

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII



MIŁOSZ JAKUB REGULSKI

---

POCHODNE *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
JAKO SELEKTYWNE INHIBITORY AKTYWNOŚCI  
CYKLOOKSYGENAZY-2 (COX-2) O WŁAŚCIWOŚCIACH  
PRZECIWNOWOTWOROWYCH I CHEMOPREWENCYJNYCH

---

Rozprawa doktorska

Promotor:

prof. dr hab. n. farm. Marek Murias

Promotor pomocniczy:

dr hab. n. farm. Hanna Piotrowska–Kempisty

POZNAŃ 2017

**Słowa kluczowe:**

*trans*-stilben

*trans*-stilbazol

cyklooksygenaza-2

stan zapalny

chemoprewencja

nowotwór piersi

*„Ludzkie poznanie wyznaczają granice  
ale nie wiemy, gdzie one leżą”*

Konrad Zacharias Lorenz

## **PRAGNĘ ZŁOŻYĆ SERDECZNE PODZIĘKOWANIA:**

PANU PROF. DR HAB. N. FARM. MARKOWI MURIASOWI

za życzliwość, nieocenione wsparcie merytoryczne  
i wszechstronną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy  
oraz wniosku o grant naukowy do Narodowego Centrum Nauki

PANI DR HAB. N. FARM. HANNIE PIOTROWSKIEJ–KEMPISTY

za życzliwość, cenne uwagi merytoryczne  
i wszechstronną pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy

PANI PROF. DR HAB. N. FARM. JADWIDZE JODYNIS-LIEBERT

za umożliwienie wykonania badań aktywności biologicznej  
pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu

PANU DR HAB. N. CHEM. WIESŁAWOWI PRUKALE, PROF. UAM

za syntezę pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu  
i przekazanie tych związków do badań aktywności biologicznej

PANU DR N. CHEM. ZBIGNIEWOWU DUTKIEWICZOWI

za okazaną pomoc w badaniach QSAR oraz dokowaniu

MOJEJ RODZINIE,

W SZCZEGÓLNOŚCI MOIM RODZICOM I MOJEJ ŻONIE

za wiarę, wsparcie i motywację

NARODOWEMU CENTRUM NAUKI

za przekazanie środków finansowych na badania,  
konkurs Preludium I – grant nr UMO-2011/01/N/NZ4/01137

**PRACĘ DEDYKUJE**

mojej kochanej **żonie Kasi**

oraz

**dzieciom – Adasiowi i Hani,**

które przyszły na świat  
w czasie jej pisania i wykonywania badań

## WYKAZ PUBLIKACJI

### Oryginalne prace doświadczalne:

- \*1. **Regulski M**, Piotrowska-Kempisty H, Pukała W, Dutkiewicz Z, Regulaska K, Stanisiz B, Murias M: Synthesis, *in vitro* and *in silico* evaluation of novel *trans*-stilbene analogues as potential COX-2 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* (praca w recenzji)  
Impact Factor = 2,930
2. Regulaska K, **Regulski M**, Paszun SK, Wzgarda A, Niemier B, Niżnik B, Stanisiz BJ: How to stabilize cilazapril-containing solid dosage forms? The optimization of a final drug formulation *Arab. J. Chem.* 2017; 10(3): 378-388  
Impact Factor = 4,553
- \*3. **Regulski M**, Regulaska K, Pukała W, Piotrowska H, Stanisiz B, Murias M: COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. *Drug Discov. Today* 2016; 21 (4): 598-615  
Impact Factor = 6,369
4. Regulaska K, Stanisiz B, **Regulski M**, Murias M: How to design a potent, specific, and stable angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Drug Discovery Today.* 2014; 19 (11): 1731-1743  
Impact Factor = 6,691
5. Regulaska K, Murias M, Stanisiz B, **Regulski M**: The mutagenicity analysis of imidapril hydrochloride and its degradant, diketopiperazinederivative, nitrosation mixtures by *in vitro* Ames test with two strains of *Salmonella typhimurium*. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2014; 19(6): 412-419
6. Regulaska K, Murias M, Stanisiz B, **Regulski M**: Is there any association between imidapril hydrochloride stability profile under dry air conditions and cancer initiation? *Int. J. Pharm.* 2013; 456(2): 332-339  
Impact Factor = 3,458
7. Bienert A, Kusza K, Wawrzyniak K, Grześkowiak E, Kokot ZJ, Matysiak J, Grabowski T, Wolc A, Wiczling P, **Regulski M**: Assessing circadian rhythms in propofol PK and PD during prolonged infusion in ICU patients. *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* 2010; 37(3): 289-304  
Impact Factor = 1,708

### Prace poglądowe:

8. Niżnik B, **Regulski M**, Regulaska K, Stanisiz BJ: Risks of nutritional supplements consumption by pregnant women. *J. Med. Sci. [d. Now. Lek.]* 2017; 86 (2): 186-190
9. Wzgarda A, Kleszcz R, Prokop M, Regulaska K, **Regulski M**, Paluszczak J, Stanisiz BJ: Unknown face of known drugs - what else can we expect from angiotensin converting enzyme inhibitors? *Eur. J. Pharmacol.* 2017; 797: 9-19  
Impact Factor = 2,730
10. **Regulski M**, Regulaska K, Stanisiz BJ, Murias M, Gieremek P, Wzgarda A, Niżnik B: Chemistry and pharmacology of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 2015; 21 (13): 1764-1775  
Impact Factor = 3,052

11. Regulska K, Stanis B, **Regulski M**, Gieremek P: Molekularne podstawy interakcji międzylekowych w terapii nowotworów jelita grubego (Molecular fundamentals of drug interactions in the therapy of colorectal cancer). *Postepy Hig Med Dośw.* (online) 2014; 68: 209-226  
Impact Factor = 0,633
12. Stanis B, Regulska K, Niżnik B, **Regulski M**, Wzgarda A: Kwas hialuronowy, substancja lecznicza czy tylko korektor urody? (Hyaluronic acid, a remedy or just a mere beauty equalizer?). *Pol. J. Cosmetol.* 2014; 17(1): 14-21
13. Stanis B, Regulska K, **Regulski M**: The angiotensin converting enzyme inhibitors – alternative clinical applications. *J. Med. Sci. [d. Now. Lek.]* 2014; 83(1): 57-61
14. Regulska K, Stanis B, **Regulski M**: The renin-angiotensin system as a target of novel anticancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19(40): 7103-7125  
Impact Factor = 3,311
15. Regulska K, Stanis B, **Regulski M**: Indywidualizacja terapii przeciwnowotworowej; molekularne uwarunkowania mechanizmów działania nowoczesnych leków onkologicznych (Individualization of anticancer therapy; molecular targets of novel drugs in oncology). *Post. Hig. Med. Dośw.* (online) 2012; 66: 855-867  
Impact Factor = 0,552
16. Kaźmierczak E, **Regulski M**: RutiMaxCe - unikatowe połączenie witaminy C i rutyny w walce z przeziębieniem i grypą. *Gaz. Farm.* 2012; 1(237): 55

### Komunikaty ustne:

17. Regulska K, Murias M, Stanis B, **Regulski M**: Impact of nitrosation on mutagenicity of imidapril hydrochloride and its degradation product. 25th Bilateral Poznań-Halle Symposium "Perspectives and challenges in medicine". Poznań, Poland, 13-15 IX 2013. Programme and abstracts. *Wydaw. Nauk. Uniw. Med. im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu* 2013: 31-32

### Streszczenia zjazdowe:

- \*18. **Regulski M**, Piotrowska H, Regulska K, Pukała W, Stanis B, Murias M: Biologiczna aktywność nowych pochodnych trans-stilbenu – w poszukiwaniu inhibitorów COX-2 o działaniu przeciwnowotworowym. W: *Materiały Konferencji "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia"*. Poznań, 17-18 IX 2015r., s. 83
19. Regulska K, **Regulski M**, Murias M, Stanis B: Ocena zależności budowy chemicznej od trwałości w fazie stałej dla dikarboksylovych inhibitorów konwertazy angiotensyny (I-ACE) metodą QSPR 2D. W: *Materiały Konferencji "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia"*. Poznań, 17-18 IX 2015r., s. 91
- \*20 **Regulski M**, Pukała W, Murias M: 2D QSAR analysis of trans-stilbene derivatives as COX-1/COX-2 inhibitors. W: 8<sup>th</sup> Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science "Retrospects, insights and prospects". Kiel, Germany, 29<sup>th</sup> - 30<sup>th</sup> May 2015. Abstract str. PH-04
21. Regulska K, **Regulski M**, Murias M, Stanis B: Mutagenicity of imidapril hydrochloride degradation product in Ames test. W: 8<sup>th</sup> Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science "Retrospects, insights and prospects". Kiel, Germany, 29<sup>th</sup> - 30<sup>th</sup> May 2015. Abstract str. PH-06.

22. Regulska K, **Regulski M**, Murias M, Stanisł B: Zastosowanie techniki QSPR w analizie trwałości wybranych inhibitorów konwertazy angiotensyny (I-ACE). W: Konferencja Naukowa "Nowoczesne techniki badawcze stosowane w analizie farmaceutycznej i biomedycznej". Bydgoszcz, 10-12 IX 2014 r. s. [1].
- \*23. **Regulski M**, Prukala W, Murias M: Stilbene and stilbazole derivatives as potential and selective COX-2 inhibitors: ELISA screening versus QSAR study. W: 25th Bilateral Poznań-Halle Symposium "Perspectives and challenges in medicine". Poznań, Poland, 13-15 IX 2013. Programme and abstracts. Wydaw. Nauk. Uniw. Med. im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu 2013: 114-115

\* publikacje dotyczące tematyki rozprawy doktorskiej

**Sumaryczna wartość wskaźnika Impact Factor: 35,987**

**Indeks Hirscha H = 5**



# SPIS TREŚCI

WSTĘP.....	14
------------	----

## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

<b>1. Cyklooksygenaza-2 i jej inhibitory.....</b>	<b>17</b>
1.1. Budowa i funkcje COX.....	17
1.2. Prostaglandyny i tromboksany.....	22
1.3. Inhibitory COX-2.....	24
1.3.1. Koksyby .....	25
1.3.2. Pochodne <i>trans</i> -stilbenu.....	27
<b>2. Stan zapalny a rozwój nowotworów – na przykładzie nowotworów piersi.....</b>	<b>33</b>
2.1. Nowotwory piersi – epidemiologia, etiologia oraz leczenie.....	34
2.2. Ekspresja COX-2 w nowotworach piersi.....	35
2.3. Wpływ COX-2 na rozwój nowotworów piersi .....	36
2.3.1. Apoptoza .....	37
2.3.2. Proliferacja.....	38
2.3.3. Angiogeneza.....	39
2.3.4. Immunosupresja.....	41
2.3.5. Wpływ COX-2 na aromatazę P450.....	42
2.3.6. Produkcja mutagenów <i>in vivo</i> .....	42
2.4. Farmakologiczna wartość selektywnych inhibitorów COX-2 w raku piersi .....	43
<b>3. Analiza QSAR i dokowanie – opis metod i zastosowanie.....</b>	<b>45</b>
3.1. Wprowadzenie .....	45
3.2. Wady i zalety analizy QSAR .....	47
3.3. Zastosowanie analizy QSAR we współczesnej nauce .....	48
3.4. Deskryptory molekularne.....	49
3.4.1. Podział deskryptorów molekularnych.....	50
3.4.2. Opis podstawowych deskryptorów molekularnych stosowanych w analizie QSAR... 51	
3.5. Analiza 2D QSAR.....	56
3.5.1. Prosta regresja liniowa .....	57
3.5.2. Wielokrotna regresja liniowa .....	58
3.5.3. Analiza czynników głównych .....	58
3.5.4. Podsumowanie 2D QSAR.....	60
3.5.5. Walidacja i kryteria akceptacji modelu 2D QSAR .....	61

3.6.	Inne metody QSAR.....	63
3.6.1.	Naiwny model Bayesa.....	65
3.6.1.1.	Przykładowe obliczenia.....	65
3.6.1.2.	Walidacja naiwnego modelu Bayesa.....	68
3.7.	Dokowanie ligandów do receptora .....	70
3.7.1.	Przygotowanie układu ligand – receptor.....	71
3.7.2.	Algorytmy dokowania.....	72
3.7.3.	Wyniki dokowania .....	73
<b>4.</b>	<b>Oznaczenie aktywności cytotoksycznej leków <i>in vitro</i> .....</b>	<b>75</b>
4.1.	Ogólna charakterystyka testów cytotoksycznych <i>in vitro</i> .....	75
4.1.1.	Wstęp .....	75
4.1.2.	Podstawowe cechy testów cytotoksyczności .....	75
4.2.	Rodzaje testów cytotoksyczności i badanych parametrów .....	77
4.2.1.	Test MTT .....	80
4.3.	Zalety i wady oznaczania cytotoksyczności za pomocą testów <i>in vitro</i> .....	81

## CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

<b>5.</b>	<b>Założenia i cel pracy .....</b>	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>Badane związki.....</b>	<b>85</b>
<b>7.</b>	<b>Oznaczanie aktywności inhibicyjnej pochodnych <i>trans</i>-stilbenu i <i>trans</i>-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach <i>in vitro</i> (ETAP I oraz IV) .....</b>	<b>90</b>
7.1.	Cel badania.....	90
7.2.	Badane związki .....	90
7.3.	Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie.....	90
7.4.	Metodyka badania .....	91
7.4.1.	Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA) .....	91
7.4.1.1.	Zasada oznaczania .....	91
7.4.1.2.	Sposób oznaczania .....	91
7.4.1.3.	Przygotowanie związków przed wykonaniem inkubacji z COX .....	94
7.4.1.4.	Procedura inkubacji związków z COX oraz oznaczenie stężenia prostaglandyn. 94	
<b>8.</b>	<b>Analiza 2D QSAR, naiwny model Bayesa oraz dokowanie do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2 (ETAP II, V oraz VIII) .....</b>	<b>96</b>
8.1.	Cel badania.....	96
8.2.	Badane związki .....	96

8.3.	2D QSAR.....	102
8.3.1.	Zasada oznaczania.....	102
8.3.2.	Deskrytory molekularne.....	102
8.3.3.	Oprogramowanie komputerowe.....	102
8.4.	Naiwny model Bayesa.....	103
8.4.1.	Zasada oznaczania.....	103
8.4.2.	Wartość graniczna.....	103
8.4.3.	Deskrytory i fingerprinty molekularne.....	103
8.4.4.	Oprogramowanie komputerowe i analiza danych.....	104
8.5.	Dokowanie ligandu do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2.....	104
8.5.1.	Zasada oznaczania.....	104
8.5.2.	Struktury krystaliczne COX.....	105
8.5.3.	Oprogramowanie komputerowe.....	106
<b>9.</b>	<b>Synteza pochodnych <i>trans</i>-stilbenu (ETAP III).....</b>	<b>107</b>
9.1.	Cel syntezy.....	107
9.2.	Odczynniki i sprzęt.....	108
9.3.	Opis syntezy.....	109
9.3.1.	Produkt pośredni dla związku nr Z5: 4-chloro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilben.....	109
9.3.2.	Produkt pośredni dla związków nr Z9 i Z11: 4-nitro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilben.....	109
9.3.3.	Związek nr Z5: 4-chloro-4'-karboksymetyloktoksy- <i>trans</i> -stilben.....	110
9.3.4.	Związek nr Z9: 4-nitro-4'-etoksy- <i>trans</i> -stilben.....	111
9.3.5.	Związek nr Z11: 4-nitro-4'-karboksymetyloktoksy- <i>trans</i> -stilben.....	111
9.3.6.	Związek nr N1: 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso- <i>trans</i> -stilben.....	112
9.3.7.	Związek nr N2: 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilben.....	113
9.3.8.	Związek nr N6: 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilben.....	113
9.4.	Potwierdzenie tożsamości i struktury zsyntezowanych związków.....	114
9.4.1.	Metody badań analitycznych.....	114
<b>10.</b>	<b>Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnych <i>trans</i>-stilbenu wobec linii komórkowej MCF-7 (ETAP VI).....</b>	<b>115</b>
10.1.	Cel badania.....	115
10.2.	Badane związki.....	115
10.3.	Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie.....	115
10.3.1.	Hodowla komórek MCF-7.....	115
10.3.2.	Test MTT.....	116
10.4.	Metodyka badania.....	117
10.4.1.	Hodowla komórek MCF-7.....	117

10.4.2. Test MTT .....	117
10.4.2.1. Zasada oznaczania.....	117
10.4.2.2. Sposób oznaczania .....	118
<b>11. Oznaczanie stopnia zahamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII).....</b>	<b>119</b>
11.1. Cel badania.....	119
11.2. Badane związki.....	119
11.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie.....	119
11.3.1. Hodowla komórek MCF-7 .....	119
11.3.2. Oznaczanie stężenia PGE <sub>2</sub> w supernatancie komórkowym .....	119
<b>11.4. Metodyka badania.....</b>	<b>119</b>
11.4.1. Hodowla komórek MCF-7 .....	119
11.4.2. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA) .....	120
11.4.2.1. Zasada oznaczania.....	120
11.4.2.2. Sposób oznaczania .....	120
11.4.2.3. Przygotowanie komórek MCF-7 i związku N1 przed wykonaniem inkubacji...	123
11.4.2.4 Inkubacja związku N1 z komórkami MCF-7 .....	123
11.4.2.5 Procedura oznaczania stężenia prostaglandyny E2 w supernatancie hodowlanym .....	123
<b>12. Wyniki.....</b>	<b>124</b>
<b>12.1. Oznaczanie aktywności inhibicyjnej pochodnych <i>trans-stilbenu</i> i <i>trans-stilbazolu</i> wobec COX-1 i COX-2 w warunkach <i>in vitro</i> (ETAP I).....</b>	<b>124</b>
12.1.1. Badanie przesiewowe.....	124
12.1.2. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków Z5, Z9 i Z11 .....	132
12.1.3. Podsumowanie ETAPU I.....	139
<b>12.2. Analiza 2D QSAR (ETAP II) .....</b>	<b>139</b>
12.2.1. Prosta regresja liniowa (SLR) .....	139
12.2.2. Wieloraka regresja liniowa (MLR) .....	153
12.2.3. Analiza głównych składowych (PCA) .....	157
12.2.4. Wytypowanie struktur nowych związków w oparciu o wyniki 2D QSAR i dane literaturowe .....	165
12.2.5. Badane związki – reguła Lipińskiego .....	167
12.2.6. Podsumowanie ETAPU II.....	168
<b>12.3. Synteza pochodnych <i>trans-stilbenu</i> (ETAP III) .....</b>	<b>168</b>
12.3.1. Wyniki badań tożsamości i struktury .....	169
12.3.2. Podsumowanie ETAPU III .....	169

---

<b>12.4. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków nr N1, N2 i N6 wobec COX-1 i COX-2 w warunkach <i>in vitro</i> (Etap IV)</b> .....	<b>169</b>
12.4.1. Podsumowanie ETAPU IV .....	178
<b>12.5. Naiwny model Bayesa (ETAP V)</b> .....	<b>179</b>
12.5.1. Model inhibitorów COX-1 .....	179
12.5.2. Model inhibitorów COX-2.....	182
<b>12.6. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnych <i>trans-stilbenu</i> wobec linii komórkowej MCF-7 – badanie <i>in vitro</i> – test MTT (ETAP VI)</b> .....	<b>186</b>
12.6.1. Podsumowanie ETAPU VI .....	188
<b>12.7. Oznaczenie aktywności biologicznej związku nr N1 – badanie <i>in vitro</i> – ocena stopnia hamowania syntezy PGE2 w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII)</b> .....	<b>189</b>
12.7.1. Podsumowanie ETAPU VII.....	191
<b>12.8. Dokowanie związku N1 i celekoksylu do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2 (ETAP VIII)</b> .....	<b>191</b>
12.8.1. Związek nr N1: 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilben .....	191
12.8.2. Związek referencyjny - celekoksylb .....	195
12.8.3. Podsumowanie ETAPU VIII .....	200
<b>13. Dyskusja</b> .....	<b>201</b>
<b>14. Podsumowanie i wnioski</b> .....	<b>211</b>
<b>WYKAZ SKRÓTÓW</b> .....	<b>213</b>
<b>SPIS RYCIN</b> .....	<b>219</b>
<b>SPIS TABEL</b> .....	<b>222</b>
<b>SPIS WYKRESÓW</b> .....	<b>224</b>
<b>PIŚMIENNICTWO</b> .....	<b>229</b>
<b>STRESZCZENIE</b> .....	<b>239</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>242</b>
<b>SUPLEMENT</b> .....	<b>244</b>
<b>OŚWIADCZENIA</b> .....	<b>317</b>

## WSTĘP

Choroby nowotworowe stanowią obecnie drugą, po chorobach układu sercowo-naczyniowego, przyczynę zgonów we współczesnej populacji, ale szacuje się, że za kilka lat stanowiąc będą główną przyczynę chorób w starzejącym się społeczeństwie. Obecnie ich leczenie pociąga za sobą bardzo znaczne koszty finansowe, ekonomiczne, jak i społeczne.

Współczesna medycyna zwraca uwagę nie tylko na samo leczenie chorób nowotworowych, ale także na ich profilaktykę i chemoprewencję, czyli zapobieganie transformacjom nowotworowym w organizmie.

Jednym z celów wzbudzających szczególne zainteresowanie zarówno w aspekcie chemoprewencji, jak i terapii chorób nowotworowych jest cyklooksygenaza (COX). Enzym ten występuje w organizmie człowieka w postaci trzech izoenzymów: COX-1 ulegającego ekspresji konstytutywnej, COX-2 indukowanego na skutek procesu zapalnego oraz słabo jeszcze poznanego COX-3 pełniącego funkcje podobne do COX-1. Zainteresowanie COX-2 wzrasta z uwagi na fakt, że jest uważana za kluczowy enzym biorący udział w procesach zapalnych oraz, w będącej w bardzo wielu przypadkach ich następstwem, transformacji nowotworowej. COX-2 uczestniczy w wielu etapach onkogenezy, takich jak: proces inicjacji, angiogeneza, metastaza, jak również procesy hamujące indukcję apoptozy.

Od dłuższego czasu trwają poszukiwania związków o charakterze selektywnych inhibitorów COX-2. Współczesna medycyna dysponuje jednak niewielkim wachlarzem tego typu związków. Zastosowanie kliniczne znalazły jedynie syntetyczne pochodne z grupy oksyamów i koksymbów, a w szczególności celekoksyb, który stosowany jest np. w profilaktyce i leczeniu nowotworu jelita grubego. W odróżnieniu od nieselektywnych inhibitorów COX, związki te cechują się mniejszą toksycznością wobec przewodu pokarmowego. Z drugiej strony ich stosowanie wiąże się ze wzrostem ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych, co było przyczyną wycofania np. rofekoksybu w 2004 r.

W ostatnich latach nowe światło rzucają wyniki badań *in vitro* z zastosowaniem pochodnych *trans*-stilbenu, naturalnego oraz syntetycznego pochodzenia, jak np. *trans*-resweratrolu i jego analogów. Jednym z takich obiecujących związków jest piceatannol (hydroksylowa pochodna *trans*-resweratrolu), w przypadku którego stwierdzono właściwości przeciwwzapalne poprzez zdolność do silnego i selektywnego hamowania aktywności COX-2 (porównywalną do celekoksybu). Ponadto, w szeregu innych badań *in vitro* wykazano różnego rodzaju dodatkowe właściwości tego związku, jak np. działanie chemoprewencyjne, indukcja apoptozy komórek nowotworowych czy działanie mikrobiobójcze. Istotnym ograniczeniem w klinicznym zastosowaniu tych związków jest jednakże ich niska biodostępność po podaniu doustnym oraz brak wystarczającej liczby danych przedklinicznych.

W niniejszej pracy doktorskiej zbadane zostały syntetyczne pochodne *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu pod kątem potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych, związanych z hamowaniem aktywności COX-2. Badane związki zostały wybrane na podstawie przeglądu piśmiennictwa. Dobór grup funkcyjnych obecnych w pierścieniach aromatycznych tych związków powinien też warunkować ich lepszą biodostępność, co będzie można zweryfikować w dalszych badaniach. Do chwili obecnej nie było jakichkolwiek informacji na temat ich aktywności biologicznej.

Wyniki uzyskane w ramach badań podstawowych mogą stanowić pierwszy etap w dalszych badaniach właściwości biologicznych nowych pochodnych *trans*-stilbenu pod kątem potencjalnego zastosowania w terapii chorób nowotworowych, np. raka piersi.

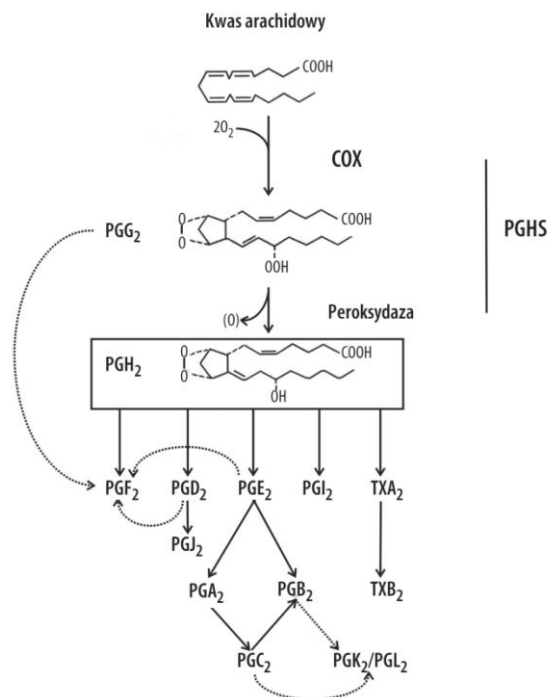
# **CZEŚĆ TEORETYCZNA**



# 1. Cyklooksygenaza-2 i jej inhibitory

## 1.1. Budowa i funkcje COX

Cyklooksygenaza (COX), inaczej zwana syntazą cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego (PGHS) lub syntazą prostaglandynową G/H, należy do grupy oksydoreduktaz katalizujących przemiany metaboliczne, które prowadzą do utworzenia prostanoidów, czyli prostaglandyn, prostacyklin oraz tromboksanów. W ludzkim organizmie występuje w postaci trzech izoenzymów: konstytutywnej COX-1, indukowanej COX-2 oraz najslabiej poznanej COX-3, których substratem są nienasycone kwasy tłuszczowe: kwas arachidonowy, dihomo- $\gamma$ -linolenowy,  $\alpha$ -linolenowy oraz eikozapentaenowy (EPA), pochodzące z – katalizowanej przez fosfolipazy A<sub>2</sub>, C oraz D – hydrolizy fosfolipidów błony komórkowej [1; 2]. COX należy do enzymów bifunkcyjnych, ponieważ posiada dwie różne aktywności katalityczne, tj.: cyklooksygenazową oraz peroksydazową. Jako cyklooksygenaza COX katalizuje reakcję cyklizacji oraz podwójnej oksydacji kwasu arachidonowego z utworzeniem 15-hydroksynadtlenku prostaglandyny G<sub>2</sub>. Z kolei komponenta peroksydazowa COX jest odpowiedzialna za redukcję grupy 15-hydroksynadtlenkowej PGG<sub>2</sub> prowadzącą do powstania prostaglandyny H<sub>2</sub>, która *in vivo* jest formą nietrwałą i pełni funkcję prekursora prostaglandyn D<sub>2</sub>, F<sub>2</sub> oraz E<sub>2</sub>, a także prostacykliny PGI<sub>2</sub> oraz tromboksanu TXA<sub>2</sub> (Ryc. 1.1) [2].



RYCINA 1.1

Schemat biosyntezy prostanoidów z udziałem cyklooksygenazy (alternatywne drogi oznaczono linią przerywaną) [1].

(PGHS – syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego, COX – cyklooksygenaza, PGA<sub>2</sub>-J<sub>2</sub> – prostaglandyny, PGI<sub>2</sub> – prostacyklina, TXA<sub>2</sub>-B<sub>2</sub> – tromboksan).

Konstitutywna postać, czyli COX-1, obecna jest w niemal wszystkich ludzkich organach i tkankach, a jej funkcją jest utrzymanie wewnętrznej homeostazy, między innymi poprzez zapewnienie właściwego przepływu nerkowego oraz filtracji kłębuszkowej, cytoprotekcję błony śluzowej żołądka, regulację napięcia mięśniówki gładkiej naczyń tętniczych oraz zachowanie prawidłowej funkcji trombocytów. COX-2, jako forma indukowana, w warunkach fizjologicznych jest w zasadzie niewykrywalna w tkankach dorosłego człowieka. Wyjątek stanowią ośrodkowy układ nerwowy, nerki i pęcherzyki nasienne. COX-2 występuje również w łożysku oraz w sercu, nerkach, płucach i skórze płodu [1; 2]. W wyniku endogennej stymulacji ekspresja indukowanej formy COX może jednak ulec zwielokrotnieniu. Dotyczy to przede wszystkim komórek zaangażowanych w procesy patofizjologiczne i patologiczne związane ze stanem zapalnym, bólem, gorączką, zmianami zwyrodnieniowymi, chorobą Alzheimera czy nowotworami [3; 4].

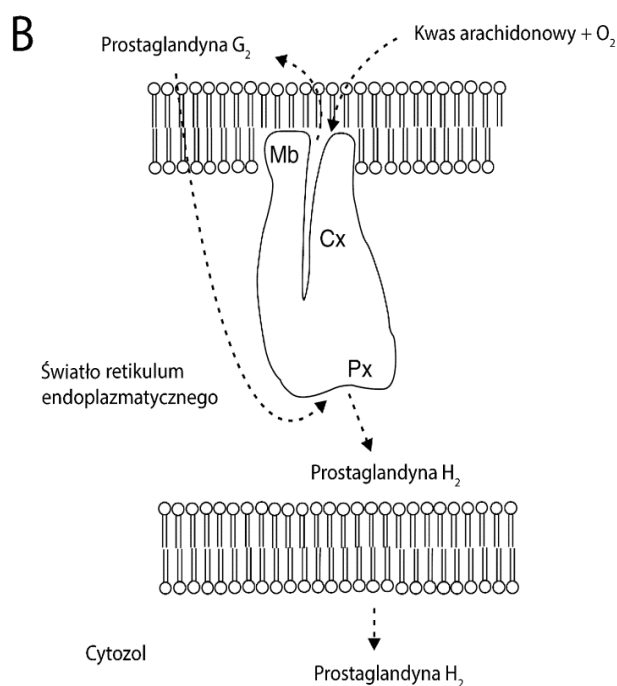
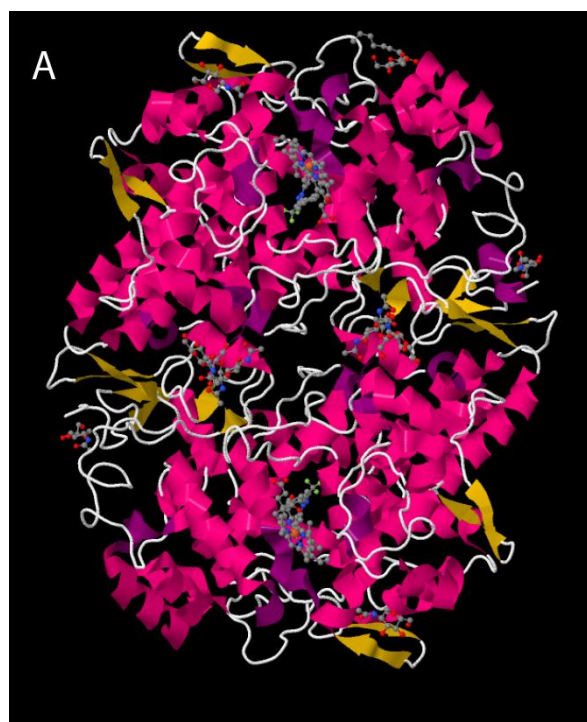
Gen kodujący COX-1 zaliczany jest do genów podstawowego cyklu komórkowego. U człowieka znajduje się on na 9 chromosomie i posiada nieliczne miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych, stąd jego ekspresja jest stała i podlega tylko nieznacznej regulacji. Gen kodujący COX-2 zlokalizowany jest na chromosomie 1, a w jego obrębie wyróżniono kilka regionów regulacji transkrypcji, w tym kasetę TATA (ang. TATA box), motyw NF-IL-6, dwa regiony AP-2, trzy regiony SP1, dwa regiony NF- $\kappa$ B, motyw CRE oraz sekwencję E (ang. E-box). Dzięki temu ekspresja genu COX-2 może być indukowana przez różne mediatory zapalenia oraz czynniki wewnątrzkomórkowe, takie jak: bakteryjne lipopolisacharydy, prozapalne cytokiny IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF- $\alpha$  oraz czynniki wzrostowe EGF, PDGF, TGF $\beta$ . Co więcej, substancje przeciwzapalne takie jak kortykosteroidy, IL-13, IL-10 czy IL-4 mają możliwość hamowania ekspresji COX-2 [1; 2; 5].

Na poziomie komórkowym COX-1 i COX-2 umiejscowione są po wewnętrznej stronie retikulum endoplazmatycznego oraz po obydwu stronach otoczki jądrowej. Pod względem mechanistycznym wykazują one duży stopień pokrewieństwa, a ponadto posiadają podobny profil produktowo-substratowy. Przemiany kwasu arachidonowego katalizują z niemal identyczną kinetyką, jednakże w stosunku do pozostałych substratów, czyli kwasu dihomog- $\gamma$ -linolenowego,  $\alpha$ -linolenowego oraz EPA, COX-2 jest bardziej wydajna [4]. Również budowa cząsteczkowa obydwu izoform COX jest zbliżona, gdyż zgodność ich sekwencji aminokwasowej sięga do 63%. Ponadto, obie izoformy zwykle występują w postaci homodimerów związanych ze sobą za pomocą interakcji hydrofobowych, wiązań wodorowych oraz mostków elektrolitycznych. Szczegółowe różnice strukturalne pomiędzy COX-1 i COX-2 dotyczą między innymi długości ich łańcucha polipeptydowego oraz sposobu wiązania z glikanami [1; 2; 5; 6; 7].

Ludzkie białko COX-1 zbudowane jest z 599 aminokwasów, posiada trzy miejsca N-glikozylacji (przy Asn67, Asn103 i Asn147), a jego masa cząsteczkowa wynosi 70 kDa. Ponadto, wiązania dwusiarczkowe występują tutaj pomiędzy następującymi resztami cysteiny: 35-46, 36-158, 40-56, 58-68 oraz 568-574 [1; 6].

COX-2 składa się z 604 aminokwasów (72 kDa), wśród których wyróżniono cztery miejsca N-glikozylacji w pozycjach Asn53, Asn130, Asn395 oraz Asn580 oraz pięć wiązań dwusiarczkowych pomiędzy resztami cysteiny: 21-32, 22-145, 26-42, 44-54 oraz 555-561 [2; 7]. W ujęciu szczegółowym, struktura pierwszorzędowa białka COX-2 cechuje się obecnością czterech regionów, począwszy od N-końca [1; 5; 7]:

- peptyd sygnałowy (odcinek pomiędzy Met1 a Thr17), odcinany w trakcie obróbki potranslacyjnej,
- domena przypominająca naskórkowy czynnik wzrostu EGF (odcinek pomiędzy Ala18 a Ser55), która zawiera trzy konserwatywne wiązania disiarczkowe i uczestniczy w procesie homodimeryzacji,
- domena błonowa, która tworzy prawoskrętną spiralę zbudowaną z czterech amfipatycznych  $\alpha$ -helis i pełni rolę miejsca zakotwiczenia,
- domena katalityczna, posiadająca dwa niezależne centra aktywne, tj: cyklooksygenazy i peroksydazy.



#### RYCINA 1.2.A i 1.2.B

Budowa indukowanej COX-2 [5; 8; 9].

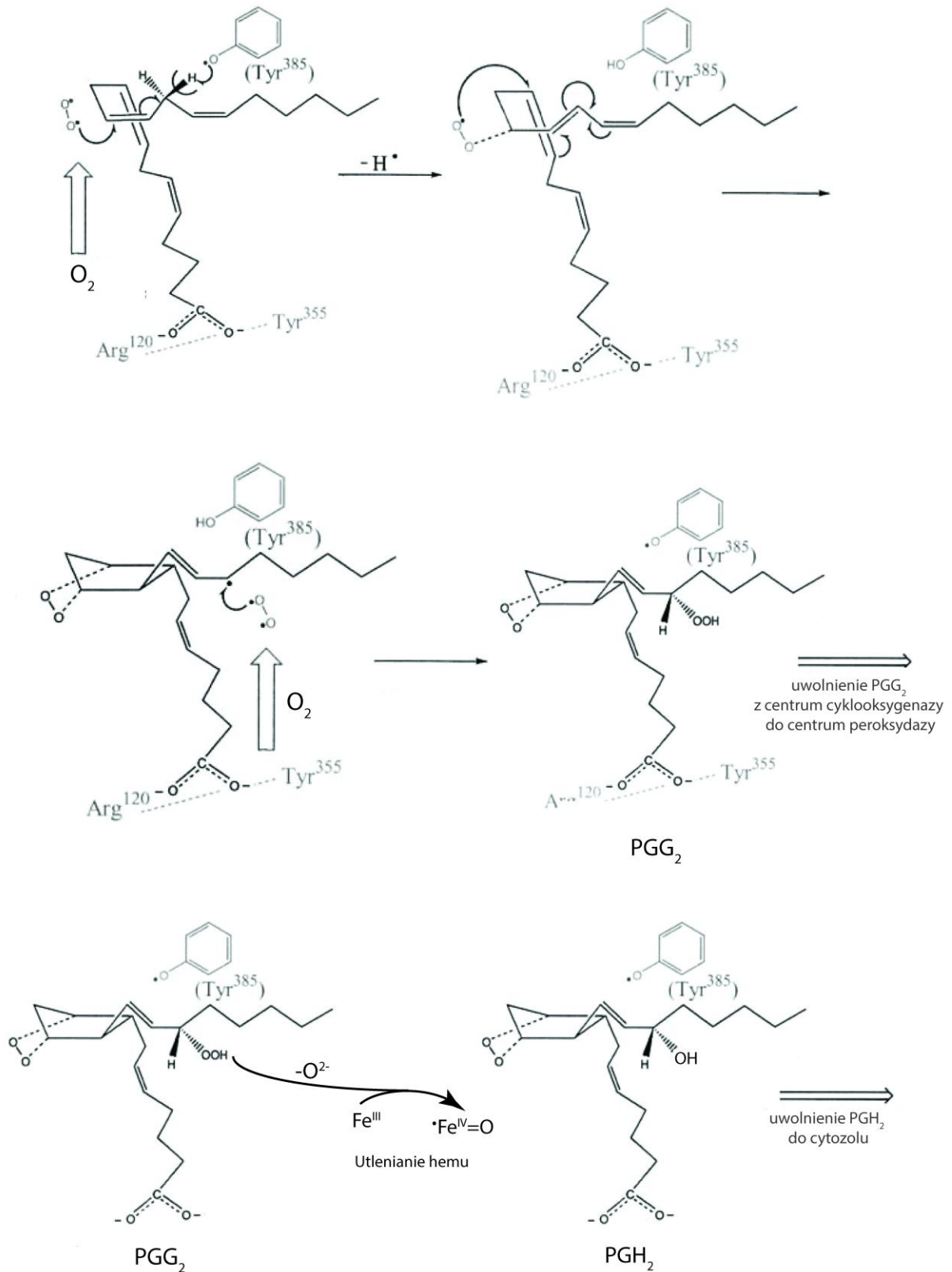
Na RYCINIE 1.2.A zaprezentowano drugorzędową strukturę cząsteczki COX-2 w postaci homodimeru.

RYCINA 1.2.B przedstawia centrum aktywne cyklooksygenazy i peroksydazy w COX-2

(Mb – domena błonowa, Cx – centrum katalityczne cyklooksygenazy, Px – centrum katalityczne peroksydazy).

Zgodnie ze schematem, centrum cyklooksygenazy otoczone jest domeną błonową i przyjmuje postać wąskiego, hydrofobowego kanału o szerokości około 8 Å i długości 25 Å, z ujściem znajdującym się w bliskim sąsiedztwie błony komórkowej. Taka budowa umożliwia penetrację lipofilowych cząsteczek kwasu arachidonowego w głąb enzymu do położonego na dnie kanału, ślepo zakończonego odcinka, będącego właściwym miejscem cyklizacji. Centrum peroksydazy znajduje się natomiast w powierzchniowej części enzymu, w szczelinie, która jest łatwo dostępna dla cząsteczek rozpuszczalnika. Co istotne, w odróżnieniu od centrum cyklooksygenazy, posiada ono cząsteczkę hemu w roli kofaktora, która związana jest z His374 [5].

