w przypadku związku **V** cząsteczki układają się w łańcuch typu zygzakowatego (ang. zig-zag) i tworzą wstęgę. Natomiast warstwy można wyróżnić w sieci krystalicznej związków **II**, **III**, **IV** i **VI**.

Za jedną z przyczyn gaszenia fluorescencji w stanie stałym uznaje się obecność silnych oddziaływań typu  $\pi \cdots \pi$ .<sup>42</sup> Związek **I** nie wykazuje fluorescencji, jednak w jego strukturze krystalicznej nie występują takie oddziaływania, a za brak właściwości fluorescencyjnych najprawdopodobniej odpowiedzialny jest brak odpowiedniego dla tego zjawiska warstwowego ułożenia cząsteczek.

Obecność opisanych wyżej oddziaływań międzycząsteczkowych potwierdza także analiza powierzchni Hirshfelda (Ryc. 13 – 15, publikacja **H6**). Intensywnie czerwone punkty reprezentują silne oddziaływania typu O $\cdots$ H w związkach **I**, **II** i **V** oraz kontakty typu N $\cdots$ H we wszystkich związkach z wyjątkiem **II**.

Powierzchnię Hirshfelda można przedstawić także w postaci jej dwuwymiarowego obrazu tzw. fingerprintu, na którym częstość występowania poszczególnych oddziaływań międzycząsteczkowych zaznaczona jest kolorem od niebieskiego przez zielony do czerwonego (zgodnie ze wzrostem częstości). Jednocześnie dekompozycja „fingerprintu” pozwala wizualizować fragmenty powierzchni Hirshfelda odpowiadające pojedynczemu rodzajowi oddziaływań (ryc. 14 i 15 w **H6**). Na ich podstawie stwierdzono, że w strukturze krystalicznej badanych związków dominują oddziaływania typu H $\cdots$ H oraz C $\cdots$ H, sumarycznie od 77,4% dla związku **III** do 88,5% dla związku **II**. Z kolei udział oddziaływań typu N $\cdots$ H oraz O $\cdots$ H waha się w stosunkowo szerokich granicach 4,7 – 19,0% oraz 3,4 – 11,4%, a takie zróżnicowanie jest związane z obecnością podstawników zawierających atomy N i O (OH dla związków **I** i **V** oraz CN dla związku **VI**).

<sup>42</sup> Y. Ooyama, K. Yoshida, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 2564-2570.

## Zależności pomiędzy procentowymi udziałami oddziaływań międzycząsteczkowych w powierzchni Hirshfelda a $\log P$ i parametrami charakteryzującymi fluorofory

Biorąc pod uwagę wyniki analizy „fingerprintów” powierzchni Hirshfelda, w kolejnym etapie badań podjęłam próbę:

- i. wskazania rodzaju słabych oddziaływań międzycząsteczkowych wpływających na lipofilowość ( $\log P$ ) związków **I – VI**,
- ii. znalezienia korelacji pomiędzy procentowymi udziałami poszczególnych oddziaływań międzycząsteczkowych a parametrami charakteryzującymi właściwości fluorescencyjne tych związków: wydajnością kwantową ( $\Phi_{PL}$ ), czasem zaniku fluorescencji ( $\tau$ ) i stałymi szybkości procesów towarzyszących temu zjawisku.

Lipofilowość związków jest bezsprzecznie uznawana za jedną z najważniejszych cech w kontekście ich działania farmakologicznego i toksyczności. Wartość  $\log P$  związków **I**, **II**, **V** i **VI** mieści się w granicach 4,4–4,6. Natomiast, zgodnie z oczekiwaniami obecność w cząsteczce atomu chloru (związek **IV**) lub bromu (związek **III**) powoduje wzrost lipofilowości ( $\log P$  ok. 5,2 – 5,3). Fakt ten sugeruje, że na wzrost  $\log P$  związków **III** i **IV** mogą mieć wpływ słabe oddziaływania międzycząsteczkowe angażujące atom halogenu. Potwierdzono to wyraźną liniową korelacją pomiędzy  $\log P$  a sumą procentowego udziału w powierzchni Hirshfelda oddziaływań typu C...H oraz tych z udziałem atomów Cl i Br (Ryc. 17 i 18 w publikacji **H6**). Pomimo tego, że informacja o rodzaju oddziaływań międzycząsteczkowych uzyskana na podstawie analizy powierzchni Hirshfelda dotyczy otoczenia cząsteczki w strukturze krystalicznej związku, może wskazywać na preferencje określonych interakcji także w roztworze.