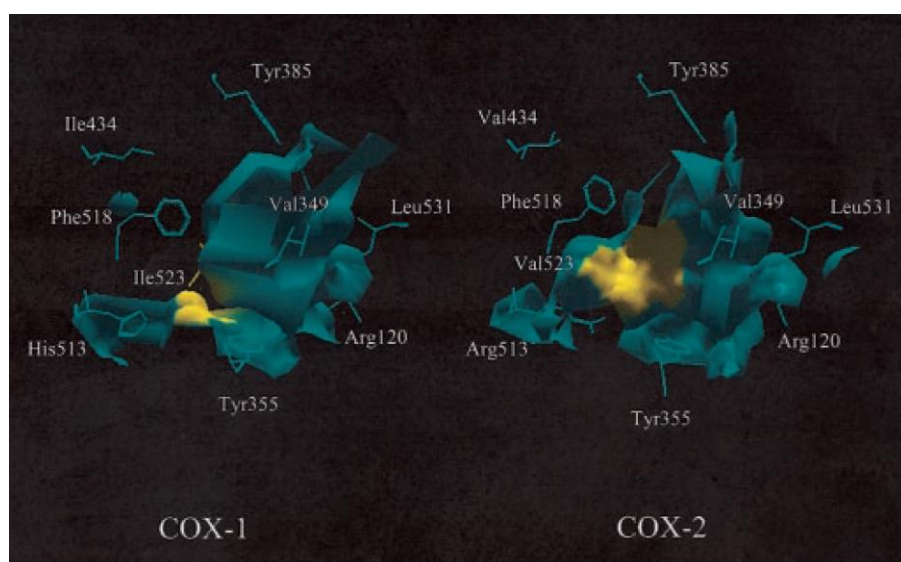
Katalityczny mechanizm konwersji kwasu arachidonowego do prostaglandyny  $H_2$  z udziałem COX-2 może być rozpatrywany jako seria reakcji rodnikowych, która przebiega następująco: w początkowej fazie dochodzi do aktywacji enzymu w wyniku utworzenia rodnika tyrozynowego w pozycji Tyr385 przy udziale grupy hemowej centrum peroksydazy (a dokładnie rodnika ferryloksoporfirynowego). Powstały rodnik tyrozynowy uczestniczy w przekształceniu kwasu arachidonowego do aktywnego rodnika, zdolnego do interakcji z dwiema cząsteczkami tlenu w pozycji C11 i C9. Co istotne, cząsteczka kwasu arachidonowego w centrum aktywnym COX-2 przyjmuje kształt litery L, dzięki czemu jej grupa karboksylowa może zostać związana przez reszty Arg120 i Tyr355 enzymu tworzące z nią wiązania wodorowe, a węgiel C15 ustawia się w optymalnej pozycji do interakcji z rodnikiem tyrozynowym, który pełni funkcję akceptora protonu. W ten sposób tworzy się labilny 15-hydroksynadtlenek, a zachodzącej reakcji cyklizacji i podwójnej oksydacji towarzyszy regeneracja rodnika tyrozynowego. Utworzona w ten sposób prostaglandyna  $PGG_2$  przemieszcza się w stronę centrum peroksydazy, gdzie ulega konwersji do prostaglandyny  $H_2$  w wyniku redukcji z udziałem jonu żelaza wchodzącego w skład hemu [2; 5]. Opisany proces endogennej syntezy  $PGH_2$  przedstawiono schematycznie na RYCINIE 1.3.



RYCINA 1.3

Schemat katalicznej przemiany kwasu arachidonowego do prostaglandyny H<sub>2</sub> przy udziale centrum aktywnego cyklooksygenazy i peroksydazy COX-2 [2].

Niezwykle istotnym elementem budowy centrum aktywnego COX-2 są reszty Val523, Arg513 i Val434, które w COX-1 zastąpione są aminokwasami o większym łańcuchu bocznym – Ile523, His513 i Ile434 (RYCINA 1.4). Różnica ta warunkuje zmianę środowiska wewnątrz kanału na bardziej hydrofilowe oraz zwiększenie wymiarów kieszeni wiążącej substrat w COX-2 o około 17%, co stanowi bezpośrednią przyczynę poszerzenia jej spektrum substratowego w stosunku do COX-1 oraz uzasadnia jej odmienne zachowanie w obecności nieodwracalnego inhibitora COX, którym jest kwas acetylosalicylowy. W tym przypadku COX-1 całkowicie traci zdolność do oksygenacji kwasu arachidonowego w wyniku zależnej od kwasu acetylosalicylowego acetylacji Ser530, podczas gdy COX-2 zachowuje swą aktywność katalityczną, jednakże zmienia się jej profil produktowy, gdyż zamiast PGG<sub>2</sub> tworzy kwas 15-hydroksyeikosatetraenowy (HETE). Różnice w sekwencji aminokwasów w obrębie centrum aktywnego COX-1 i COX-2 stanowią także podstawę dla projektowania selektywnych inhibitorów izoformy indukowanej, które cechują się obecnością dużych, bardziej hydrofilowych ugrupowań chemicznych, łatwo wpasowujących się do szerszego miejsca aktywnego COX-2, ale nie COX-1 [2; 5; 10].



RYCINA 1.4

Różnice w budowie centrum aktywnego cyklooksygenazy pomiędzy COX-1 i COX-2 [2].

## 1.2. Prostaglandyny i tromboksany

Prostaglandyny i tromboksany, jako główne produkty aktywności COX, stanowią dużą rodzinę endogennych związków regulatorowych, zwanych inaczej eikozanoidami. Chemicznie należą one do grupy prostanoidów, zaznaczyć jednak należy, że prostaglandyny są kwasami cyklopentanowymi, a tromboksany są kwasami tetrahydropiranyowymi. Obydwa rodzaje związków powstają w wyniku biosyntezy z tego samego prekursora – kwasu arachidonowego. Biosynteza prostaglandyn i tromboksanów odbywa się w niemal wszystkich tkankach organizmu, przy czym różne komórki

w zależności od stanu fizjologicznego mogą syntezować różne prostanoidy. Prostaglandyna D<sub>2</sub> powstaje przede wszystkim w komórkach tłuszczowych oraz w mózgu, prostaglandyna F<sub>2</sub> w macicy, prostaglandyna I<sub>2</sub> (prostacyklina) w komórkach endotelialnych, prostaglandyna E<sub>2</sub> jest syntezowana w całym organizmie, a tromboksany występują w płytkach krwi i makrofagach. Prostaglandyny i tromboksany mają bardzo krótki czas biologicznego półtrwania, dlatego działają miejscowo w sposób auto- oraz parakryny poprzez interakcje ze specyficznymi receptorami, odpowiednio prostaglandynowymi i tromboksanowymi, przede wszystkim w obrębie układu pokarmowego, sercowo-naczyniowego, centralnego i obwodowego układu nerwowego, wydalniczego oraz rozrodczego. Najważniejsze efekty biologiczne wynikające z działania prostaglandyn i tromboksanów zestawiono w TABELI 1.1 [4; 11; 12].

TABELA 1.1  
Biologiczne efekty prostaglandyn i tromboksanów [4; 11; 12].

Lokalizacja	Mediator	Efekt biologiczny
Żeński układ rozrodczy	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	Skurcz mięśni gładkich macicy
Męski układ rozrodczy	PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	Regulacja płodności
Układ sercowo-naczyniowy	PGE <sub>1</sub> , PGI <sub>2</sub> , TXA <sub>1-2</sub> TXA <sub>2</sub> PGE <sub>1-3</sub> , PGI <sub>2</sub> TXA <sub>2</sub> , PGE <sub>1-3</sub> , PGF <sub>2α</sub> PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Hamowanie / pobudzenie procesów krzepnięcia i agregacji płytek krwi Przepuszczalność naczyń Wazodilatacja naczyń tętniczych Wazokonstrykcja naczyń żylnych Drożność przewodu tętniczego Botalla u płodu
Układ oddechowy	PGE <sub>1-2</sub> , PGI <sub>2</sub> PGF <sub>2α</sub> , TXA <sub>2</sub>	Rozkurcz oskrzeli Skurcz oskrzeli
Układ wydalniczy	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Regulacja przepływu nerkowego, filtracji kłębuszkowej oraz wydalania sodu i wody, uwalnianie reniny
Układ pokarmowy	PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGI <sub>2</sub>	Cytoprotekcja błony śluzowej żołądka, hamowanie wydzielania kwasu solnego i pepsyny Regulacja kurczliwości mięśni gładkich jelit
Układ immunologiczny	PGE <sub>1-3</sub> , PGI <sub>2</sub>	Inhibicja proliferacji limfocytów T i B
Ośrodkowy układ nerwowy	PGE <sub>1-2</sub> PGD <sub>2</sub> PGE <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	Gorączka Sen Ból, stan zapalny

Prostaglandyna PGE<sub>2</sub> jest najważniejszym produktem reakcji katalizowanych przez COX-2. Oprócz wymienionych powyżej funkcji, związanych z mediacją stanu zapalnego oraz bólu, pośredniczy ona także w procesach dotyczących regulacji mechanizmów proliferacyjnych komórki,

a także apoptozy oraz metastazy w przebiegu rozlicznych nowotworów, w tym raka jelita grubego, płuca oraz piersi [12; 13]. Na komórki docelowe działa ona za pośrednictwem swoistych błonowych receptorów: EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> i EP<sub>4</sub>, które należą do rodziny siedmio-transbłonowych receptorów sprzężonych z białkami G [14]. Każdy z nich uruchamia inne ścieżki sygnałowe w komórce. Receptor EP<sub>1</sub> jest sprzężony z białkiem G<sub>q</sub>, a jego wtórnym przekaźnikiem są utworzone przez aktywowaną fosfolipazę C – inozytolo-1,4,5-trifosforan (IP<sub>3</sub>) i diacyloglicerol (DAG), odpowiedzialne za mobilizację wapnia w komórce. EP<sub>2</sub> i EP<sub>4</sub> są natomiast sprzężone z białkiem G<sub>s</sub>, które stymuluje cyklazę adenylową do nasilonej syntezy wewnątrzkomórkowego 3',5'-cyklicznego adenozynomonofosforanu (cAMP), wykazującego właściwości stymulujące kinazę białkową A (PKA), kinazę fosfatydylo-3-inozytolu (PI3K) oraz kinazę 3 syntazy glikogenu (GSK-3). Co istotne, aktywność tych ostatnich związana jest z szlakiem beta-kateniny, odgrywającym rolę w proliferacji komórkowej. Receptor EP<sub>4</sub> jest także związany z, zależną od PGE<sub>2</sub>, indukcją białek odpowiedzi wczesnego wzrostu komórki (EGR-1, z ang. *early growth response protein 1*), a receptor EP<sub>3</sub>, będąc sprzężonym z białkiem G<sub>i</sub>, powoduje inhibicję działania cyklazy adenylowej i spadek zawartości cAMP [12].

Niewłaściwą ekspresję receptorów EP postulowano między innymi w przebiegu raka piersi, gdzie, zgodnie z wynikami badań eksperymentalnych, odnotowywano między innymi zwiększony poziom receptorów EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> i EP<sub>4</sub> oraz zmniejszony poziom receptora EP<sub>3</sub>. Dlatego też zwiększona rola receptorów EP w modulacji procesów wzrostowych komórek nowotworowych, a zaburzenia ich ekspresji dają podstawy do wykorzystania antagonistów COX-2 lub receptorów EP w terapii chorób nowotworowych [15–17].

### 1.3. Inhibitory COX-2

Inhibitory COX, inaczej zwane niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi (NLPZ), wykazują działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne i przeciwgorączkowe. W medycynie należą do najszerszej wykorzystywanej grupy środków farmaceutycznych, głównie w terapii chorób zwyrodnieniowych stawów, w chorobach reumatoidalnych, metabolicznych, zaburzeniach sercowo-naczyniowych oraz w innych chorobach, którym towarzyszą objawy bólowe i procesy zapalne.

W obrębie wymienionej klasy terapeutycznej najstarszą generację stanowią nieselektywne (nieswoiste) inhibitory COX, posiadające porównywalne powinowactwo do formy konstytutywnej COX-1, jak i formy indukowanej COX-2. Pierwszym lekiem tego typu, produkowanym od 1898 roku, była aspiryna (kwas acetylosalicylowy), której działanie polega na nieodwracalnej inhibicji enzymu docelowego w wyniku acetylacji Ser530 (zgodnie z nomenklaturą COX-1). Pozostałe, dostępne dziś, nieswoiste inhibitory COX działają na zasadzie kompetycyjnej inhibicji, poprzez konkurencję z kwasem arachidonowym o miejsca wiązania w centrum aktywnym enzymu [2]. Należą do nich między innymi: diklofenak, indometacyna, ketoprofen, naproksen, ibuprofen, meklofenamat czy



fenylobutazon. W grupie nieswoistych inhibitorów COX istnieje również podgrupa preferencyjnych inhibitorów COX-2, do której należą: nabumeton, etodolak, nimesulid i meloksykam, a ich cechą charakterystyczną jest silniejsza inhibicja COX-2 niż COX-1 w zakresie dawek terapeutycznych. Farmakologiczna korzyść płynąca z nieselektywnej inhibicji COX, związana z efektem przeciwbólowym, przeciwzapalnym i przeciwgorączkowym, jest istotnie ograniczona znaczną toksycznością żołądkowo-jelitową oraz nerkową wymienionej grupy leków. W konsekwencji hamowanie COX-1 powoduje zmniejszenie syntezy prostaglandyn o działaniu hemo- i homeostatycznym, w tym cytoprotekcyjnym, co prowadzi do uszkodzeń przewodu pokarmowego, owrzodzeń żołądka oraz krwawień. W nerkach natomiast inhibicja COX-1 przyczynia się do nadmiernej retencji wody i sodu oraz zmniejszenia przepływu krwi [1–4; 10]. Co istotne, zjawiska te znacznie komplikują proces leczenia oraz podwyższają jego koszty, a także mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka.

### 1.3.1. Koksyby

Dokładny opis mechanizmów związanych z powstawaniem i rozwojem ognisk zapalnych w organizmie doprowadził do rozwoju nowszej generacji leków z grupy NLPZ, selektywnie hamujących formę indukowaną COX-2 (ponad 50-krotnie silniej niż COX-1), czyli tą, która jest odpowiedzialna za syntezę prostaglandyn o działaniu prozapalnym. Pierwsze selektywne inhibitory COX-2, zaliczane do grupy koksybów, zostały wprowadzone do leczenia na przełomie 1998 i 1999 roku, a były to celekoksyb i rofekoksyb [4; 18; 19]. Obecnie znane są również inne koksyby, np. waldekoksyb, parekoksyb, lumirakoksyb i etorikoksyb [20].

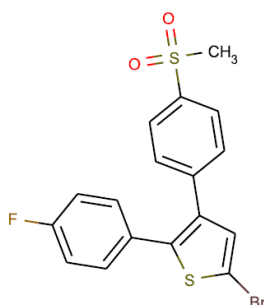
Z chemicznego punktu widzenia związki te można podzielić na 2 zasadnicze grupy [20]:

- heterocykliczne diarylopo pochodne: celekoksyb, rofekoksyb, waldekoksyb, parekoksyb sodu, etorikoksyb;
- pochodne kwasu fenylooctowego: lumirakoksyb (podobny w budowie do diklofenaku).

Związki te, jako bardzo słabe inhibitory COX-1 oraz bardzo silne inhibitory COX-2, nie wpływają na syntezę prostaglandyn o fizjologicznym działaniu ochronnym na śluzówkę żołądka. Dlatego też mają mniejszy zakres działań niepożądanych w obrębie przewodu pokarmowego i nerek w porównaniu z nieswoistymi NLPZ. Ich stosowanie natomiast związane jest ze zwiększonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych (np. zawał serca, udar), co prawdopodobnie wynika z zachwiania równowagi hemostatycznej organizmu [4]. Teoretycznie zjawisko to przypisuje się zmniejszeniu, zależnej od COX-2, syntezy przeciwzakrzepowej prostacykliny PGI<sub>2</sub> w naczyniach krwionośnych bez kompensacyjnego zmniejszania stężenia prozakrzepowych tromboksanów wytwarzanych przez COX-1 [20]. Z tego powodu zwiększone ryzyko incydentów sercowo-naczyniowych było bezpośrednią przyczyną wycofania z leczenia rofekoksybu w 2004

roku [21] i waldekoksybu w 2005 roku [22]. Lumirakoksyb natomiast został wycofany z powodu nadmiernej hepatotoksyczności w 2007 roku [23].

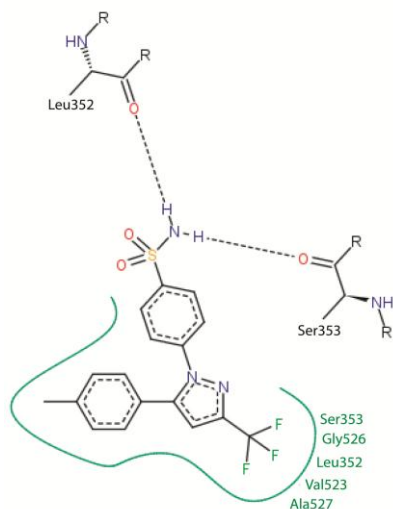
Podstawą procesu projektowania i rozwoju selektywnych inhibitorów COX-2 były opisane w ROZDZIALE 1.1 różnice w budowie centrów aktywnych obydwu izoform cyklooksygenazy – przede wszystkim charakterystyczne dla COX-2 zwiększenie wymiarów hydrofobowego „kanału” wiążącego substrat oraz obecność bocznej „kieszeni” hydrofilowej [10]. Stąd oczywistym kierunkiem poszukiwań selektywnych inhibitorów COX-2 stało się wprowadzanie do cząsteczki inhibitora zawady sterycznej w postaci grupy sulfonamidowej (celekoksyb i parekoksyb) lub metylosulfonowej (rofekoksyb i etorikoksyb), uniemożliwiającej interakcję z COX-1, przy jednoczesnym silnym oddziaływaniu z „kieszenią” hydrofilową w COX-2 [2; 24]. Prototypem wymienionych powyżej inhibitorów COX-2 był związek o nazwie DuP-697 z grupy diarylowych heterocykli, zawierających ugrupowanie *cis*-stilbenu, które w badaniu SAR okazało się niezbędnym elementem budowy warunkującym selektywność wobec COX-2 (RYCINA 1.5) [25; 26]. Co więcej, dodatkowemu zwiększeniu powinowactwa do COX-2 sprzyjała obecność podstawników stanowiących zawadę steryczną dla COX-1 w pierścieniu aromatycznym w pozycji *para* oraz odpowiedni stopień utlenienia siarki w podstawniku sulfonowym, przy czym wykazano, że sulfony i sulfonamidy są selektywne w przeciwieństwie do sulfonotlenków i sulfidów [26].



RYCINA 1.5  
Struktura związku DuP-697 [25].

Na podstawie krystalicznej struktury przestrzennej kompleksu COX-2-celekoksyb stwierdzono, że selektywność oraz powinowactwo tego inhibitora wynika z szeregu interakcji pomiędzy nim a resztami aminokwasowymi enzymu. Związek ten przyjmuje konformację podobną do *cis*-stilbenu, dzięki czemu oddziałuje z trzema regionami miejsca aktywnego COX-2. Atomy tlenu grupy sulfonamidowej celekoksybu tworzą wiązania wodorowe z aminokwasami bocznej „kieszeni” hydrofilowej: His90, Gln192 oraz Arg513. Pierścień pirazolu wraz z grupą trifluorometylową reaguje natomiast za pomocą oddziaływań elektrostatycznych i wiązań Van der Waals’a z aminokwasami znajdującymi się u podstawy głównego kanału hydrofobowego oraz budującymi boczny kanał hydrofobowy, tj.: Arg120, Tyr355 oraz Leu352, Ser353, Val523 i Gly526. Pierścień benzenu podstawiony grupą metylową w pozycji *para* oddziałuje wiązaniami Van der Waals’a z aminokwasami tworzącymi główny kanał hydrofobowy, m.in. Ser530 i Tyr385 [8; 9; 27–29]. Przedstawiona poniżej

RYCINA 1.6 wygenerowana za pomocą programu PoseView przedstawia pozostałe interakcje w kompleksie celekoksybu z COX-2 [30].



RYCINA 1.6

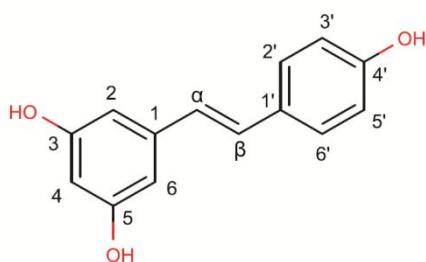
Schemat wiązania celekoksybu z COX-2

(linie czarne, przerywane – wiązania wodorowe, linie ciągłe, zielone – oddziaływania hydrofobowe) [30].

### 1.3.2. Pochodne *trans*-stilbenu

Oprócz koksylbów istnieją inne selektywne inhibitory COX-2, których aktywność wykazano w badaniach *in vitro* i *ex vivo*, ale obecnie nie są one wykorzystywane w medycynie jako leki. Wśród tych związków wyróżnia się również pochodne *trans*-stilbenu.

Impulsem do poszukiwania nowych inhibitorów COX, naturalnego jak i syntetycznego pochodzenia, było odkrycie biologicznych właściwości resweratrolu, który *in vitro* wykazuje nieselektywną zdolność do hamowania aktywności COX-1 ( $IC_{50} \sim 0,5 \mu\text{mol/l}$ ) i COX-2 ( $IC_{50} \sim 1 \mu\text{mol/l}$ ) [31; 32]. Związek ten występuje w różnych gatunkach roślin, a jego szczególnie bogatym źródłem są owoce winogron i czarnej porzeczki oraz orzeszki ziemne. Wśród jego wielu właściwości biologicznych można wymienić działanie przeciwzapalne, przeciwgrzybicze, przeciwbakteryjne, cytotoksyczne oraz kardioprotekcyjne [32]. Z chemicznego punktu widzenia resweratrol jest pochodną stilbenu i może występować w formie dwóch izomerów: *cis* oraz *trans*. Aktywność biologiczną wykazuje jednakże jedynie naturalnie występujący *trans*-resweratrol (3,4',5-trihydroxy-*trans*-stilben) (RYCINA 1.7) [31; 32].



RYCINA 1.7

Struktura *trans*-resweratrolu [31].

W oparciu o uzyskane wyniki rozpoczęto badania różnorodnych pochodnych *trans*-resweratrolu i *trans*-stilbenu, które mogłyby wykazywać selektywną zdolność do hamowania aktywności indukowanej formy COX-2. Związki te poszukiwano zarówno wśród naturalnych pochodnych, jak również syntezowano nowe analogi w oparciu o wcześniejsze doświadczenia oraz analizy QSAR *in silico*.

Szczególnie istotną grupę nowych związków stanowią hydroksylowe pochodne *trans*-resweratrolu, z których największą selektywność wobec COX-2 w warunkach *in vitro* stwierdzono dla 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu (3,3',4,4',5,5'-HHS) oraz piceatannolu (3,3',4',5-tetrahydroksy-*trans*-stilbenu). Za pomocą immunoenzymatycznego testu *in vitro* wykazano, że 3,3',4,4',5,5'-HHS ponad 700 razy silniej hamuje COX-2 niż COX-1, a piceatannol cechuje się ponad 400 razy silniejszym działaniem wobec COX-2. Tak znaczny wzrost aktywności w porównaniu do nieselektywnego *trans*-resweratrolu wynikać może z obecności wielu grup hydroksylowych (-OH) w pierścieniach aromatycznych obydwóch związków, szczególnie w pozycji 3'. Z kolei badania dotyczące dokowania wykazały, że związki te (w przeciwieństwie do koksylów) nie zajmują hydrofilowej bocznej „kieszeni” utworzonej w wyniku zastąpienia Ile523 przez Val523. Można zatem wnioskować, że większa ilość grup -OH skutkuje utworzeniem dodatkowych wiązań wodorowych oraz innym sposobem wiązania się tych związków z centrum aktywnym COX-2 [32]. Warto nadmienić, że szereg badań *in vitro* wykazało również różnorodne biologiczne właściwości piceatannolu, od aktywności przeciwzapalnej i cytotoksycznej po działanie mikrobiobójcze, co związane jest z oddziaływaniem tego związku na wiele enzymów i komórkowych szlaków sygnałowych [33].

Inną grupę związków w warunkach *in vitro* stanowią metylowe pochodne *trans*-resweratrolu, które, za wyjątkiem jednego z nich, okazały się słabymi i nieselektywnymi inhibitorami COX-2. Jedynie 3,3',4,4',5,5'-heksametoksy-*trans*-stilben cechował się umiarkowanie silnym i selektywnym działaniem wobec COX-2, ok. 45 razy większym niż wobec COX-1 (TABELA 1.2) [32].

W kolejnym badaniu wykonano syntezę i oceniono właściwości biologiczne 16 różnych pochodnych *trans*-stilbenu pod kątem zdolności do hamowania COX-1 i COX-2. Były to grupy związków, którym do pierścieni aromatycznych wprowadzono następujące podstawniki w pozycje meta lub para: -OH, -OCH<sub>3</sub>, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -F, -CF<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub> lub jeden z pierścieni fenyłowych zastąpiono naftyłowym. Ponadto, w niektórych związkach dokonano modyfikacji struktury w mostku etylenowym łączącym oba pierścienie poprzez zastąpienie atomu wodoru grupą -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> lub -CF<sub>3</sub>. Największą aktywność wobec COX-2 stwierdzono dla kilku związków (IC<sub>50</sub> < 2 μmol/l), które w pozycji 4' posiadają grupę -OH lub -CF<sub>3</sub>. Prawie wszystkie posiadały również grupę -OH lub -OCH<sub>3</sub> w pozycjach 3 i 5 oraz grupę -CH<sub>3</sub> lub -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> w mostku etylenowym. Jeden związek (oznaczony jako 1M13) nie posiadał podstawników w pozycjach 3 i 5, ale w pozycję 4 miał wprowadzoną grupę -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Jedynie ten związek okazał się nie tylko silnym, ale i umiarkowanie selektywnym inhibitorem COX-2 (prawie 80 razy silniejszym niż wobec izoformy konstytutywnej).

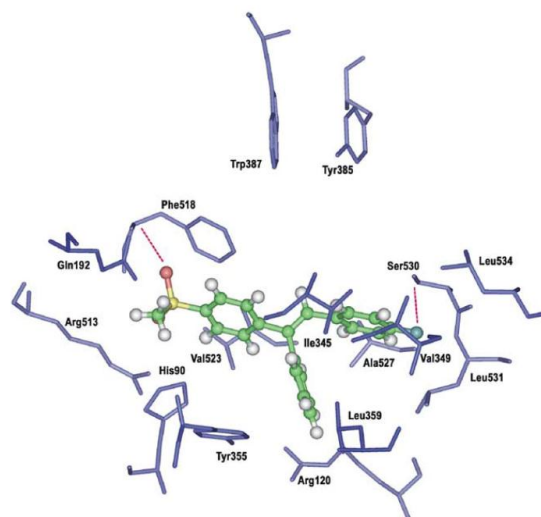
Na podstawie uzyskanych rezultatów można przypuszczać, że silne działanie wobec COX-2 wynikać może z obecności różnych podstawników bogatych w elektrony w jednym z pierścieni aromatycznych – w pozycjach 3, 4 i 5. Z kolei podstawnik alkilowy w mostku etylenowym stanowi zawadę steryczną dla płaskiej konformacji pochodnych *trans*-stilbenu i zmienia przestrzenną orientację obydwóch pierścieni aromatycznych w stosunku do płaskiej struktury mostka, co może mieć również znaczenie w lepszym dopasowaniu się tych związków do miejsca aktywnego COX-2 [34]. Szczegółowe dane przedstawiono w TABELI 1.2.

Ciekawą, aczkolwiek niewielką, grupę inhibitorów COX stanowią pochodne *trans*-1,1,2-triaryloetenu, wśród których cztery związki cechują się silną inhibicją ( $IC_{50} < 1 \mu\text{mol/l}$ ) i wysoką selektywnością ( $> 100$ -krotną) wobec COX-2. Na szczególną uwagę zasługuje związek o nazwie: 4-sulfonmetylo-4'-fluoro- $\alpha$ -fenylo-*trans*-stilben (oznaczony jako 10c), który wykazuje selektywność rzędu  $>3000$ , czyli ponad 6-krotnie wyższą niż celekoksyb. Co istotne, struktura przestrzenna tych związków w pewnym zakresie przypomina budowę koksyby – w obu przypadkach występują trzy pierścienie aromatyczne oraz grupa sulfonmetylowa w pozycji para w jednym z pierścieni. Rezultaty dokowania ww. związków z miejscem aktywnym COX-2 wskazują na, analogiczne jak w przypadku koksybołów, oddziaływania z trzema regionami, tj.:

- hydrofilową boczną „kieszeń” (His90, Arg513 oraz Gln192) za pomocą pierścienia podstawionego grupą  $-\text{SO}_2\text{CH}_3$ ,
- bocznym kanałem hydrofobowym (Arg120, Leu359 i Tyr 355) za pomocą pierścienia benzenu,
- głównym kanałem hydrofobowym (Ser530, Ala527 i Val349) za pomocą pierścienia benzenu podstawionego fluorem, chlorem lub grupą metylową w pozycji para.

Taki sposób interakcji sugeruje przyjęcie konformacji *cis* badanych związków w miejscu aktywnym COX-2, co może tłumaczyć tak wysoką selektywność tych związków wobec badanego enzymu.

Należy również stwierdzić, że kluczowym elementem budowy warunkującym wysoką selektywność analizowanych związków jest obecność podstawnika w pozycji para w pierścieniu oddziałującym z głównym kanałem hydrofobowym, dlatego że podstawnik ten reaguje wiązaniem wodorowym z grupą  $-\text{OH}$  Ser530. W tym przypadku najsilniejszą interakcję obserwuje się dla fluoru, mniejszą dla chloru i grupy metylowej (TABELA 1.2). Brak podstawnika w tym miejscu całkowicie znosi selektywność wobec COX-2. Dokowanie najsilniejszego związku 10c przedstawiono na RYCINIE 1.8 [35].



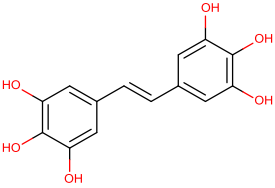
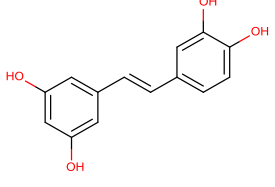
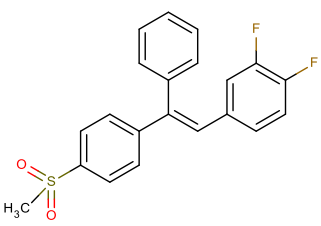
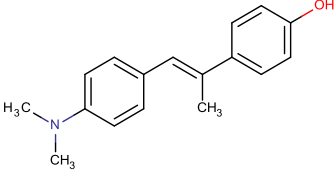
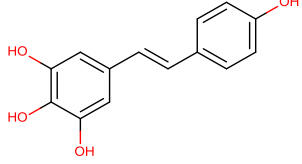
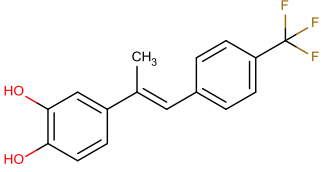
RYCINA 1.8

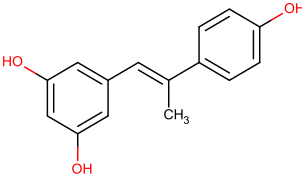
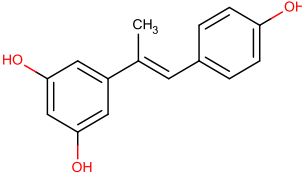
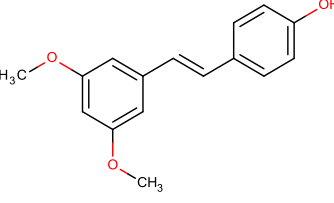
Schemat dokowania związku 10c w miejscu aktywnym COX-2 [35].

TABELA 1.2

Pochodne *trans*-stilbenu selektywnie (>50x) i/lub silnie ( $IC_{50} < 2 \mu\text{mol/l}$ ) hamujące aktywność COX-2.

Nazwa chemiczna i struktura pochodnej <i>trans</i> -stilbenu (w nawiasie podano oznaczenie związku w publikacji)	COX-1 $IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	COX-2 $IC_{50}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	Wskaźnik selektywności (COX-1 $IC_{50}$ / COX-2 $IC_{50}$ )
 4'-fluoro-4-sulfonmetylo- $\alpha$ -fenylo- <i>trans</i> -stilben (10c) [35]	>100	0,0316	>3164
 4'-chloro-4-sulfonmetylo- $\alpha$ -fenylo- <i>trans</i> -stilben (10e) [35]	>100	0,1138	>878
 4'-metylo-4-sulfonmetylo- $\alpha$ -fenylo- <i>trans</i> -stilben (10b) [35]	>100	0,12	>833

Nazwa chemiczna i struktura pochodnej <i>trans</i> -stilbenu (w nawiasie podano oznaczenie związku w publikacji)	COX-1 IC <sub>50</sub> (μmol/l)	COX-2 IC <sub>50</sub> (μmol/l)	Wskaźnik selektywności (COX-1 IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub> )
 <p>3,3',4,4',5,5'-heksahydrokso-<i>trans</i>-stilben (3,3',4,4',5,5'-HHS) (12) [32]</p>	0,748	0,00104	719,23
 <p>3,3',4',5-tetrahydrokso-<i>trans</i>-stilben (3'-hydrokso-<i>trans</i>-resweratrol, piceatannol) (10) [32]</p>	4,713	0,0113	417,08
 <p>3',4'-difluoro-4-sulfonmetylo-α-fenilo-<i>trans</i>-stilben (10d) [35]</p>	>100	0,97	>103
 <p>4-(N,N-dimetylo)amino-4'-hydrokso-β-metylo-<i>trans</i>-stilben (1M13) [34]</p>	36,3	0,47	77,23
 <p>4-hydrokso-<i>trans</i>-resweratrol (8) [32]</p>	2,072	0,04537	45,67
 <p>3,4-dihydrokso-4'-trifluorometylo-α-metylo-<i>trans</i>-stilben (2M16) [34]</p>	10,7	1,74	6,15

Nazwa chemiczna i struktura pochodnej <i>trans</i> -stilbenu (w nawiasie podano oznaczenie związku w publikacji)	COX-1 IC <sub>50</sub> (μmol/l)	COX-2 IC <sub>50</sub> (μmol/l)	Wskaźnik selektywności (COX-1 IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub> )
 <p>β-metylo-<i>trans</i>-resweratrol (1M2) [34]</p>	1,9	1,57	1,21
 <p>α-metylo-<i>trans</i>-resweratrol (2M1) [34]</p>	1,9	1,78	1,07
 <p>3,5-dimetoksy-4'-hydrokso-<i>trans</i>-stilben (pterostilben) (1H6) [32; 34]</p>	4,84 <sup>32</sup> 0,70 <sup>34</sup>	1,19 <sup>32</sup> 0,82 <sup>34</sup>	4,07 <sup>32</sup> 0,85 <sup>34</sup>

W oparciu o dane literaturowe należy stwierdzić, że w badaniach *in vitro* przeanalizowano jak dotąd niewielką grupę pochodnych *trans*-stilbenu (ok. 100 związków) pod kątem zdolności do hamowania aktywności cyklooksygenazy oraz właściwości przeciwnowotworowych. Spośród nich wyróżnić można kilka związków, które preferencyjnie lub wysoce selektywnie oddziaływały na izoformę COX-2. Przykładami tych związków są: 3,3',4,4',5,5'-HHS, piceatannol [32], 1M13 [34] oraz 10b-d [35]. Na szczególną uwagę zasługują różnorodne właściwości biologiczne (w tym chemoprewencyjne) naturalnej pochodnej *trans*-resweratrolu – piceatannolu [33]. Z kolei pozostałe związki mogą stanowić obiecujący materiał do dalszych analiz *in vitro* z udziałem komórek nowotworowych. Powyższe informacje stanowią także impuls do poszukiwania nowych inhibitorów COX-2 w obrębie pochodnych *trans*-stilbenu / *trans*-resweratrolu.



## 2. Stan zapalny a rozwój nowotworów – na przykładzie nowotworów piersi

Reakcja zapalna jest złożonym procesem biochemicznym oraz immunologicznym o zasięgu lokalnym bądź ogólnym, zachodzącym w naczyniach krwionośnych i tkankach, oraz będącym wyrazem swoistej i ukierunkowanej odpowiedzi organizmu na działanie czynników uszkodzających strukturę tkankową lub narządową, do których należą patogeny, wadliwe komórki lub substancje drażniące. Pierwotnymi mediatorami procesu zapalnego są między innymi prostaglandyny wytwarzane na skutek aktywności katalitycznej COX-2, ponieważ te związki hormonalne pojawiają się w dużych ilościach w miejscu działania czynnika uszkodzającego w wyniku zmian lokalnych struktur komórkowych oraz wywołują odpowiedź naczyniową odpowiedzialną za inicjację oraz utrzymanie zapalenia [36]. Z tego też względu prostaglandyny zaliczane są także do mediatorów zapalenia przewlekłego, co sprawia, że ich chroniczna nadprodukcja może prowadzić do rozwoju ognisk o charakterze nowotworowym. Tego rodzaju obserwacje potwierdzone są również danymi, które wskazują że długotrwałe utrzymywanie się stanu zapalnego w organizmie jest powiązane z etiologią ponad 15% wszystkich nowotworów złośliwych. Korelację pomiędzy czynnikiem o charakterze prozapalnym a indukcją onkogenezy potwierdzono w następujących przypadkach [37–39]:

- zakażeniem *Helicobacter pylori* a predyspozycją do rozwoju raka żołądka,
- chronicznym wirusowym zapaleniem wątroby a rozwojem nowotworów wątroby,
- zakażeniem *Human papilloma virus* (HPV) a rozwojem raka szyjki macicy,
- zakażeniami pasożytniczymi, jak np. *Schistosoma haematobium*, a rozwojem raka pęcherza moczowego,
- przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (POChP), spowodowaną głównie paleniem tytoniu, a rozwojem raka płuca,
- chronicznym zapaleniem jelit (np. wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniowskiego-Crohna) a nowotworami jelita grubego,
- rakiem wewnątrzprzewodowym (przedinwazyjna forma raka piersi), charakteryzującym się wysokim poziomem COX-2 a inwazyjnym rakiem piersi.

Przypuszcza się, że miejscowe ogniska zapalne, ulegające stopniowemu uogólnieniu, tworzą się już na etapie inicjacji kancerogenezy. Z kolei promocji i progresji nowotworu sprzyja utrzymywanie się pierwotnego stanu zapalnego, gdyż w jego obecności dochodzi do lokalnej, nadmiernej produkcji reaktywnych form tlenu. Te ostatnie natomiast uszkodzając DNA prowadzą do akumulacji mutacji w materiale genetycznym komórki, destabilizując go i ułatwiając komórce ostateczne wyłamanie się spod rygoru podziałowego i nabycie cech nieśmiertelności. Proces zapalny przyczynia się także do uwalniania czynników wzrostu, takich jak EGF lub FGF, które stymulują proliferację komórek nowotworowych i dzięki temu odgrywają ważną rolę na etapie promocji kancerogenezy. Co więcej,

w obrębie mikrośrodowiska guza obserwowano obecność różnorodnych komórek układu odpornościowego, w tym komórek dendrytycznych, limfocytów oraz makrofagów, uwalniających cytokiny prozapalne, takie jak TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz IL-8, które wtórnie indukują proces zapalny oraz przyczyniają się do powstania komórek o fenotypie złośliwym [12].

### **2.1. Nowotwory piersi – epidemiologia, etiologia oraz leczenie**

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym w populacji kobiet w Polsce i stanowi główną przyczynę umieralności z powodu nowotworów złośliwych w strukturze tej płci (rocznie około 5000 zgonów). Ocenia się, że odsetek zachorowań na nowotwory piersi w wymienionej grupie wynosi około 20,5% wszystkich nowotworów złośliwych (zapadalność rzędu 61,2 na 100 tys.) [40]. W Wielkopolsce rak piersi był nowotworem o największej zachorowalności u kobiet w 2010 (zachorowalność rzędu 23%, tj. 1 583 zarejestrowanych przypadków), co oznacza 31% wzrost w stosunku do roku 2001. Co istotne, ponad 81% wszystkich przypadków raka piersi rozpoznano w populacji kobiet w grupie wiekowej 50+. Liczba zgonów wyniosła 13% (466 przypadków) i była druga co do wielkości w strukturze zgonów na nowotwory złośliwe u Wielkopolanek w 2010 roku, ustępując tylko nowotworom płuca [41]. Co istotne, wykazano, że liczby bezwzględne zgonów wzrastają liniowo z wiekiem.

W większości przypadków raka piersi, etiologia choroby pozostaje nieznana. Jednakże do najważniejszych czynników ryzyka zachorowania należą: czynniki stylu życia (np. alkohol, zła dieta, otyłość, brak aktywności fizycznej), rak piersi w wywiadzie, obciążenie rodzinne, czynniki dziedziczne (mutacje *BRCA1* i *BRCA2*), płeć żeńska, starszy wiek, czas aktywności hormonalnej przekraczający 30 lat (wczesna pierwsza miesiączka, późna menopauza), stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, późny wiek pierwszego porodu lub nierództwo, ekspozycja na promieniowanie jonizujące, niektóre łagodne choroby piersi [40–42].

Rak piersi należy do nowotworów dobrze rokujących. Jego wskaźnik zachorowania/zgony ogółem w Wielkopolsce w 2010 wyniósł 3,4. Jednakże w grupie wiekowej 35-39 lat osiągnął on wartość równą 25. Podstawą skutecznej terapii jest wczesne wykrycie, a leczenie chorych jest procesem wieloetapowym i obejmuje postępowanie chirurgiczne, radioterapię oraz leczenie systemowe [41]. W ramach leczenia systemowego stosuje się hormonoterapię, chemioterapię oraz leczenie celowane, przy czym lekami z wyboru są [40]:

- antyestrogeny (tamoksyfen, idoksyfen, toremifen, droloksyfen),
- inhibitory aromatazy (letrozol, anastrozol, eksemestan),
- analogi gonadoliberyny (goserelina, buserelina),
- progestageny (octan megestrolu, medroksyprogesteron),
- analogi pirymidyn (5-fluorouracyl, kapecytabina),
- analogi kwasu foliowego (metotreksat),

- leki alkilujące (cyklofosfamid),
- inhibitory topoizomerazy (antracykliny),
- leki zaburzające funkcjonowanie mikrotubul (taksany – paklitaksel, docetaksel),
- przeciwciała monoklonalne (trastuzumab, bewacyzumab),
- inhibitory kinaz tyrozynowych (lapatynib).

Dobór odpowiedniego schematu terapeutycznego u chorych z rakiem piersi uwarunkowany jest indywidualnym fenotypem komórek nowotworowych, związanym z ich statusem receptorowym, a więc stopniem ekspresji receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PG) oraz receptorów HER2. I tak, wykazano, że odsetek odpowiedzi na leczenie hormonalne jest ściśle związany z obecnością i ilością receptorów ER i PG, przy czym im jest ona większa, tym większe prawdopodobieństwo skuteczności hormonoterapii. Z kolei, obecność receptora HER2 (20–30% wszystkich nowotworów piersi) stwarza możliwość wdrożenia leczenia celowanego molekularnie [43; 44].

## 2.2. Ekspresja COX-2 w nowotworach piersi

Już w latach 80-tych XX wieku zwrócono uwagę na podwyższone stężenie prostanoidów PGE<sub>2</sub> i TXA<sub>2</sub> w komórkach raka piersi, wskazując jednocześnie, że długotrwałe stosowanie leków z grupy NLPZ koreluje ze zmniejszonym ryzykiem rozwoju tej choroby. Późniejsza analiza ekspresji COX-2 istotnie potwierdziła te obserwacje, wykazując podwyższony poziom badanego enzymu w raku piersi, podobnie jak w wielu innych ludzkich nowotworach litych, w tym w raku jelita grubego, płuca, przełyku, żołądka, trzustki, pęcherza moczowego, endometrium oraz stercza [45]. Wykazano między innymi, że w warunkach fizjologicznych nie stwierdza się obecności COX-2 w tkance nabłonkowej piersi, jednakże już w stanach poprzedzających rozwój raka piersi, takich jak nieinwazyjny rak przewodowy *in situ* (*ductus carcinoma in situ*), obserwowano ekspresję tego enzymu w 63–85% przypadków, podobnie jak w około 40% przypadków inwazyjnych ludzkich nowotworów piersi, przy czym częstość ta wahała się w granicach 17–84% w zależności od zaakceptowanej metodyki badań. Oprócz tkanki nabłonkowej, zwiększona ekspresja białka COX-2 dotyczy także tkanki przylegającej do guza oraz śródbłonna naczyniowego [46]. Co więcej, nadmierną aktywność COX-2 w raku piersi indukowanym kancerogenami, takimi jak dimetylobenz[a]antracen (DMBA), N-nitrozometylomocznik (NMU), 2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna (PhIP), potwierdzono w toku licznych badań eksperymentalnych na szczurach, gdzie podobnie jak w przypadku ludzkich nowotworów wykazano COX-2 w nabłonku piersi. Badania z wykorzystaniem myszy transgenicznych wykazujących nadekspresję HER2 również potwierdziły wzmożoną aktywność COX-2 w obrębie guza w piersi [44].

Nadekspresja COX-2 dotyczy przede wszystkim raka piersi o pozytywnym statusie receptora HER2 oraz komórek z mutacją genu Ras, podczas gdy nowotwory HER2 negatywne rzadziej wykazują wzmożoną aktywność tego enzymu [44]. Efekt ten związany jest najprawdopodobniej z inicjacją transkrypcji COX-2 w wyniku pobudzenia ścieżki Ras/Raf/Mek/ERK, a także kinaz JNK i p38 MAPK, które są sprzężone właśnie z receptorem HER2 [47].

Z uwagi na fakt, że wzrostowi poziomu COX-2 towarzyszą zaburzenia w szlakach sygnalizacyjnych prostaglandyn związanych z proliferacją, nadekspresja tego enzymu w raku piersi koreluje z bardziej agresywnym charakterem guza, którego takie cechy jak: większe rozmiary, wysoka aktywność mitotyczna, negatywny status receptora estrogenowego (ER-), nadekspresja HER2 oraz zwiększona gęstość mikronaczyń przemawiają za gorszym rokowaniem dla pacjentki [48].

### **2.3. Wpływ COX-2 na rozwój nowotworów piersi**

Doniesienia z rozlicznych badań eksperymentalnych na modelach mysich jednoznacznie potwierdzają, że inhibicja enzymu COX-2 powoduje zahamowanie rozwoju guza piersi. Ponadto, z badań genetycznych wiadomo, że wyciszenie ekspresji genu COX-2 u myszy transgenicznnych typu *HER2/neu* skutkuje zmniejszeniem ilości ognisk nowotworowych w piersi, w porównaniu do osobników typu dzikiego. Co więcej, nadekspresja COX-2 jest czynnikiem wystarczającym do inicjacji procesu kancerogenezy u myszy transgenicznnych po wielokrotnych okresach gestacji. Przytoczone dane ostatecznie potwierdzają, że COX-2 odgrywa ważną rolę w procesie kancerogenezy w przypadku omawianego typu nowotworu u myszy. Oprócz tego, dalsze badania na modelach zwierzęcych potwierdzają również, że COX-2 wpływa nie tylko na powstawanie guza, ale także na jego rozrost oraz unaczynienie. Obserwowano bowiem obniżenie gęstości naczyń krwionośnych u zwierząt doświadczalnych z wyciszoną ekspresją genu COX-2, a efekt ten korelował ze zmniejszoną ekspresją genów odpowiedzialnych za proces angiogenezy, w tym VEGF, Ang1, Ang2, Flk1, Flt-1. Godnym uwagi w tym zakresie jest również fakt, że nadmiernej ekspresji COX-2 w raku piersi towarzyszy także wzrost stężenia prostaglandyn, głównie PGE<sub>2</sub>, których obecność wpływa na nasilenie procesu przerzutowania do kości, w wyniku indukcji IL-8, IL-11, wzmożonej produkcji RANKL i stymulacji osteoklastów powodujących lizę kości, co ostatecznie stanowi negatywny czynnik rokowniczy [45; 49]. Z pozostałych danych literaturowych wynika natomiast, że gen COX-2 w komórkach raka piersi stanowi jeden z czterech podstawowych genów, których wzmożona ekspresja jest niezbędna dla progresji choroby i utworzenia przerzutów do innych organów [50].

Zidentyfikowano kilka prawdopodobnych mechanizmów, na drodze których COX-2 może stymulować rozwój i progresję nowotworów piersi. Należą do nich: działanie antyapoptotyczne, działanie proangiogenne, indukcja aktywności metaloproteinaz macierzy komórkowej, nasilenie syntezy białek adhezyjnych, działanie immunosupresyjne, stymulacja aktywności aromatazy P450

oraz udział w tworzeniu mutagenów *in vivo* [45–50]. Szczegółowa analiza udziału poszczególnych typów aktywności COX-2 w procesie kancerogenezy została przedstawiona w dalszych rozdziałach niniejszej pracy.

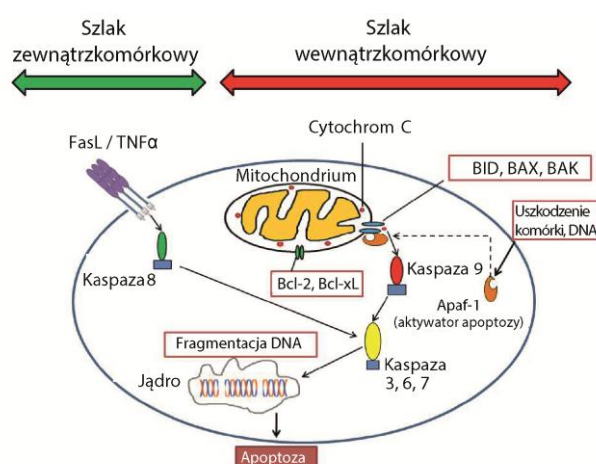
### 2.3.1. Apoptoza

Apoptoza to naturalny, złożony proces zaprogramowanej śmierci komórki w organizmie zwierzęcym. Jest ona niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, gdyż jej celem jest eliminacja komórek uszkodzonych, zainfekowanych lub zbędnych. Indukcja apoptozy odbywa się głównie na drodze wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowej.

W szlaku zewnątrzkomórkowym sygnał proapoptotyczny pochodzi z otoczenia komórki w wyniku aktywacji błonowych receptorów śmierci przez odpowiednie cytokiny (np.  $TNF\alpha$ , FasL), co powoduje aktywację kaskady kaspaz oraz lizę komórki.

Natomiast apoptoza wewnątrzkomórkowa (inaczej mitochondrialna) związana jest z uszkodzeniem DNA oraz ekspresją cytoplazmatycznych białek proapoptotycznych takich jak BID, BAX i BAK, które za życia komórki pozostają w równowadze z białkami antyapoptotycznymi (Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1), i które będąc w nadmiarze zaburzą integralność błony mitochondrialnej, przez co powodują uwolnienie do przestrzeni cytoplazmatycznej cytochromu c. Ten ostatni natomiast łącząc się z ATP, enzymem Apaf-1 oraz prokaspazą 9 formułuje apoptosom, w którym dochodzi do aktywacji kaspazy 9. Tak utworzony kompleks aktywuje wykonawcze kaspazy – 3, 6 i 7. W następstwie dochodzi do fragmentacji DNA oraz degradacji białek strukturalnych i enzymatycznych komórki, co prowadzi do jej śmierci (RYCINA 2.1).

Z uwagi na fundamentalne znaczenie, apoptoza podlega bardzo precyzyjnej regulacji ze strony organizmu, a wszelkie nieprawidłowości mechanizmów jej kontroli prowadzą do stanów patologicznych. Brak apoptozy w komórce powoduje, że staje się ona nieśmiertelna i dzięki temu może przekształcić się w komórkę nowotworową [51; 52].



RYCINA 2.1

Uproszczony schemat apoptozy indukowanej drogą zewnątrz- i wewnątrzkomórkową [52].

W przypadku nowotworów piersi, nieśmiertelność komórek tworzących masę guza wynika między innymi z zależnej od COX-2, PGE<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub> podwyższonej ekspresji antyapoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 oraz z obniżonego poziomu białek proapoptotycznych – charakterystycznych dla ścieżki mitochondrialnej apoptozy – BAX i BAK. Oprócz tego, nadekspresja COX-2 w raku piersi powoduje także aktywację kinazy serynowo-treoninowej Akt oraz ścieżki sygnalizacyjnej PI3K/Akt/mTOR, która jest znanym szlakiem promującym przeżycie komórki. Zjawisko to potwierdzone zostało między innymi w komórkach raka piersi o fenotypie ER(-) HER2(+) [53]. Co więcej, w przeprowadzonych badaniach *in vitro* i *in vivo* na myszach wykazano, że selektywny inhibitor COX-2 – celekoksyb powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego komórek gruczolakoraka w fazie G1 oraz zmniejszenie ilości komórek w fazie S oraz G2/M. Efekt ten wynika bezpośrednio z istotnego wzrostu potencjału apoptotycznego komórek gruczolakoraka w obecności celekoksybu, co objawia się nasiloną aktywnością kaspazy 3 i kaspazy 9, ale nie kaspazy 8. Te dane sugerują, że w analizowanym modelu działanie tego leku związane jest ze stymulacją wewnątrzpochodnej ścieżki apoptozy [45].

Alternatywnie, znaną substancją promującą apoptozę jest kwas arachidonowy, czyli główny substrat COX-2. Zatem obecność i nadmierna aktywność indukowanej cyklooksygenazy w komórkach gruczolakoraka (np. raka piersi) może prowadzić do zmniejszenia wewnątrzkomórkowej puli endogennej substancji proapoptotycznej, czemu towarzyszy zmniejszenie zdolności komórki do ulegania programowanej śmierci [44; 54].

### **2.3.2. Proliferacja**

Proliferacja komórek związana jest z cyklicznymi procesami ich wzrostu oraz podziału drogą przemian biochemicznych i biofizycznych zachodzących w ramach cyklu życiowego, zwanego cyklem komórkowym, na który składają się cztery fazy: faza G1, faza S i faza G2 (zwane łącznie interfazą) oraz faza M (mitoza lub mejoza). Faza G1 jest etapem intensywnego rozwoju wynikającego z syntezy białek i lipidów, dzięki której komórka silnie powiększa swoje rozmiary. Faza S natomiast obejmuje replikację DNA oraz podwojenie ilości chromatyny w jądrze komórkowym, podczas gdy w fazie G2 dochodzi do dalszej syntezy białek, głównie tubuliny, a także odbywa się naprawa uszkodzeń DNA oraz ostateczne przygotowanie komórki do mitozy lub mejozy. Właściwy podział następuje w fazie M, która obejmuje podział jądra, czyli kariokinezę oraz podział cytoplazmy, czyli cytokinezę. Utworzone w wyniku tego procesu komórki potomne rozpoczynają od nowa swój cykl życiowy, wchodząc w fazę G1, a po przekroczeniu punktu kontrolnego mogą go kontynuować albo przejść w fazę spoczynkową G0, podczas której nie następują wzrost, replikacja DNA ani podziały [55]. Co istotne, powrót komórki z fazy G0 do fazy G1 możliwy jest w obecności czynników wzrostowych. Prawidłowy przebieg cyklu komórkowego ma kluczowe znaczenie dla zachowania endogennej homeostazy, stąd proces ten podlega wielokierunkowej i precyzyjnej regulacji, zależnej od

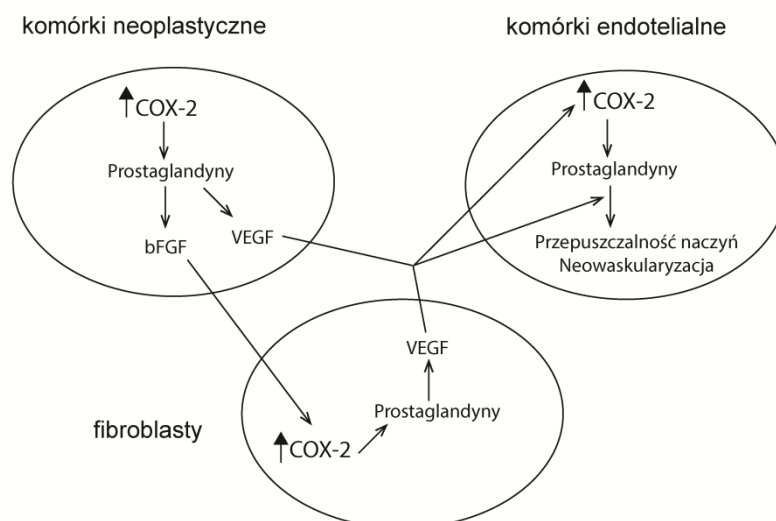
aktywności enzymów zwanych kinazami cyklinozależnymi (CDK), którym towarzyszą białka regulatorowe – cykliny. Funkcją wymienionych enzymów CDK jest nadzór nad skoordynowanym procesem przejścia międzyfazowego drogą fosforylacji prowadzącej do uaktywnienia bądź dezaktywacji podstawowych białek cyklu komórkowego [56]. Ponadto, kluczową rolę w regulacji przebiegu cyklu życiowego komórki odgrywa także białko regulatorowe p53, zwane strażnikiem genomu, którego zadaniem jest kontrola integralności materiału genetycznego. Również COX-2 oraz jej produkty, w tym PGE<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub>, uczestniczą w procesach proliferacji komórkowej poprzez wpływ na wzmożoną syntezę DNA w procesie regeneracji tkanki, co potwierdzono m.in. w badaniach z wykorzystaniem linii komórkowej hepatocytów szczura [54].

Fundamentalny charakter procesów związanych z namnażaniem komórek powoduje, że wszelkie nieprawidłowości w funkcjonowaniu białek uczestniczących w jego kontroli prowadzą do powstania wielu anomalii, w tym zmian o charakterze nowotworowym. Z danych literaturowych wynika między innymi, że zaburzenia ekspresji COX-2 w komórkach raka piersi stanowią jeden z elementów warunkujących ich niekontrolowaną proliferację. Wzrost aktywności COX-2 przyczynia się bowiem do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia cykliny D1, która jest podstawowym regulatorem przejścia z fazy G1 do fazy S [57]. Stąd inhibicja COX-2 za pomocą celekoksybu skutkuje zatrzymaniem cyklu komórkowego w fazie G1, zmniejszeniem ilości komórek w fazie S i G2/M oraz spowolnieniem lub zahamowaniem podziałów komórkowych w raku piersi [45; 58]. Zjawisko to potwierdzono w wielu innych badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, a także w randomizowanym badaniu klinicznym II fazy na grupie pacjentek z pierwotnym rakiem piersi. Wykazano, że podawanie celekoksybu powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M w wyniku aktywacji białka p53 i wzrostu poziomu proteiny GADD45A, która hamuje cyklinę B1 oraz cyklinę B2, odgrywające istotną rolę w przejściu międzyfazowym pomiędzy fazą G2 i M [59; 60]. Ponadto, nadmierna proliferacja komórek raka piersi może też być wynikiem zależnej od PGE<sub>2</sub> stymulacji EGFR oraz następczej aktywacji kaskady kinaz MAP, które są ważnymi przekaźnikami sygnału mitogenowego w komórce [12].

### **2.3.3. Angiogeneza**

Angiogeneza, jako element patologicznego obrazu nowotworów, jest złożonym procesem wytwarzania nowych naczyń krwionośnych na podłożu istniejącej sieci żył i tętnic, których zadaniem jest promocja wzrostu guza poprzez doprowadzenie krwi oraz substancji odżywczych, a także poprzez wymianę metabolitów. Nowopowstałe naczynia oprócz funkcji odżywczych pełnią także rolę „wrót inwazji” nowotworu oraz umożliwiają mu utworzenie przerzutu. Fizjologicznie, regulacja procesu angiogenezy zależy od zachowania endogennej równowagi pomiędzy substancjami pro-angiogennymi, takimi jak: VEGF, PDGF, TGF $\alpha$  i  $\beta$ , bFGF i IL-8, HIF $\alpha$  oraz anty-angiogennymi, do których należą angiostatyna, endostatyna i trombospondyna [61]. Nadmierne stężenie tych pierwszych w mikrośrodkowisku nowotworu powoduje, że pobliskie komórki śródbłonna zaczynają silnie

proliferować, a następnie migrować w kierunku guza w wyniku trawienia macierzy zewnątrzkomórkowej przez metaloproteinazy MMP [56]. Godnym uwagi jest fakt, że jednym z czynników warunkujących postęp angiogenezy w przebiegu wielu nowotworów, w tym raka jelita grubego, piersi, płuca, prostaty, trzustki oraz nowotworów głowy i szyi, jest podwyższona – w stosunku do zdrowej tkanki – ekspresja COX-2, która powiązana jest z wytwarzaniem sieci patologicznych naczyń [62]. Obecność wymienionego enzymu powoduje bowiem wzmożoną aktywność MMP w złożonym procesie z udziałem NF-kappaB, a także wpływa na migrację komórek endotelialnych za pośrednictwem TXA<sub>2</sub> [63; 64]. Co więcej, podwyższonej aktywności COX-2 towarzyszy także wydzielanie substancji pro-angiogennych, zarówno w epitelialnych komórkach nowotworowych, jak również w komórkach endotelialnych naczyń guza oraz w fibroblastach i makrofagach [63–65]. Stąd uważa się, że mechanizm angiogenezy zależnej od COX-2 jest ściśle powiązany z interakcją pomiędzy wyżej wymienionymi elementami środowiska guza. Cykl odpowiednich przemian rozpoczyna się produkcją pro-angiogennych prostaglandyn (przede wszystkim PGE<sub>2</sub>) przez komórki neoplastyczne, w wyniku czego dochodzi w nich do wtórnego wzrostu poziom VEGF i bFGF, które dalej bezpośrednio stymulują COX-2 w fibroblastach. Zwiększone stężenie prostaglandyn, stymulacja receptora EP<sub>2</sub> oraz pobudzenie ścieżki PKA w fibroblastach powoduje natomiast uwalnianie z nich VEGF, który w sposób parakrynnny oddziałuje na komórki endotelialne. W wyniku tych zmian dochodzi do stymulacji COX-2 w komórkach śródbłonna naczyń, wzrostu ich przepuszczalności, proliferacji oraz morfogenezy. Przebieg opisanego powyżej procesu przedstawiono schematycznie na RYCINIE 2.2 [65]



RYCINA 2.2

Rola COX-2 w procesie angiogenezy nowotworowej [65].



Prostaglandyny w środowisku guza, oprócz bezpośredniego działania pro-angiogenego, wykazują także zdolność do stymulacji monocytów, infiltrujących tkankę nowotworową, do produkcji czynników prozapalnych, tj. IL-2. Powoduje to dalszy napływ makrofagów do wytworzonego ogniska zapalnego, które jest przez nie rozpoznawane jako obszar uszkodzenia tkanki. Makrofagi indukują w nim proces gojenia, który polega m.in. na doprowadzeniu do niego łożyska naczyniowego, wytworzeniu tkanki łącznej podporowej oraz na stymulacji procesu regeneracji, co ostatecznie umożliwia utworzenie guza i jego progresję.

Jak już wcześniej wspomniano, w nowotworach piersi obserwuje się pozytywną korelację pomiędzy zwiększoną aktywnością COX-2 i PGE<sub>2</sub> a poziomem VEGF oraz TGFβ [57; 65]. Ponadto, wymienionym zmianom przeważnie towarzyszy zwiększenie gęstości mikronaczyń w obrębie guza oraz większy potencjał metastatyczny komórek nowotworowych, co warunkuje złe rokowanie [65; 66]. PGE<sub>2</sub> może także bezpośrednio wpływać na nasilenie angiogenezy już we wczesnych stadiach tego procesu – poprzez aktywację receptora EP<sub>4</sub> oraz jego wtórnego przekaźnika PKA w komórkach endotelialnych, co wykazano w badaniu na zwierzęcym modelu raka piersi [67; 68]. Z kolei we wspomnianym wyżej badaniu klinicznym II fazy, stosowanie preoperacyjnej terapii adjuwantowej z wykorzystaniem celekoksylu w grupie pacjentek z rakiem piersi skutkowało poprawą stabilności macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zahamowaniem aktywności MMP-2 i MMP-9, które są odpowiedzialne za degradację macierzy zewnątrzkomórkowej, a efekt ten wynikał z zależnej od celekoksylu aktywacji antagonistów ww. enzymów, a więc TIMP1, TIMP2, TIMP3 i RECK [60].

#### **2.3.4. Immunosupresja**

Omówione wcześniej działanie mitogenne prostaglandyn wytwarzanych przez COX-2 nie dotyczy wszystkich komórek. W stosunku do komórek układu odpornościowego, w tym limfocytów T oraz B, a także komórek NK i komórek dendrytycznych może występować działanie wręcz przeciwstawne, a więc anty-proliferacyjne, powodując w ten sposób immunosupresję. Utrwaleniu tego efektu sprzyja zależne od PGE<sub>2</sub> zmniejszenie produkcji TNFα i nasilenie działania IL-10. Opisane zjawisko sprawia, że komórki nowotworowe raka piersi mogą łatwo „wylamać się” spod nadzoru układu odpornościowego gospodarza i namnażać się w sposób nieograniczony [69]. Potwierdzeniem znaczenia enzymu COX-2 w procesie immunosupresji raka piersi jest fakt, że w mikrośrodowisku guza z zahamowaną jego aktywnością obserwowano zwiększoną infiltrację i aktywność limfocytów T cytotoksycznych (CD8<sup>+</sup>) niszczących te komórki. Ponadto, selektywny inhibitor COX-2 pozytywnie wpływał na zwiększenie napływu różnych komórek immunologicznych, w tym komórek prezentujących antygeny do wnętrza ludzkiego guza piersi [60; 69].

### 2.3.5. Wpływ COX-2 na aromatazę P450

Aromataza P450 należy do grupy białek związanych z układem cytochromu P450 i odpowiada za konwersję androgennych steroidów do estradiolu i estronu. Odgrywa również istotną rolę w miejscowej produkcji wymienionych hormonów w patogenezie estrogeno-zależnych nowotworów piersi, które stanowią około 60–70% wszystkich nowotworów wodzących się z tego organu [70]. Podstawą rozwoju i progresji nowotworów estrogeno-zależnych jest interakcja estrogenów z odpowiednimi receptorami błonowymi w komórkach neoplastycznych, gdyż stanowi ona impuls pobudzający je do wzrostu i podziałów. Nadmierna aktywność aromatazy P450 jest zatem ważnym czynnikiem warunkującym postęp procesu chorobowego. Co istotne, ekspresja genu kodującego aromatazę P450 – CYP19 zależy od auto- i parakrynnego działania PGE<sub>2</sub>, która stymulując EP<sub>2</sub> i EP<sub>4</sub> prowadzi do akumulacji cAMP, PKC i PKA [70]. Należy również zaznaczyć, że w ludzkich nowotworach piersi wykazano pozytywną korelację pomiędzy ekspresją genu CYP19 a ekspresją genu COX-2 w obrębie guza [44]. Ponadto, w badaniach eksperymentalnych na modelach zwierzęcych stwierdzono istotnie zmniejszoną czynność aromatazy u myszy z wyciszoną ekspresją COX-2, podczas gdy u myszy transgenicznych z nadekspresją COX-2 obserwowano zwiększoną ekspresję i aktywność aromatazy P450 [39].

Godnym uwagi jest również fakt, że wpływ COX-2 na lokalną syntezę estrogenów w dużej mierze może tłumaczyć chemoprewencyjne właściwości leków z grupy NLPZ w przypadku postmenopauzalnego raka piersi, przy czym ten korzystny efekt dotyczy tylko nowotworów piersi z ekspresją receptorów hormonalnych. Negatywny status receptorów steroidowych natomiast jest czynnikiem powodującym zanik zależności pomiędzy leczeniem przeciwzapalnym a częstością występowania choroby nowotworowej piersi [39].

### 2.3.6. Produkcja mutagenów *in vivo*

Mutagenem jest każda substancja endo- lub egzogenna, która w sposób bezpośredni powoduje uszkodzenie DNA przyczyniając się do rozwoju nowotworu złośliwego. Do mutagenów endogennych zaliczany jest między innymi malonodialdehyd (MDA) tworzący się w wyniku enzymatycznej lub nieenzymatycznej degradacji PGH<sub>2</sub>, czyli jednego z podstawowych produktów reakcji katalizowanych przez COX-2. Szkodliwe działanie MDA polega na tworzeniu adduktów z deoksynukleotydami oraz powodowaniu mutacji punktowych i zmian ramki odczytu. Ponadto COX-2, będąc peroksydazą, może także katalizować oksydację takich związków jak aminy aromatyczne, aminy heterocykliczne, pochodne dihydrodiolu oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, prowadząc do utworzenia aktywnych kancerogenów [44].

## 2.4. Farmakologiczna wartość selektywnych inhibitorów COX-2 w raku piersi

Podstawą wykorzystania inhibitorów COX-2 w raku piersi są ich właściwości chemoprewencyjne, z których korzyść odnoszono, zarówno w profilaktyce pierwotnej, jak i wtórnej. Odpowiednie badania na modelach zwierzęcych wykazały skuteczność tego typu strategii terapeutycznych, potwierdzoną między innymi zmniejszoną częstością powstawania nowotworów piersi indukowanych kancerogenami, takimi jak DMBA w wyniku stosowania flurbiprofenu i indometacyny. Ponadto, działanie chemoprewencyjne obserwowano także u selektywnych i preferencyjnych inhibitorów COX-2, w tym celekoksylu, nimesulidu i rofekoksylu, których dodatkową zaletą jest zdolność do hamowania tempa wzrostu komórek raka piersi o fenotypie ER(+), ale również ER(-) HER2(+). Ciekawym spostrzeżeniem jest również fakt, że celekoksyl wykazuje większą skuteczność w opóźnianiu rozwoju nowotworów piersi stymulowanych DMBA w porównaniu do nieselektywnego ibuprofenu [44]. Ponadto, dostępne dane epidemiologiczne potwierdzają, że długotrwałe stosowanie leków z grupy NLPZ korzystnie wpływa na obniżenie częstości występowania nowotworów piersi. Efekt ten wykazano już w 1980 roku na grupie 4876 pacjentek przyjmujących indometacynę oraz w 1996 roku, kiedy to oszacowano, że stosowanie NLPZ trzy razy w tygodniu przez co najmniej rok obniża ryzyko rozwoju raka piersi o 66%. Podobne wyniki uzyskano także w dwóch innych badaniach z roku 1994 i 2000. Co więcej, w przeprowadzonym w 2006 roku badaniu kliniczno-kontrolnym stwierdzono 71% redukcję ryzyka rozwoju raka piersi wśród kobiet stosujących selektywne inhibitory COX-2 (celekoksyl i rofekoksyl) w standardowych dawkach przez okres co najmniej dwóch lat [71]. Niestety doniesienia z innych badań epidemiologicznych pozostają w sprzeczności z danymi zaprezentowanymi powyżej, gdyż sugerują brak zależności pomiędzy stosowaniem NLPZ a częstością występowania raka piersi. Niejednoznaczność dostępnych wyników tłumaczy się zróżnicowaną ekspresją COX-2 w przypadku różnych podtypów omawianego rodzaju nowotworu [44].

Oprócz profilaktyki, inhibitory COX-2 mogą być także wykorzystywane w leczeniu nowotworów piersi. Uzasadnieniem takiej koncepcji terapeutycznej są wyniki badań eksperymentalnych na szczurach, u których guzy piersi indukowano podaniem DMBA, a następnie, po 100 dniach rozwoju nowotworu, podawano placebo lub ibuprofen przez 5 tygodni. Stwierdzono niemal 40% pomniejszenie rozmiarów guzów piersi po zastosowaniu leku z grupy NLPZ, podczas gdy w grupie zwierząt otrzymującej placebo ogniska nowotworowe powiększyły się o 180%. Celekoksyl stosowany przez 6 tygodni, po uprzedniej indukcji guzów przez DMBA i ich 4-miesięcznym rozwoju, również wywoływał podobne efekty, powodując zmniejszenie objętości guzów o 32%, podczas gdy w grupie placebo ich rozmiary zwiększyły się o ponad 500% [44].

Alternatywną możliwością wykorzystania inhibitorów COX-2 w leczeniu raka piersi jest terapia adjuwantowa. W tym zakresie korzystnym rozwiązaniem wydaje się być skojarzenie tych leków z taksanami, ponieważ cytostatyki te działają jak induktory transkrypcji genu cyklooksigenazy typu 2,

w wyniku czego może dojść do obniżenia ich siły działania. Dlatego też, kombinacja inhibitora COX-2 z taksolem potencjalnie mogłaby przyczynić się do poprawy aktywności przeciwnowotworowej tego cytostatyku [44]. Inną możliwością jest także połączenie inhibitora COX-2 z inhibitorem aromatazy (np. letrozolem) w terapii nowotworów hormonozależnych lub z trastuzumabem w nowotworach z nadekspresją HER2 [60].

### 3. Analiza QSAR i dokowanie – opis metod i zastosowanie

#### 3.1. Wprowadzenie

Współczesne metody poszukiwania i badania nowych leków obejmują analizę związków chemicznych oraz substancji biologicznych pod kątem właściwości farmakologicznych, toksykologicznych i fizyko-chemicznych, ocenianych poprzez zastosowanie wielu różnorodnych technik badawczych. Przez wiele lat ubiegłego stulecia dominujące zastosowanie miały badania *in vitro* oraz *in vivo*. Z upływem czasu, od drugiej połowy XX-tego wieku coraz większą rolę zaczęły odgrywać również metody badawcze *in silico*, określane często jako komputerowe wspomaganie projektowania leków (CADD, z ang. *Computer-Aided Drug Design*) [72; 73].

Ciągły i intensywny postęp inżynierii komputerowej, chemio- i bioinformatyki oraz rozwój strukturalnych baz danych dla białek i małych molekuł spowodowały, że metody CADD są coraz lepsze, dokładniejsze i wydajniejsze oraz stanowią coraz częściej wykorzystywane narzędzie pracy w wielu przyrodniczo-ścisłych dziedzinach współczesnej nauki, np. w farmacji, toksykologii, biologii molekularnej, rolnictwie czy chemii [72–74].

Współczesne metody *in silico* ułatwiają i przyspieszają opracowanie docelowej struktury nowych, potencjalnych „kandydatów” na leki spośród milionów związków dostępnych w bazach danych poprzez optymalizację ich budowy pod kątem oddziaływania z receptorem. Etap ten pozwala obniżyć koszty i czas trwania długiego procesu projektowania nowego leku.

Metody CADD wykorzystują różnego typu zależności między właściwościami biologicznymi i fizyko-chemicznymi potencjalnych leków, tzw. ligandów oraz ich terapeutycznych celów, czyli receptorów, którymi są makromolekuły zaangażowane w dany proces chorobowy np. enzymy, receptory na błonach komórkowych.

Powszechnie stosowaną metodą CADD w farmacji i toksykologii jest analiza QSAR (ang. *Quantitative Structure – Activity Relationships*). Jest to metoda polegająca na analizie zależności między aktywnością biologiczną ligandów dla danego receptora, a ich właściwościami fizyko-chemicznymi (RYCINA 3.1) [73; 75]. Za początek rozwoju tej metody *in silico* uważa się publikację z 1962 roku autorstwa *Hanscha i wsp.* zatytułowaną: *Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients* (*Nature* 1962; 194: 178-180) [73; 76].

Dzięki analizie QSAR możliwe jest określenie, które właściwości ligandów mają największy wpływ na ich aktywność oraz wyznaczenie matematycznego modelu tej zależności – w postaci równania o dwóch lub więcej zmiennych.

Ogólny wzór tego równania jest następujący:

$$\text{aktywność biologiczna} = f(\text{struktura i/lub właściwości fizyko-chemiczne})$$

Inną, ogólną postać tego równania można przedstawić jako:

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_nX_n + C$$

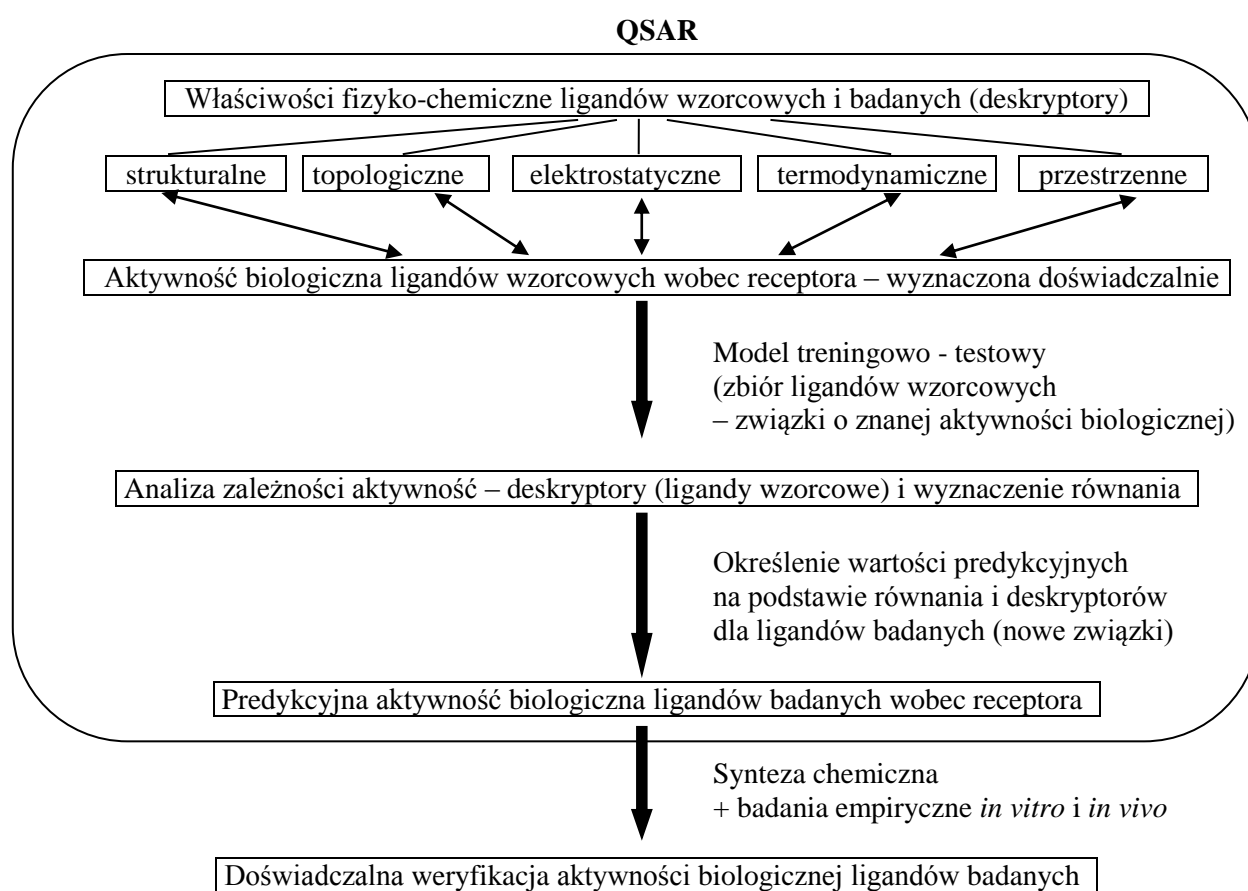
gdzie:

Y – aktywność biologiczna liganda (zmienna zależna)

a – współczynnik

X – parametr fizyko-chemiczny (deskrytor) liganda (zmienna niezależna)

C – stała



RYCINA 3.1

Ogólny schemat idei badania QSAR.

W badaniach eksperymentalnych aktywność biologiczna ligandów oznaczana jest z reguły jako [73–75; 77]:

- C (stężenie liganda, przy którym wykazuje określoną aktywność biologiczną wobec receptora),
- $K_i$  (stała inhibicji, stopień powinowactwa liganda do receptora),
- $IC_{50}$  (stężenie inhibitorowe liganda, które powoduje 50% zahamowanie aktywności receptora),
- $EC_{50}$  (stężenie efektywne liganda, które powoduje 50% zmianę aktywności receptora),

- $ED_{50}$  (dawka efektywna ligandu, która powoduje 50% zmianę aktywności receptora),
- $K_m$  (stała Michaelisa: stężenie liganda, przy którym aktywność receptora wynosi 50% aktywności maksymalnej);
- lub jako logarytmy tych wartości ( $\log C$ ,  $\log K_i$ ,  $\log IC_{50}$ ,  $\log EC_{50}$ ,  $\log ED_{50}$ ,  $\log K_m$ ),
- lub jako logarytmy z odwrotności tych wartości ( $\log 1/C$ ,  $\log 1/K_i$ ,  $\log 1/IC_{50}$ ,  $\log 1/EC_{50}$ ,  $\log 1/ED_{50}$ ,  $\log 1/K_m$ ),
- lub jako ujemne logarytmy z tych wartości ( $pC$ ,  $pK_i$ ,  $pIC_{50}$ ,  $pEC_{50}$ ,  $pED_{50}$ ,  $pK_m$ ).

Parametry fizyko-chemiczne przedstawiane są natomiast w postaci liczbowej za pomocą odpowiednich deskryptorów, których opis przedstawiono w ROZDZIALE 3.4.

### 3.2. Wady i zalety analizy QSAR

Analiza QSAR, jak każda metoda badawcza, ma swoje zalety oraz wady, które należy uwzględniać podczas wykorzystywania tej metody jej w codziennej pracy badawczej.

Zalety analizy QSAR [75; 78]:

- ułatwia wyciągać wnioski w zakresie mechanizmów interakcji ligandów z receptorem,
- pozwala przewidywać aktywność niezbadanych jeszcze związków oraz ułatwia wybór potencjalnie najlepszych ligandów do syntezy chemicznej i analizy eksperymentalnej *in vitro* i *in vivo*,
- dostarcza informacji o najkorzystniejszych modyfikacjach struktury ligandów w celu zwiększenia ich aktywności,
- porządkuje i grupuje ligandy pod względem ich aktywności oraz cech fizyko-chemicznych,
- ilościowe określenie zależności między strukturą a aktywnością pomaga zrozumieć wpływ zmian struktury ligandów na ich aktywność wobec danego receptora, co nie jest proste przy zwykłej analizie matematycznej dużej liczby wygenerowanych danych,
- umożliwia redukcję kosztów oraz przyczynia się do przyspieszenia rozwoju nowych leków (aspekt ekonomiczny),
- zmniejsza konieczność i ilość analiz eksperymentalnych *in vitro* i *in vivo* na liniach komórkowych i zwierzętach, a niekiedy daje możliwość ich zastąpienia badaniem *in silico* (aspekt etyczny),
- poprzez zmniejszenie ilości analiz eksperymentalnych następuje redukcja zużycia odczynników chemicznych i materiałów biologicznych (aspekt środowiskowy i ekologiczny).

Wady analizy QSAR [75; 78]:

- możliwość uzyskania fałszywej zależności struktura-aktywność poprzez zbyt silne uzależnienia wyników od danych biologicznych, które ze swej natury są przedmiotem znacznego błędu doświadczalnego,
- badania doświadczalne, na wynikach których oparta jest analiza QSAR, mogą być nie w pełni prawidłowo zaprojektowane i wykonane, przez co uzyskane wyniki mogą nie odzwierciedlać faktycznej aktywności ligandów. Może to prowadzić to fałszywych wyników prognozowania aktywności dla nowych ligandów,
- w przypadku zastosowania zbyt małego zbioru związków treningowych (wzorcowych) istnieje ryzyko, że uzyskanych wyników nie będzie można z dużą pewnością wykorzystać do wskazania nowych związków o największej aktywności,
- wiele parametrów fizyko-chemicznych jest ze sobą silnie skorelowanych krzyżowo, dlatego zastosowanie zmiennych lub kombinacji zmiennych o niskiej korelacji względem siebie może prowadzić do uzyskania nieprawdziwych wyników,
- analiza dwuwymiarowa (2D QSAR) jest niewystarczająca do ustalenia struktury nowych związków o wyższej aktywności, gdyż mogą one mieć taką samą wartość kluczowych deskryptorów,
- w przypadku stosowania technik trójwymiarowych (3D QSAR) obliczone parametry mogą być niedokładne, szczególnie gdy nie jest znana struktura przestrzenna oddziaływania wzorcowych ligandów z receptorem,
- konieczność stosowania specjalistycznego oprogramowania, często wymagającego wykupienia licencji oraz sprzętu komputerowego o wysokiej wydajności obliczeniowej.

### 3.3. Zastosowanie analizy QSAR we współczesnej nauce

Jak wspomniano wyżej, analiza QSAR znajduje coraz większe i szersze zastosowanie w wielu dziedzinach nauki. W przypadku farmacji, toksykologii i chemii wykorzystuje się ją do różnych celów, jak np. [74; 75; 78]:

- przewidywanie aktywności biologicznej nowych związków o optymalnych właściwościach farmakodynamicznych i farmakokinetycznych,
- przewidywanie zakresu i siły interakcji nowych związków z receptorami, enzymami,
- przewidywanie parametrów farmakokinetycznych nowych związków, a w szczególności możliwych szlaków ich metabolizmu pod wpływem izoform cytochromu P450,
- pomoc w określaniu interakcji *in vivo* między lekami a nowymi związkami,
- przewidywanie właściwości mutagennych i cytotoksycznych nowych związków,



- przewidywanie właściwości toksycznych wobec ludzi oraz stopnia narażenia, w tym narażenia zawodowego,
- przewidywanie właściwości toksycznych wobec różnych gatunków zwierząt i roślin,
- identyfikacja związków szkodliwych i niebezpiecznych dla ludzi i środowiska na wczesnym etapie projektowania nowych leków,
- udział rozwoju różnego typu nowych związków o różnorodnym zastosowaniu, np. związków powierzchniowo czynnych, barwników, aromatów,
- przewidywanie właściwości biobójczych nowych pestycydów lub herbicydów,
- przewidywanie losów nowych związków po uwolnieniu do środowiska.