Wydajność kwantowa ( $\Phi_{PL}$ ) oraz czas zaniku fluorescencji ( $\tau$ ) należą do najważniejszych parametrów charakteryzujących fluorofory. Badane związki wykazują zróżnicowaną wydajność kwantową fluorescencji w stanie stałym. Dla niepodstawionego związku **II**  $\Phi_{PL}$  wynosi 0,24. Wprowadzenie do cząsteczki atomu Cl powoduje zwiększenie wydajności kwantowej do 0,37, natomiast obecność takich podstawników jak OH, Br i CN powoduje obniżenie wydajności kwantowej do 0,13-0,15. Spadek  $\Phi_{PL}$  dla pochodnej z podstawnikiem Br spowodowany jest prawdopodobnie tzw. efektem ciężkiego atomu (ang. heavy atom effect).<sup>43,44</sup>

Proces zaniku fluorescencji dla niepodstawionego związku **II** można opisać funkcją jednowykładniczą, natomiast dla związków posiadających dodatkowy podstawnik zanik fluorescencji nie jest jednowykładniczy, co wskazuje na złożony charakter procesów zachodzących w stanie wzbudzonym. W przypadku związków **III – VI** krzywe zaniku fluorescencji dopasowano funkcją dwueksponencjalną i wyróżniono dwie składowe o różnych czasach zaniku. Porównując średnie czasy, wyraźnie widać, że w stosunku do związku niepodstawionego, obecność atomu halogenu w cząsteczce powoduje ok. 2-krotne

<sup>43</sup> J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> ed.; Springer, New York, 2009

<sup>44</sup> T. N. Kirillova, M. A. Gerasimova, E. V. Nemtseva, N. S. Kudryasheva, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 400, 343-351

wydłużenie czasu zaniku fluorescencji, natomiast obecność grupy OH lub CN wpływa na jego skrócenie (również ok. 2-krotne).

Do pełniejszej charakterystyki fluoroforów, oprócz wydajności kwantowej fluorescencji oraz czasu jej zaniku wykorzystano także, obliczone na ich podstawie, stałe szybkości procesów promienistych ( $k_r$ ) i bezpromienistych ( $k_{nr}$ ). Analiza potencjalnego wpływu międzycząsteczkowych oddziaływań w strukturze krystalicznej na fluorescencję związków **II** – **VI** wykazała paraboliczną korelację pomiędzy odwrotnością średniego czasu zaniku fluorescencji a sumą procentowego udziału w powierzchni Hirshfelda oddziaływań typu  $H\cdots O$  i  $H\cdots N$ . Podobną zależność zaobserwowano dla stałej szybkości procesów bezpromienistych (Ryc. 20, w **H6**). Wynika z tego, że im więcej oddziaływań typu  $H\cdots O$  i  $H\cdots N$  w kryształach tym wyższa stała szybkości procesów bezpromienistych a w konsekwencji krótszy czas zaniku fluorescencji. Najkrótsze czasy zaniku fluorescencji stwierdzono dla związku **V** (z podstawnikiem OH) i związku **VI** (z grupą CN). Większy udział interakcji angażujących atomy tlenu i azotu ( $H\cdots O$  i  $H\cdots N$ )

Opisane związki wykazują także intensywną fluorescencję w roztworze (w różnych rozpuszczalnikach), a dodatkowo dwa z nich zjawisko wzmocnienia fluorescencji indukowane agregacją w układzie woda:metanol = 80:20 (*dane niepublikowane*).

### 2.3.4 Podsumowanie wyników badań

Przedstawione do oceny publikacje (**H1** – **H6**) obejmowały badania pochodnych chalkonu, chromonu i chromanonu, których celem było przede wszystkim wskazanie cech strukturalnych odpowiedzialnych za ich działanie cytotoksyczne *in vitro* oraz właściwości fluorescencyjne, a także ilościowe ujęcie zależności struktura–aktywność.