### 3.4. Deskryptory molekularne

Kluczowymi elementami warunkującymi przeprowadzenie analizy QSAR są:

- znajomość aktywności biologicznej związków wzorcowych, uzyskana w badaniach empirycznych i wyrażona za pomocą odpowiednich wartości,
- oraz
- znajomość właściwości fizyko-chemicznych związków wzorcowych i związków badanych, które opisane są w postaci tzw. deskryptorów molekularnych.

Deskryptor molekularny stanowi matematyczne (liczbowe) przedstawienie danej właściwości fizyko-chemicznej związku, otrzymane w wyniku określonego sposobu postępowania wykorzystującego budowę związku lub określone badanie eksperymentalne. W związku z tym deskryptor molekularny jest wynikiem logicznej i matematycznej procedury przetwarzającej chemiczne dane zakodowane w strukturze i właściwościach związku w użyteczną liczbę lub jest wynikiem doświadczeń [79; 80].

Inaczej mówiąc, szereg cech związku jak np.: masa cząsteczkowa, rozmiar cząsteczki, moment dipolowy, polaryzowalność czy rozpuszczalność w wodzie i tłuszczach jest przedstawione w formie liczb wraz z odpowiednimi jednostkami.

Znajomość wartości deskryptorów molekularnych jest niezbędna do przeprowadzenia analizy statystycznej i stworzenia równania ilościowo opisującego zależność struktura-aktywność, czyli QSAR.

Za pierwsze deskryptory molekularne uważa się liczbę Platt'a (Platt number, F) oraz wskaźnik Wiener'a (Wiener index, W), które zostały zdefiniowane w 1947 roku [80; 81–83].

### 3.4.1. Podział deskryptorów molekularnych

Zgodnie z przedstawioną definicją, deskryptory molekularne dzieli się na dwie grupy [75]:

- doświadczalne (eksperymentalne), np.  $\log P$ ,  $\log D$ , elektryczny moment dipolowy, refraktywność molowa, współczynnik refrakcji, stała Hammetta, parametr steryczny Tafta;
- teoretyczne (wyliczone na podstawie symbolicznego przedstawienia cząsteczki), np. masa cząsteczkowa, liczba atomów danego typu, liczba wiązań rotowalnych, wskaźnik Wiener'a, topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki, polaryzowalność cząsteczkowa.

Inny podział deskryptorów obejmuje cztery zasadnicze grupy ze względu na charakter właściwości, które opisują [79; 80]:

- strukturalne i topologiczne – liczbowo opisują strukturę i budowę płaską (2D) cząsteczki związku, jej masę, ułożenie wiązań względem siebie, ilość wiązań wodorowych, np.: liczba atomów, masa cząsteczkowa, liczba pierścieni aromatycznych, liczba atomów wodoru i heteroatomów, liczba wiązań pojedynczych (rotowalnych), ilość grup funkcyjnych, wskaźnik Wiener'a, ilość donorów i akceptorów wiązań wodorowych, parametr steryczny Tafta  $E_s$ , topologiczne pole powierzchni polarnej  $TPSA$ ;
- elektronowe – liczbowo opisują rozmieszczenie elektronów i ładunku w cząsteczce związku, np. ładunek całkowity, elektryczny moment dipolowy, polaryzowalność, energia orbitali molekularnych HOMO i LUMO, stała Hammetta  $\sigma$ , współczynniki indukcyjne i rezonansowe;
- termodynamiczne – liczbowo opisują energię cząsteczki związku i jej konwersję, właściwości hydrofilowe i hydrofobowe, np.: współczynnik podziału n-oktanol : woda  $\log P$ , rozpuszczalność w wodzie  $\log S$ , hydrofobowość podstawników  $\pi_x$ , refraktywność molowa  $MR$ ;
- geometryczne – liczbowo opisują budowę płaską (2D), kształt i budowę przestrzenną (3D) cząsteczki związku, np.: objętość molekularna, moment bezwładności, pole powierzchni, pole powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika  $SASA$ , trójwymiarowe pole powierzchni polarnej  $3D PSA$ , pole powierzchni Van der Waals'a  $VdWSA$ .

Oprócz podanych powyżej podstawowych deskryptorów stosowanych jest jeszcze wiele tysięcy innych, w tym również złożonych deskryptorów, opartych m.in. na analizie konformacyjnej, ułożeniu i oddziaływaniu przestrzennym cząsteczek względem siebie lub zastosowaniu teorii grafów w odniesieniu do połączeń międzyatomowych. Deskryptory tego typu stosowane są głównie w trójwymiarowej analizie QSAR (3D QSAR).

### 3.4.2. Opis podstawowych deskryptorów molekularnych stosowanych w analizie QSAR

#### Masa cząsteczkowa (MW, z ang. *molecular weight*)

Jest to masa jednej cząsteczki związku chemicznego, obliczana jako suma mas atomowych tworzących ją atomów.

Jednostką bezwzględnej masy cząsteczkowej w układzie SI jest kg. Jednakże znacznie powszechniej, również w analizie QSAR, masa cząsteczkowa wyrażana jest w postaci względnej w jednostkach masy atomowej  $u$  (z ang. *unit*; równej  $1/12$  masy atomu izotopu węgla  $^{12}\text{C}$ ) lub Da (daltonach). Liczbowo masa cząsteczkowa i masa molowa są takie same, ale masa molowa jest wyrażana w g/mol [80; 84].

#### Ilość donorów wiązań wodorowych (HBD) / ilość akceptorów wiązań wodorowych (HBA)

(z ang. *H-bond donors / H-bond acceptors*)

Parametr określa ilość ugrupowań zdolnych do tworzenia mostków wodorowych w kompleksach. Jest to parametr bezwymiarowy.

Donorami protonu wodoru (HBD) w wiązaniach wodorowych mogą być np. grupa hydroksylowa (-OH), aminowa (-NH<sub>x</sub>), tiolowa (-SH), halogenowódor (XH) oraz ugrupowanie (-CH<sub>x</sub>).

Z kolei akceptorami protonu wodoru (HBA) mogą być wszystkie atomy silnie elektroujemne takie jak np. fluor, azot, tlen, a także siarka i pozostałe atomy z grupy chlorowców, a także układy  $\pi$ -elektronowe występujące w nienasyconych związkach organicznych.

Klasyczne, silne wiązanie wodorowe posiada długość ok. 1,5 Å, słabsze mogą mieć długość nawet do 3,0 Å [80; 84].

#### Współczynnik podziału (logP, z ang. *partition coefficient*)

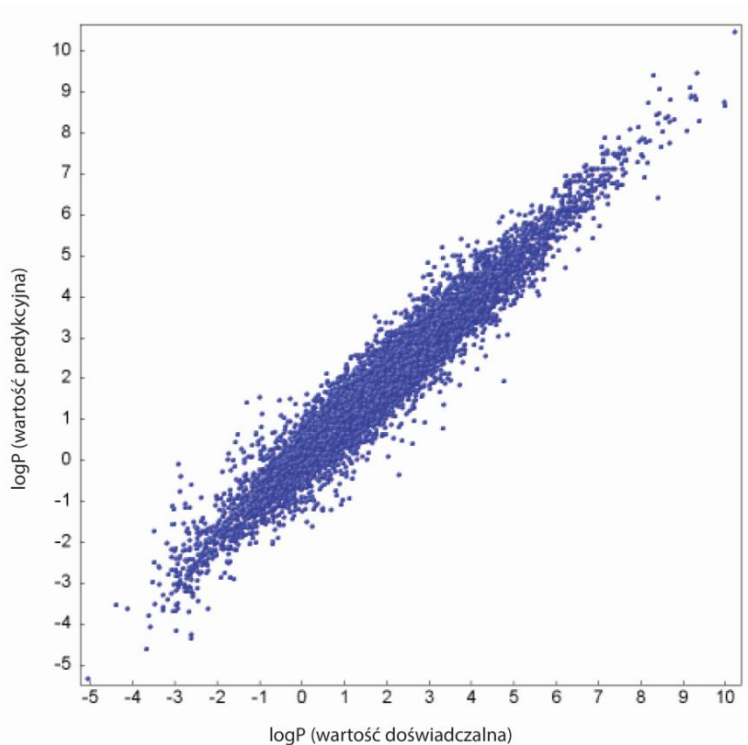
Jest to logarytm stosunku stężeń równowagowych niezjonizowanych form danego związku chemicznego w dwóch niemieszających się cieczach (fazach). Zazwyczaj do wyznaczania wartości logP stosowane są woda i *n*-oktanol [80; 84]:

$$\log P = \log \left( \frac{[\text{stężenie niezjonizowanej formy związku}]_{n\text{-oktanol}}}{[\text{stężenie niezjonizowanej formy związku}]_{\text{woda}}} \right)$$

logP jest miarą hydrofobowości (liofilowości) związku i koreluje z jego zdolnością do przenikania przez błony biologiczne, w tym przez barierę krew-mózg, co ma istotne znaczenie w odniesieniu do leków stosowanych w schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego [85].

logP jest to parametr bezwymiarowy. Jego wartość wyznaczoną doświadczalnie można porównać z wartością obliczoną za pomocą algorytmów wykorzystywanych przez programy do analizy QSAR, które szacują jego wartość w oparciu o budowę chemiczną danego związku, rodzaj i ilość atomów

róznego typu czy rodzaj grup funkcyjnych obecnych w cząsteczce (RYCINA 3.2). Parametr logP uzyskany w wyniku takich obliczeń, w zależności od użytej metody, nosi nazwę np. AlogP, ClogP, MlogP lub milogP [86; 87].



$n = 12202$  związków,  $r^2 = 0,944$ ,  $r = 0,972$ , odchylenie standardowe dla logP = 0,428

### RYCINA 3.2

Porównanie korelacji między logP (wartość doświadczalna) a logP (wartość predykcyjna) [87].

#### *Reguła Lipińskiego („reguła pięciu”)* [84]

Wymienione wyżej cztery deskryptory (MW, HBD, HDA, logP) wiąże ze sobą tzw. „reguła pięciu” stworzona przez *Lipińskiego i wsp.* w 1996 roku, która powszechnie wykorzystywana jest przy projektowaniu i ocenie nowych związków chemicznych jako potencjalnych kandydatów na leki podawane drogą doustną. „Reguła pięciu” służy do jakościowego przewidywania stopnia wchłaniania i przenikalności związków chemicznych, co między innymi warunkuje ich pożądane właściwości farmakokinetyczne. Reguła ta nie określa stopnia i siły aktywności farmakodynamicznej przyszłych leków.

Reguła Lipińskiego sformułowana została w oparciu o analizę właściwości fizyko-chemicznych i farmakokinetycznych leków podawanych doustnie i stwierdzenie, że większość z tych leków to małe i lipofilowe cząsteczki. Na tej podstawie określono graniczne wartości czterech deskryptorów, jakimi powinny charakteryzować się nowe cząsteczki, tj:

- masa cząsteczkowa:  $MW \leq 500$  Da
- właściwości lipofilne:  $ClogP \leq 5$  ( $MlogP \leq 4,15$ )
- suma donorów wiązań wodorowych (suma wiązań -NH i -OH):  $HBD \leq 5$
- suma akceptorów wiązań wodorowych (suma atomów N i O):  $HBA \leq 10$

Przewiduje się, że związki cechujące się takimi wartościami powinny wykazywać dobrą wchłanianiałość i przenikalność przez błony biologiczne.

Dopuszcza się przypadki, gdy wartość nie więcej niż jednego z parametrów jest przekroczona.

Obecnie istnieją również modyfikacje tej reguły, uwzględniające zmianę wartości czterech podstawowych deskryptorów oraz dodanie innych deskryptorów jak MR, TPSA, ilość atomów [88] oraz ilość wiązań rotowalnych [89].

#### Współczynnik dystrybucji (logD, z ang. *distribution coefficient*)

Jest to logarytm ze stosunku sumy stężeń wszystkich form związku (zjonizowanej i niezjonizowanej) w każdej z dwóch niemieszających się cieczy (faz), zależny od wartości pH fazy wodnej. Zazwyczaj do wyznaczania wartości logD stosowane są woda i *n*-oktanol. Dla substancji nie ulegających jonizacji współczynnik dystrybucji logD równy jest współczynnikowi podziału logD.

logD jest to parametr bezwymiarowy [80]:

$$\log D = \log \left( \frac{[\text{stężenie niezjonizowanej formy związku}]_{n\text{-oktanol}}}{[\text{stężenie niezjonizowanej} + \text{zjonizowanej formy związku}]_{\text{woda}}} \right)$$

#### Refraktywność molowa (MR, z ang. *molar refractivity*)

Parametr ten wiąże współczynnik załamania światła (właściwości elektronowe) z objętością cząsteczki (właściwości strukturalne) i określa wielkość polaryzacji jednego mola substancji w polu elektromagnetycznym. Parametr ten jest zdefiniowany przy pomocy równania Lorentza-Lorentza [80; 90]:

$$MR = \frac{(n^2 - 1)}{(n^2 + 2)} \left( \frac{M}{d} \right)$$

gdzie:

*n* – współczynnik załamania światła (współczynnik refrakcji)

*M* – masa molowa

*d* – gęstość ośrodka (cieczy)

Jednostką refraktywności molowej w układzie SI jest m<sup>3</sup>/kmol. Dla większości znanych związków chemicznych jej wartość zawiera się w granicach 10-50 cm<sup>3</sup>/mol. Dla związków polarnych lub o wysokiej polaryzowalności wartość MR jest duża.

W analizie QSAR wartość MR często dzielona jest przez 10 w celu zbliżenia zakresu jej wartości do zakresu wartości logP i innych klasycznych deskryptorów [90].

Parametr ten jest wielkością addytywną, dla związku chemicznego refraktywność jest sumą refraktywności poszczególnych atomów oraz refraktywności grup atomów i wiązań. Zależy on również od sposobu rozmieszczenia i rodzaju wiązań między atomami, temperatury, ciśnienia, rodzaju i gęstości ośrodka przez który przechodzi promieniowanie świetlne oraz długości fali świetlnej, dla której jest wyznaczana wartość współczynnika załamania światła [80].

#### Elektryczny moment dipolowy ( $\mu$ , z ang. *electric dipole moment*)

Jest to wektorowa wielkość fizyczna, która określa wartość iloczynu ładunku i odległości między biegunami w cząsteczce dwubiegunowej.

Elektryczny moment dipolowy obrazuje neutralny układ wielu ładunków w przestrzeni, którego ładunek wypadkowy jest zerowy:  $\sum_i q_i = 0$ . Momentem dipolowym takiego układu jest wektor [80]:

$$\mu = \sum_i q_i r_i$$

gdzie:

$r_i$  jest wektorem położenia ładunku  $q_i$

Jednostką elektrycznego momentu dipolowego w układzie SI jest C·m. Z kolei do opisu momentu dipolowego cząsteczek w analizie QSAR stosuje się jednostkę debaj D ( $1 \text{ D} = 3,33564 \cdot 10^{-30} \text{ C}\cdot\text{m}$ ) [80].

#### Liczba wiązań pojedynczych (rotowalnych) (RBN, z ang. *number of rotatable bonds*)

Jest to parametr topologiczny, który wskazuje na stopień giętkości i rozgałęzienia cząsteczki. Wyraża on ilość wiązań pojedynczych pomiędzy nie-terminalnymi atomami ciężkimi (tj. nie-wodorami). Przy zliczaniu wiązań rotowalnych pomijane są wiązania amidowe (rezonans chemiczny między atomami  $\text{O}=\text{C}-\text{N} \leftrightarrow \text{O}^-\text{C}=\text{N}^+$  nadaje wiązaniu C-N częściowo charakter wiązania podwójnego o wysokiej energii, co uniemożliwia rotację) oraz wiązania w pierścieniach aromatycznych. Jest to parametr bezwymiarowy [80; 89; 91]

Stanowi bardzo dobry deskryptor dla biodostępności leków podawanych doustnie [89].

#### Polaryzowalność cząsteczkowa ( $\alpha$ , z ang. *molecular polarizability*)

Jest to wielkość wyrażająca zdolność do zaburzenia rozkładu gęstości elektronowej wokół jąder atomowych oraz zmiany geometrii cząsteczek pod wpływem zewnętrznego pola elektrycznego, czego konsekwencją jest tworzenie elektrycznych dipoli elektrycznych.

Stanowi ona współczynnik proporcjonalności między natężeniem zewnętrznego pola elektrycznego a indukowanym przez to pole elektrycznym momentem dipolowym:

$$\alpha = \frac{\mu}{E}$$

gdzie:

$\alpha$  – polaryzowalność cząsteczki

$\mu$  – elektryczny moment dipolowy cząsteczki

$E$  – natężenie zewnętrznego pola elektrycznego

W jednostkach SI polaryzowalność cząsteczkową wyraża się w  $C \cdot m^2 \cdot V^{-1} = A^2 \cdot s^4 \cdot kg^{-1}$ , ale częściej, również w analizie QSAR stosuje się jednostki objętości  $cm^3$  lub  $\text{Å}^3$ . Związki o większej polaryzowalności wykazują lepszą rozpuszczalność w wodzie.

Deskryptor ten koreluje z MR [80].

#### Suma polaryzowalności atomów (APOL, z ang. *sum of atomic polarizabilities*)

Analogicznie jak w przypadku polaryzowalności cząsteczkowej – jest to suma polaryzowalności atomów w cząsteczce, włączając atomy wodoru. W odróżnieniu od polaryzowalności cząsteczkowej parametr ten nie uwzględnia polaryzowalności wiązań między atomami.

W jednostkach SI polaryzowalność atomowa wyrażana jest w  $C \cdot m^2 \cdot V^{-1} = A^2 \cdot s^4 \cdot kg^{-1}$ , ale częściej, również w analizie QSAR stosuje się jednostki objętości  $cm^3$  lub  $\text{Å}^3$  [80].

#### Topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki (TPSA, z ang. *topological polar surface area*)

Zdefiniowana jest jako suma polarnych powierzchni Van der Waals'a atomów w cząsteczce (zwykle tlenów i azotów wraz z odpowiadającymi im wodorami) i obliczana jest za pomocą metodologii opracowanej przez *Ertla i wsp.* [92].

TPSA stanowi bardzo dobry deskryptor charakteryzujący wchłanianie leków przez przewód pokarmowy, ich biodostępność oraz przenikalność przez barierę krew-mózg [80].

Wartość tego deskryptora wyrażana jest jednostce powierzchni  $\text{Å}^2$ . Uważa się, że związki posiadające TPSA  $<140 \text{ Å}^2$  powinny wykazywać dobrą przenikalność przez błony biologiczne oraz wchłanianie z przewodu pokarmowego. W przypadku większości leków działających na ośrodkowy układ nerwowy wartość tego parametru nie przekracza  $70 \text{ Å}^2$  [89].

#### Wskaźnik Wiener'a (W, z ang. *Wiener index*)

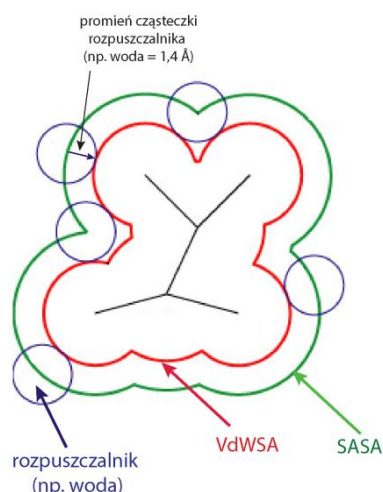
Definiowany jest jako suma najkrótszych połączeń (tzw. ścieżek) między wszystkimi możliwymi parami ciężkich atomów znajdujących się w cząsteczce. Charakteryzuje on stopień przestrzennego rozgałęzienia związku, np. dla cząsteczki *n*-butanu  $W=10$ , a dla izobutanu  $W=9$  [80].

Parametr ten koreluje m.in. z VdWSA oraz temperaturami wrzenia *n*-alkanów [81–83; 93].

#### Powierzchnia Van der Waals'a (VdWSA, z ang. *Van der Waals surface area*)

Stanowi sumę teoretycznych powierzchni atomów w cząsteczce, wyliczaną w oparciu o promienie Van der Waals'a dla poszczególnych atomów (RYCINA 3.3) [94].

Wartość tego deskryptora wyrażana jest jednostce powierzchni  $\text{Å}^2$  [80].



RYCINA 3.3

Obrazowe przedstawienie różnicy między sposobem wyznaczania powierzchni cząsteczki, powierzchni Van der Waals'a (VdWSA) – kolor czerwony oraz powierzchni dostępności rozpuszczalnika (SASA) – kolor zielony [94].

### 3.5. Analiza 2D QSAR

Intensywny rozwój analizy QSAR trwa już ponad 50 lat. Przez ten czas doszło do ewolucji stosowanych metod komputerowych oraz podejścia do problematyki związanej z projektowaniem nowych leków o coraz lepszej aktywności biologicznej i większym bezpieczeństwie stosowania.

Nadal istotnym i podstawowym, ale nie jedynym, sposobem wyznaczania zależności między aktywnością biologiczną a strukturą i właściwościami fizyko-chemicznymi związków chemicznych jest klasyczna analiza QSAR, zwana też dwuwymiarową analizą QSAR (2D QSAR).

Głównym zadaniem analizy 2D QSAR jest wygenerowanie równania, które najdokładniej jak to możliwe będzie opisywać zależność aktywności biologicznej ligandów od wartości poszczególnych deskryptorów opisujących ich jedno- i dwuwymiarową strukturę oraz podstawowe właściwości.

Najczęściej poszukuje się równania liniowego – tzw. równania Hanscha, którego ogólną postać zaprezentowano w ROZDZIALE 3.1, tj:

$$Y = a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots + a_nX_n + C$$

Niezbędnym elementem w tej analizie jest wyznaczenie wartości współczynników  $a_i$  dla poszczególnych deskryptorów  $X_i$  współtworzących równanie.

Ponadto należy określić inne parametry równania prostej, tj. [75; 95; 96]:

- **R<sup>2</sup>** lub **r<sup>2</sup>** (squared correlation coefficient):
  - kwadrat współczynnika korelacji (pożądana wartość wynosi >0,75)
  - opisuje jakość dopasowania modelu QSAR



- **Q<sup>2</sup> lub q<sup>2</sup>** (squared cross-validation correlation coefficient):
  - kwadrat współczynnika korelacji wyznaczony za pomocą krzyżowej walidacji (pożądana wartość wynosi >0,5),
  - opisuje moc predykcyjną modelu QSAR;
- **F** (Fisher value):
 
$$F_{m, DF; 0,05} = (DF * R^2) / [(1 - R^2) * m]$$

m – ilość deskryptorów/zmiennych  
DF – ilość stopni swobody

  - wartość wyznaczana z testu Fishera (pożądana wartość jak najwyższa),
  - określa poziom istotności statystycznej modelu QSAR,
  - jej wartość maleje wraz ze zwiększeniem ilości deskryptorów/zmiennych,
  - określa stopień możliwości „przenoszenia” uzyskanych wyników QSAR do innego zestawu danych;
- **p** (probability value):
  - wartość prawdopodobieństwa dla współczynników poszczególnych deskryptorów (z reguły wyznaczana dla 95% poziomu istotności statystycznej);
- **DF** (number of degrees of freedom)
  - ilość stopni swobody (z reguły prezentowana jako ilość obserwacji lub ilość analizowanych związków – 2, n-2);
- **Residual** (Reszty):
  - różnica między wartością eksperymentalną a predykcyjną.

Istnieje kilka metod wyznaczenia równania liniowego 2D QSAR. Najczęściej stosowane są dwie metody regresji opisane poniżej.

### 3.5.1. Prosta regresja liniowa

Prosta regresja liniowa (SLR, z ang. *simple linear regression*) jest najprostszą i najszybszą metodą pozwalającą określić ilościowo zależność SAR. W metodzie tej pod uwagę brany jest pojedynczy parametr opisany przy pomocy deskryptora (zmienna niezależna) oraz aktywność biologiczna (zmienna zależna) badanych związków. Całość ma postać równania liniowego 2D QSAR [75; 76; 96; 97]:

$$Y = aX + C$$

gdzie:

Y – aktywność biologiczna liganda (zmienna zależna)

a – współczynnik

X – parametr fizyko-chemiczny (deskryptor) liganda (zmienna niezależna)

C – stała

Na podstawie wyznaczonej krzywej liniowej określa się stopień korelacji między zmienną X i Y. Równanie takie wykonuje się osobno dla każdego użytego deskryptora. W ten sposób można wytypować, który deskryptor ma najwyższą korelację, a co za tym idzie może najsilniej determinować aktywność biologiczną.

### 3.5.2. Wielokrotna regresja liniowa

Wielokrotna regresja liniowa (MLR, z ang. *multilinear regression*) stanowi rozszerzenie metody SLR. Jest podstawowym sposobem postępowania matematycznego pozwalającym na wygenerowanie równania liniowego 2D QSAR. MLR znana jest również pod nazwą analizy Hanscha. W metodzie tej liczba szukanych współczynników (a więc i liczba zastosowanych deskryptorów) wynosi co najmniej dwa i musi być znacznie mniejsza niż liczba związków o znanej aktywności, do których dopasowywane są obliczane dane. W praktyce jeden współczynnik/deskryptor powinien przypadać na co najmniej pięć związków, przy czym łączna ilość stosowanych współczynników/deskryptorów z reguły wynosi od 2 do 12. W ten sposób można wytypować, która kombinacja deskryptorów ma najwyższą korelację, a co za tym idzie może najsilniej determinować aktywność biologiczną [75; 79; 96].

Jednakże należy uwzględnić uwagę fakt, że wartości wielu deskryptorów mogą być ze sobą skorelowane, zatem należy unikać ich jednoczesnego stosowania, gdyż nie wpływa to istotnie na zwiększenie dokładności obliczeń. Problemy te można częściowo ominąć dzięki metodzie pomocniczej (np. analizie czynników głównych), opisanej na kolejnych stronach.

Równanie liniowe 2D QSAR wyznaczone metodą MLR ma postać równania Hanscha (ROZDZIAŁ 3.5).

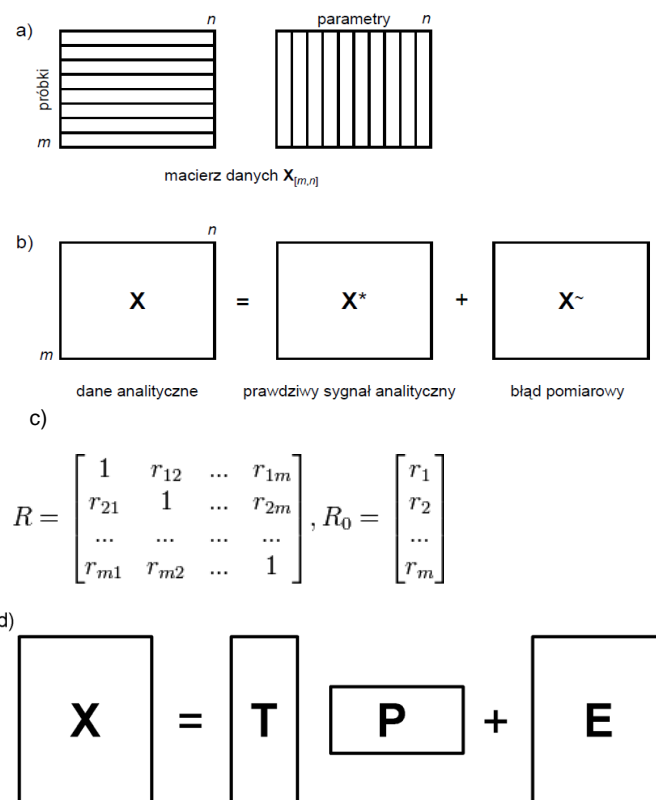
Równanie Hanscha pozwala w warunkach *in silico* ocenić aktywność biologiczną związków jeszcze niezbadanych w warunkach *in vitro*. Pozwala także zaplanować syntezę nowych związków o najbardziej pożądanym właściwościach fizyko-chemicznych i biologicznych, gdyż ułatwia dobór podstawników celem uzyskania struktury nowych związków przed rozpoczęciem etapu syntezy.

### 3.5.3. Analiza czynników głównych

Problemy właściwego zastosowania metod regresji mogą być związane z obecnością silnie skorelowanych deskryptorów, co może utrudniać wyznaczenie jak najlepszej zależności aktywność-struktura. Z tego względu wykorzystuje się dodatkowo inne metody matematyczne, które wspomagają obliczenia równań regresji. Do tych metod zalicza się np. analizę czynników głównych.

Za pioniera metody zwanej Analizą czynników głównych (PCA, z ang. *Principal Component Analysis*) uważa się Pearsona [97]. Istotą metody PCA jest redukcja ilości deskryptorów opisujących ilościowo zależność SAR poprzez zgrupowanie ich w tzw. czynniki główne („nowe” deskryptory).

W tym celu tworzy się macierz korelacji deskryptorów, a następnie wyznacza się z niej wartości własne i wektory własne dla poszczególnych czynników głównych, które są liniowymi kombinacjami oryginalnych deskryptorów. Utworzona macierz korelacji stanowi iloczyn dwóch nowych macierzy, tj. macierzy wyników,  $T$ , i wag,  $P$ . Zawierają one odpowiednio informacje o właściwościach badanych związków i zmiennych eksperymentalnych określających ich aktywność (RYCINA 3.4) [97–100].



RYCINA 3.4

Schemat tworzenia i analizy macierzy korelacji danych [98; 99]

- graficzne przedstawienie macierzy danych o  $m$  wierszach (nazywanych obiektami, próbkami lub badanymi związkami) i  $n$  kolumnach (nazywanych zmiennymi, deskryptorami lub parametrami),
- poszczególne składowe macierzy danych  $X$ : prawdziwy sygnał analityczny i błąd pomiarowy,
- ogólny wzór macierz korelacji  $X$
- schemat dekompozycji macierzy  $X$  na macierz wyników  $T$  i macierz wag  $P$  z ewentualnym uwzględnieniem macierzy błędów  $E$ .

W oparciu o uzyskane dane wybiera się te czynniki główne, które odpowiadają kilku największym wartościom własnym i wariancom dla macierzy korelacji. W praktyce wykorzystuje się te czynniki, które łącznie wyjaśniają co najmniej 70-80% wariancji wszystkich deskryptorów. Czynniki główne o największej wariancji jest reprezentantem tej grupy i nie wykazuje korelacji z następnymi czynnikami. Kolejne czynniki:

- są również wzajemnie nieskorelowane (mają ortogonalny charakter),
- są definiowane tak, aby zmaksymalizować zmienność, która nie została wyjaśniona przez poprzedni czynnik.

Wyniki przedstawiane są tabelarycznie oraz graficznie w postaci układu współrzędnych [98; 99].

Ogólny model PCA przedstawiono poniżej:

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} n \\ \boxed{\phantom{X}} \\ m \end{array} = \begin{array}{c} n \\ \boxed{P_1} \\ m \end{array} + \begin{array}{c} n \\ \boxed{P_2} \\ m \end{array} + \dots + \begin{array}{c} n \\ \boxed{P_f} \\ m \end{array} + \begin{array}{c} n \\ \boxed{E} \\ m \end{array} \\
 \text{Dane wyjściowe} \quad \mathbf{t}_1 \quad \mathbf{t}_2 \quad \mathbf{t}_f \quad \text{Macierz reszt} \\
 \mathbf{X}_{[m,n]} \quad \mathbf{E}_{[m,n]}
 \end{array}$$
  

$$\begin{array}{c}
 \begin{array}{c} n \\ \boxed{\phantom{X}} \\ m \end{array} = \begin{array}{c} \boxed{\phantom{X}} \\ m \end{array} + \begin{array}{c} \boxed{\phantom{X}} \\ m \end{array} + \dots + \begin{array}{c} \boxed{\phantom{X}} \\ m \end{array} + \begin{array}{c} \boxed{E} \\ m \end{array} \\
 \text{Dane wyjściowe} \quad \hat{\mathbf{X}}_{[m,n]}(1) \quad \hat{\mathbf{X}}_{[m,n]}(2) \quad \hat{\mathbf{X}}_{[m,n]}(f) \quad \text{Macierz reszt} \\
 \mathbf{X}_{[m,n]} \quad \mathbf{E}_{[m,n]}
 \end{array}$$

dane wyjściowe zrekonstruowane z 1, 2, ..., f czynnikami głównymi

RYCINA 3.5

Model PCA o  $f$  czynnikach głównych [98; 99].

Główne zastosowania analizy czynników głównych to [98–100]:

- redukcja liczby deskryptorów (zmiennych niezależnych),
- wykrywanie zależności między deskryptorami,
- weryfikacja wykrytych prawidłowości i powiązań między aktywnością a strukturą i właściwościami fizyko-chemicznymi badanych związków,
- klasyfikacja badanych związków w nowych przestrzeniach zdefiniowanych przez utworzone czynniki.

### 3.5.4. Podsumowanie 2D QSAR

Analiza 2D QSAR nadal stanowi ważny element badań QSAR, ale w toku intensywnego rozwoju nauk bioinformatycznych straciła pierwszeństwo na rzecz półilościowej analizy SAR, jak również analizy 3D QSAR oraz jej dalszych rozszerzeń, tj. 4D, 5D i 6D QSAR.

Obecnie stosowane regresyjne metody biomatematyczne, pozwalające na wyznaczenie zależności między biologiczną aktywnością a dwuwymiarową strukturą związków chemicznych, traktowane są jako element uzupełniający dla trójwymiarowych analiz SAR.

Zaletami tych metod jest dość szybka możliwość przetwarzania danych i określenie zależności SAR w odniesieniu do podstawowych danych dotyczących struktury 2D i właściwości fizyko-chemicznych badanych związków. Obecne możliwości obliczeniowe komputerów są znacznie większe i wydajniejsze niż w przypadku sprzętu stosowanego jeszcze w XX wieku, co sprawia, że współczesne analizy 2D QSAR są bardzo rozbudowane i obejmują analizę wielu setek i tysięcy deskryptorów dla danego zestawu związków. Pozwala to na znalezienie ilościowego SAR dla deskryptorów wcześniej pomijanych w klasycznych analizach QSAR.

Ponadto, na podstawie wyznaczonego równania Hanscha można określić, które deskryptory i w jakim stopniu mogą mieć najistotniejszy wpływ na aktywność biologiczną nowych związków przeznaczonych do syntezy i weryfikacji w warunkach *in vitro*.

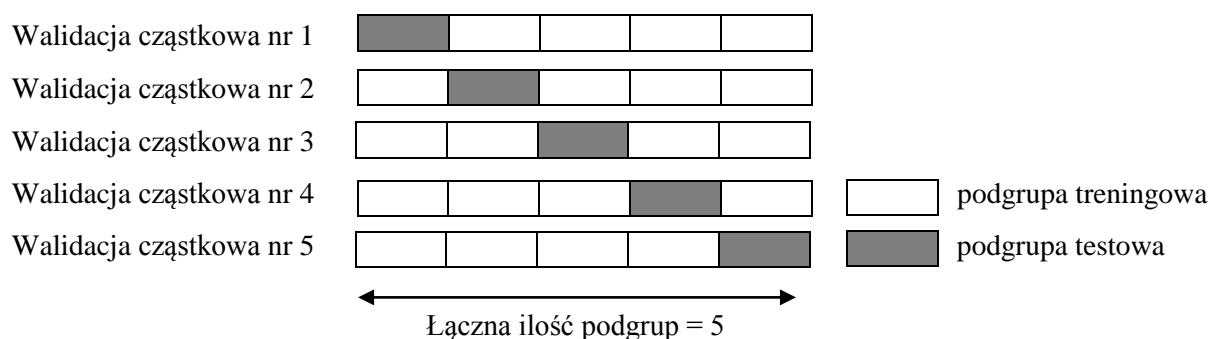
Jak każda metoda badawcza, 2D QSAR ma również wady, z których najistotniejszą jest brak uwzględniania trójwymiarowej struktury badanych związków, która ma kluczowe znaczenie przy określaniu przestrzennej interakcji ligandów z receptorem i jest nieoceniona przy ustalaniu struktury przestrzennej nowych ligandów, stąd tak intensywny rozwój metod 3D QSAR od lat 80-tych ubiegłego wieku [75; 78; 101; 102].

### 3.5.5. Walidacja i kryteria akceptacji modelu 2D QSAR

Parametry predykcyjne modelu 2D QSAR oraz równanie Hanscha uzyskane dla badanych związków treningowych wymagają również walidacji celem potwierdzenia poziomu dopasowania wyników eksperymentalnych i prognozowanych oraz siły przewidywania aktywności biologicznej danego modelu. W tym celu stosuje się metodę statystyczną – tzw. krzyżową walidację (ang. *cross-validation*) [103; 104].

Metoda ta pozwala odpowiednio ocenić trafność prognostyczną dla utworzonego modelu 2D QSAR. Jest ona szczególnie użyteczna, gdy model konstruowany jest z małego zestawu związków treningowych ( $N \leq 20$ ). Najpowszechniej stosowana jest walidacja krzyżowa 5-krotna lub typu „wyrzuc jeden obiekt”, zwana również LOO (ang. *leave-one-out*). Bez jej zastosowania nie można być pewnym czy uzyskany model będzie dobrze przewidywał wartości prognostyczne dla nowych związków, które nie są wykorzystywane do jego konstruowania [103–105].

Przystępując do walidacji krzyżowej, należy zestaw badanych związków treningowych podzielić na  $k$  podgrup – związki „uczące się” ( $k-1$  podgrup) i związki testowe (1 podgrupa). Łączna ilość grup i walidacji cząstkowych odpowiada krotności zastosowanej walidacji, np. pięć podgrup poddaje się łącznie 5-krotnej cząstkowej walidacji krzyżowej, wydzielając na każdym etapie cztery podgrupy związków „uczących się” i jedną podgrupę związków testowych (RYCINA 3.6).



RYCINA 3.6  
Schemat procedury walidacji krzyżowej 5-krotnej [105].

Etapy postępowania dla  $k$ -krotnej walidacji krzyżowej są następujące [103; 104]:

- w pierwszym etapie wydziela się jedną grupę związków testowych, dla których oblicza się przewidywaną aktywność – służą one do testowania modelu 2D QSAR. Pozostałe grupy tworzą zestaw związków „uczących się”, dla których generowany jest model i równanie 2D QSAR.
- w kolejnym etapie wydziela się następną grupę związków testowych. Pozostałe grupy tworzą nowy zestaw związków „uczących się”.
- etapy powtarzane są  $k$ -krotnie, a uzyskane wyniki są uśredniane w celu wyznaczenia ogólnego modelu i równania 2D QSAR.
- obliczane są parametry statystyczne:

**PRESS** – przewidywana suma kwadratów reszt (z ang. *predicted residual sum of squares*)

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^N (y_{i,\text{test(pred)}} - y_{i,\text{test(obs)}})^2$$

gdzie,

$y_{i,\text{test(pred)}}$  – przewidywana aktywność biologiczna dla  $i$ -tego związku testowego (nie tworzącego modelu), wyznaczona z równania 2D QSAR

$y_{i,\text{test(obs)}}$  – doświadczalnie wyznaczona aktywność biologiczna dla  $i$ -tego związku testowego (nie tworzącego modelu)

**$R^2_{\text{pred}}$**  – przewidywany współczynnik determinacji, inaczej kwadrat współczynnika korelacji (z ang. *squared correlation coefficient, coefficient of determination*)

$$R^2_{\text{pred}} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (y_{i(\text{pred})} - y_{i(\text{obs})})^2}{\sum_{i=1}^N (y_{i(\text{obs})} - \bar{y}_{(\text{obs})})^2}$$

gdzie,

$y_{i(\text{pred})}$  – przewidywana aktywność biologiczna dla  $i$ -tego związku treningowego, wyznaczona z równania 2D QSAR

$y_{i(\text{obs})}$  – doświadczalnie wyznaczona aktywność biologiczna dla  $i$ -tego związku treningowego

$\bar{y}_{(\text{obs})}$  – doświadczalnie wyznaczonej aktywności biologicznej dla wszystkich związków treningowych

**$Q^2$**  – kwadrat współczynnika korelacji dla równania modelowego uzyskanego metodą krzyżowej walidacji (z ang. *squared cross-validation correlation coefficient*)

$$Q^2 = 1 - \frac{\text{PRESS}}{\sum_{i=1}^N (y_{i(\text{obs})} - \bar{y}_{(\text{obs})})^2}$$

gdzie,

$y_{i(\text{obs})}$  – doświadczalnie wyznaczona aktywność biologiczna dla  $i$ -tego związku treningowego

$\bar{y}_{(\text{obs})}$  – średnia arytmetyczna doświadczalnie wyznaczonej aktywności biologicznej dla wszystkich związków treningowych

Kryteria akceptacji predykcyjnego modelu 2D QSAR [103; 104]:

1. Współczynnik determinacji  $R^2_{\text{pred}}$ :
  - określa w jakim stopniu model 2D QSAR wyjaśnia zmienną zależną Y (aktywność biologiczna) za pomocą zmiennych niezależnych X (deskryptory) ;
  - jego wartość mieści się w zakresie  $0 \leq R^2_{\text{pred}} \leq 1$ ;
  - im wyższa wartość, tym model jest lepiej dopasowany pod kątem rodzaju i ilości deskryptorów, które objaśniają aktywność biologiczną;
  - stanowi wskaźnik jakości dopasowania predykcyjnego modelu 2D QSAR;
  - pożądana dolna wartość w badaniach QSAR wynosi 0,5.
2. Kwadrat współczynnika korelacji  $Q^2$ :
  - określa zdolność i moc prognozowania modelu 2D QSAR w odniesieniu do nowych związków;
  - jego wartość mieści się w zakresie  $Q^2 \leq 1$ ;
  - im wyższa wartość, tym prognoza aktywności biologicznej nowych związków jest silniejsza;
  - pożądana dolna wartość w badaniach QSAR wynosi 0,5;
  - wartość ujemna świadczy o złych parametrach modelu – konieczność dokonania zmiany deskryptorów i ich liczby oraz wykonania ponownych obliczeń.
3. Różnica między wartością  $R^2_{\text{pred}}$  a  $Q^2$  nie powinna przekraczać 0,3.  
Większa różnica wskazuje na zbyt dużą liczbę deskryptorów użytych do stworzenia modelu.

### 3.6. Inne metody QSAR

Klasyczna analiza QSAR dała podstawy do dalszego, intensywnego rozwoju kolejnych technik obliczeniowych, które uwzględniają rzeczywistą, trójwymiarową strukturę cząsteczek, ich przestrzenną zmienność oraz sposób oddziaływania z receptorem i cząsteczkami rozpuszczalnika, głównie wody. Za prekursora rozwoju tych metod uznawany jest Cramer, który w 1988 roku opublikował przełomową pracę pt. „*Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins*” (*J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110 (18), 5959–5967), w której opisał zastosowanie metody CoMFA do określenia wpływu budowy steroidów na ich zdolność do wiązania się z białkami nośnikowymi [101; 102].

Metoda CoMFA (ang. *Comparative Molecular Field Analysis*) jest najstarszą i jednocześnie najpowszechniej wykorzystywaną techniką 3D QSAR. Jej podstawowym założeniem jest stwierdzenie, że biologiczna aktywność związku jest funkcją jego właściwości sterycznych (kształt i wielkości cząsteczki) oraz właściwości elektronowych (obecność podstawników o różnych

ładunkach, struktura chmury elektronowej). Parametry te przedstawiane są w postaci pól sterycznych i elektrostatycznych otaczających cząsteczkę, a do ich obliczenia wykorzystuje się odpowiednio potencjał Lennarda-Jonesa i Coulomba [75; 79; 102; 106].

Ponadto, CoMFA stanowiła punkt wyjścia do rozwoju kolejnych metod obliczeniowych, w tym [75; 79; 102; 106]:

- CoMSIA (ang. *Comparative Molecular Similarity Indexes Analysis*) – rozszerzenie CoMFA. Do obliczenia pól sterycznych i elektrostatycznych stosuje się funkcję Gaussa, a dodatkowo wyznacza się wielkości pól hydrofobowych i wodorowych. Metoda ta pozwala na porównywanie struktur molekularnych związków o podobnych właściwościach, co umożliwia znalezienie wspólnych cech badanych cząsteczek istotnych dla wiązania z danym receptorem.
- COMBINE (ang. *Comparative Binding Energy Analysis*). CoMFA i CoMSIA są metodami bazującymi na właściwościach oraz przestrzennej budowie ligandów, podczas gdy w metodzie COMBINE wykorzystuje się oddziaływania molekularne poszczególnych fragmentów kompleksu ligand-receptor. Założeniem tej metody jest hipoteza, że swobodna energia wiązania ligand-receptor może korelować ze zbiorem jej komponentów, które oblicza poprzez porównanie struktury ligandu i receptora w postaci niezwiązanej oraz połączonych ze sobą.

Oprócz wyżej wymienionych technik w badaniach QSAR używa się również odmiennych metod obliczeniowych, wśród których można wyróżnić uczenie maszynowe wykorzystujące sztuczne sieci neuronowe (ANN, ang. *Artificial Neural Networks*), jak również klasyfikatory statystyczne (np. modele Bayesa) [75; 79; 102; 107; 108].

Obecnie znanych jest ponad 30 technik, w których zastosowanie znajdują ANN oparte na różnych algorytmach (np. genetyczny, probabilistyczny, logika rozmyta, drzewa decyzyjne) [107].

Modele Bayesa (zwane też klasyfikatorami Bayesa) bazują na rachunku prawdopodobieństwa warunkowego [105; 108; 109]. Jednym z twórców tej teorii jest Thomas Bayes, który w XVIII w. sformułował twierdzenie opisane następującym wzorem [107; 110]:

$$P(A|B) = \frac{P(A) * P(B|A)}{P(B)}$$

gdzie:

$P(A|B)$  – prawdopodobieństwo warunkowe (*a posteriori*) zdarzenia A (należenie do klasy A) pod warunkiem zajścia zdarzenia B (posiadanie właściwości B)

$P(A)$  – prawdopodobieństwo bezwarunkowe (*a priori*) zdarzenia A, niezależne od zajścia zdarzenia B

$P(B|A)$  – prawdopodobieństwo warunkowe (*a posteriori*) zdarzenia B (należenie do klasy B) pod warunkiem zajścia zdarzenia A (posiadanie właściwości A)

$P(B)$  – prawdopodobieństwo bezwarunkowe (*a priori*) zdarzenia B, niezależne od zajścia zdarzenia A



Jednym z najpowszechniej stosowanych klasyfikatorów jest tzw. naiwny model Bayesa [108], który został opisany w kolejnym rozdziale.

Metody obliczeniowe QSAR zostały zaimplementowane do różnego typu oprogramowania i w połączeniu z wysokiej klasy komputerami, dają możliwość szybkiego, wydajnego i coraz dokładniejszego wyznaczenia ilościowej zależności struktura-aktywność w oparciu o budowę planarną, jak i przestrzenną analizowanych związków.

### 3.6.1. Naiwny model Bayesa

Analiza QSAR wykorzystująca naiwny model Bayesa jest stosowana przede wszystkim w wirtualnym skriningu bibliotek związków chemicznych (ang. *virtual screening*) oraz do klasyfikowania cząsteczek w odniesieniu do konkretnej aktywności biologicznej [108].

Naiwny model Bayesa, zwany również modelem cech niezależnych, to prosty klasyfikator statystyczny, w którym zakłada się wzajemną niezależność („naiwność”) zmiennych niezależnych. Tymi zmiennymi w badaniach QSAR są z reguły deskryptory molekularne [105; 107–109].

Celem obliczeń jest określenie prawdopodobieństwa przynależności badanych związków do klasy aktywnych lub nieaktywnych biologicznie na podstawie rozkładu wartości analizowanych deskryptorów. Modele prawdopodobieństwa wyznacza się za pomocą twierdzenia Bayesa [105; 107–112].

Przy wykonywaniu obliczeń korzysta się również z tzw. korekty Laplace’a (wygładzania Laplace’a), która modyfikuje jednakowo wszystkie możliwe prawdopodobieństwa dla danego deskryptora. Działanie to stabilizuje estymator i zapobiega występowaniu zerowych prawdopodobieństw. Zastosowanie korekty Laplace’a jest uzasadnione w przypadku, gdy prawdopodobieństwo występowania zakresu wartości danego deskryptora (np.  $\log P \geq 6$ ) wśród testowanych związków jest zerowe lub bliskie zeru [108; 109; 111; 112].

Uzyskane wyniki nie określają w sposób dokładny aktywności testowanych związków (np. w formie konkretnej wartości  $IC_{50}$ ), lecz wskazują czy dana cząsteczka może taką aktywność wykazywać czy raczej nie posiada jej [105; 108].

Ponadto, korzystając ze złożonych deskryptorów (tzw. fingerprintów), można wytypować fragmenty budowy analizowanych związków (np. grupy funkcyjne, podstawniki pierścieni aromatycznych, położenie podstawników, rodzaje wiązań), które powinny zwiększać lub zmniejszać ich aktywność biologiczną [108; 109].

#### 3.6.1.1. Przykładowe obliczenia

Sposób wykonywania obliczeń z wykorzystaniem naiwnego modelu Bayesa zaprezentowano na poniższym przykładzie.

Do badania zakwalifikowano 10 związków o różnej sile hamowania aktywności COX-1. Wyznaczono dla nich wartości trzech deskryptorów: logP, ilość wiązań rotowalnych oraz TPSA. Cząsteczki o wartościach  $IC_{50}$  poniżej 10  $\mu\text{mol/l}$  należały dla klasy aktywnych biologicznie. Szczegółowe dane przedstawia poniższa TABELA.

TABELA 3.1  
Naiwny model Bayesa – badane związki (przykład)

Nr związku	logP	ilość wiązań rotowalnych (RBN)	TPSA [ $\text{\AA}^2$ ]	$IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	Związek aktywny
1	3,51	6	121,41	23,11	NIE
2	4,36	8	148,36	8,79	TAK
3	4,78	4	98,79	5,63	TAK
4	5,13	9	105,63	4,58	TAK
5	3,02	3	111,87	11,47	NIE
6	6,11	5	87,53	15,69	NIE
7	4,59	4	132,56	6,89	TAK
8	5,14	7	124,01	19,55	NIE
9	5,89	9	102,69	3,02	TAK
10	3,91	6	95,25	9,54	TAK

W oparciu o powyższe dane chcemy wyznaczyć prawdopodobieństwo aktywności dla nowego związku, dla którego wartości deskryptorów są następujące:

- $\log P \geq 4$
- ilość wiązań rotowalnych (RBN)  $\geq 6$
- $TPSA \geq 120 \text{\AA}^2$

W tym celu należy podzielić związki na dwie klasy:  $A_1$  („związki aktywne”) i  $A_2$  („związki nieaktywne”) biologicznie oraz wyliczyć prawdopodobieństwo przynależności do obydwóch klas za pomocą twierdzenia Bayesa:

$$P(A_1|B) = \frac{P(A_1) * P(B|A_1)}{P(B)}$$

$$P(A_2|B) = \frac{P(A_2) * P(B|A_2)}{P(B)}$$

Prawdopodobieństwo  $P(B)$  ma wartość stałą, dlatego podczas obliczeń można je pominąć, maksymalizując tylko iloczyn w liczniku:

$$P(A_1|B) = P(A_1) * P(B|A_1)$$

$$P(A_2|B) = P(A_2) * P(B|A_2)$$

Prawdopodobieństwo  $P(A_1)$  oraz  $P(A_2)$  wylicza się ze wzoru :

$$P(A_1) = P(\text{związek aktywny}) = \frac{\text{ilość związków aktywnych}}{\text{całkowita ilość związków}}$$

$$P(A_2) = P(\text{związek nieaktywny}) = \frac{\text{ilość związków nieaktywnych}}{\text{całkowita ilość związków}}$$

Następnie, poszczególne deskryptory oznacza się jako ( $B_1, B_2, B_3$ ), a wartość  $P(B/A)$  dla danej klasy oblicza się jako iloczyn:

$$P(B|A_1) = P(B_1|A_1) * P(B_2|A_1) * P(B_3|A_1)$$

$$P(B|A_2) = P(B_1|A_2) * P(B_2|A_2) * P(B_3|A_2)$$

przy czym:

$$P(B_i | A_j) = \frac{\text{ilość związków należących do klasy } A_j, \text{ których wartość deskryptora } B_i \text{ jest równa lub wyższa od zakładanej}}{\text{całkowita ilość związków należących do klasy } A_j}$$

Wykorzystując powyższe zależności otrzymuje się ostateczny wzór do wyliczenia prawdopodobieństwa przynależności do danej klasy:

$$\begin{aligned} P(\text{związek aktywny} | \log P \geq 4, \text{RBN} \geq 6, \text{TPSA} \geq 120 \text{ \AA}^2) \\ = \\ P(\text{związek aktywny}) * P(\log P \geq 4 | \text{związek aktywny}) * \\ P(\text{RBN} \geq 6 | \text{związek aktywny}) * \\ P(\text{TPSA} \geq 120 \text{ \AA}^2 | \text{związek aktywny}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(\text{związek nieaktywny} | \log P \geq 4, \text{RBN} \geq 6, \text{TPSA} \geq 120 \text{ \AA}^2) \\ = \\ P(\text{związek nieaktywny}) * P(\log P \geq 4 | \text{związek nieaktywny}) * \\ P(\text{RBN} \geq 6 | \text{związek nieaktywny}) * \\ P(\text{TPSA} \geq 120 \text{ \AA}^2 | \text{związek nieaktywny}) \end{aligned}$$

W oparciu o powyższe wzory wyznacza się ostateczną wartość prawdopodobieństwa:

$$\begin{aligned} P(\text{związek aktywny} | \log P \geq 4, \text{RBN} \geq 6, \text{TPSA} \geq 120 \text{ \AA}^2) \\ = 6/10 * 5/6 * 4/6 * 2/6 = 0,111 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} P(\text{związek nieaktywny} | \log P \geq 4, \text{RBN} \geq 6, \text{TPSA} \geq 120 \text{ \AA}^2) \\ = 4/10 * 2/4 * 2/4 * 2/4 = 0,050 \end{aligned}$$

#### Wniosek:

Prawdopodobieństwo przynależności nowego związku do klasy „związki aktywne” wynosi 0,111, a do klasy „związki nieaktywne” ma wartość 0,050.

W związku z powyższym nowy związek jest klasyfikowany do związków aktywnych i przypuszcza się, że jego wartość  $IC_{50}$  wobec COX-1 jest poniżej 10  $\mu\text{mol/l}$ .

W analizowanym modelu nie występuje jakiegokolwiek zerowe prawdopodobieństwo, dlatego zastosowanie korekty Laplace'a nie jest wymagane przy wykonywaniu obliczeń.

### 3.6.1.2. Walidacja naiwnego modelu Bayesa

Klasyfikatory Bayesa, podobnie jak inne modele QSAR, podlegają procesowi walidacji w celu potwierdzenia, że uzyskany model prognozuje aktywność biologiczną testowanych związków w sposób wiarygodny. W tym celu stosuje się również tzw. krzyżową walidację – najczęściej metodę LOO [103–105].

Należy jednak zaznaczyć, że do oceny modeli opartych na rachunku prawdopodobieństwa stosuje się inne parametry statystyczne niż ma to miejsce w przypadku klasycznych obliczeń.

Parametry oceniające model wyznacza się w oparciu o tzw. macierz klasyfikacji (tablicę pomyłek). Biorąc pod uwagę częstość występowania rzeczywistego stanu pozytywnego i negatywnego w modelu oraz wzajemnych relacji prawidłowych i nieprawidłowych klasyfikacji można wyróżnić szereg miar jakości modelu [109; 111–113].

TABELA 3.2  
Macierz klasyfikacji [113].

		klasa rzeczywista (wyniki eksperymentalne)	
		pozytywna (zaobserwowano stan wyróżniony)	negatywna (nie zaobserwowano stanu wyróżnionego)
klasa prognozowana (wyniki QSAR)	pozytywna (przewidywano stan wyróżniony)	TP	FP
	negatywna (nie przewidywano stanu wyróżnionego)	FN	TN

Stan wyróżniony = aktywność biologiczna badanych związków:

- zaklasyfikowanie do stanu wyróżnionego (stan zaobserwowany / przewidywany) = związek jest aktywny
  - brak klasyfikacji do stanu wyróżnionego (stan niezaobserwowany / nieprzewidywany) = związek nie jest aktywny
- **TP** – klasa prawdziwie pozytywna (ang. *true positive*):
    - związek w badaniach eksperymentalnych oraz modelu Bayesa został uznany za aktywny biologicznie,
    - oznacza prawidłowe zaklasyfikowanie związku do stanu wyróżnionego;
  - **TN** – klasa prawdziwie negatywna (ang. *true negative*):
    - związek w badaniach eksperymentalnych oraz modelu Bayesa został uznany za nieaktywny biologicznie,
    - oznacza prawidłowy brak zaklasyfikowania związku do stanu wyróżnionego;
  - **FP** – klasa fałszywie pozytywna (ang. *false positive*):
    - związek w badaniach eksperymentalnych został uznany za nieaktywny biologicznie, ale w modelu Bayesa przypisana została mu aktywność biologiczna,
    - oznacza nieprawidłowe zaklasyfikowanie związku do stanu wyróżnionego (błąd pierwszego rodzaju);

- **FN** – klasa fałszywie negatywna (ang. *false negative*)
  - związek w badaniach eksperymentalnych został uznany za aktywny biologicznie, ale w modelu Bayesa został uznany za nieaktywny biologicznie,
  - oznacza nieprawidłowy brak zaklasyfikowanie związku do stanu wyróżnionego (błąd drugiego rodzaju).

Łączna ilość obserwacji (całkowita ilość związków budujących model QSAR) = TP + TN + FP + FN

Dobry model Bayesa to taki, w którym liczba błędów (FP i FN), czyli liczba związków z błędnie przypisaną aktywnością jest możliwie jak najmniejsza.

Na podstawie przyporządkowania związków do poszczególnych klas można wyznaczyć docelowe parametry jakości naiwnego modelu Bayesa [109; 111–113]:

- **czułość** (ang. *sensitivity*) lub odsetek prawdziwie pozytywnych (ang. *true positive rate*, TPR):

$$\text{Czułość} = \frac{TP}{TP + FN}$$

- **specyficzność** (ang. *specificity*, SPC) lub odsetek prawdziwie negatywnych (ang. *true negative rate*, TNR):

$$\text{Specyficzność} = \frac{TN}{TN + FP}$$

- **precyzja** (ang. *precision*):

- wartość predykcyjna dodatniego wyniku (ang. *positive predictive value*, PPV):

$$\text{PPV} = \frac{TP}{TP + FP}$$

- wartość predykcyjna ujemnego wyniku (ang. *negative predictive value*, NPV):

$$\text{NPV} = \frac{TN}{TN + FN}$$

- **dokładność** (ang. *accuracy*, ACC):

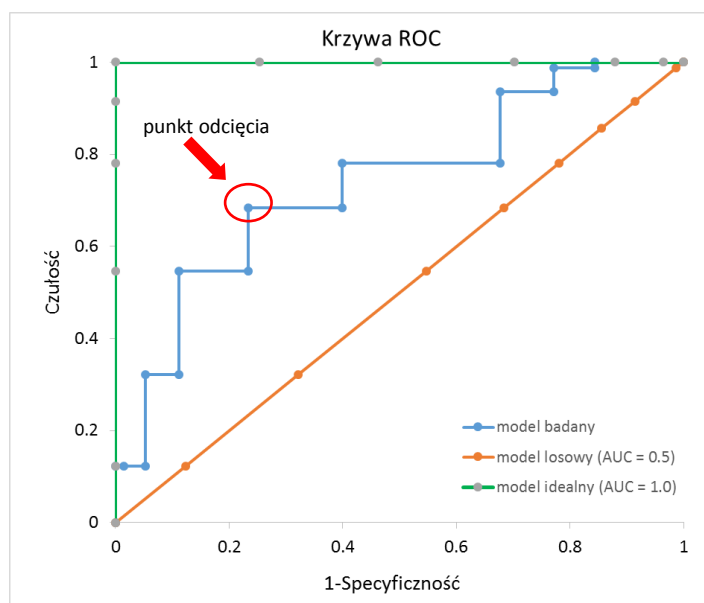
$$\text{ACC} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FN + FP}$$

Czułość i specyficzność są podstawą w konstruowaniu krzywych charakterystyki operacyjnej odbiornika (ROC, ang. *Receiver Operating Characteristic curve*). Obliczenia wykorzystujące tego rodzaju krzywe stosowane są w wielu dziedzinach, a szczególnie popularne są w analizie danych medycznych [113].

Krzywa ROC (RYCINA 3.7) opisuje związek między czułością a specyficznością analizowanego modelu Bayesa. Pole pod wykresem krzywej ROC, oznaczane jako AUC (z ang. *area under the curve*), charakteryzuje jakość utworzonego modelu Bayesa. Wartość AUC mieści się w przedziale

(0 – 1) – im wyższa, tym model w sposób dokładniejszy prognozuje aktywność badanych związków. Dla modelu idealnego wartość AUC równa jest 1, a dla losowego 0,5. Dla modeli doświadczalnych parametr ten przyjmuje z reguły wartość z zakresu 0,5 – 1.

Inną cechą charakterystyczną krzywej ROC jest punkt odcięcia, czyli punkt leżący najbliżej punktu idealnego o współrzędnych ( $x=0$ ,  $y=1$ ). Punkt idealny to punkt o czułości równej 1 (czyli wszystkie związki aktywne zostały prawidłowo zaklasyfikowane do stanu wyróżnionego;  $TP = 100\%$ ,  $FN = 0\%$ ) i specyficzności równej 1 (czyli żaden związek nieaktywny nie został przypisany do stanu wyróżnionego;  $TN = 100\%$ ,  $FP = 0\%$ ). Model tym lepszy, im punkt odcięcia leży bliżej punktu idealnego [113].



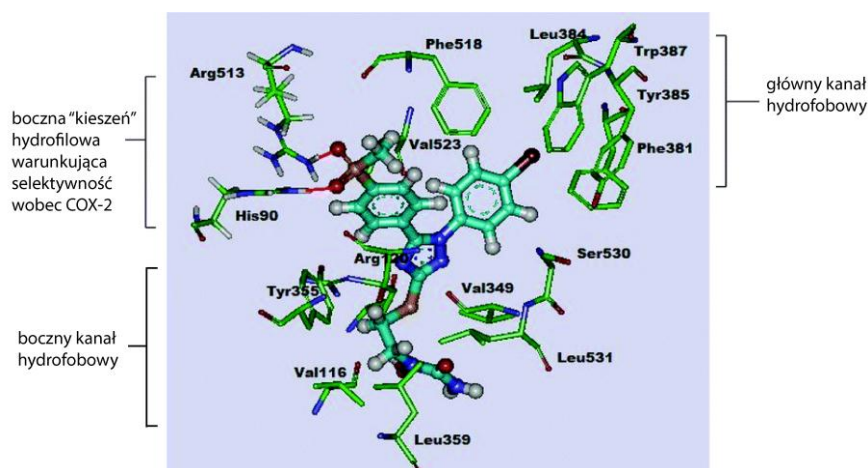
RYCINA 3.7

Przykładowy wykres krzywej ROC.

### 3.7. Dokowanie ligandów do receptora

Celem procedury dokowania jest odnalezienie sposobu optymalnego, przestrzennego ułożenia liganda w miejscu aktywnym receptora, tj. sposobu wiązania się obydwóch związków oraz ocena siły tego wiązania [114].

Przeważnie wybrany receptor poddaje się analizie z bardzo dużą liczbą ligandów. W tym celu wykorzystywane są specjalistyczne programy komputerowe, które wykorzystują algorytmy dokowania oparte na kompromisie pomiędzy szybkością obliczeniową a dokładnością oceny wiązania. Rezultatem obliczeń jest trójwymiarowe przedstawienie najkorzystniejszego oddziaływania ligand-receptor, które charakteryzuje się stanem o najniższej energii dokowania (RYCINA 3.8) [114; 115].



RYCINA 3.8

Graficzny przykład dokowania pochodnej diarylo-1,2,4-triazolu w miejscu aktywnym COX-2 [115].

### 3.7.1. Przygotowanie układu ligand – receptor

Kluczowym elementem dla właściwego przeprowadzenia całej procedury dokowania jest odpowiednie przygotowanie przestrzennej struktury receptora. Niezbędna tutaj jest dokładna znajomość atomowej struktury receptora oraz posiadanie biblioteki potencjalnych ligandów. Wymagana jest także znajomość miejsca wiążącego i aminokwasów zaangażowanych w ten proces. Wykonanie dokowania do całego receptora skutkuje z reguły otrzymaniem niewłaściwych wyników i jest czasochłonne [114–116].

Podczas analizy budowy receptora należy szczególną uwagę zwrócić na jego miejsce aktywne, tj. [114; 116]:

- ilość i rodzaj aminokwasów tworzących jego strukturę oraz ich ładunki,
- przestrzenne ułożenie aminokwasów, charakterystyczne obszary (np. kieszenie hydrofilowe, kanały hydrofobowe),
- ilość możliwych wiązań wodorowych (miejsca akceptorowych i donorowych),
- sposób wiązania atomów wodoru z atomem-donorem wiązania wodorowego,
- obecność i rodzaj grupy prostetycznej (np. hem),
- obecność jonów metali jako kofaktorów (najczęściej na +2 stopniu utlenienia),
- cząsteczki wody (rola przy mostkowaniu wiązań wodorowych).

W przypadku ligandów należy przygotować właściwe konformacje przestrzenne oraz, jeśli to konieczne, nadać atomom odpowiednie ładunki. Ważne, aby przestrzenne ułożenie liganda było takie samo, jak to wykorzystywane w analizie QSAR [114; 116].

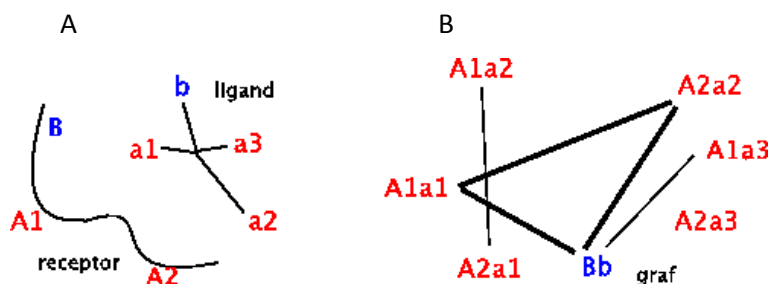
### 3.7.2. Algorytmy dokowania

Oddziaływanie liganda z receptorem nie ma sztywnego charakteru i powoduje złożone zmiany konformacyjne w strukturze obu związków. Ilość i zakres tych zmian jest niezwykle trudna do zidentyfikowania, przede wszystkim w odniesieniu do receptora, który cechuje się dużo bardziej złożoną strukturą. W związku z tym w praktyce uwzględniane są jedynie zmiany konformacyjne ligandów lub analizuje się sztywne oddziaływania ligand-receptor [116–118].

*Algorytmy dokowania sztywnych ligandów* [116; 117]

#### 1. Metoda grafów

Oparta jest na teorii grafów. W tym celu budowany jest graf, w którego węzłach zestawia się pary pasujących do siebie cech ligandu i receptora (np. kieszeni hydrofilowej receptora z grupą hydrofilową ligandu). Jeśli odległość (geometryczna) między miejscami zawierającymi dane cechy jest identyczna w ligandzie i w receptorze, to odpowiadające im węzły grafu są łączone. Najlepsze dopasowanie do receptora powinno występować w przypadku takiego liganda, którego graf cechuje się największą liczbą połączeń (RYCINA 3.9).



RYCINA 3.9

Schemat budowania grafu ligand-receptor [116].

- A Struktura ligandu i receptora w miejscu aktywnym. Wielkie litery oznaczają cechy miejsca wiążącego (np. B – obszar hydrofilowy, A1 i A2 miejsca akceptorowe dla wiązań wodorowych), małe – cechy ligandu (b – grupa hydrofilowa, a1, a2, a3 donory wiązania wodorowego). Pary komplementarnych cech stanowią np. A1a2 i Bb.
- B Graf obrazujący dopasowanie ligandu i receptora, np. odległość B – A2 jest taka sama jak b – a2, stąd połączenie węzłów Bb i A2a2.

#### 2. Metoda wykorzystująca pole siłowe

W tej metodzie obszar miejsca aktywnego wypełniany jest sferami stycznymi do powierzchni molekularnej. W kolejnym etapie (przy pomocy metody najmniejszych kwadratów) wykonuje się próby dopasowania położenia poszczególnych atomów liganda do środków tych sfer.



Po każdorazowym dopasowaniu wyznaczana jest energia oddziaływania liganda z receptorem. Za najbardziej korzystne uznawane jest dopasowanie o najniższej energii.

#### *Algorytmy dokowania giętkich ligandów [116; 118]*

##### 1. Metoda dokowania zespołów konformacji:

polega na wygenerowaniu różnych konformacji przestrzennych dla każdego liganda, a następnie dokowaniu każdej z nich jako osobnej cząsteczki do sztywnego miejsca aktywnego.

##### 2. Metoda fragmentacji ligandów:

polega na podziale ligandu na kilka sztywnych fragmentów i zastosowaniu jednego z dwóch wariantów dokowania. W pierwszym główny, największy fragment jest dokowany do miejsca aktywnego, a pozostałe są dobudowywane do niego tak, aby odtworzyć układ wiązań w cząsteczce. W drugim dokowane są wszystkie fragmenty jednocześnie i następnie sprawdzana jest możliwość odtworzenia molekuły.

### 3.7.3. Wyniki dokowania

Proces dokowania dużej liczby ligandów dostarcza wielu danych. Dla każdego liganda generowany jest zbiór kilkunastu lub kilkudziesięciu możliwych konformacji w miejscu aktywnym oraz informacje oceniające każde położenie za pomocą wartości liczbowych różnych funkcji.

Wartość energii dokowania stanowi powszechne kryterium wyboru najkorzystniejszej konformacji liganda. Tego rodzaju energia może być wyrażana np. w postaci energii (entalpii) swobodnej wiązania (oddziaływania) ligandu z receptorem ( $G_{\text{bind}}$ ):

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta H - T\Delta S$$

lub

$$\Delta G_{\text{bind}} = -RT \ln K_a$$

gdzie:

$\Delta G_{\text{bind}}$  – zmiana energii (entalpii) swobodnej kompleksu ligand-receptor ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ )

$\Delta H$  – zmiana entalpii kompleksu ligand-receptor ( $\frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$ )

T – temperatura kompleksu ligand-receptor (K)

$\Delta S$  – zmiana entropii kompleksu ligand-receptor ( $\frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ )

R – stała gazowa ( $R = 8,3145 \frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}}$ )

$K_a$  – stała asocjacji kompleksu ligand-receptor ( $K_a = \frac{[\text{stężenie kompleksu ligand - receptor}]}{[\text{stężenie liganda}] * [\text{stężenie receptora}]}$ )

Im wartość tej energii jest niższa, tym połączenie ligand-receptor jest bardziej stabilne, gdyż w tym przypadku ligand wykazuje największe powinowactwo albo taki kompleks ma najwyższą wartość stałej asocjacji [116].

Ponadto, programy komputerowe generują przestrzenne struktury 3D dla każdej możliwej konformacji o określonej energii, które graficznie obrazują sposób oddziaływania ligandu z miejscem aktywnym receptora (RYCINY 1.6, 1.8, 3.8).

## 4. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej leków *in vitro*

### 4.1. Ogólna charakterystyka testów cytotoksycznych *in vitro*

#### 4.1.1. Wstęp

Cytotoksyczność jest cechą związku chemicznego, która określa jego zdolność do indukowania śmierci komórek. W farmakoterapii onkologicznej cytotoksyczność stanowi podstawowy mechanizm działania leków przeciwnowotworowych. Natomiast w przypadku leków z pozostałych grup terapeutycznych jest to działanie niepożądane, którego występowanie istotnie ogranicza lub całkowicie uniemożliwia stosowanie tych leków u ludzi [119–121].

Podstawowe cele wykonywania badań cytotoksycznych dla nowych związków są następujące [119–125]:

- określenie potencjału toksycznego badanych związków,
- określenie zakresu dawek toksycznych,
- uzyskanie wiedzy na temat mechanizmu działania toksycznego na komórki,
- określenie siły działania toksycznego w zależności od typu komórki,
- określenie interakcji cytotoksycznych z innymi związkami.

Należy zaznaczyć, że współczesne przepisy prawne wymagają, aby potencjalnie nowe leki zostały, przed przystąpieniem do prób klinicznych, szczegółowo przebadane przedklinicznie pod kątem szeregu właściwości farmakologicznych i toksycznych, w tym aktywności cytotoksycznej [119; 120].

Aktywność cytotoksyczną związków oznacza się w modelach eksperymentalnych *in vitro* oraz *in vivo*. Testy *in vitro* stosowane są w ramach wstępnych badań przesiewowych i stanowią źródło cennych informacji odnośnie mechanizmu toksycznego działania badanych związków. Cechują się one szybkością, prostotą wykonania oraz powtarzalnością wyników, a co więcej oferują możliwość pracy na ludzkich liniach komórkowych. Z drugiej jednak strony, nie odwzorowują one w pełni siły i skali toksycznego działania, jakie związek może wykazywać w układzie *in vivo* [119; 121–127].

#### 4.1.2. Podstawowe cechy testów cytotoksyczności

Zasadniczo każdy test składa się z tych samych dwóch ogólnych etapów [121–127]:

1. inkubacji komórek danego typu z badanym związkiem – w danym zakresie stężeń i przez określony czas (zwykle 3-4 cykle komórkowe) – w celu wystąpienia efektu cytotoksycznego działania związku,
2. oznaczenia parametru związanego z funkcjonowaniem lub proliferacją komórek za pomocą odpowiedniej metody i z wykorzystaniem różnych związków – szerzej omówione w ROZDZIALE 4.2.

Obecnie istnieje wiele odmiennych testów przeznaczonych do oznaczania aktywności cytotoksycznej badanych związków. Wykorzystują one różne punkty uchwytu związane z budową i fizjologią komórek, a zastosowane w nich metody biochemiczne i związki służą do ilościowego oznaczenia zmian zachodzących w komórkach poddawanych działaniu toksycznemu. Najczęściej stosowanymi metodami są: kolorymetria, fluorymetria, bioluminescencja lub metody izotopowe, a najczęściej używanymi związkami są różnego rodzaju barwniki, np. MTT, XTT, SRB, DAPI, PI lub błękit trypanu [119; 121–127].

Opis wybranych metod zaprezentowano w ROZDZIALE 4.2.

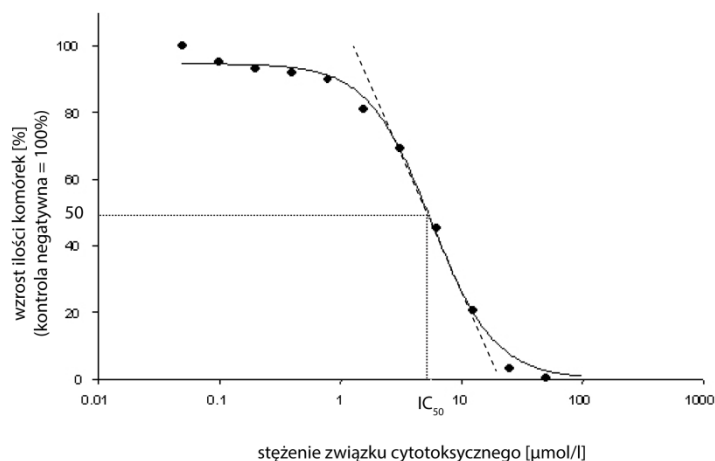
Ilościowa ocena zaburzeń procesów fizjologicznych komórki w wyniku obecności badanego związku wykazującego aktywność cytotoksyczną odbywa się wobec kontroli negatywnej. Analogicznie, jak w przypadku oznaczania aktywności biologicznej inhibitorów (ROZDZIAŁY 1.3.2 oraz 3.1), wartością liczbową, która pozwala wyrazić siłę obserwowanego działania cytotoksycznego jest:

- **IC<sub>50</sub>** – stężenie związku, przy którym proliferacja i wzrost komórek zostają zahamowane w 50% w porównaniu do kontroli negatywnej.

Ponadto, siłę działania cytotoksycznego można przedstawić za pomocą innych wartości, np. [121–127]:

- EC<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub> (omówione w ROZDZIALE 3.1)
- LD<sub>50</sub> – dawka związku powodująca śmierć 50% komórek
- MIC – minimalne stężenie związku hamujące wzrost komórek
- MTD – maksymalna tolerowana dawka związku

W celu określenia wartości IC<sub>50</sub> należy przeprowadzić procedurę inkubacji określonej linii komórkowej z badanym związkiem. Istotnym elementem jest właściwy dobór zakresu stężeń, który następnie posłuży do wyznaczenia tzw. sigmoidalnej krzywej w skali półlogarytmicznej, obrazującej zależność stężenia związku od siły jego cytotoksycznego działania, tj. stopnia zahamowania wzrostu komórek. Uzyskane wyniki należy skorygować o wartość kontroli negatywnej, uzyskanej podczas inkubacji komórek z substancją, dla której przyjmuje się brak działania cytotoksycznego (brak hamowania wzrostu). W oparciu o parametry krzywej i jej liniowy odcinek wyznacza się wartość IC<sub>50</sub> (RYCINA 4.1) [119; 121; 123–127].



RYCINA 4.1

Przykładowa krzywa wyznaczania cytotoksyczności z zaznaczoną wartością IC<sub>50</sub>.

## 4.2. Rodzaje testów cytotoksyczności i badanych parametrów

Testy *in vitro* umożliwiają pomiar aktywności/żywności komórek w badanej hodowli w sposób bezpośredni lub pośredni.

Poszczególne testy różnią się zasadami pomiaru w zależności od rodzaju badanego parametru żywności komórki i zastosowanej metody oznaczania, a najważniejsze z nich zostały wymienione w TABELI 4.1 oraz na RYCINIE 4.2 [119; 121; 123–127].

Metody bezpośrednie wykorzystują zmienną przepuszczalność błony komórkowej i pozwalają na wyznaczenie liczby komórek żywych i martwych w hodowli za pomocą ich wybarwienia. W tym celu stosowane są odpowiednie barwniki, do których należą np. błękit trypanu i czerwień obojętna (NR). Błękit trypanu wykazuje zdolność do wnikania do cytoplazmy komórek martwych, nekrotycznych i późnoapoptycznych barwiąc je na ciemnoniebiesko, podczas gdy komórki żywe pozostają niewybarwione w jego obecności. Dzięki temu komórki martwe mogą zostać zliczone w komorze hemocytometru, w mikroskopie świetlnym. Czerwień obojętna transportowana jest natomiast przez błonę komórkową wyłącznie komórek żywych na drodze aktywnej endocytozy. Barwnik ten kumuluje się w lizosomach, a zliczanie żywych komórek odbywa się w komorze hemocytometru lub spektrofotometrycznie.

Metodami pośrednimi są pomiary aktywności enzymów komórkowych, np.: dehydrogenazy mleczanowej (test LDH), kwaśnej fosfatazy (oznaczanie masy żywych komórek) oraz dehydrogenazy bursztynianowej (test MTT) [119; 121; 123–127].

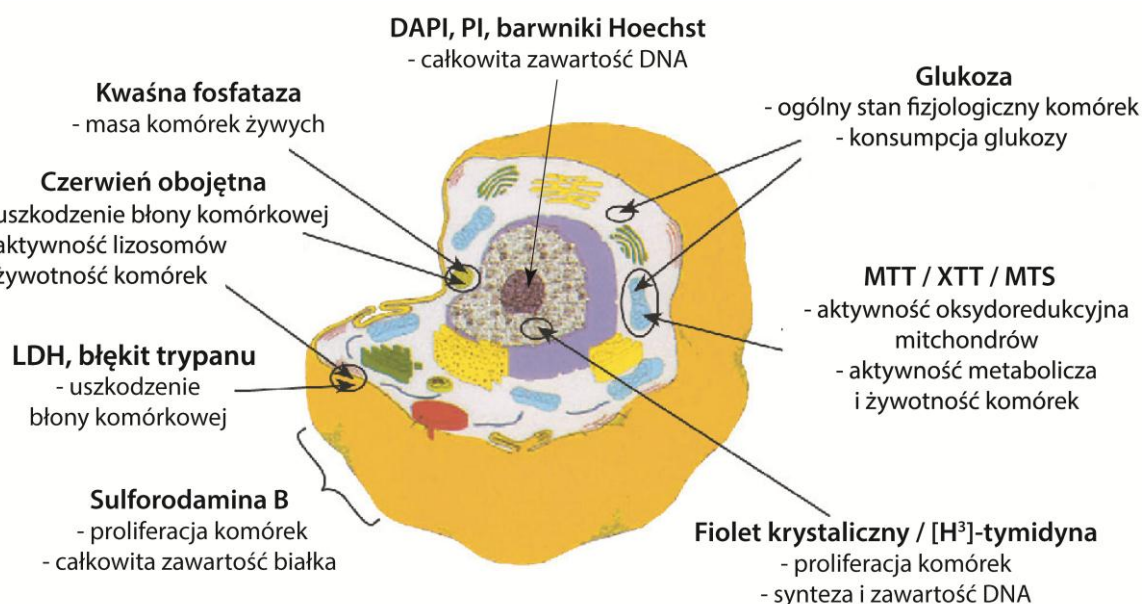
Do precyzyjnych pomiarów żywności komórek warto skompilować dwa różne testy, np. test bezpośredni z czerwiecią obojętną oraz test pośredni LDH [119; 121].

TABELA 4.1

Charakterystyka podstawowych testów do oznaczania cytotoksyczności komórkowej [119; 121–127].