Podsumowanie wyników realizacji obu wątków badawczych można ująć w kilku punktach dotyczących:

- **ANALIZY ZALEŻNOŚCI STRUKTURA-AKTYWNOŚĆ CYTOTOKSYCZNA *IN VITRO* (SAR)**

Stwierdzono, że badane pochodne chalkonów i chromanonów wykazują silniejsze działanie cytotoksyczne względem linii komórkowych białaczki (HL-60 i NALM-6) niż wobec linii komórkowej czerniaka WM115.

W przypadku *pochodnych chalkonów* wykazano, że rozkład gęstości elektronowej w cząsteczce, determinowany położeniem i charakterem podstawników, koreluje z ich cytotoksycznością względem linii komórkowych białaczki (HL-60 i NALM-6). Kluczowy w uzyskaniu wysokiej cytotoksyczności wydaje się elektrofilowy charakter fragmentu cząsteczki obejmującego wiązanie  $C_\alpha=C_\beta$  sprzężone z grupą karbonylową. Zwiększeniu aktywności cytotoksycznej *in vitro* sprzyja umieszczenie elektronodonorowej grupy OH w pierścieniu A lub grup elektroakceptorowych, Cl, Br i  $NO_2$ , w pierścieniu B.

Dla 3-arylidenopochodnych flawanonu jak i 3-arylopochoodnych flawonu korzystny wpływ na cytotoksyczność mają również elektroakceptorowe podstawniki Cl, Br,  $NO_2$  i CN (w pierścieniu D, Ryc. 2).

Analiza SAR grupy chalkonów oraz 3-arylidenopochodnych chromonu i chromanonu sugeruje udział elektrofilowego  $\alpha$ ,  $\beta$  – nienasyconego układu karbonylowego w aktywności cytotoksycznej. Natomiast w trzeciej grupie badanych związków układ ten został „zablokowany” przez pierścień 2-pirazoliny. Pozbawienie pochodnych 3-arylidenoflawanonu zawierających skondensowany pierścień 2-pirazoliny wolnej grupy karbonylowej oraz wiązania podwójnego ( $C_{\alpha}=C_{\beta}$ ) a jednocześnie obecność atomu halogenu wydaje się być przyczyną selektywnej cytotoksyczności tych związków wobec komórek nowotworowych. **Związki z podstawnikiem Cl lub Br wykazują wysoką cytotoksyczność względem komórek białaczki HL-60 a jednocześnie niewielką lub brak aktywności względem komórek prawidłowych (HUVEC).**

- **IŁOŚCIOWYCH ZALEŻNOŚCI STRUKTURA-AKTYWNOŚĆ CYTOTOKSYCZNA *IN VITRO* (QSAR)**

Modele QSAR opisujące ilościowe zależności struktura – aktywność cytotoksyczna *in vitro* zbudowano w oparciu o **interpretowalne deskryptory** należące do kategorii:

- deskryptorów kwantowo-chemicznych: energia orbitalu LUMO, potencjał chemiczny  $\mu$ , indeks elektrofilowości  $\omega$  i ładunki cząstkowe;
- właściwości fizykochemicznych: parametr hydrofobowości cząsteczki -  $\log P$ ;
- deskryptorów geometrycznych 3D-MoRSE: Mor04v.

Wszystkie modele zawierają deskryptory pozwalające na mechanistyczną interpretację otrzymanych równań.

W analizie QSAR opartej o **udziały słabych oddziaływań międzycząsteczkowych w powierzchni Hirshfelda** uzyskano model o **dobrym dopasowaniu oraz mocy predykcyjnej** dla aktywności cytotoksycznej pochodnych 3-arylidenoflawanonu skondensowanego z pierścieniem 2-pirazoliny wobec linii komórkowej białaczki limfoblastycznej (HL-60). Model zawiera dwa istotne statystycznie deskryptory: udziały oddziaływań typu  $H\cdots H$  ( $f_{H\cdots H}$ ) oraz interakcji angażujących atom halogenu, Cl lub Br ( $f_{hal}$ ). Dlatego też, analiza powierzchni Hirshfelda pozwalająca uzyskać ilościową informację o słabych międzycząsteczkowych oddziaływaniach wydaje się być obiecującym narzędziem w badaniach zależności struktura-aktywność (biologiczna).