Parametr komórkowy	Zasada pomiaru i metody oznaczania	Stosowane związki chemiczne
Całkowita zawartość białka	Elektrostatyczne wiązanie barwnika z białkami żywych komórek – utworzenie barwnego kompleksu – pomiar absorpcji (spektrofotometr).	sulforodamina B (SRB), błękit kenacidu (KB), błękit kumassi (CBB)
Całkowita zawartość DNA	Wiązanie (interkalacja) fluorochromu z DNA w żywych i/lub martwych komórkach – utworzenie kompleksu – pomiar zawartości DNA oraz ilości komórek wg fazy cyklu komórkowego (cytometr przepływowy, fluorescencja)	<i>Oznaczanie tylko ilości komórek martwych:</i> bromek etydyny, jodek propidyny (PI), Hoechst 33258, 4',6-diamidyno-2-fenylindol (DAPI);  <i>Oznaczanie ilości wszystkich komórek (żywych i martwych):</i> oranż akrydyny, Hoechst 33342
Synteza DNA i wzrost komórek	Zastosowanie prekursorów syntezy DNA znakowanych trytem – określenie intensywności syntezy DNA przez żywe komórki (pomiar scyntylicyjny promieniowania $\beta$ ).	trytowana tymidyna – [ $H^3$ ] tymida
Aktywność oksydoredukcyjna mitochondriów	Oznaczanie aktywności dehydrogenaz (mitochondrialnych (np. bursztynianowej) w żywych komórkach poprzez zastosowanie związków ulegających redukcji – utworzenie barwnych pochodnych – pomiar absorpcji (spektrofotometr).	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliny (MTT), 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenilo)-2-(4-sulfofenilo)-2H-tetrazolina (MTS), sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenilo)-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu (XTT)
Aktywność metaboliczna	Oznaczanie intensywności metabolicznej i żywotności komórek przy użyciu barwników oksydoredukcyjnych, zmieniających barwę w zależności od pH cytoplazmy – utworzenie barwnych pochodnych – pomiar absorpcji (spektrofotometr).	rezazuryna (błękit Alamara) ulegająca redukcji do rezurfiny
	Pomiar konsumpcji glukozy przez żywe komórki	glukoza
Integralność błony komórkowej	Barwienie martwych komórek barwnikami, które nie wnikają do wnętrza żywych komórek lub łączą się z fosfolipidami błonowymi komórek apoptycznych – zliczanie ilości martwych / apoptycznych komórek (hemocytometr, mikroskop świetlny lub cytometr przepływowy)	błękit trypanu, jodek propidyny (PI), erytrozyna B;  aneksyna V znakowana izotiocyanianem fluoresceiny (FITC)

Parametr komórkowy	Zasada pomiaru i metody oznaczania	Stosowane związki chemiczne
	Pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), która przedostała się z cytoplazmy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w wyniku uszkodzenia błony komórkowej (komórki martwe) – zastosowanie związków ulegających redukcji – utworzenie barwnych pochodnych – pomiar absorbancji (spektrofotometr).	Kwas mlekowy + NAD <sup>+</sup> + sól tetrazolowa, np. sól sodowa 2-(4-jodofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazoliny (WST-1) lub jodonitrotetrazoliny chlorek (INT)
Żywność komórek	Stosowanie barwników aktywnie wchłanianych (za pomocą endocytozy) tylko przez żywe komórki i gromadzonych w ich lizosomach – zliczanie ilości żywych komórek (hemocytometr lub mikroskop świetlny) lub pomiar absorbancji (spektrofotometr).	czerwień obojętna (NR)
Masa żywych komórek	Pomiar aktywności kwaśnej fosfatazy, która sprzężona jest z błoną komórkową – zastosowanie fosforanowych substratów ulegających defosforylacji do barwnych – pomiar absorbancji (spektrofotometr).	fosforan p-nitrofenyłu
Proliferacja komórek	Zastosowanie barwników gromadzących się w jądrze komórkowych i wiążących się z chromatyną	fiolet krystaliczny



RYCINA 4.2

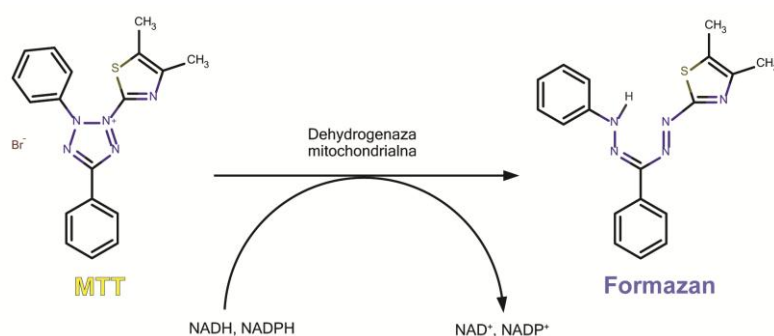
Metody oznaczania cytotoxycznosci komórkowej w oparciu o budowę i funkcję poszczególnych organelli [127].

Jedną z najpowszechniej stosowanych metod oznaczania cytotoksyczności ksenobiotyków jest test pośredni MTT, który został omówiony w kolejnym rozdziale.

#### 4.2.1. Test MTT

Test MTT służy do oceny żywotności i aktywności metabolicznej (intensywności przemian energetycznych) komórek poddawanych cytotoksycznemu działaniu różnych związków. W tym celu wykonuje się oznaczenia aktywności oksydoredukcyjnej dehydrogenaz mitochondrialnych, np. bursztynianowej. Enzymy te, zależne od NAD(P)H, powodują w żywych komórkach redukcję soli tetrazolowej (MTT) do formazanu [119; 121; 123; 124; 126–128].

MTT jest substratem rozpuszczalnym w wodzie, o zabarwieniu białym do żółtego. Związek ten przenika przez błonę komórkową i mitochondrialne do wnętrza mitochondriów. Z kolei otrzymywany formazan jest nierozpuszczalny w wodzie i ma kolor ciemno-niebieski do fioletowego, tym samym intensywnie barwi komórki, w których powstał (RYCINA 4.3). Poprzez dodanie izopropanolu, kwaśnego etanolu, DMSO lub innego rozpuszczalnika do hodowli – barwnik ten ulega rozpuszczeniu i transportowi poza komórki. Następnie intensywność jego roztworu mierzona jest spektrofotometrycznie (przy długości fali 570 nm). Ilość barwnego, zredukowanego MTT jest proporcjonalna do aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów, a w ściśle określonych warunkach doświadczalnych do liczby aktywnych metabolicznie, żywych komórek [119; 121; 123; 124; 126–128].



RYCINA 4.3

Redukcja MTT do formazanu przy udziale dehydrogenazy mitochondrialnej [119; 123; 124; 128].

Test MTT może być używany do określania żywotności komórek szczególnie w liniach komórek już niedzielących się, ale nadal aktywnych metabolicznie. Musi jednak być stosowany z dużą ostrożnością, gdyż wiele komórek żywych może nie wykazywać pożądanej aktywności mitochondrialnej [119; 121].

Modyfikacją testu MTT są testy XTT, MTS i WTS. Pierwsze dwa wykorzystują sole rozpuszczalne tetrazolowe, które, w obecności dehydrogenazy mitochondrialnej, NAD(P)H i 1-metoksyPMS (pośredniego donora/akceptora elektronów), ulegają redukcji do rozpuszczalnych w wodzie barwnych formazanów. Dzięki temu unika się stosowania dodatkowych rozpuszczalników



w badanej hodowli komórkowej oraz skraca się czas badania z 1-2 dni do kilku godzin. Test WST wykorzystuje natomiast rozpuszczalne sole tetrazolowe, które pod wpływem dehydrogenaz komórkowych, NAD(P)H i 1-metoksyPMS ulegają redukcji do rozpuszczalnych formazanów poza komórką. W tym przypadku również skraca się czas badania poprzez ominięcie etapu rozpuszczania barwnika [129].

#### **4.3. Zalety i wady oznaczania cytotoksyczności za pomocą testów *in vitro***

Zalety [119; 123]:

- prostota, szybkość i wydajność wykonywanych analiz,
- powtarzalność wyników danego testu,
- możliwość pracy z ludzkimi liniami komórkowymi,
- redukcja badań *in vivo* z udziałem zwierząt (faza przedkliniczna) – ekstrapolacja wyników podczas rozwoju nowych leków (względy humanitarne),
- zastąpienie wymaganych prawem badań *in vivo* na zwierzętach – dla nowych lub istniejących leków (względy humanitarne),
- niskie koszty analiz w porównaniu do badań *in vivo*,
- wykrywania mechanizmów toksyczności specyficznych dla określonych komórek lub narządów,
- szeroki zakres badanych parametrów toksyczności komórkowej,
- eliminacja cytotoksycznych kandydatów na leki we wczesnej fazie badań – oszczędność czasu, pieniędzy i zwierząt.

Wady [119; 123]:

- problem doboru właściwej linii komórkowej do badań z uwagi na różną lub brak wrażliwości komórek na działanie danego związku – możliwość uzyskania niejednoznacznych wyników w różnych testach,
- szersza ocena działania cytotoksycznego danego związku wymaga zastosowania linii komórkowych o różnej wrażliwości,
- nierównoważność stosowanych testów dla danej linii komórkowej – odmienne wartości  $IC_{50}$  dla badanych związków,
- subiektywność oceny wyników w metodach opartych na zliczaniu liczby komórek (np. w komorze hemocytometru) w porównaniu do metod spektrofotometrycznych.

## **CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA**

## 5. Założenia i cel pracy

Obecnie znana jest ogromna liczba związków naturalnego pochodzenia, które cechują się różnorodną aktywnością biologiczną, w tym działaniem przeciwnowotworowym.

Wśród tego typu związków można wyróżnić np. resweratrol i piceatannol, które wykazują szereg właściwości, w tym: przeciwzapalne, antyproliferacyjne, antyoksydacyjne, mikrobiobójcze, przeciwpasożytnicze, neuroprotekcyjne czy przeciwmiażdżycowe. W dotychczasowych badaniach *in vitro* stwierdzono, iż związki te mają zdolność do hamowania procesu nowotworowego na różnych etapach jego rozwoju, tj. inicjacji, promocji i progresji, m.in. poprzez zdolność do hamowania aktywności cyklooksygenazy-2 (COX-2). Istotnym ograniczeniem w zastosowaniu tych związków *in vivo* (np. w postaci leków lub w diecie) jest jednak ich niska biodostępność.

Fakt ten stanowił impuls do dalszych badań, w toku których opracowano nowe pochodne *trans*-stilbenu, które winny wykazywać lepszą biodostępność i jeszcze większą aktywność biologiczną, szczególnie przeciwzapalną i przeciwnowotworową. Do tych związków zalicza się np. pochodne metylowe i hydroksylowe *trans*-resweratrolu oraz *trans*-1,1,2-triaryloeteny. Ilość przebadanych związków tego typu pozostaje nadal niewielka, stąd zasadnym postępowaniem wydaje się być weryfikacja biologicznej aktywności nowych pochodnych *trans*-stilbenu w warunkach *in vitro*.

Celem niniejszej pracy jest ocena działania przeciwnowotworowego pochodnych *trans*-stilbenu oraz *trans*-stilbazolu poprzez analizę ich właściwości cytotoksycznych oraz zdolności do hamowania procesu zapalnego. Weryfikacja tej hipotezy została przeprowadzona za pomocą testów *in vitro* oraz analiz *in silico*.

Celem części eksperymentalnej jest:

- wstępne określenie siły i selektywności hamowania COX-1 i COX-2 przez pochodne *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu poprzez wykonanie badania przesiewowego *in vitro* z zastosowaniem kompetycyjnego testu immunoenzymatycznego (c-EIA);
- wytypowanie najbardziej selektywnych inhibitorów COX-2 na podstawie badania przesiewowego oraz wyznaczenie wartości IC<sub>50</sub> tych związków wobec obu izoform COX;
- wykonanie badań *in silico* (2D QSAR) w oparciu o uzyskane dane eksperymentalne i dane literaturowe w celu wyznaczenia zależności struktura – aktywność oraz określenia fragmentów budowy odpowiedzialnych za pożądany efekt biologiczny;
- zaprojektowanie nowych cząsteczek w oparciu o uzyskane wyniki analizy komputerowej, określenie przewidywanej aktywności biologicznej i wytypowanie najbardziej aktywnych związków do kolejnych badań eksperymentalnych;

- synteza chemiczna wyselekcjonowanych związków i potwierdzenie ich tożsamości za pomocą metod klasycznych i spektroskopowych;
- wyznaczenie wartości  $IC_{50}$  nowych związków wobec obu izoform COX za pomocą testu c-EIA.
- ilościowa analiza zależności struktura – aktywność (tzw. naiwny model Bayesa) z wykorzystaniem danych doświadczalnych i literaturowych – określenie fragmentów budowy odpowiedzialnych za pożądany efekt biologiczny oraz porównanie wyników z badaniem 2D QSAR;
- określenie właściwości cytotoksycznych nowych związków oraz cząsteczek wytypowanych w badaniach przesiewowych wobec komórek raka piersi MCF-7 (wykazujących nadekspresję COX-2) – test MTT;
- wykonanie dodatkowych badań dla związku wykazującego najsilniejsze działanie biologiczne:
  - wyznaczenie stopnia hamowania COX-2 w komórkach MCF-7 poprzez oznaczenie poziomu prostaglandyny  $E_2$  w supernatancie hodowlanym,
  - przeprowadzenie procesu dokowania *in silico* w celu określenia sposobu i siły wiązania badanej cząsteczki z centrum katalitycznym COX-1 i COX-2 o aktywności cyklooksygenazy.

## 6. Badane związki

### ETAP I – badanie przesiewowe z COX-1 i COX-2

Do badania wyselekcjonowano łącznie 25 związków, z których 19 należy do grupy pochodnych *trans*-stilbenu, a sześć zalicza się do pochodnych *trans*-stilbazolu. Budowę analizowanych cząsteczek przedstawiono w TABELI 6.1 i 6.2.

Związki te zostały zsyntezowane na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Opis drogi syntezy oraz wyniki badań tożsamości są zgodne z danymi literaturowymi [130–133].

Badanie przesiewowe zostało wykonane przy użyciu komercyjnego testu ELISA o nazwie *COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit* (nr katalogowy 560131) firmy Cayman Chemical, USA [134]. Za pomocą tego testu istnieje możliwość jednoczesnego oznaczenia interakcji badanych związków z izoformą COX-1 i COX-2.

TABELA 6.1

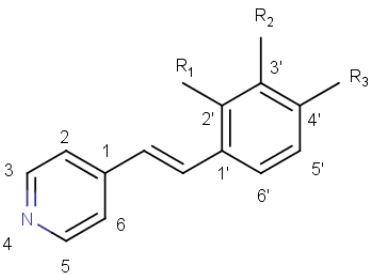
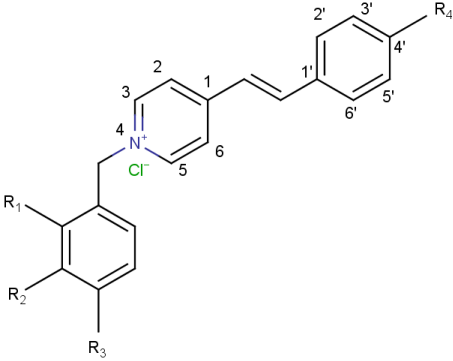
Struktura badanych pochodnych *trans*-stilbenu.

pochodne <i>trans</i> -stilbenu							
związek nr	R <sub>1</sub> (=2)	R <sub>2</sub> (=3)	R <sub>3</sub> (=4)	R <sub>4</sub> (=5)	R <sub>5</sub> (=3')	R <sub>6</sub> (=4')	R <sub>7</sub> (=5')
<b>Z1</b>	-H	-H	-H	-H	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H
<b>Z2</b>	-H	-H	-H	-H	-H	-OC(O)CH <sub>3</sub>	-H
<b>Z3</b>	-H	-H	-Cl	-H	-H	-OH	-H
<b>Z4</b>	-H	-H	-Cl	-H	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H
<b>Z5</b>	-H	-H	-Cl	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	-H
<b>Z6</b>	-H	-H	-Br	-H	-H	-OH	-H
<b>Z7</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H	-H
<b>Z8</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OH	-H
<b>Z9</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H
<b>Z10</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-H
<b>Z11</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	-H
<b>Z12</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	-H
<b>Z13</b>	-NO <sub>2</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OH	-H
<b>Z14</b>	-NO <sub>2</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H

<b>Z15</b>	-NO <sub>2</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-H
<b>Z16</b>	-NO <sub>2</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OC(O)CH <sub>3</sub>	-H	-H
<b>Z17</b>	-H	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H
<b>Z18</b>	-H	-H	-OC(O)CH <sub>3</sub>	-H	-H	-OC(O)CH <sub>3</sub>	-H
<b>Z19</b>	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	-H

TABELA 6.2

Struktura badanych pochodnych *trans*-stilbazolu.

pochodne <i>trans</i> -stilbazolu								
								
związek nr	R <sub>1</sub> (=2')	R <sub>2</sub> (=3')	R <sub>3</sub> (=4')	związek nr	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub> (=4')
<b>Z20</b>	-OH	-H	-H	<b>Z23</b>	-Cl	-H	-H	-OH
<b>Z21</b>	-H	-OH	-H	<b>Z24</b>	-H	-Cl	-H	-OH
<b>Z22</b>	-H	-H	-OH	<b>Z25</b>	-H	-H	-Cl	-OH

**ETAP II – badanie 2D QSAR oraz ustalenie budowy nowych związków do dalszych badań**

Do analizy *in silico* 2D QSAR wytypowano trzy związki z badania przesiewowego o największej selektywności wobec COX-2, tj. związki nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (TABELA 6.1).

W celu wytypowania struktury nowych związków niezbędne jest utworzenie tzw. komputerowego modelu predykcyjnego w oparciu o uzyskane wyniki doświadczalne oraz dane literaturowe dla innych pochodnych *trans*-stilbenu. Model ten zawiera trzy w/w związki badane oraz 37 cząsteczek literaturowych o znanej aktywności biologicznej i właściwościach fizykochemicznych [32; 34; 35]. Do obliczeń wykorzystano m.in. 1,1,2-triaryloeteny posiadające nie tylko układ *trans*-stilbenu, ale również dodatkowy trzeci pierścień aromatyczny przy mostku etylenowym. Taka różnica w budowie nie ma znaczenia w analizie 2D QSAR, w której nie bierze się pod uwagę budowy przestrzennej, a jedynie właściwości fizykochemiczne (deskryptory molekularne 1D i 2D) analizowanych cząsteczek.

Szczegółowe dane na temat struktury oraz aktywności biologicznej (COX-1 IC<sub>50</sub>, COX-2 IC<sub>50</sub>) związków literaturowych przedstawiono w TABELI 8.1.

W wyniku tego badania wyselekcjonowano struktury trzech nowych pochodnych *trans*-stilbenu (TABELA 6.3), które powinny wykazywać następujące właściwości:

- związek nr **N1** – silne i selektywne hamowanie aktywności COX-2,
- związek nr **N2** – nieselektywne działanie wobec obydwóch izoform COX,
- związek nr **N6** – selektywne lub preferencyjne hamowanie aktywności COX-1.

TABELA 6.3

Struktura nowych pochodnych *trans*-stilbenu.

pochodne <i>trans</i> -stilbenu							
związek nr	R <sub>1</sub> (=2)	R <sub>2</sub> (=3)	R <sub>3</sub> (=4)	R <sub>4</sub> (=5)	R <sub>5</sub> (=3')	R <sub>6</sub> (=4')	R <sub>7</sub> (=5')
<b>N1</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OH	-OH	-OH
<b>N2</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>
<b>N6</b>	-H	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H

Szczegółowe informacje dotyczące wyboru tych cząsteczek do dalszych badań zostały zaprezentowane w ROZDZIALE 12.2.4.

### **ETAP III – synteza pochodnych *trans*-stilbenu**

Trzy nowe pochodne – nr **N1**, **N2** i **N6** (wytypowane w badaniu 2D QSAR, ETAP II, TABELA 6.3) zostały zsyntezowane i przeznaczone do następnych analiz.

Dodatkowo, związki nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (wytypowane w badaniu przesiewowym, ETAP I, TABELA 6.1) zostały poddane resyntezie i przekazane do kolejnych badań.

Dane na temat syntezy wymienionych cząsteczek przedstawiono w ROZDZIAŁACH 9.3, 9.4 oraz 12.3.

### **ETAP IV – inkubowanie COX-1 i COX-2 z nowymi związkami**

Nowe, potencjalne inhibitory COX (związki nr **N1**, **N2** i **N6**) poddano identycznym badaniom *in vitro* jak w ETAPIE I – w celu oceny zdolności do hamowania aktywności COX-1 i COX-2.

Jako związek referencyjny został zastosowany celekoksyb, który jest wysoce selektywnym inhibitorem COX-2 [4; 18; 32]. Próbkę tego związku (3 g, nr serii: 0090, termin ważności: 01.2017) otrzymano z firmy PharmaZell GmbH. Jakość celekoksylu jest zgodna z wymaganiami Farmakopei Europejskiej (wytwórca posiada Certyfikat Zgodności z Farmakopeą Europejską o numerze R0-CEP 2012-151-Rev 00). Struktura tego związku jest zaprezentowana w ROZDZIALE 1.3.1 – na RYCINIE 1.6.

#### ***ETAP V – naiwny model Bayesa oraz pórwanie wyników z 2D QSAR***

Analiza *in silico* obejmowała zastosowanie klasyfikatora bayesowskiego (tzw. naiwnego modelu Bayesa) do półilościowego wyznaczenia zależności struktura-aktywność biologiczna testowanych związków.

Do stworzenia modelu komputerowego wykorzystano łącznie: 29 związków literaturowych (TABELA 8.1) [32; 34], trzy związki nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (TABELA 6.1) oraz dodatkowo trzy nowe pochodne *trans*-stilbenu nr **N1**, **N2** i **N6** (TABELA 6.3).

W odróżnieniu od klasycznej analizy 2D QSAR, modele Bayesa do szacowania aktywności wykorzystują nie tylko właściwości, ale również fragmenty budowy testowanych związków (tzw. fingerprinty molekularne). W związku z tym, w tego typu obliczeniach wykorzystano jedynie klasyczne *trans*-stilbeny, czyli związki posiadające dwa pierścienie aromatyczne połączone mostkiem etylenowym. Wykorzystanie pochodnych 1,1,2-triaryloetenu [35], czyli związków posiadających dodatkowy, trzeci pierścień aromatyczny mogłoby doprowadzić do sytuacji, w której uzyskany model komputerowy typowałby również konfigurację *cis* jako korzystnie wpływającą na aktywność ocenianych związków.

Uzyskane wyniki porównano z obliczeniami 2D QSAR (ETAP II).

#### ***ETAP VI – ocena cytotoksyczności związków wobec linii komórkowej MCF-7 (test MTT)***

Zbadano właściwości cytotoksyczne związków nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (wytypowanych w badaniu przesiewowym, ETAP I, TABELA 6.1) oraz trzech nowo zsyntezowanych cząsteczek – nr **N1**, **N2** i **N6** (ETAP III oraz IV, TABELA 6.3). Do badania wykorzystano linię komórkową MCF-7.

Jako związek referencyjny zastosowano celekoksyb.

#### ***ETAP VII – ocena stopnia hamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 przez wybrany związek***

Do tego etapu zakwalifikowano jedynie pochodną oznaczoną symbolem **N1**, która wykazywała najsilniejsze i najbardziej selektywne działanie wobec COX-2 spośród związków testowanych w ETAPIE I oraz IV.



W przypadku celekoksybu wykorzystano dostępne dane literaturowe [135].

Badanie zostało wykonane *in vitro* przy użyciu ludzkiej linii komórkowej raka piersi MCF-7 (ECACC nr 86012803) oraz komercyjnego testu ELISA – Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Kit (nr katalogowy 500141) firmy Cayman Chemical, USA [136].

***ETAP VIII – dokowanie wybranego związku do centrum kalalitycznego COX-1 i COX-2 o aktywności cyklooksygenazy***

Proces dokowania wykonano dla związku nr **N1** oraz celekoksybu. W ramach analizy zidentyfikowano rodzaje wiązań, grupy funkcyjne i reszty aminokwasowe biorące udział w oddziaływaniu badanych cząsteczek z enzymami.

Dane dotyczące energii dokowania oraz energii interakcji badanych związków z miejscem aktywnym porównano z selektywnością związków względem COX-2.

## **7. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro* (ETAP I oraz IV)**

### **7.1. Cel badania**

Określenie zdolności badanych związków do hamowania aktywności enzymatycznej obydwóch izoform cyklooksygenazy w warunkach *in vitro*, w tym:

- wyznaczenie siły i stopnia inhibicji obu izoform COX,
- wyznaczenie wskaźnika selektywności wobec COX-2.

### **7.2. Badane związki**

Informacje na temat analizowanych związków przedstawiono w ROZDZIALE 6.

### **7.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie**

Do badania aktywności potencjalnych inhibitorów COX-1 i COX-2 wykorzystano komercyjny zestaw *COX Inhibitor Screening Assay Kit* (item no. 560131) firmy Cayman Chemical Company, USA [134]. Wykaz materiałów i odczynników wchodzących w skład tego zestawu znajduje się w SUPLEMENCIE do niniejszej pracy doktorskiej.

*Pozostałe odczynniki:*

- woda ultraczysta o oporności 18.2 M $\Omega$ -cm w temp. 25 °C (MerckMillipore, Szwajcaria);
- DMSO for molecular biology  $\geq 99,9\%$  (Avantor Performance Materials, Polska).

*Sprzęt:*

- pipety manualne i automatyczne, jednokanałowe o pojemnościach: 0,1-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l i 1-10 ml (Eppendorf, Niemcy);
- pipety automatyczne, 12-kanałowe o pojemnościach: 0,5-10  $\mu$ l i 10-100  $\mu$ l (Eppendorf, Niemcy);
- końcówki do pipet o pojemności: 0,1-10  $\mu$ l, 10-300  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l, 10 ml (Bionovo, Polska);
- probówki szklane o pojemności 5 ml (Bionovo, Polska);
- probówki plastikowe o pojemności 1,5 ml (Bionovo, Polska);
- korki silikonowe do probówek (Bionovo, Polska);
- łaźnia wodna (AJL Electronic, Polska);
- wytrząsarka płytek DTS-4 (Sky Line, Łotwa);
- płuczka do płytek Asys Atlantis 2 (Biochrom, Wielka Brytania);

- czytnik płytek BioTek Elx-800 (BioTek Instruments, USA);
- komora laminarna BioBan 48 (Angelantoni Life Science, Włochy);
- lodówka 2-8°C (Samsung, Korea Płd.);
- zamrażarki -20°C, -80°C (Samsung, Korea Płd.).

*Oprogramowanie:*

- KC Junior v. 1.4.1.8 – program sterujący czytnikiem płytek BioTek Elx-800 (BioTek Instruments, USA);
- ACD/ChemSketch v. 12.01 – program do rysowania wzorów strukturalnych i wykonywania obliczeń chemicznych (Advanced Chemistry Development, Kanada) [137];
- Marvin Suite v. 6.0.2 – zestaw narzędzi do rysowania wzorów strukturalnych i wykonywania obliczeń chemicznych (ChemAxon, Węgry) [138];
- Microsoft Office – Excel 2007 – arkusz kalkulacyjny (Microsoft, USA);
- GraphPad v. 5.0 – program stosowany do sporządzenia wykresów oraz analizy statystycznej (GraphPad Prism Software, USA) [139].

## **7.4. Metodyka badania**

### **7.4.1. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA)**

#### **7.4.1.1. Zasada oznaczania**

Istotą testu cEIA jest pomiar aktywności enzymatycznej COX-1 i COX-2, poddanych interakcji z badanymi związkami chemicznymi (potencjalnymi inhibitorami), poprzez oznaczenie ilości  $\text{PGH}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$  utworzonej z kwasu arachidonowego w wyniku reakcji katalitycznej [134].

#### **7.4.1.2. Sposób oznaczania**

- Z uwagi na labilność  $\text{PGH}_2$ , po wykonaniu reakcji a przed właściwą analizą jest ona poddawana redukcji do  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pod wpływem chlorku cyny.
- Utworzona  $\text{PGF}_{2\alpha}$  rywalizuje następnie ze znacznikiem (koniugatem  $\text{PGE}_2$  z AChE) o wiązanie z króliczym antyserum specyficznym dla prostaglandyn. Antyserum wiąże się natomiast z mysim anti-króliczym przeciwciałem pokrywającym powierzchnię każdego z 96 dołków płytki.
- Ilość stosowanego antyserum jest stała i ograniczona w każdym dołku. Ilość znacznika również jest stała. Ilość  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zmienia się w zależności od aktywności (stopnia inhibicji) COX.
- W rezultacie ilość  $\text{PGF}_{2\alpha}$  związanego z antyserum jest wprost proporcjonalna do stężenia  $\text{PGF}_{2\alpha}$  uzyskanej w reakcji inhibitora z COX, natomiast ilość znacznika związanego z antyserum jest odwrotnie proporcjonalna.

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)

---

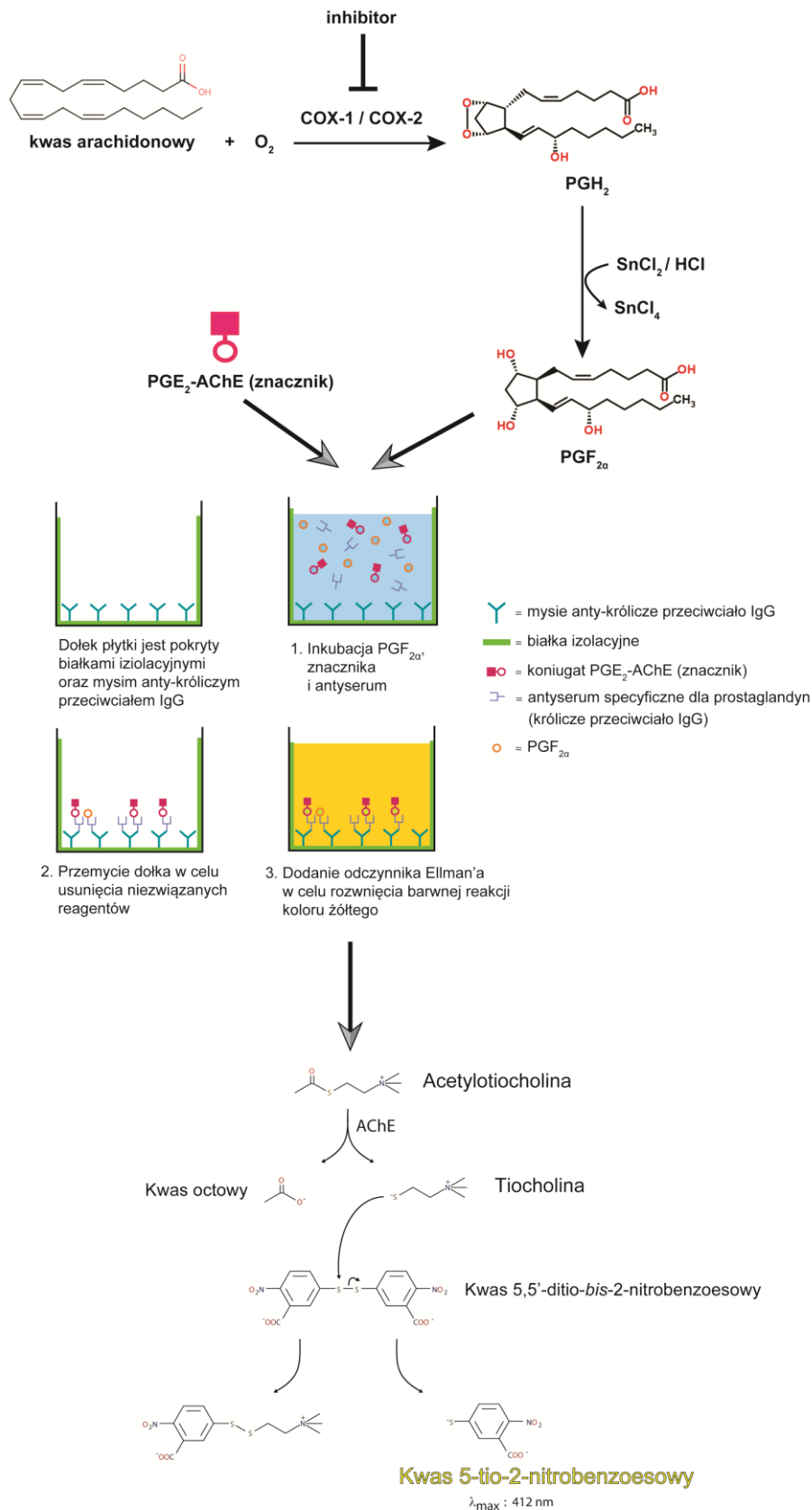
- Tak utworzony kompleks (antyserum-PGF<sub>2α</sub> i antyserum-znacznik) łączy się z mysim anty-króliczym przeciwciałem na powierzchni płytki, która następnie jest przemywana w celu usunięcia niezwiązanej PGF<sub>2α</sub> i znacznika.
- W ostatnim etapie dodawany jest odczynnik Ellman'a. W ten sposób otrzymuje się roztwór o żółtym zabarwieniu, które powstaje wskutek katalitycznej przemiany acetylotiocholiny i kwasu 5,5'-ditio-*bis*-2-nitrobenzoesowego do kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego pod wpływem AChE wchodzącej w skład znacznika.
- Intensywność barwy mierzona jest spektrofotometrycznie w zakresie długości fali 405-420 nm. Jest ona wprost proporcjonalna do ilości związanego znacznika, a odwrotnie proporcjonalna do ilości utworzonej PGF<sub>2α</sub>, a więc również aktywności COX:

$$\text{Absorbancja} \propto [\text{znacznik}] \propto 1/[\text{PGF}_{2\alpha}] \propto 1/[\text{aktywność COX}]$$

- W oparciu o uzyskane wyniki absorbancji określany jest stopień inhibicji COX przez określone stężenie badanego związku.

Ogólny schemat przeprowadzania reakcji oraz oznaczania aktywności COX zaprezentowano na RYCINIE 7.1 [134].

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)



RYCINA 7.1

Schemat oznaczania aktywności COX w obecności inhibitora za pomocą metody cEIA [134].

### 7.4.1.3. Przygotowanie związków przed wykonaniem inkubacji z COX

Sporządzono roztwory zapasowe badanych związków o stężeniach 100 mmol/l poprzez rozpuszczenie odważek w odpowiedniej objętości DMSO. Z uzyskanych roztworów przygotowano następnie rozcieńczenia do reakcji z COX. Otrzymane rozcieńczenia były 50-krotnie większe niż docelowe stężenia uzyskiwane w bezpośrednich reakcjach z COX.

#### ETAP I – badanie przesiewowe z COX-1 i COX-2

Z uzyskanych wcześniej roztworów zapasowych przygotowano rozcieńczenie 5 mmol/l dla każdego z 25 analizowanych związków, co odpowiadało stężeniu 100  $\mu$ mol/l stosowanemu bezpośrednio w przesiewowym badaniu z COX-1 i COX-2.

Dla trzech najbardziej selektywnych związków nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (TABELA 6.1) przygotowano serię rozcieńczeń roztworów zapasowych w celu wyznaczenia wartości IC<sub>50</sub>:

<b>Reakcje z COX-1:</b>		<b>Reakcje z COX-2:</b>	
Rozcieńczenie roztworu zapasowego	Docelowe stężenie w reakcji z COX-1	Rozcieńczenie roztworu zapasowego	Docelowe stężenie w reakcji z COX-2
50 mM	<b>1 mM</b>	5 mM	<b>100 <math>\mu</math>M</b>
5 mM	<b>100 <math>\mu</math>M</b>	500 $\mu$ M	<b>10 <math>\mu</math>M</b>
500 $\mu$ M	<b>10 <math>\mu</math>M</b>	50 $\mu$ M	<b>1 <math>\mu</math>M</b>
50 $\mu$ M	<b>1 <math>\mu</math>M</b>	5 $\mu$ M	<b>100 nM</b>
5 $\mu$ M	<b>100 nM</b>	500 nM	<b>10 nM</b>
500 nM	<b>10 nM</b>	50 nM	<b>1 nM</b>
50 nM	<b>1 nM</b>	5 nM	<b>100 pM</b>
5 nM	<b>100 pM</b>	500 pM	<b>10 pM</b>

#### ETAP IV – badanie nowych, zsyntezowanych związków – wytypowanych w oparciu o wyniki analizy 2D QSAR

Dla trzech nowych związków **N1**, **N2** i **N6** (TABELA 6.3) oraz celekoksylu zakres rozcieńczeń i docelowych stężeń stosowanych w reakcjach z COX-1 i COX-2 był identyczny jak dla związków nr **Z5**, **Z9** i **Z11**.

### 7.4.1.4. Procedura inkubacji związków z COX oraz oznaczenie stężenia prostaglandyn

Testowane związki poddano badaniu *in vitro* z COX-1 oraz COX-2 zgodnie z instrukcją producenta zestawu *COX Inhibitor Screening Assay Kit* [134].

Poszczególne etapy analizy były następujące:

1. Przygotowanie materiałów i odczynników do wykonania inkubacji.

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)

---

2. Inkubacja badanych związków z COX-1 oraz COX-2.
3. Przygotowanie wzorców, materiałów i odczynników do oznaczania zawartości prostaglandyn.
4. Wykonanie rozcieńczeń roztworów prostaglandyn, które otrzymano w wyniku inkubacji.
5. Przygotowanie 96-dołkowej płytki do inkubacji, nanoszenie odczynników do odpowiednich dołków.
6. Inkubacja płytki oraz pomiar absorbancji.
7. Obliczenia – wyznaczenie stopnia zahamowania aktywności COX-1 i COX-2, w tym wartości  $IC_{50}$  poszczególnych związków wobec obydwóch izoform.

Szczegółowy opis poszczególnych etapów badania przedstawiono w SUPLEMENCIE.

## 8. Analiza 2D QSAR, naiwny model Bayesa oraz dokowanie do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2 (ETAP II, V oraz VIII)

### 8.1. Cel badania

#### Analiza 2D QSAR:

1. Stworzenie komputerowego modelu prognozowania aktywności biologicznej inhibitorów COX na podstawie zależności struktura-aktywność biologiczna wyznaczonej dla badanych i literaturowych pochodnych *trans*-stilbenu.  
Wspomnianą zależność zdefiniować należy *in silico* wykorzystując wartości  $IC_{50}$  poszczególnych związków wobec COX-1 i COX-2 oraz deskryptory molekularne.
2. Ustalenie struktury nowych pochodnych *trans*-stilbenu w oparciu o uzyskaną zależność struktura-aktywność oraz teoretyczne oszacowanie ich zdolności do hamowania aktywności COX-1 i COX-2.

#### Naiwny klasyfikator Bayesa:

1. Stworzenie komputerowego modelu prognozowania aktywności biologicznej inhibitorów COX w oparciu o wartości  $IC_{50}$  poszczególnych związków wobec COX-1 i COX-2 oraz deskryptory i fingerprinty molekularne.
2. Wskazanie, jakie fragmenty budowy, w tym podstawniki i ich położenie w pierścieniach aromatycznych, potencjalnie zwiększają lub zmniejszają aktywność ocenianych związków.
3. Porównanie rzeczywistej i prognozowanej aktywności wybranych cząsteczek w oparciu o tzw. macierz klasyfikacji (związek aktywny lub nieaktywny).
4. Porównanie uzyskanych wyników dla wybranych związków z analizą 2D QSAR.

#### Dokowanie:

1. Przeprowadzenie komputerowego procesu dokowania pochodnej *trans*-stilbenu wykazującej najsilniejszą i najbardziej selektywną zdolność do hamowania aktywności COX-2 oraz związku referencyjnego (celekoksyb) do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2.  
Poznanie sposobu oddziaływania obydwóch inhibitorów z aminokwasami tworzącymi miejsce aktywne.

### 8.2. Badane związki

Szczegółowe dane dotyczące budowy i właściwości biologicznych testowanych i referencyjnych związków przedstawiono na kolejnych stronach w TABELACH 8.1 oraz 8.2.



#### Analiza 2D QSAR:

Do analizy zakwalifikowano związki nr **Z5**, **Z9** i **Z11** oraz **37** cząsteczek wybranych w oparciu o przegląd aktualnej literatury naukowej.

W celu stworzenia odpowiedniego modelu 2D QSAR badane związki dzielone były na 2 zbiory: zestaw treningowy oraz zestaw testowy. Pierwsza grupa związków służyła do stworzenia danego modelu obliczeniowego i jego walidacji wewnętrznej. Drugi zestaw związków był natomiast niezbędny do wykonania walidacji zewnętrznej danego modelu.

Związki znacznie odbiegające wynikami obliczeń od pozostałych (tzw. *outliers*) nie były brane pod uwagę przy konstrukcji modeli.

Jako związek porównawczy wykorzystano celekoksyb.

#### Naiwny klasyfikator Bayesa:

Do badania zakwalifikowano związki nr **Z5**, **Z9**, **Z11**, **N1**, **N2**, **N6** oraz **29** cząsteczek wybranych w oparciu o przegląd aktualnej literatury naukowej.

Z obliczeń wykluczono osiem związków (nr 10a – 10h) z uwagi na odmienną strukturę związaną z obecnością dodatkowego pierścienia aromatycznego przy mostku etylenowym (winylowym).

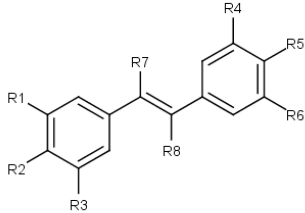
#### Dokowanie:

Symulację wiązania pochodnych *trans*-stilbenu z miejscem aktywnym COX-1 i COX-2 (centrum katalitycznym o aktywności cyklooksygenazy) przeprowadzono dla związku nr **N1**, który najsilniej i najbardziej selektywnie hamował aktywność COX-2.

Jako związek porównawczy wykorzystano również celekoksyb.

8. ANALIZA 2D QSAR, NAIWNY MODEL BAYESA  
ORAZ DOKOWANIE DO MIEJSCA AKTYWNEGO COX-1 I COX-2 (ETAP II, V ORAZ VIII)

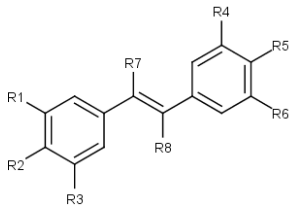
TABELA 8.1 Struktura oraz aktywność biologiczna badanych i literaturowych pochodnych *trans*-stilbenu.