- **ZALEŻNOŚCI WŁAŚCIWOŚCI FLUORESCENCYJNYCH OD STRUKTURY KRystalicznej ZWIĄZKÓW**

Wnikliwa analiza struktur krystalicznych (pochodnych chromonu i 3-arylidenoflawanonu, a także związków kompleksowych z jonami Zn (II)) w połączeniu z wynikami analizy powierzchni Hirshfeld potwierdzają, że oddziaływania typu  $\pi\cdots\pi$  lub  $C-H\cdots\pi$  odgrywają znaczącą rolę w wygaszaniu fluorescencji w ciele stałym. Z kolei warstwowe ułożenie molekuł w strukturze krystalicznej i brak międzycząsteczkowych oddziaływań typu  $\pi$ -stacking należą do czynników sprzyjających emisji fluorescencji.

W analizie właściwości fluorescencyjnych pochodnych 3-arylidenoflawanonu zawierających skondensowany pierścień 2-pirazoliny stwierdzono, że:

- i. **obecność atomu chloru w cząsteczce sprzyja intensywnej i wydajnej fluorescencji** (jak również selektywnej cytotoksyczności). Związek z podstawnikiem Cl charakteryzuje się najwyższą kwantową wydajnością fluorescencji (0,37) w stanie stałym,
- ii. duży udział oddziaływań typu H···O i H···N w kryształach związków, będący konsekwencją obecności podstawników OH i CN, ma niekorzystny wpływ zarówno na wydajność kwantową jak i czas zaniku fluorescencji,
- iii. istnieje paraboliczna korelacja pomiędzy odwrotnością średniego czasu zaniku fluorescencji a sumą procentowego udziału w powierzchni Hirshfelda oddziaływań typu H···O i H···N.

Warto także podkreślić, że podobnie jak w badaniu zależności struktura-aktywność wyniki analizy powierzchni Hirshfelda okazały się przydatne również w opisie zależności struktura-fluorescencja (w stanie stałym).

### **Ze względu na interdyscyplinarny charakter badania były przeprowadzone we współpracy:**

- z *prof. Elżbietą Budzisz* z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i *prof. Ingo-Peter Lorenzem* z Ludwig-Maximilians-Universität w Monachium w zakresie syntezy części związków,
- z *prof. Piotrem Panethem* z Politechniki Łódzkiej, *prof. Andrzejem A. Jarzęckim* z City University of New York oraz *dr Anną Kaczmarek-Kędzierą* z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, która dotyczyła obliczeń teoretycznych,
- z *dr hab. Magdaleną Małecką* z Uniwersytetu Łódzkiego, *dr Karin Lux* i *dr Peterem Mayerem* z Ludwig-Maximilians-Universität w Monachium w zakresie badań krytalograficznych,
- z *dr Markiem Różalskim* oraz *mgr Urszulą Krajewską* z Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, którzy wykonali badania cytotoksyczności *in vitro*.

### 3. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

*W nawiasach podano odnośniki do prac umieszczonych w wykazie w Zał. 3a  
(oznaczenia: P – publikacja oryginalna, R – referat konferencyjny, K – konferencja - poster,  
S – książka, skrypt, monografia)*

#### 3.1 Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora

Po ukończeniu studiów rozpoczęłam pracę w Zakładzie Analityki Farmaceutycznej Studium Farmaceutycznego – bydgoskiej części Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego (CMKP w Warszawie). Moje zainteresowania naukowe dotyczyły głównie badań flawonoidów, szczególnie kwercetyny i jej rozpuszczalnej w wodzie pochodnej – kwasu kwercetyno-5'-sulfonowego (QSA) w kontekście ich właściwości chelatujących jony metali. Systematyczne badania kompleksów kwercetyny i QSA z jonami toru(IV) obejmowały m.in. ustalenie składu w stanie stałym i roztworze, a następnie ich analityczne wykorzystanie do oznaczania jonów fluorkowych. Efekty tych badań zostały opublikowane [P1, P2] i stały się podstawą mojej rozprawy doktorskiej.

Pod kierunkiem prof. Zenona Kokota, który był kierownikiem Zakładu od 1993 r. uczestniczyłam także w badaniach oddziaływań fluorochinolonów z lekami alkalizującymi [R1] oraz wykorzystaniu metod chromatograficznych w analizie; chromatografii cieczowej (HPLC-UV) do oznaczania bupiwakainy w surowicy krwi, a także chromatografii gazowej (GC-FID) do oznaczania lotnych rozpuszczalników w powietrzu na stanowiskach pracy [P3].

#### 3.2 Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora

W roku 2000, po likwidacji bydgoskiej części CMKP, podjęłam pracę na Wydziale Zootechnicznym (obecnie Hodowli i Biologii Zwierząt) Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy (obecnie Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, UTP), którą kontynuowałam do września 2011 roku. W latach 2004-2008 w ramach współpracy z prof. Ryszardem Siudą i dr Grażyną Czerniak z Instytutu Matematyki i Fizyki UTP oraz prof. Czesławem Sadowskim z Wydziału Rolniczego UTP uczestniczyłam, jako wykonawca, w dwóch grantach KBN (Zał. 3a pkt. 6), celem których było opracowanie metody oznaczania stężeń mykotoksyn fuzaryjnych w ziarnie pszenicy za pomocą spektroskopii optycznej oraz zbadanie zależności pomiędzy wybranymi cechami fizycznymi i jakościowymi ziarna pszenicy a nasileniem objawów fuzariozy. Moim zadaniem było opracowanie i walidacja, referencyjnych w stosunku do spektroskopii, metod chromatograficznych (GC-MS oraz HPLC-DAD) oznaczania mykotoksyn z grupy trichotecenów B (deoxynivalenolu i jego pochodnych, nivalenolu oraz zearalenonu) w ziarnie pszenicy. Jednym z kluczowych elementów metody było opracowanie i zoptymalizowanie procedury przygotowania próbek do analizy chromatograficznej, obejmującej ekstrakcję do fazy stałej oraz proces derywatywacji (w przypadku metody GC-MS) (P6, K1, K2). W trakcie wizyty naukowej w Institute of Plant Analysis w Quedlinburgu (obecnie Institute for Ecological Chemistry, Plant Analysis and Stored Product Protection), zapoznałam się z techniką pomiarów metodą FTIR-ATR i wykonałam pomiary dla próbek pszenicy. Dzięki współpracy z prof. Siudą



zainteresowałam się bliżej chemometrią oraz metodami spektroskopowymi, a współpracę z dr Grażyną Czerniak nadal kontynuuję (H2, **P18**, **P22**, K9).

W roku 2002 podjęłam pracę w nowo powstałej Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Bydgoszczy (obecnie Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu) kierowanej wówczas przez prof. Jana Pawlaczyka, gdzie pracuję do chwili obecnej. W 2006 r. Katedra została przeniesiona do nowego budynku i uzyskała znaczące dofinansowanie na zakup aparatury. Stąd też moja aktywność początkowo skupiała się na dydaktyce (w tym czasie powstały dwa skrypty dla studentów kierunku Farmacja - S2, S4) a działalność naukową zintensyfikowałam w następnych latach. Oprócz zasadniczego kierunku badań, które stanowią podstawę przedstawionego osiągnięcia, moje zainteresowania naukowe obejmują wykorzystanie technik instrumentalnych (przede wszystkim chromatograficznych i spektroskopowych) w połączeniu z metodami chemometrycznymi:

- i. w analizie zanieczyszczeń leków zawierających simwastatynę (**P18**) oraz leków p/bólowych z kwasem acetylosalicylowym (**P20**);
- ii. w ocenie właściwości przeciwutleniających wybranych leków i suplementów diety zawierających ekstrakty roślinne: z zielonej herbaty *Camelia sinensis* (**P21**, **P23**, K22, K25, K26), z nasion soi (K27) oraz miłorzębu japońskiego (**P19**);

Kolejny wątek w mojej pracy naukowej to udział w badaniach związków kompleksowych:

- i. jonów Cu(II) z pochodnymi pirazolu pod kątem ich właściwości cytotoksycznych (**P16**) i antyoksydacyjnych (**P17**)
- ii. jonów Ru(II) z ligandami z grupy pochodnych chromonu (**P26**).