Budowa chemiczna									Aktywność biologiczna wobec COX			Uwagi
									COX-1 IC <sub>50</sub> <sup>#</sup> [μmol/l]	COX-2 IC <sub>50</sub> <sup>#</sup> [μmol/l]	wskaźnik selektywności wobec COX-2 (COX-1IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub> )	
związek nr	R <sub>1</sub> (=3)	R <sub>2</sub> (=4)	R <sub>3</sub> (=5)	R <sub>4</sub> (=3')	R <sub>5</sub> (=4')	R <sub>6</sub> (=5')	R <sub>7</sub> (=α)	R <sub>8</sub> (=β)				
<b>Z5</b>	-H	-Cl	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	40,98	7,52	5,45	badane związki
<b>Z9</b>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	-H	-H	-H	84,98	4,02	21,15	
<b>Z11</b>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-OCH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	30,83	7,46	4,13	
<b>N1</b>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OH	-OH	-OH	-H	-H	17,498	0,279	62,81	
<b>N2</b>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	2,667	2,168	1,23	
<b>N6</b>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	0,659	4,688	0,14	
<b>M1</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	1,228	1,667	0,74	Murias i wsp. [32]
<b>M2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	9,099	7,797	1,17	
<b>M3</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	27,783	1,575	17,64	
<b>M4</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	2,834	0,796	3,56	
<b>M5</b>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-H	7,247	0,514	14,11	
<b>M6</b>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	11,348	0,355	31,97	
<b>M7</b>	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	0,535	0,996	0,54	
<b>M8</b>	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	-H	2,072	0,04537	45,67	
<b>M9</b>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	0,00998	0,00171	5,83	
<b>M10</b>	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-H	-H	-H	4,713	0,0113	417,08	
<b>M11</b>	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH	-H	-H	0,01027	0,00138	7,44	

8. ANALIZA 2D QSAR, NAIWNY MODEL BAYESA  
ORAZ DOKOWANIE DO MIEJSCA AKTYWNEGO COX-1 I COX-2 (ETAP II, V ORAZ VIII)

Budowa chemiczna									Aktywność biologiczna wobec COX			Uwagi
związek nr	R <sub>1</sub> (=3)	R <sub>2</sub> (=4)	R <sub>3</sub> (=5)	R <sub>4</sub> (=3')	R <sub>5</sub> (=4')	R <sub>6</sub> (=5')	R <sub>7</sub> (=α)	R <sub>8</sub> (=β)	COX-1 IC <sub>50</sub> <sup>#</sup> [μmol/l]	COX-2 IC <sub>50</sub> <sup>#</sup> [μmol/l]	wskaźnik selektywności wobec COX-2  (COX-1IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub> )	
<b>M12</b>	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-H	0,748	0,00104	719,23	Murias i wsp. [32]
<b>DL1</b>	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-H	-H	4,92	2,21	2,23	
<b>DL2</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-H	-H	4,84	1,19	4,07	
<b>1M2</b>	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	1,9	1,57	1,21	Kang i wsp. [34]
<b>1M13</b>	-H	-CF <sub>3</sub>	-H	-H	-OH	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	36,3	0,47	77,23	
<b>2E16</b>	-H	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-OH	-H	-OH	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	7,4	2,2	3,36	
<b>2H5</b>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	25,8	19,6	1,32	
<b>2H7</b>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H	0,29	21,3	0,01	
<b>2H14</b>	-OH	-H	-OH	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H	2,2	31,6	0,07	
<b>2M1</b>	-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	1,9	1,78	1,07	
<b>2M7</b>	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH	-H	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	10,6	12,8	0,83	
<b>2M16</b>	-H	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-OH	-H	-OH	-H	-CH <sub>3</sub>	10,7	1,74	6,15	
<b>5M2</b>	-OH	-H	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	12,4	16,0	0,78	
<b>6H14</b>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OCH <sub>3</sub>	-H	-NO <sub>2</sub>	-H	-H	-H	10,0	5,94	1,68	
<b>10E2</b>	-OH	-H	-OH	-H	-H	-F	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,5	17,7	0,20	
<b>10M2</b>	-OH	-H	-OH	-H	-H	-F	-H	-CH <sub>3</sub>	4,9	2,54	1,93	
<b>15E2</b>	-OH	-H	-OH	-CH=CH-CH=CH-		-H	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0,17	3,3	0,05	
<b>16E2</b>	-OH	-H	-OH	-H	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	30,5	14,8	2,06	

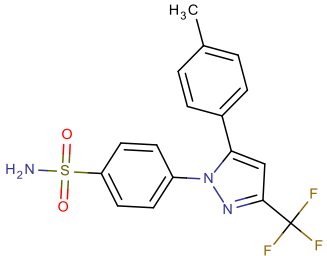
8. ANALIZA 2D QSAR, NAIWNY MODEL BAYESA  
ORAZ DOKOWANIE DO MIEJSCA AKTYWNEGO COX-1 I COX-2 (ETAP II, V ORAZ VIII)

Budowa chemiczna									Aktywność biologiczna wobec COX			Uwagi
									COX-1 IC <sub>50</sub> <sup>#</sup> [μmol/l]	COX-2 IC <sub>50</sub> <sup>#</sup> [μmol/l]	wskaznik selektywności wobec COX-2  (COX-1IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub> )	
związek nr	R <sub>1</sub> (=3)	R <sub>2</sub> (=4)	R <sub>3</sub> (=5)	R <sub>4</sub> (=3')	R <sub>5</sub> (=4')	R <sub>6</sub> (=5')	R <sub>7</sub> (=α)	R <sub>8</sub> (=β)				
<b>10a</b>	-H	-H	-H	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	0,14	0,31	0,45	
<b>10b</b>	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>100*	0,12	>833	
<b>10c</b>	-H	-F	-H	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>100*	0,0316	>3164	
<b>10d</b>	-F	-F	-H	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>100*	0,97	>103	
<b>10e</b>	-H	-Cl	-H	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	>100*	0,1138	>878	
<b>10f</b>	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-CH <sub>3</sub>	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - <i>p</i> -CH <sub>3</sub>	>100*	31,6	>3	
<b>10g</b>	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-F	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - <i>p</i> -F	>100*	32,0	>3	
<b>10h</b>	-H	-SO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-H	-H	-Cl	-H	-H	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - <i>p</i> -Cl	>100*	2,0	>50	

Uddin  
i wsp.  
[35]

8. ANALIZA 2D QSAR, NAIWNY MODEL BAYESA  
ORAZ DOKOWANIE DO MIEJSCA AKTYWNEGO COX-1 I COX-2 (ETAP II, V ORAZ VIII)

TABELA 8.2 Struktura oraz aktywność biologiczna celekoksybu.

	COX-1 IC <sub>50</sub> # [μmol/l]	COX-2 IC <sub>50</sub> # [μmol/l]	wskaźnik selektywności wobec COX-2 (COX-1 IC <sub>50</sub> / COX-2 IC <sub>50</sub> )	Uwagi
	19,026	0,03482	546,41	Murias i wsp. [32]

# W celu wyznaczenia zależności struktura – aktywność wartości podane w kolumnach zlogarytmowano wg wzoru  $pIC_{50} = -\log IC_{50}$ .

Transformacja logarymiczna parametru IC<sub>50</sub> minimalizuje potencjalne błędy, jakie mogą powstać przy wyznaczaniu zależności struktura – aktywność [140].

\* W przypadku związków 10b – 10h do obliczeń 2D QSAR zastosowano wartości graniczne parametrów COX-1 IC<sub>50</sub>, np. dla związku 10b przyjęto odpowiednio COX-1 IC<sub>50</sub> = 100 μmol/l. Takie założenie jest konieczne, żeby móc wyznaczyć korelację pomiędzy budową i aktywnością testowanych związków [35].

### 8.3. 2D QSAR

#### 8.3.1. Zasada oznaczania

Zasada oznaczania i wykorzystywane metody zostały opisane w ROZDZIALE 3.5.

Przy wyznaczaniu zależności QSAR stosowane są następujące metody matematyczno-statystyczne:

- prosta regresja liniowa (SLR);
- wielokrotna regresja liniowa (MLR);
- analiza czynników głównych (PCA).

#### 8.3.2. Deskryptory molekularne

Zastosowane deskryptory molekularne opisane zostały w ROZDZIALE 3.4.2 i są to:

- MW (masa cząsteczkowa);
- HBD (ilość donorów wiązań wodorowych);
- HBA (ilość akceptorów wiązań wodorowych);
- ClogP (współczynnik podziału n-oktanol / woda);
- logD (współczynnik dystrybucji przy pH 7,0);
- MR (refraktywność molowa);
- $\mu$  (elektryczny moment dipolowy);
- RBN (liczba wiązań pojedynczych, rotowalnych);
- $\alpha$  (polaryzowalność cząsteczkowa);
- APOL (suma polaryzowalności atomów);
- TPSA (topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki);
- W (wskaźnik Wiener'a);
- VdWSA (powierzchnia Van der Waals'a).

W oparciu o wartości MW, HBD / HBA i ClogP należy ustalić, czy związki nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (wytypowane w badaniu przesiewowym, ETAP I) oraz **N1**, **N2** i **N6** (wytypowane w analizie 2D QSAR, ETAP II) spełniają regułę Lipińskiego [84].

#### 8.3.3. Oprogramowanie komputerowe

Do wyznaczenia wartości deskryptorów wykorzystano specjalistyczne programy komputerowe, takie jak:

- ACD/ChemSketch v. 12.01 (Advanced Chemistry Development, Kanada) – do obliczenia ClogP [137];

- Marvin Suite v. 6.0.2 (ChemAxon, Węgry) – do obliczenia MW, HBD/HBA, logD, MR,  $\mu$ ,  $\alpha$ , VdWSA [138];
- PADEL-Descriptor v. 2.21 (Pharmaceutical Data Exploration Laboratory, Wydział Farmacji, Narodowy Uniwersytet w Singapurze) – do obliczenia RBN, APOL, TPSA, W [141; 142].

W celu przeprowadzenia obliczeń metodami SLR, MLR i PCA zastosowano programy komputerowe, takie jak:

- Microsoft Office – Excel 2013;
- PQStat, wersja 1.6 [143].

## 8.4. Naiwny model Bayesa

### 8.4.1. Zasada oznaczania

Przy wyznaczaniu zależności struktura – aktywność zastosowano tzw. **naiwny model Bayesa**, który jest probabilistyczną metodą opartą na twierdzeniu Bayesa [105; 107–112]. Szczegółowy opis tej metody znajduje się w ROZDZIALE 3.6.1.

Model ten pozwala przedstawić aktywność biologiczną badanych związków tylko w postaci zapisu binarnego (związek aktywny – przypisana wartość logiczna „1”, nieaktywny – przypisana wartość logiczna „0”). W celu rozróżnienia związków aktywnych od nieaktywnych należy wyznaczyć optymalną wartość graniczną (*cut-off value*), która dzieli badane związki na 2 podgrupy oraz wpływa istotnie na parametry walidacyjne danego modelu.

### 8.4.2. Wartość graniczna

W modelach oceniających aktywność pochodnych *trans*-stilbenu względem COX-1 oraz COX-2 jako optymalną wartość graniczną przyjęto  $IC_{50} = 5 \mu\text{mol/l}$ , poniżej której związki oznaczono jako aktywne (wartość „1”), a powyżej jako nieaktywne (wartość „0”).

### 8.4.3. Deskryptory i fingerprinty molekularne

W celu wyznaczenia przewidywanej aktywności biologicznej wykorzystano następujące deskryptory i fingerprinty molekularne:

- AlogP (współczynnik podziału n-oktanol/woda obliczony metodą opracowaną przez Ghose i Crippen) [144];
- MW;
- NAR (liczba pierścieni aromatycznych);
- NR (liczba pierścieni);
- HBD;

- HBA;
- RBN;
- TPSA;
- ECFP\_6 (fingerprint molekularny składający się z 2048 deskryptorów)  
(ang. *extended-connectivity fingerprint of depth 6*).

#### 8.4.4. Oprogramowanie komputerowe i analiza danych

Do obliczenia wartości w/w deskryptorów i fingerprintów molekularnych oraz stworzenia naiwnego modelu Bayesa wykorzystano specjalistyczny program komputerowy:

- Discovery Studio v. 4.0 (BIOVIA dawniej: Accelrys, USA) – stosując dedykowany protokół „*Create bayesian model*” w sekcji „*QSAR and ADMET*” [145].

Na podstawie zbudowanego modelu wyznaczyć:

- fragmenty budowy, w tym podstawniki oraz ich położenie w pierścieniach aromatycznych, które najczęściej występują w związkach wytypowanych przez model za aktywne – czyli struktury potencjalnie zwiększające aktywność biologiczną inhibitorów COX (*good fingerprints*);
- fragmenty budowy, w tym podstawniki oraz ich położenie w pierścieniach aromatycznych, które najrzadziej lub w ogóle nie są obecne w związkach uznanych przez model za aktywne – czyli struktury potencjalnie zmniejszające aktywność biologiczną inhibitorów COX (*bad fingerprints*);
- macierz klasyfikacji z ilością związków uznanych jako TP, FP, TN i FN;
- krzywą ROC wraz z parametrami.

Wyniki uzyskane dla poszczególnych modeli porównać z analizą 2D QSAR.

### 8.5. Dokowanie ligandu do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2

#### 8.5.1. Zasada oznaczania

Symulacja wiązania związku nr **N1** i **celekoksybu** z miejscem aktywnym COX-1 i COX-2 (centrum katalitycznym o aktywności cyklooksygenazy) przeprowadzona została za pomocą dokowania „semi-giętkiego” (z ang. *semi-flexible docking*). Jest to metoda, w której cząsteczka receptora (np. enzymu) przyjmuje sztywną strukturę, podczas gdy cząsteczka ligandu podlega translacjom, rotacjom oraz zmianom konformacyjnym w celu uzyskania kompleksu o najniższej energii swobodnej [114; 116; 146].



Do utworzenia struktur przestrzennych ligandu wykorzystano dynamikę molekularną (z ang. *molecular dynamics*, MD), która jest ogólną techniką symulacji oddziaływań i ruchu atomów w cząsteczce. W metodzie tej stosuje się wysokie temperatury (do 1000 K), które umożliwiają osiągnięcie dowolnych zmian konformacyjnych cząsteczki w wyniku pokonania barier energetycznych. Do wyznaczenia potencjału (energii potencjalnej) tego rodzaju oddziaływań w ligandzie wykorzystuje się pole siłowe mechaniki molekularnej (np. CHARMM), za pomocą którego oblicza się oddziaływania wiążące (człony energii potencjalnej związanej ze zmianą długości wiązań chemicznych, zmianą kątów, zmianą kątów torsyjnych) oraz oddziaływania niewiążące (potencjał van der Waals'a i potencjał elektrostatyczny). Z kolei ruch każdego atomu jest opisywany klasycznym równaniem ruchu Newtona w postaci  $F_i = m_i \cdot a_i$ , gdzie  $i$  oznacza  $i$ -ty atom w cząsteczce. Spośród losowo uzyskanych konformacji do oddziaływań z receptorem wybiera się struktury optymalne, czyli te o najniższej energii (najbardziej stabilne) [114; 116; 146–148].

Dynamika molekularna stosowana jest następnie do symulacji oddziaływań ligandu z sztywnym receptorem. Wytypowane wcześniej struktury ligandu dokowane są do miejsca aktywnego receptora, w którym podlegają dodatkowym zmianom przestrzennym (sztywne obracanie cząsteczki) i „zestaleniu” („hartowanie”, z ang. *annealing*) w celu uzyskania docelowej budowy. Dla tak powstałych kompleksów definiowany jest sposób wiązania pomiędzy receptorem i ligandem na poziomie atomowym oraz obliczana jest energia swobodna. Za najlepsze połączenie uznaje się kompleks o najniższej energii swobodnej czyli taki, w którym oddziaływania i wiązania są najtrwalsze, a ligand przyjmuje najbardziej prawdopodobną pozycję w miejscu aktywnym [114; 116; 146–148].

Tego rodzaju metoda stosowana jest w wielu programach komputerowych np. CHARMM, GOLD, AutoDock, Discovery Studio [114; 116; 145; 146].

Komputerowo wygenerowane pochodne *cis*-stilbenu nie były brane pod uwagę przy wyznaczaniu najtrwalszych kompleksów, ponieważ celem niniejszej pracy była ocena aktywności biologicznej związków stilbenu o izomerii *trans*.

### 8.5.2. Struktury krystaliczne COX

W procesie dokowania pochodnych *trans*-stilbenu wykorzystano trójwymiarowe struktury COX-1 i COX-2, które pobrano z bazy PDB (the Protein Data Bank) [149]:

**COX-1** (PDB ID):  
**1EQH** [150; 151]

**COX-2** (PDB ID):  
**4COX** [152; 153]

### 8.5.3. Oprogramowanie komputerowe

W celu przeprowadzenia komputerowej symulacji dokowania zastosowano specjalistyczny program komputerowy:

- Discovery Studio v. 4.0 (BIOVIA dawniej: Accelrys, USA) – stosując dedykowany protokół „CDOCKER” w sekcji „Receptor-Ligand Interaction” [145].

CDOCKER to zwalidowany algorytm wykorzystujący do obliczeń dynamikę molekularną opartą na polu siłowym CHARMM.

Wyniki symulacji dokowania przedstawiane są w postaci:

- graficznej – prezentowany jest sposób wiązania poszczególnych konformacji ligandu z miejscem aktywnym receptora;
- numerycznej – energia dokowania każdej struktury ligandu obliczana jest w kcal/mol i wyrażana w postaci parametrów „-CDOCKER INTERACTION ENERGY” oraz „-CDOCKER ENERGY”.

-CDOCKER INTERACTION ENERGY to suma energii oddziaływań niewiązących pomiędzy ligandem a receptorem (oddziaływania Van der Waals’a, elektrostatyczne, wodorowe, odpychanie steryczne),

-CDOCKER ENERGY to suma energii oddziaływań niewiązących ligand-receptor oraz zmiany wewnętrznej energii ligandu (związanej z jego naprężeniem sterycznym, indukowanym podczas wiązania przez receptor)

- ✓ dodatnie wartości parametrów świadczą o korzystnym oddziaływaniu danej konformacji ligandu z receptorem (wzajemne przyciąganie, wydzielanie energii podczas wiązania);
- ✓ ujemne wartości oznaczają, że to oddziaływanie jest niekorzystne (słaba interakcja, odpychanie, konieczność dostarczenia energii w celu utworzenia wiązań);
- ✓ im wyższe wartości parametrów, tym wiązanie się danej konformacji ligandu z miejscem aktywnym receptora jest łatwiejsze i silniejsze (korzystniejsze energetycznie).

Na podstawie przeprowadzonej procedury dokowania należy:

- obliczyć wartości parametrów „-CDOCKER INTERACTION ENERGY” oraz „-CDOCKER ENERGY” dla najlepszej struktury przestrzennej cząsteczki **N1**;
- przedstawić w sposób graficzny oddziaływanie preferowanej konformacji związku badanego **N1** z miejscem aktywnym COX-1 oraz COX-2;
- porównać uzyskane rezultaty z wynikami dokowania celekoksylu;
- dla obydwóch związków porównać parametry energetyczne z selektywnością względem COX-2 wyznaczoną w badaniu *in vitro*.

## 9. Synteza pochodnych *trans*-stilbenu (ETAP III)

### 9.1. Cel syntezy

Otrzymanie sześciu pochodnych *trans*-stilbenu (ETAP III) w oparciu o wyniki badania przesiewowego (ETAP I) oraz na podstawie analiz 2D QSAR (ETAP II).

Trzy pochodne wytypowane w ETAPIE I (związki nr **Z5**, **Z9** i **Z11**) resyntezyowano zgodnie z danymi literaturowymi [130–133].

Z kolei związki **N1**, **N2** i **N6**, wytypowane w ETAPIE II, syntezowano w oparciu o reakcję typu kondensacji aldolowej pomiędzy pochodną benzaldehydu a pochodną kwasu fenylloctowego, z pominięciem produktów pośrednich [154].

Tego typu reakcja przebiega w czterech zasadniczych etapach:

- najpierw dochodzi do dekarboksylacji pochodnej kwasu fenylloctowego do pochodnej toluenu w wyniku ogrzewania;
- w kolejnym etapie powstaje karboanion pochodnej toluenu w wyniku usunięcia protonu ( $H^+$ ) z aktywnej grupy metylowej przy użyciu zasady (np. piperydyny);
- następnie powstaje jon karboniowy pochodnej benzaldehydu w wyniku migracji  $\Pi$ -elektronów z atomu węgla do atomu tlenu w grupie aldehydowej;
- w ostatnim etapie karboanion łączy się z jonem karboniowym, z jednoczesnym usunięciem grupy -OH i wytworzeniem wiązania podwójnego pomiędzy atomami węgla.

Uzyskane związki zostaną poddane następującym badaniom:

- w ETAPIE IV – badanie *in vitro* w kierunku zdolności, siły i selektywności do hamowania aktywności COX-1 i COX-2 (szczegóły w ROZDZIALE 7),
- w ETAPIE V – badanie *in silico* w celu określenia wpływu grup funkcyjnych, w tym podstawników pierścieni aromatycznych, na aktywność biologiczną potencjalnych inhibitorów COX (szczegóły w ROZDZIALE 8),
- w ETAPIE VI – badanie *in vitro* do oceny siły cytotoksycznego działania wobec linii komórkowej MCF-7 (szczegóły w ROZDZIALE 10),
- w ETAPIE VII – badanie *in vitro* pod kątem zdolności i siły do hamowania aktywności COX w komórkach MCF-7, wyrażonej poprzez zmniejszenie stężenia  $PGE_2$  w supernatancie komórkowym (szczegóły w ROZDZIALE 11),
- w ETAPIE VIII – badanie *in silico* w kierunku wyznaczenia siły i prawdopodobnego sposobu wiązania się badanych związków z miejscem aktywnym COX-1 i COX-2 (szczegóły w ROZDZIALE 8).

## 9.2. Odczynniki i sprzęt

### *Odczynniki:*

- kwas p-chlorofenylooctowy ( $\geq 99,0\%$ , reagent grade, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- kwas p-nitrofenylooctowy ( $\geq 99,0\%$ , reagent grade, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- p-hydroksybenzaldehyd ( $\geq 98,0\%$ , reagent grade, Alfa Aesar, Niemcy);
- chlorooctan metylu ( $> 99,0\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- jodek etylu ( $\geq 99,0\%$ , reagent grade with copper as stabilizer, Sigma Aldrich, Niemcy);
- 3,4,5-trihydroksybenzaldehyd, hydrat ( $\geq 97,0\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- aldehyd weratrowy (3,4-dimetoksybenzaldehyd) ( $\geq 99,0\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- 3,4,5-trimetoksybenzaldehyd ( $\geq 98,0\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- piperydyna ( $\geq 99,5\%$ , reagent grade, Sigma-Aldrich, Niemcy);
- metanol ( $\geq 99,8\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- etanol bezwodny ( $\geq 99,8\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- o-ksylen ( $\geq 99,0\%$ , reagent grade, AlfaAesar, Niemcy);
- NaOH, 1 mol/l (cz.d.a., POCH, Polska);
- HCl, 1 mol/l (cz.d.a., POCH, Polska);
- HCl, 0,1 mol/l (cz.d.a., POCH, Polska);
- sól metaliczny ( $\geq 99,95\%$ , metalbasis, AlfaAesar, Niemcy);
- azot (99,99%, Linde Gaz, Polska).

### *Produkty pośrednie:*

- 4-chloro-4'-hydroksy-*trans*-stilben
- 4-nitro-4'-hydroksy-*trans*-stilben

### *Sprzęt:*

- waga analityczna AS310/X (Radwag, Polska)
- chłodnica zwrotna spiralna, kulowa (Chemland, Polska);
- łaźnia olejowa O415E (Laboplay, Polska);
- wyparka obrotowa Laborota 4000 (Heidolph, Niemcy);
- termometr rtęciowy o zakresie temperatury  $-10 / +250^{\circ}\text{C}$  (Roth, Niemcy);
- kolby kuliste, okrągłodenne o pojemności 25 ml, 100 ml, 250 ml i 500 ml (Chemland, Polska);
- lejki szklane, porcelanowe, Büchnera (Chemland, Polska);
- łyżeczka, kroplomierz, krążki bibułowe, sączki.

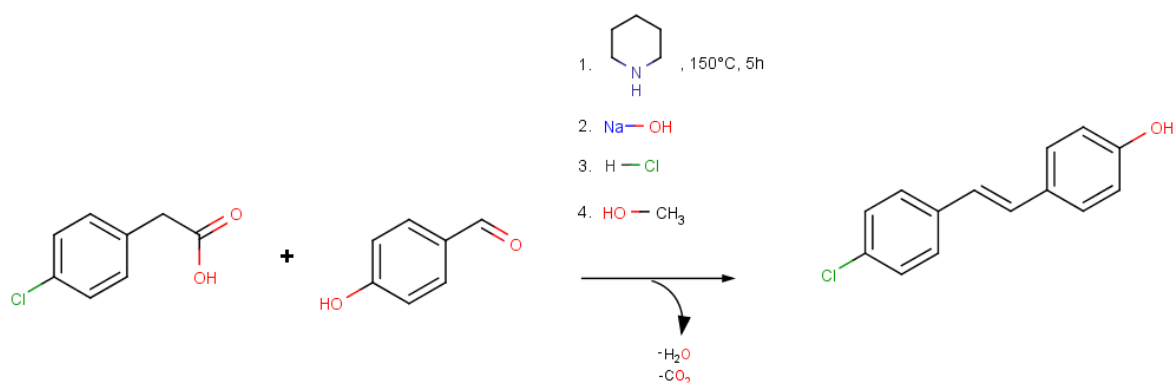
### 9.3. Opis syntezy

#### 9.3.1. Produkt pośredni dla związku nr Z5: 4-chloro-4'-hydrokso-*trans*-stilben

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.1.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 0,3 mola kwasu p-chlorofenylooctowego, 0,3 mola p-hydroksybenzaldehydu i 30 ml piperydyny.
2. Uzyskaną mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 150°C przez 5 godzin.
3. Powstały olej wmywano zimnym 1 mol/l roztworem NaOH. Otrzymany roztwór zobojętniono za pomocą 1 mol/l HCl wobec papierka wskaźnikowego.
4. Wytrącony osad odsączono i krystalizowano z metanolu.



RYCINA 9.1

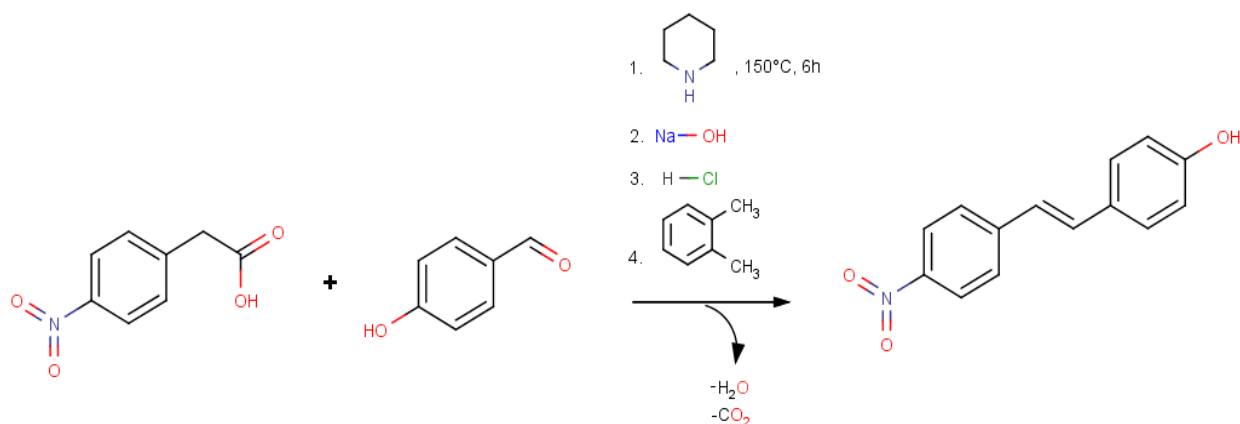
Schemat syntezy 4-chloro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu.

#### 9.3.2. Produkt pośredni dla związków nr Z9 i Z11: 4-nitro-4'-hydrokso-*trans*-stilben

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.2.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 250 ml umieszczono 0,08 mola (14,5 g) kwasu p-nitrofenylooctowego; 0,08 mola (9,8 g) p-hydroksybenzaldehydu oraz 4 ml piperydyny.
2. Uzyskaną mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną na łaźni olejowej w temperaturze 150°C przez 6 godzin.
3. Po tym czasie powstałą stopioną masę rozpuszczono w 10% wodnym roztworze NaOH (ok. 50 mL).
4. Otrzymany roztwór zobojętniono za pomocą 1 mol/l HCl wobec papierka wskaźnikowego.
5. Wytrącony osad odsączono i krystalizowano z o-ksylenu. Otrzymano jasnożółte kryształy.



RYCINA 9.2

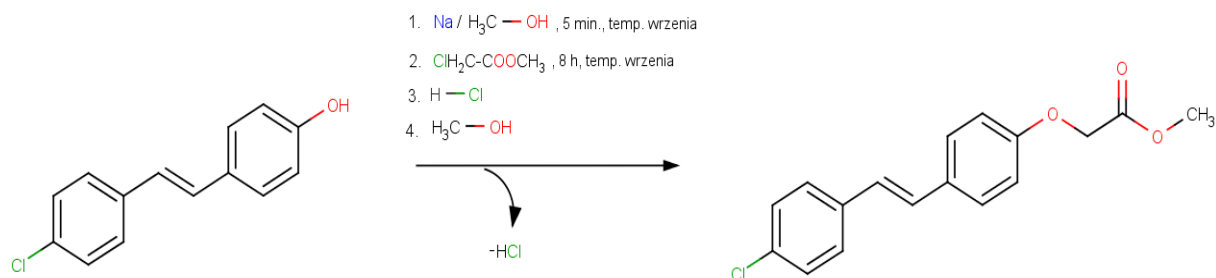
Schemat syntezy 4-nitro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu.

### 9.3.3. Związek nr Z5: 4-chloro-4'-karboksymetyloktoksy-*trans*-stilben

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.3.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 500 ml umieszczono 0,05 mola (11,53 g) 4-chloro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu i dodano 250 ml metanolu w celu rozpuszczenia.
2. Do roztworu dodano w kawałkach 0,05 mola (1,15 g) sodu metalicznego i po jego rozтворzeniu całość ogrzewano do wrzenia przez ok. 5 minut pod chłodnicą zwrotną.
3. Następnie do wrzącego roztworu wkroplono 0,06 mola (5,29 mL) chlorooctanu metylu. Całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 8 godzin.
4. W kolejnym etapie odparowano połowę początkowej objętości rozpuszczalnika na wyparce obrotowej, a następnie zobojętniono mieszaninę reakcyjną za pomocą 0,1 mol/l roztworu HCl i ochłodzono do temperatury pokojowej.
5. Wytrącony jasnożółty osad odsączono, a przesącz zateżono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję produktu.
6. Połączone frakcje osadu odsączono i krystalizowano z metanolu, otrzymując jasnożółte kryształy.



RYCINA 9.3

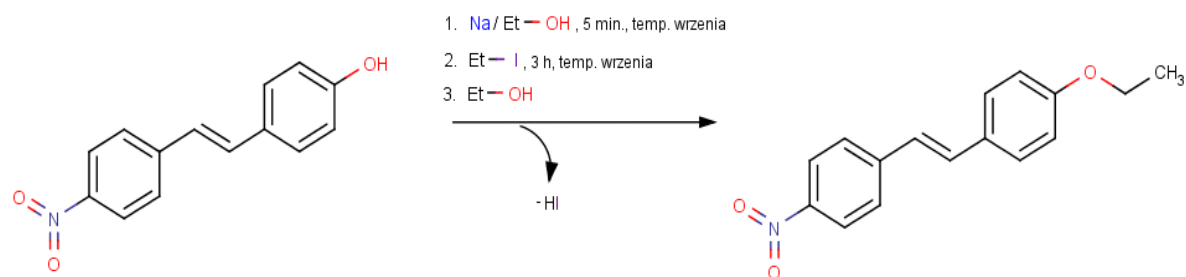
Schemat syntezy 4-chloro-4'-karboksymetyloktoksy-*trans*-stilbenu.

**9.3.4. Związek nr Z9: 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilben**

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.4.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 100 ml umieszczono 0,01 mola (2,41 g) 4-nitro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu w 60 ml bezwodnego etanolu w celu rozpuszczenia.
2. Do roztworu dodano w kawałkach 0,015 mola (0,345 g) sodu metalicznego i po jego roztworzeniu całość ogrzewano do wrzenia przez ok. 5 minut pod chłodnicą zwrotną.
3. Następnie do wrzącego roztworu wdroplono 0,02 mola (1,60 mL) jodku etylu. Całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny, a następnie ochłodzono do temperatury pokojowej.
4. Wytrącony żółty osad odsączono, a przesącz zatężono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję produktu.
5. Połączone frakcje osadu odsączono i krystalizowano z bezwodnego etanolu, otrzymując żółte kryształy.



RYCINA 9.4

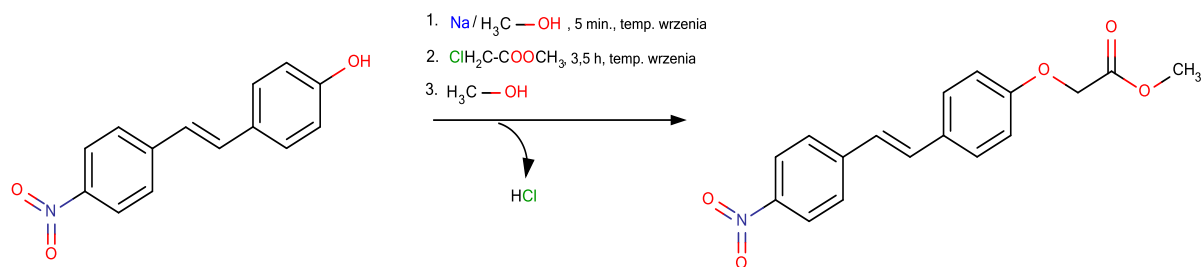
Schemat syntezy 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilbenu.

**9.3.5. Związek nr Z11: 4-nitro-4'-karboksymetyloetoksy-*trans*-stilben**

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.5.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 500 ml umieszczono 0,03 mola (7,23 g) 4-nitro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu i dodano 200 ml metanolu w celu rozpuszczenia.
2. Do roztworu dodano w kawałkach 0,045 mola (1,035 g) sodu metalicznego i po jego roztworzeniu całość ogrzewano do wrzenia przez ok. 5 minut pod chłodnicą zwrotną.
3. Następnie do wrzącego roztworu wdroplono 0,06 mola (5,29 mL) chlorooctanu metylu. Całość ogrzewano do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 3,5 godziny, a następnie ochłodzono do temperatury pokojowej.
4. Wytrącony żółty osad odsączono, a przesącz zatężono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję produktu.
5. Połączone frakcje osadu odsączono i krystalizowano z metanolu, otrzymując żółte kryształy.



RYCINA 9.5

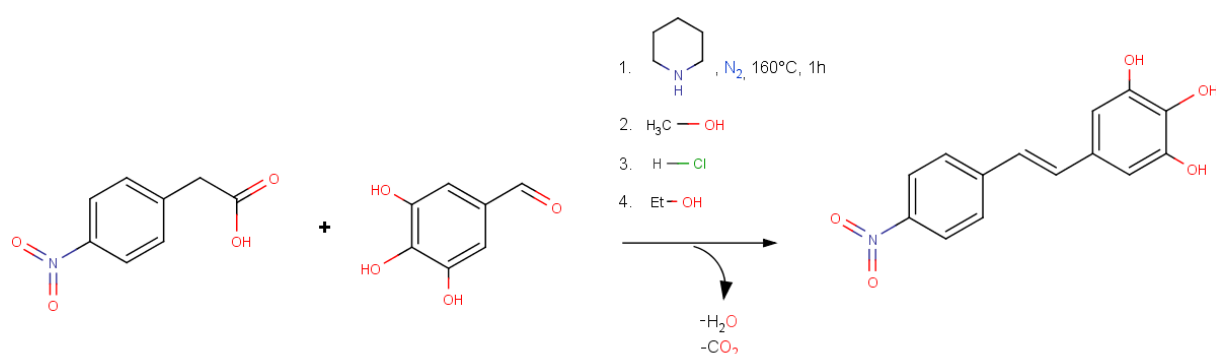
Schemat syntezy 4-nitro-4'-karboksymetyloetoksy-*trans*-stilbenu.

### 9.3.6. Związek nr N1: 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.6.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 0,003 mola (0,543 g) kwasu p-nitrofenylooctowego; 0,003 mola (0,462 g) 3,4,5-trihydroksybenzaldehydu i 0,6 ml piperydyny w celu rozpuszczenia.
2. Mieszaninę tę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w przepływie azotu, na łaźni olejowej w temperaturze 160°C przez 1 godzinę. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej.
3. W wyniku reakcji otrzymano czarny osad, do którego dodano 10 ml metanolu i ponownie ogrzewano pod chłodnicą zwrotną aż do rozpuszczenia się osadu.
4. Następnie roztwór zobojętniono za pomocą 0,1 mol/l HCl i wypadły osad odsączono. Przesącz zateżono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję osadu.
5. Wytrącony czarny osad odsączono i przemyto etanolem bezwodnym, a przesącz zateżono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję produktu.
6. Połączone frakcje osadu odsączono i krystalizowano z bezwodnego etanolu, otrzymując brunatno-czarne kryształy.



RYCINA 9.6

Schemat syntezy 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilbenu.

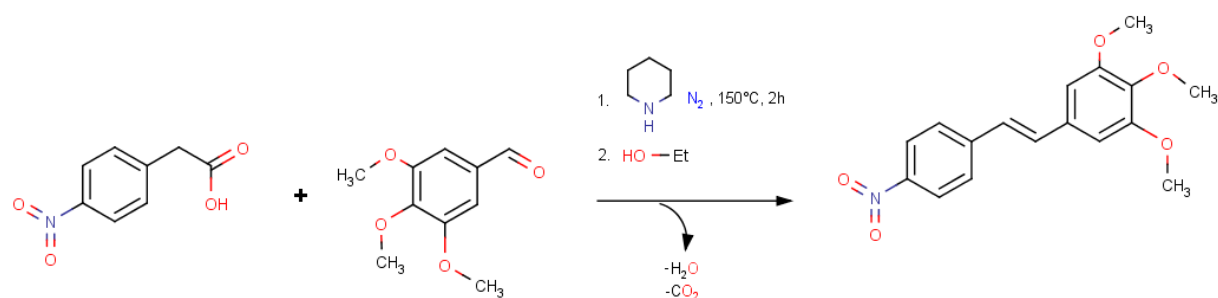


**9.3.7. Związek nr N2: 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben**

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.7.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 0,02 mola (3,623 g) kwasu *p*-nitrofenylooctowego; 0,02 mola (3,924 g) 3,4,5-trimetoksybenzaldehydu i 2 ml piperydyny w celu rozpuszczenia.
2. Mieszaninę tę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w przepływie azotu, na łaźni olejowej w temperaturze 150°C przez 2 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej.
3. Wytrącony żółty osad odsączono i przemyto etanolem bezwodnym, a przesącz zatężono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję produktu.
4. Połączone frakcje osadu odsączono i krystalizowano z bezwodnego etanolu, otrzymując żółte kryształy.



RYCINA 9.7

Schemat syntezy 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

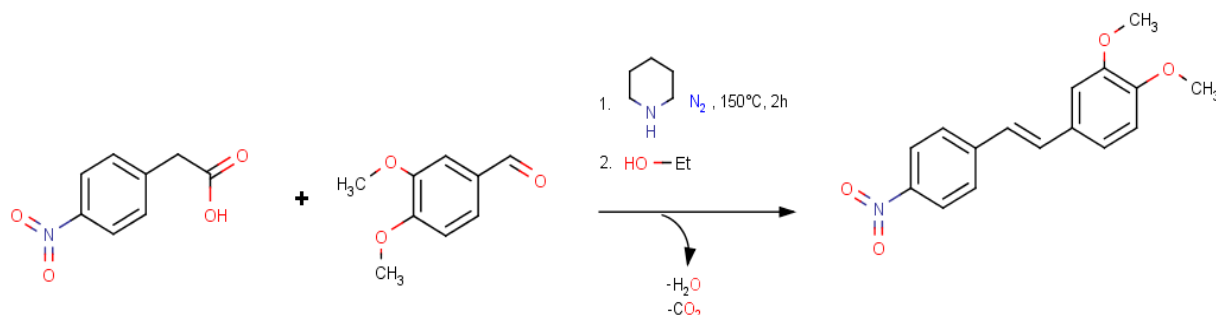
**9.3.8. Związek nr N6: 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilben**

Skrócony opis drogi syntezy przedstawiono na RYCINIE 9.8.

*Etapy syntezy:*

1. W kolbie kulistej o pojemności 25 ml umieszczono 0,02 mola (3,623 g) kwasu *p*-nitrofenylooctowego; 0,02 mola (3,324 g) aldehydu weratrowego i 2 ml piperydyny w celu rozpuszczenia.
2. Mieszaninę tę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną, w przepływie azotu, na łaźni olejowej w temperaturze 150°C przez 2 godziny. Następnie mieszaninę reakcyjną ochłodzono do temperatury pokojowej.
3. Wytrącony żółty osad odsączono i przemyto etanolem bezwodnym, a przesącz zatężono na wyparce obrotowej, uzyskując kolejną frakcję produktu.

4. Połączone frakcje osadu odsączone i krystalizowano z bezwodnego etanolu, otrzymując żółte kryształy.



#### RYCINA 9.8

Schemat syntezy 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu.

### 9.4. Potwierdzenie tożsamości i struktury zsyntezowanych związków

#### 9.4.1. Metody badań analitycznych

Pochodne *trans*-stilbenu zostały poddane analizie klasycznej i instrumentalnej w celu weryfikacji ich tożsamości, w tym budowy przestrzennej, oraz czystości chemicznej.

Wśród metod klasycznych wykorzystano następujące analizy:

- oznaczenie zawartości podstawowych pierwiastków – węgiel, wodór i azot (elementarna analiza organiczna);
- oznaczenie temperatury topnienia;
- wyznaczenie współczynnika retencji  $R_f$  (chromatografia cienkowarstwowa, TLC).

W przypadku metod instrumentalnych zastosowanie znalazły:

- spektrometria mas (MS);
- spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR):  $^1H$  NMR oraz  $^{13}C$  NMR;
- spektroskopia w podczerwieni (IR).

Należy zaznaczyć, że nie wszystkie metody (szczególnie instrumentalne) były konieczne do identyfikacji poszczególnych związków. W niektórych przypadkach wykorzystano dwie z trzech metod instrumentalnych.

Opisy poszczególnych metod analitycznych znajdują się w SUPLEMENCIE.

## 10. Oznaczenie aktywności cytotoksycznej pochodnych *trans*-stilbenu wobec linii komórkowej MCF-7 (ETAP VI)

### 10.1. Cel badania

Ocena działania cytotoksycznego badanych związków wobec ludzkich komórek raka piersi MCF-7 za pomocą testu MTT.

### 10.2. Badane związki

Informacje na temat analizowanych związków przedstawiono w ROZDZIALE 6.

Roztwory testowanych związków przygotowano w stężeniach wyjściowych 1000-krotnie wyższych niż docelowe, poprzez rozpuszczenie w DMSO.