Ponadto, brałam udział w projektach, w których byłam współodpowiedzialna za planowanie badań od strony statystycznej oraz wykonałam analizę statystyczną lub chemometryczną wyników. Były to badania z zakresu hodowli zwierząt (**P8**), ochrony środowiska (**P4**), oceny wpływu gatunku, płci i zbiornika wodnego na zawartość kwasów tłuszczowych w mięsie ryb (**P13**, **P15**) i raków (**P11**) oraz z zakresu diagnostyki medycznej (**P9**, **P10**). Brałam udział także w trzech projektach realizowanych we współpracy z przedsiębiorstwami (**Zał. 3a**, **p. 6**), a do moich zadań (w dwóch projektach wspólnie z dr Joanną Ronowicz) należało zoptymalizowanie i walidacja metod oznaczania substancji czynnych w opracowywanych produktach leczniczych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach **P24** i **P25**.

Aktualnie kontynuuję badania związków o podobnej budowie jak przedstawione w publikacji **H6** jak również współpracę z dr hab. Magdaleną Małecką z Uniwersytetu Łódzkiego. Modyfikacje układu pirazolino-chromanu dały w efekcie związku o bardzo obiecujących właściwościach. Niektóre pochodne wykazują fluorescencje w stanie stałym oraz podwójną fluorescencję w roztworze, której końcowa barwa może być modulowana składem roztworu czyli rodzajem i proporcjami zastosowanych rozpuszczalników. Stąd też synteza i badania związków o podobnej budowie stanowią jeden z elementów wniosku złożonego w konkursie OPUS (czerwiec 2016, kierownik dr hab. M. Małecka). Rozpoczęliśmy także wspólne badania kolejnych nowych pochodnych chalkonów

obejmujące syntezę, analizę krystalograficzną, obliczenia teoretyczne i charakterystykę spektroskopową ze szczególnym uwzględnieniem fluorescencji. W zakresie obliczeń teoretycznych kontynuuję współpracę z prof. Andrzejem Jarzęckim z City University of New York. W część badań włączony jest także mgr Mariusz Zapadka.

Obok wymienionych projektów przygotowuję również zadania badawcze dla studentów – członków koła naukowego, których często naturalną konsekwencją są realizowane pod moim kierunkiem prace magisterskie, a w przypadku mgr Mariusza Zapadki także dalsza współpraca naukowa (współautor pracy **H3**). Głównym tematem jest analiza szerokiej gamy suplementów diety, w szczególności tych pochodzenia roślinnego (np. z ekstraktem z zielonej herbaty, yerba mate, zielonej kawy i Gingko biloba) oraz produktów naturalnych (takich jak herbata lub miód) w kontekście ich jakości (zawartości składników czynnych czy problemu zafałszowań). Wykorzystywane są różne techniki: FTIR-ATR, fluorescencja i chromatografia (z naciskiem na wykorzystanie spektroskopowych i chromatograficznych *fingerprintów*) w połączeniu z metodami chemometrycznych.

Z kolei we współpracy z dr Grażyną Czerniak została przygotowana publikacja pt. "Score-based Quantitative Principal Component Analysis with application to study of active pharmaceutical ingredients based on attenuated total reflection Fourier-transform-infrared spectra" (*aktualnie poprawiony manuskrypt został przesłany do edytora Journal of Chemometrics*). Jest to wynik próby zastosowania nowego podejścia obliczeniowego mającego na celu wykorzystanie metody PCA do analizy ilościowej składników preparatów farmaceutycznych w oparciu o widma FTIR-ATR.

*Pełny wykaz opublikowanych prac znajduje się w Załączniku 3a.*

*Określenie mojego udziału we wszystkich opublikowanych pracach wraz ze wskaźnikami bibliometrycznymi zawarte są w Załączniku 6 (bibliometria przygotowana przez Bibliotekę Medyczną UMK).*