Zakres stężeń wyjściowych: 0 (kontrola); 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 mmol/l

### 10.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie

#### 10.3.1. Hodowla komórek MCF-7

*Material:*

- estrogenozależna, ludzka linia komórkowa raka piersi MCF-7, Michigan Cancer Foundation-7 (ECACC nr 86012803).

*Odczynniki:*

- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, Niemcy);
- ABAM – Antibiotic-Antimycotic solution – roztwór 100 IU/ml penicyliny, 1 mg/ml streptomycyny, 100 IU/ml nystatyny (Sigma Aldrich, Niemcy);
- L-glutamina, roztwór 2,5 mmol/l (Sigma Aldrich, Niemcy);
- FBS (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydłęca (Sigma Aldrich, Niemcy);
- PBS (ang. *phosphate buffered saline*) – bufor fosforanowy (Sigma Aldrich, Niemcy);
- trypsyna-EDTA, roztwór 10% (Sigma Aldrich, Niemcy);
- DMSO – dimetylosulfotlenek (Sigma Aldrich, Niemcy);
- Trypan blue (Sigma Aldrich, Niemcy).

*Sprzęt:*

- płytki do hodowli komórkowych 96-dołkowe (Corning Inc., USA);
- butelki hodowlane o pow. 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc., USA);
- polipropylenowe probówki wirówkowe 15 ml i 50 ml (Bionovo, Polska);

10. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU  
WOBEC LINII KOMÓRKOWEJ MCF-7 (ETAP VI)

---

- pipety manualne i automatyczne, jednokanałowe o pojemnościach: 0,1-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l i 1-10 ml (Eppendorf, Niemcy);
- pipety automatyczne, 12-kanałowe o pojemnościach: 0,5-10  $\mu$ l i 10-100  $\mu$ l (Eppendorf, Niemcy);
- pipety Pasteura (Medlab, Polska);
- pipety 10 ml i 25 ml (BD Biosciences, USA),
- probówki do zamrażania komórek (Nalgene Comp., USA),
- komora laminarna BioBan 48 (Angelantoni Life Science, Włochy);
- pompa próżniowa Biochem-Vaccu Center BVC 21 (Vaccubrandt, Niemcy);
- inkubator 490-1CE (LabLine Instruments Inc., USA);
- komory zliczeniowe Bürkera;
- mikroskop świetlny TS 100, kamera Digital SightCamera System (Nikon, Japonia);
- lodówka 2-8°C (Samsung, Korea Płd.);
- zamrażarki -20°C, -80°C (Samsung, Korea Płd.).

*Oprogramowanie:*

- Nikon Basic Research, Nikon Imaging Software, program użyty do cyfrowej analizy zdjęć z mikroskopu Nikon TS100 (Nikon, Japonia).

**10.3.2. Test MTT**

*Odczynniki:*

- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich, Niemcy);
- ABAM – Antibiotic-Antimycotic solution – roztwór 100 IU/ml penicyliny, 1 mg/ml streptomycyny, 100 IU/ml nystatyny (Sigma Aldrich, Niemcy);
- FBS (ang. *fetal bovine serum*) – płodowa surowica bydlęca (Sigma Aldrich, Niemcy);
- PBS (ang. *phosphate buffered saline*) – bufor fosforanowy (Sigma Aldrich, Niemcy);
- DMSO – dimetylosulfotlenek (Sigma Aldrich, Niemcy);
- MTT – bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliny (Sigma Aldrich, Niemcy).

*Sprzęt:*

- płytki do hodowli komórkowych 96-dołkowe (Corning Inc., USA);
- pipety Pasteura (Medlab, Polska);
- pipety 10 ml i 25 ml (BD Biosciences, USA),
- pipety manualne i automatyczne, jednokanałowe o pojemnościach: 0,1-10  $\mu$ l, 2-20  $\mu$ l, 10-100  $\mu$ l, 100-1000  $\mu$ l i 1-10 ml (Eppendorf, Niemcy);

- pipety automatyczne, 12-kanałowe o pojemnościach: 0,5-10 µl i 10-100 µl (Eppendorf, Niemcy);
- komora laminarna BioBan 48 (Angelantoni Life Science, Włochy);
- pompa próżniowa Biochem-Vaccu Center BVC 21 (Vaccubrandt, Niemcy);
- inkubator 490-ICE (Lab Line Instruments Inc., USA);
- wirówka 5810R (Eppendorf, Niemcy);
- wytrząsarka płytek DTS-4 (Sky Line, Łotwa);
- czytnik płytek BioTek Elx-800 (BioTek Instruments, USA);
- lodówka 2-8°C (Samsung, Korea Płd.);
- zamrażarki -20°C, -85°C (Samsung, Korea Płd.).

*Oprogramowanie:*

- KC Junior v. 1.4.1.8 – program sterujący czytnikiem płytek BioTek Elx-800 (BioTek Instruments, USA);
- Microsoft Office – Excel 2007 (Microsoft, USA);
- GraphPad v. 5.0 (GraphPad Prism Software, USA) [139].

## **10.4. Metodyka badania**

### **10.4.1. Hodowla komórek MCF-7**

Komórki linii MCF-7 hodowano w butelkach o powierzchni 75 cm<sup>2</sup>. Optymalne warunki hodowlane, tj. temperatura 37°C, 100% wilgotność i 5% CO<sub>2</sub>, utrzymywane były przy pomocy inkubatora.

Jako medium hodowlane stosowano pożywkę DMEM uzupełnioną o 2,5 mM L-glutaminę oraz 10% FBS. W celu uniknięcia zakażenia hodowli do medium dodawano roztwór antybiotyków i antymykotyku (ABAM, 100 U/ml penicyliny, 1 mg/ml streptomycyny, 100 U/ml nystatyny).

Komórki MCF-7 posażowano w warunkach jałowych, w komorze z przepływem laminarnym. Po dwukrotnym przepłukaniu komórek buforem fosforanowym PBS, odtrawiano je od podłoża za pomocą 10% trypsyny/EDTA, a następnie dodawano FBS w celu zahamowania aktywności enzymu.

Komórki liczone z użyciem komory Bürkera i mikroskopu świetlnego. Po liczeniu zawiesinę komórek rozdzielano do naczyń hodowlanych i dodawano odpowiednią ilość świeżej pożywki.

### **10.4.2. Test MTT**

#### **10.4.2.1. Zasada oznaczania**

Zasada oznaczania została opisana w ROZDZIALE 4.2.1.

#### 10.4.2.2. Sposób oznaczania

Komórki MCF-7 wysiewano na płytki 96-dołkowe w ilości 20 000 komórek/dołek.

Po upływie 24 godz. usuwano medium i dodawano roztwory testowanych związków. Zakres stężeń docelowych w pojedynczych dołkach wynosił: 0 (kontrola); 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100  $\mu\text{mol/l}$ , a ostateczne stężenie DMSO – 0,1%.

Komórki inkubowano z badanymi związkami przez 72 godziny. Po upływie tego czasu roztwory z badanymi związkami usuwano, a następnie dodawano roztwór MTT (150  $\mu\text{l}$  DMEM oraz 20  $\mu\text{l}$  MTT o stężeniu 5 mg/ml w PBS).

Po upływie 4 godz. komórki odwirowywano (3 min. / 200 g / 20 °C), ściągano dodany uprzednio roztwór MTT, a następnie dodawano 200  $\mu\text{l}$  DMSO w celu rozpuszczenia utworzonego fioletowego formazanu w żywych komórkach.

Absorbancję mierzono z użyciem czytnika płytek przy długości fali 570 nm (długość fali referencyjnej – 650 nm).

Intensywność barwy jest wprost proporcjonalna do ilości utworzonego formazanu oraz do ilości żywych komórek, natomiast odwrotnie proporcjonalna do siły cytotoksycznego działania testowych związków:

$$\text{Absorbancja} \propto [\text{ilość formazanu}] \propto [\text{ilość żywych komórek}]$$

$$\text{Absorbancja} \propto 1 / [\text{cytotoksyczne działanie testowanego związku}]$$

W oparciu o uzyskane wyniki absorbancji określany jest stopień cytotoksycznej aktywności badanych związków w zależności od ich stężenia.

## **11. Oznaczenie stopnia zahamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII)**

### **11.1. Cel badania**

Ocena zdolności badanych związków do hamowania aktywności COX-1 i COX-2 bezpośrednio w komórkach MCF-7 poprzez wyznaczenie poziomu PGE<sub>2</sub> w supernatancie tych komórek względem próby kontrolnej.

### **11.2. Badane związki**

Spośród pochodnych *trans*-stilbenu do tego badania wytypowano związek nr **N1**, który wykazywał nasilniejsze i najbardziej selektywne działanie wobec COX-2.

Uzyskane wyniki porównano z danymi literaturowymi dla celekoksylu [135].

Zakres stężeń stosowanych w ETAPIE V jest następujący:

0 (kontrola); 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μmol/l.

### **11.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie**

#### **11.3.1. Hodowla komórek MCF-7**

*Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie do hodowli komórkowej:* patrz ROZDZIAŁ 10.3.1

#### **11.3.2. Oznaczenie stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym**

W celu oznaczenia poziomu PGE<sub>2</sub>, wytworzonej przez COX-2 obecną w komórkach MCF-7, wykorzystano gotowy zestaw *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express ELISA Kit* firmy Cayman Chemical Company, USA [136]. Wykaz materiałów i odczynników wchodzących w skład tego zestawu znajduje się w SUPLEMENCIE do niniejszej pracy doktorskiej.

*Pozostałe odczynniki, sprzęt i oprogramowanie:* patrz ROZDZIAŁ 7.3.

### **11.4. Metodyka badania**

#### **11.4.1. Hodowla komórek MCF-7**

Patrz ROZDZIAŁ 10.4.1.

### 11.4.2. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA)

#### 11.4.2.1. Zasada oznaczania

Istotą testu cEIA jest pomiar aktywności enzymatycznej COX-2 w komórkach MCF-7, inkubowanych z badanymi związkami chemicznymi (potencjalnymi inhibitorami COX-2), poprzez oznaczenie PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym [136].

#### 11.4.2.2. Sposób oznaczania

Sposób wykonywania tego testu jest bardzo podobny do badania wykonywanego z użyciem zestawu *COX Inhibitor Screening Assay Kit* – szczegóły zawarto w ROZDZIALE 7.

Zasadnicza różnica pomiędzy obydwoma badaniami dotyczy materiału stanowiącego źródło enzymu COX-1 i/lub COX-2, sposobu przeprowadzenia reakcji tego enzymu z potencjalnymi inhibitorami, rodzaju oznaczanych prostaglandyn oraz czasu inkubacji płytki pokrytej przeciwciałem:

<i>COX Inhibitor Screening Assay Kit</i> [134]	<i>Prostaglandin E<sub>2</sub> Express ELISA Kit</i> [136]
<b>źródło COX</b>	
owcza COX-1 ludzka, rekombinowana COX-2	nowotworowa linia komórkowa MCF-7 wykazująca nadekspresję COX-2 [135; 155; 156]
<b>wykonanie reakcji COX z inhibitorem</b>	
bezpośrednie oddziaływanie inhibitora z COX-1 lub COX-2 (warunki <i>in vitro</i> )	oddziaływanie inhibitora z COX-2 zawartą w komórkach MCF-7 (warunki <i>in vitro</i> )
<b>sposób oznaczania aktywności COX</b>	
oznaczanie stężenia PGF <sub>2α</sub> w roztworze reakcyjnym (probówka)	oznaczanie stężenia PGE <sub>2</sub> w supernatancie komórkowym (płytki hodowlana, 96-dołkowa)
<b>warunki inkubacji 96-dołkowej płytki pokrytej przeciwciałem IgG</b>	
18 godzin, temperatura pokojowa, bez dostępu światła, zakres obrotów: 200-300 rpm	60 minut, temperatura pokojowa, bez dostępu światła, zakres obrotów: 200-300 rpm

Pozostałe etapy testu wykonywane są analogicznie i obejmują [134; 136], tj.:

- przygotowanie wzorcowych stężeń PGE<sub>2</sub>,
- przygotowanie odczynników do inkubacji,
- wprowadzanie supernatantu, odczynników i wzorcowych stężeń PGE<sub>2</sub> do 96-dołkowej płytki pokrytej przeciwciałem IgG,
- przemywanie płytki po inkubacji, przygotowanie odczynnika Ellmana i proces wywoływania barwnej reakcji enzymatycznej (o żółtym kolorze) w dołkach,
- pomiar intensywności barwy roztworów w poszczególnych dołkach za pomocą spektrofotometru UV (czytnika płytek) w zakresie,



- obliczenie stopnia hamowania aktywności COX w oparciu o wyznaczone stężenie PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym.

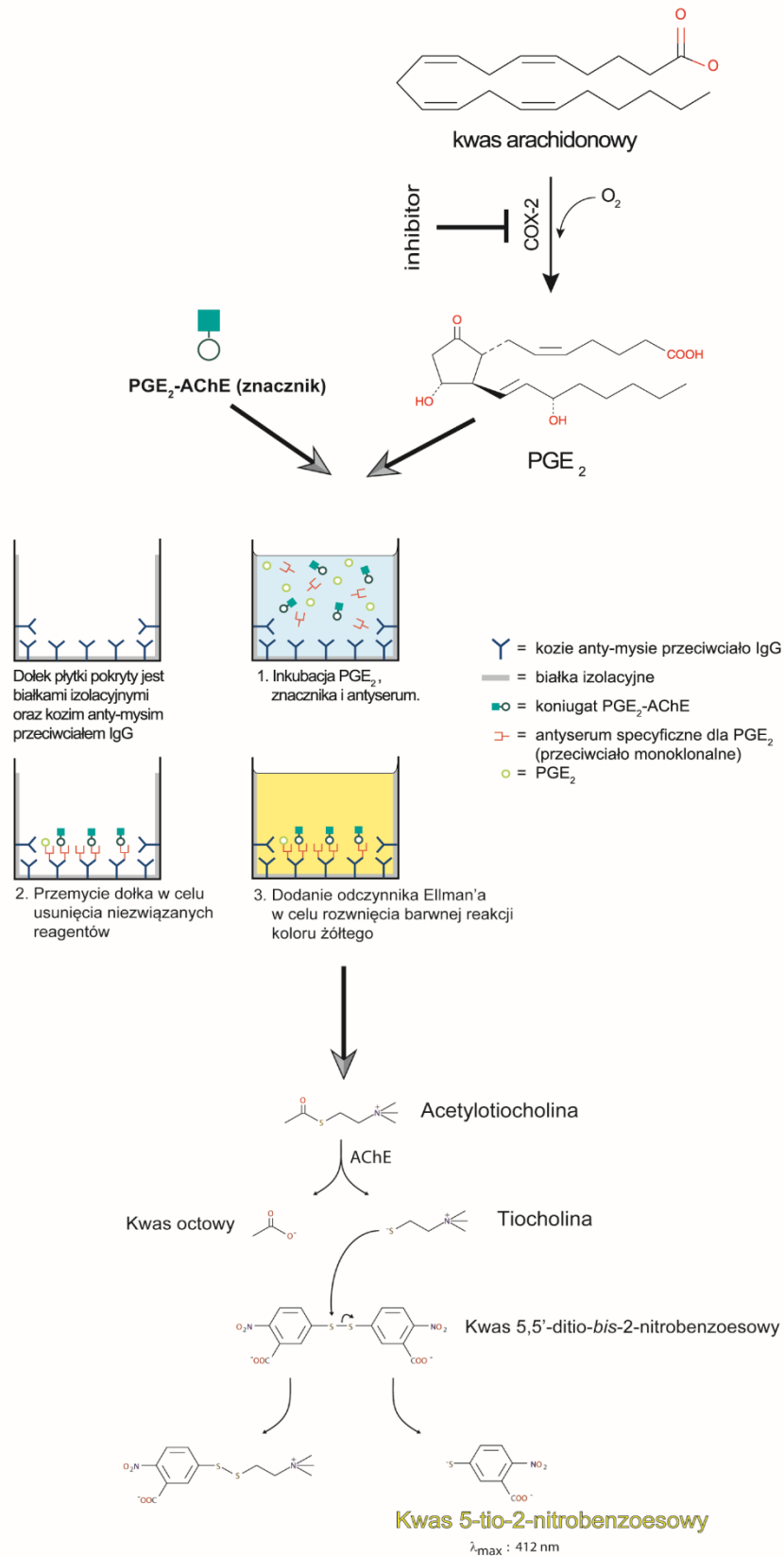
Skrócony opis poszczególnych etapów znajduje się w ROZDZIAŁACH 11.4.2.3 – 11.4.2.5.

Intensywność barwy mierzona jest spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm. Uzyskana absorbancja jest wprost proporcjonalna do ilości związanego znacznika, a odwrotnie proporcjonalna do ilości utworzonej PGE<sub>2</sub>, a więc również aktywności COX:

$$\text{Absorbancja} \propto [\text{znacznik}] \propto 1/[\text{PGE}_2] \propto 1/[\text{aktywność COX}]$$

W oparciu o uzyskane wyniki absorbancji określany jest stopień inhibicji COX przez określone stężenie badanego związku.

Ogólny schemat prowadzenia reakcji oraz oznaczania stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym zaprezentowano na RYCINA 11.1.



RYCINA 11.1

Ogólny schemat oznaczania stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym po reakcji inhibitora z cyklooksygenazą-2 [136].

### 11.4.2.3. Przygotowanie komórek MCF-7 i związku N1 przed wykonaniem inkubacji

#### *Hodowla komórek MCF-7*

Hodowlę komórek przeprowadzono zgodnie z opisem przedstawionym w ROZDZIALE 10.4.1.

#### *Badany związek N1 (4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-trans-stilben)*

Roztwory testowanego związku N1 przygotowano w stężeniach wyjściowych 1000-krotnie wyższych niż docelowe, poprzez rozpuszczenie w DMSO.

Zakres stężeń wyjściowych: 0 (kontrola); 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 mmol/l.

### 11.4.2.4 Inkubacja związku N1 z komórkami MCF-7

1. Komórki MCF-7 wysiewano na płytce 96-dółkowej w ilości 20 000 komórek/dółek.
2. Po upływie 24 godz. usuwano medium i dodawano roztwory testowanego związku. Zakres docelowych stężeń badanego związku w pojedynczych dółkach wynosił: 0 (kontrola); 6,25; 12,5; 25; 50 i 100  $\mu\text{mol/l}$ , a ostateczne stężenie DMSO – 0,1%.
3. Komórki inkubowano z badanym związkiem przez 72 godziny.
4. Po upływie tego czasu supernatant komórkowy przeniesiono z każdego dółka do nowej płytki 96-dółkowej pokrytej białkami izolacyjnymi i kozim anti-mysim przeciwciałem IgG – w celu oznaczenia zawartości PGE<sub>2</sub>.

### 11.4.2.5 Procedura oznaczania stężenia prostaglandyny E<sub>2</sub> w supernatancie hodowlanym

Stężenie PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym oznaczono zgodnie z instrukcją producenta zestawu *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express ELISA Kit* firmy Cayman Chemical Company, USA [136].

Poszczególne etapy analizy były następujące:

1. Przygotowanie wzorców, materiałów i odczynników do oznaczania zawartości prostaglandyny E<sub>2</sub>.
2. Przygotowanie 96-dółkowej płytki do inkubacji, nanoszenie odczynników do odpowiednich dółków.
3. Inkubacja płytki oraz pomiar absorbancji.
4. Obliczenia – oznaczenie stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie hodowlanym i wyznaczenie stopnia zahamowania aktywności COX-2 w komórkach MCF-7.

Szczegółowy opis poszczególnych etapów badania przedstawiono w SUPLEMENCIE.

## 12. Wyniki

### 12.1. Oznaczanie aktywności inhibicyjnej pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro* (ETAP I)

#### 12.1.1. Badanie przesiewowe

Do badania przesiewowego zakwalifikowano 25 związków opisanych w ROZDZIALE 6, z czego 19 należy do pochodnych *trans*-stilbenu, a pozostałe 6 to pochodne *trans*-stilbazolu.

Testowane cząsteczki poddano bezpośrednim reakcjom inkubacji z COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro*, w celu wstępnego określenia ich biologicznej aktywności wobec obydwóch izoform COX. Działanie to oceniano poprzez zastosowanie jednolitego stężenia progowego 100  $\mu\text{mol/l}$  dla wszystkich 25 związków reagujących z COX. Wybór takiego stężenia dokonano w oparciu o przegląd literatury i dostępne wyniki badań pochodnych *trans*-stilbenu z izoformami COX [32; 34; 35]. Szczegółowy opis wykonania badania przedstawiono w ROZDZIALE 7.

Do przeprowadzenia analizy wykorzystano komercyjne zestawy testu *COX Inhibitor Screening Assay Kit* firmy Cayman [134]. Dla każdego zestawu sporządzano osobną sigmoidalną krzywą wzorcową, która po przekształceniach matematycznych przyjmowała postać prostoliniową o ogólnym wzorze  $\text{logit}(B/B_0) = f(\text{logPGF}_{2\alpha})$ . Wykresy i parametry poszczególnych krzywych wzorcowych zaprezentowano w SUPLEMENCIE.

Obliczenia wykonano w oparciu o wyniki absorbancji ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) w poszczególnych dołkach oraz parametry krzywych wzorcowych.

Uzyskane wyniki zaprezentowano w TABELACH 12.1-4 i na WYKRESIE 12.1.

TABELA 12.1

Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-1 (związki nr Z1 – Z16).

Nr próbki / związku	Rozcieńczenie próbki	B / B <sub>0</sub> * [%]	Stężenie prostaglandyny PGF <sub>2α</sub> [pg/ml] <sup>1</sup>	SD [pg/ml]	CV # [%]	Stopień zahamowania aktywności COX-1 [%] <sup>2,3</sup>	Średnia wartość [%]	SD średniej wartości [%]
Tłó (inaktywowana COX-1)	100	93,55	258,20	25,13	9,73	100	100	-
Kontrola (100% aktywność COX-1, bez inhibitora)	2 000	28,69	1 668 861,48	148 739,83	8,91	0	0	-
	4 000	39,64	1 515 599,26	104 388,92	6,89	0		
Z1	2 000	33,75	1 138 296,00	64 815,70	5,69	31,79	32,27	0,68
	4 000	45,61	1 019 166,56	52 309,57	5,13	32,75		
Z2	2 000	31,51	1 340 442,68	54 753,35	4,08	19,68	20,52	1,18
	4 000	43,21	1 191 947,83	23 795,07	2,00	21,35		
Z3	2 000	30,22	1 478 499,84	89 248,42	6,04	11,41	9,64	2,49
	4 000	40,84	1 396 181,45	113 121,55	8,10	7,88		
Z4	2 000	35,17	1 029 509,27	79 567,82	7,73	38,30	39,22	1,29
	4 000	47,42	907 327,31	67 691,73	7,46	40,13		
Z5	2 000	42,61	620 069,01	22 360,65	3,61	62,84	59,26	5,08
	4 000	52,06	671 923,14	34 284,75	5,10	55,66		
Z6	2 000	30,05	1 498 101,97	90 725,11	6,06	10,23	6,80	4,86
	4 000	40,11	1 464 602,06	77 622,16	5,30	3,36		
Z7	2 000	31,69	1 324 559,15	89 872,73	6,79	20,63	16,26	6,18
	4 000	41,49	1 335 244,79	26 944,09	2,02	11,90		
Z8	2 000	32,37	1 258 320,71	73 172,53	5,82	24,60	22,19	3,41
	4 000	42,91	1 215 818,85	29 174,72	2,40	19,78		
Z9	2 000	40,50	713 521,24	40 602,82	5,69	57,24	54,59	3,75
	4 000	50,82	728 460,33	45 670,90	6,27	51,94		
Z10	2 000	29,23	1 596 082,84	105 755,73	6,63	4,36	2,42	2,75
	4 000	39,68	1 508 402,74	104 888,88	6,95	0,47		

12. WYNIKI

Z11	2 000	36,52	637 918,18	23 065,75	3,62	61,77	59,62	3,04
	4 000	52,71	644 560,77	35 460,54	5,50	57,47		
Z12	2 000	28,85	1 643 798,23	70 596,86	4,29	1,50	3,36	2,63
	4 000	40,41	1 436 387,86	105 110,29	7,32	5,23		
Z13	2 000	29,11	1 614 122,22	145 448,24	9,01	3,28	6,09	3,97
	4 000	41,01	1 380 786,48	122 878,25	8,90	8,90		
Z14	2 000	29,92	1 513 914,17	113 086,94	7,47	9,28	14,13	6,86
	4 000	42,78	1 227 922,62	93 303,89	7,60	18,98		
Z15	2 000	30,87	1 406 811,19	51 662,02	3,67	15,70	15,36	0,49
	4 000	42,05	1 288 022,63	82 812,12	6,43	15,02		
Z16	2 000	32,59	1 237 593,94	33 114,65	2,68	25,84	28,31	3,48
	4 000	45,18	1 049 242,47	87 076,30	8,30	30,77		

\*  $B / B_0$  – stosunek absorbancji zmierzonej dla dołka danej próbki testowej (B) do absorbancji zmierzonej dla dołka o maksymalnej zdolności wiązania znacznika ( $B_0$ )

# CV – współczynnik zmienności (*ang. coefficient of variation*)

<sup>1</sup> wyniki skorygowano o wartość próby ślepej

<sup>2</sup> stopień zahamowania aktywności enzymu COX-1 w przypadku tła ustalono na poziomie 100%, a w przypadku kontroli na poziomie 0%

<sup>3</sup> wyniki wyznaczono w odniesieniu do danego rozcieńczenia próbki: 2000-krotne lub 4000-krotne

TABELA 12.2

Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-1 (związki nr Z17 – Z25).

Nr próbki	Rozcieńczenie próbki	B / B <sub>0</sub> [%]	Stężenie prostaglandyny PGF <sub>2α</sub> [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV # [%]	Stopień zahamowania aktywności COX-1 [%]	Średnia wartość [%]	SD średniej wartości [%]
Tło (inaktywowana COX-1)	100	98,55	677,46	32,26	4,76	100	100	-
Kontrola (100% aktywność COX-1, bez inhibitora)	2 000	34,56	1 614 962,77	75 350,66	4,67	0	0	-
	4 000	54,24	1 457 465,02	123 867,68	8,50	0		
Z17	2 000	35,84	1 527 775,00	54 359,84	3,56	5,40	4,92	0,68
	4 000	55,37	1 392 788,19	65 319,13	4,69	4,44		
Z18	2 000	34,95	1 587 142,66	66 625,42	4,20	1,72	3,16	2,03
	4 000	55,42	1 390 531,67	84 396,50	6,07	4,59		
Z19	2 000	42,15	1 175 465,35	29 585,70	2,52	27,21	28,54	1,87
	4 000	62,96	1 022 224,11	83 641,63	8,18	29,86		
Z20	2 000	37,70	1 411 933,32	49 186,73	3,48	12,57	9,71	4,04
	4 000	56,01	1 357 516,66	45 078,63	3,32	6,86		
Z21	2 000	41,22	1 222 957,90	103 176,13	8,44	24,27	23,06	1,72
	4 000	60,36	1 139 104,47	94 082,96	8,26	21,84		
Z22	2 000	38,38	1 372 236,69	55 382,52	4,04	15,03	17,34	3,26
	4 000	59,68	1 171 210,31	82 932,10	7,08	19,64		
Z23	2 000	35,05	1 581 017,48	85 209,80	5,39	2,10	1,57	0,75
	4 000	54,49	1 442 333,79	59 478,31	4,12	1,04		
Z24	2 000	36,28	1 498 881,49	30 948,03	2,06	7,19	11,15	5,60
	4 000	58,31	1 237 295,37	24 295,07	1,96	15,11		
Z25	2 000	39,16	1 327 900,27	30 402,98	2,29	17,78	15,70	2,94
	4 000	57,91	1 258 943,45	109 094,88	8,67	13,62		

TABELA 12.3

Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-2 (związki nr Z1 – Z16).

Nr próbki	Rozcieńczenie próbki	B / B <sub>0</sub> [%]	Stężenie prostaglandyny PGF <sub>2α</sub> [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]	Stopień zahamowania aktywności COX-2 [%]	Średnia wartość [%]	SD średniej wartości [%]
Tł0 (inaktywowana COX-2)	100	92,37	736,16	55,63	7,56	100	100	-
Kontrola (100% aktywność COX-2, bez inhibitora)	2 000	35,94	1 151 528,66	64 047,43	5,56	0	0	-
	4 000	49,53	1 041 284,35	80 391,41	7,72	0		
Z1	2 000	46,40	621 588,69	29 315,05	4,72	46,02	40,83	7,35
	4 000	57,23	670 267,51	37 949,29	5,66	35,63		
Z2	2 000	45,39	658 598,48	33 992,96	5,16	42,81	39,92	4,08
	4 000	57,60	655 578,97	17 176,55	2,62	37,04		
Z3	2 000	36,74	1 096 771,44	75 415,03	6,88	4,76	3,73	1,45
	4 000	50,01	1 013 135,79	56 142,86	5,54	2,70		
Z4	2 000	37,85	1 024 426,69	55 690,29	5,44	11,03	12,29	1,79
	4 000	52,08	900 111,18	23 071,46	2,56	13,56		
Z5	2 000	59,56	291 967,52	16 823,57	5,76	74,65	71,84	3,97
	4 000	69,12	322 453,36	14 514,61	4,50	69,03		
Z6	2 000	39,23	943 025,82	50 588,55	5,36	18,11	14,35	5,31
	4 000	51,50	930 864,99	43 695,26	4,69	10,60		
Z7	2 000	42,90	759 996,85	16 542,23	2,18	34,00	34,97	1,38
	4 000	57,33	666 692,81	55 174,67	8,28	35,95		
Z8	2 000	43,90	717 775,33	49 695,74	6,92	37,67	37,15	0,73
	4 000	57,49	659 583,02	11 513,97	1,75	36,63		
Z9	2 000	63,92	224 565,45	13 523,06	6,02	80,45	77,37	4,43
	4 000	71,77	268 872,81	7 088,57	2,64	74,18		
Z10	2 000	41,20	840 653,98	70 235,12	8,35	27,00	23,37	5,13
	4 000	53,41	835 729,70	67 977,70	8,13	19,74		



## 12. WYNIKI

Z11	2 000	49,45	341 870,33	8 927,15	2,61	70,27	66,34	5,56
	4 000	66,15	391 425,12	27 967,04	7,14	62,47		
Z12	2 000	39,07	952 162,90	55 411,15	5,82	17,30	15,69	2,28
	4 000	52,19	894 688,39	22 936,74	2,56	14,08		
Z13	2 000	42,42	781 869,27	40 946,78	5,24	32,10	29,01	4,37
	4 000	54,79	771 336,91	29 879,11	3,87	25,92		
Z14	2 000	45,55	653 309,71	53 328,37	8,16	43,27	40,39	4,07
	4 000	57,76	650 649,05	59 659,63	9,17	37,51		
Z15	2 000	42,05	800 238,30	73 452,25	9,18	30,51	27,52	4,23
	4 000	54,47	785 845,60	43 907,12	5,59	24,53		
Z16	2 000	43,90	718 023,49	55 916,71	7,79	37,65	34,07	5,05
	4 000	55,90	723 655,45	37 552,66	5,19	30,50		

TABELA 12.4

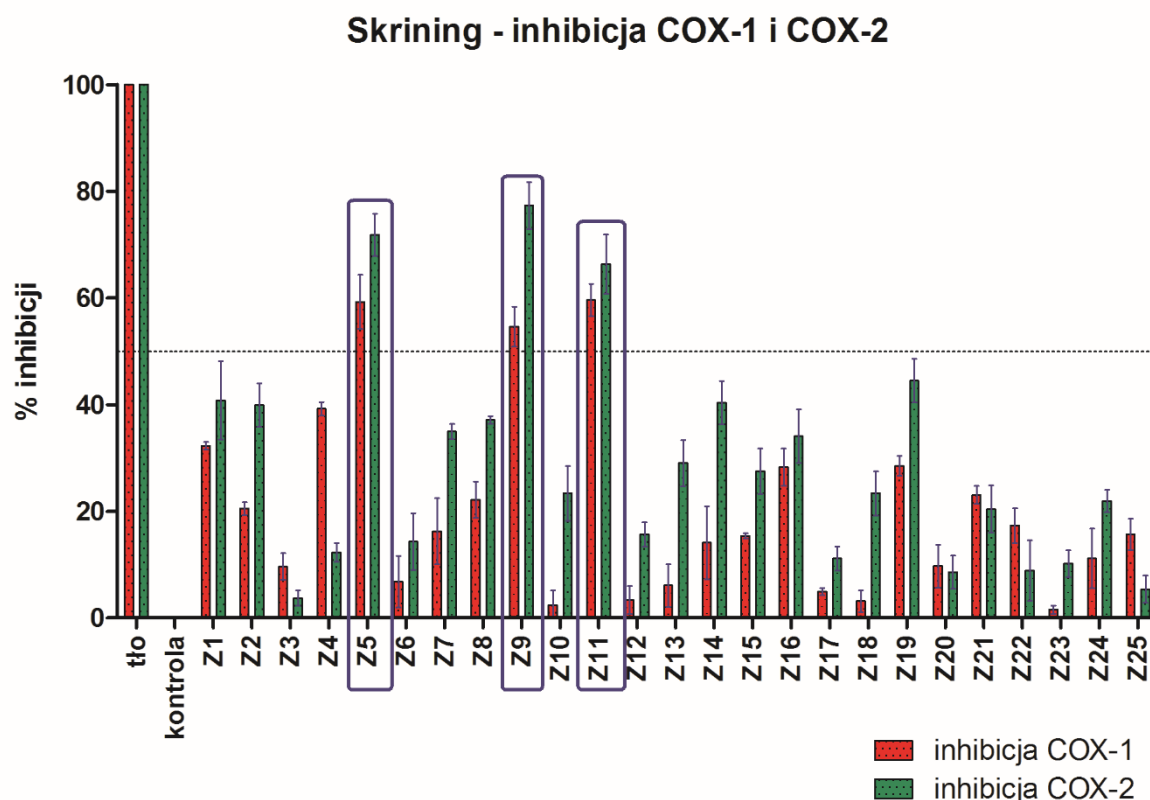
Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-2 (związki nr Z17 – Z25).

Nr próbki	Rozcieńczenie próbki	B / B <sub>0</sub> [%]	Stężenie prostaglandyny PGF <sub>2α</sub> [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]	Stopień zahamowania aktywności COX-2 [%]	Średnia wartość [%]	SD średniej wartości [%]
Tłó (inaktywowana COX-2)	100	93,28	1 612,72	168,90	10,47	100	100	-
Kontrola (100% aktywność COX-2, bez inhibitora)	2 000	41,67	1 035 262,81	103 384,41	10,06	0	0	-
	4 000	55,34	1 089 392,43	61 909,85	5,70	0		
Z17	2 000	44,45	903 231,66	23 905,75	2,66	12,75	11,13	2,30
	4 000	57,34	985 878,61	45 342,58	4,61	9,50		
Z18	2 000	48,03	763 029,00	11 434,49	1,51	26,30	23,37	4,13
	4 000	60,01	866 606,78	37 285,99	4,31	20,45		
Z19	2 000	55,24	544 640,26	47 489,51	8,75	47,39	44,50	4,09
	4 000	66,14	636 177,34	18 723,55	2,94	41,60		
Z20	2 000	44,00	923 566,12	52 462,67	5,72	10,77	8,56	3,13
	4 000	56,66	1 020 242,20	101 135,32	9,94	6,35		
Z21	2 000	47,29	791 179,02	62 259,86	7,91	23,58	20,42	4,46
	4 000	59,22	901 242,44	59 506,26	6,61	17,27		
Z22	2 000	42,64	984 773,09	18 781,65	1,92	4,88	8,88	5,65
	4 000	58,14	949 148,80	51 198,58	5,40	12,87		
Z23	2 000	43,43	948 465,03	39 622,93	4,21	8,38	10,17	2,52
	4 000	57,91	959 159,93	29 525,61	3,08	11,95		
Z24	2 000	47,24	792 948,70	53 502,48	6,79	23,41	21,92	2,11
	4 000	60,01	866 892,74	50 850,50	5,87	20,42		
Z25	2 000	43,21	960 769,62	91 232,50	9,56	7,20	5,38	2,57
	4 000	56,04	1 050 527,11	91 827,73	8,76	3,57		

W wyniku przeprowadzonego kompetycyjnego testu immunoenzymatycznego (cEIA) stwierdzono, że żaden z 25 analizowanych związków nie wykazuje silnego lub bardzo silnego działania hamującego aktywność COX-2. Również pozorna selektywność względem tej izoformy nie była zbyt wysoka. Poza tym, sześć związków (w tym trzy pochodne *trans*-stilbazolu) charakteryzowały się niewielką selektywnością wobec COX-1 [157].

Spośród wstępnie przebadanych związków jedynie trzy pochodne *trans*-stilbenu: **Z5**, **Z9** i **Z11** charakteryzowały się akceptowalnym stopniem zahamowania aktywności COX-2 powyżej 65%, co świadczy o ich umiarkowanie silnym działaniu. Związki te zakwalifikowano do dalszych badań pomimo faktu, że hamowały one aktywność COX-1 nieznacznie słabiej (55-60%) niż COX-2 [157].

Innym argumentem przemawiającym za wyborem tylko tych cząsteczek do kolejnych etapów analizy był stopień zahamowania aktywności obydwóch izoform COX wynoszący powyżej 50% (WYKRES 12.1). Na tej podstawie można było stwierdzić, że wartości COX-1 IC<sub>50</sub> oraz COX-2 IC<sub>50</sub> dla tych związków są poniżej stężenia progowego 100 µmol/l, co z kolei daje możliwość wyznaczenia wskaźnika selektywności w odniesieniu do COX-2.



WYKRES 12.1

Zbiorcze zestawienie wyników badania przesiewowego – porównanie stopnia zahamowania aktywności COX-1 i COX-2 przez badane związki.

### 12.1.2. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków Z5, Z9 i Z11

Analizowane związki poddano ponownej reakcji z obydwoma izoformami COX, ale przy zastosowaniu rozcieńczeń seryjnych, których zakres podano w ROZDZIALE 7.4.1.3. W tym celu jeszcze raz wykorzystano ten sam test cEIA (komercyjny zestaw firmy Cayman [134]). Wytypowane związki badano dwukrotnie, a uzyskane wyniki uśredniono.

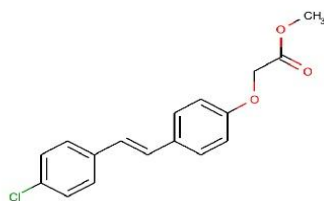
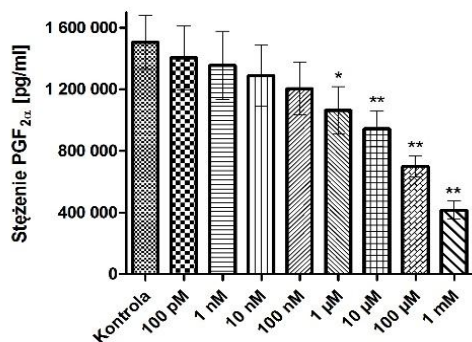
Wykresy i parametry krzywych wzorcowych przedstawiono w SUPLEMENCIE.

Spośród przebadanych pochodnych *trans*-stilbenu najsilniejsze działanie i zarazem najwyższą selektywność wobec COX-2 wykazywał związek **Z9**, dla którego wyznaczono poniższe parametry biologicznej aktywności [157–159]:

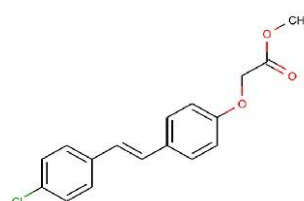
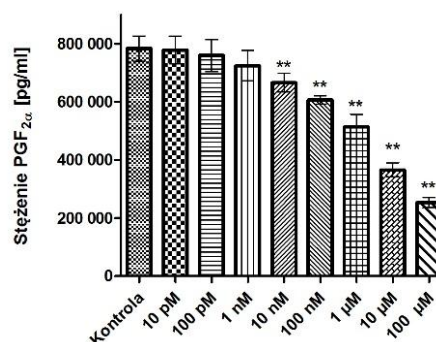
- wartość  $IC_{50}$  wobec COX-1 (COX-1  $IC_{50}$ ): **84,980  $\mu\text{mol/l}$**  (95% CI: 35,892 – 244,343)
- wartość  $IC_{50}$  wobec COX-2 (COX-2  $IC_{50}$ ): **4,017  $\mu\text{mol/l}$**  (95% CI: 2,280 – 7,586)
- selektywność względem COX-2 (COX-1  $IC_{50}$  / COX-2  $IC_{50}$ ): **21,16** (95% CI: 15,74 – 32,21)

Pozostałe dwie cząsteczki charakteryzowały się słabszym działaniem w porównaniu do związku Z9 (wartość  $IC_{50}$  wobec COX-2 wyniosła ok. 7,5  $\mu\text{mol/l}$ , a selektywność względem tej izoformy była 4-5-krotnie niższa).

Wyniki oznaczeń zaprezentowano na WYKRESACH 12.2-7.

Związek nr **Z5****Z5 vs COX-1 - stężenie PGF<sub>2α</sub>**

Stężenie związku Z5

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)**Związek Z5 vs COX-2 - stężenie PGF<sub>2α</sub>**

Stężenie związku Z5

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

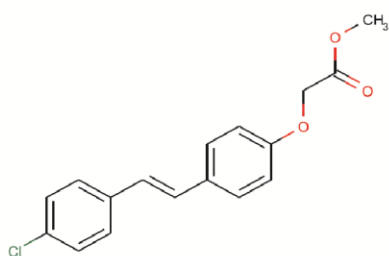
## WYKRES 12.2

Wpływ związku **Z5** na aktywność **COX-1** oraz **COX-2** wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (±SD).

Testowana cząsteczka **Z5** charakteryzuje się następującymi parametrami aktywności biologicznej [157–159]:

- COX-1 IC<sub>50</sub>: **40,980 μmol/l** (95% CI: 21,380 – 85,901)
- COX-2 IC<sub>50</sub>: **7,522 μmol/l** (95% CI: 5,888 – 9,840)
- selektywność względem COX-2: **5,45** (95% CI: 3,63 – 8,73)

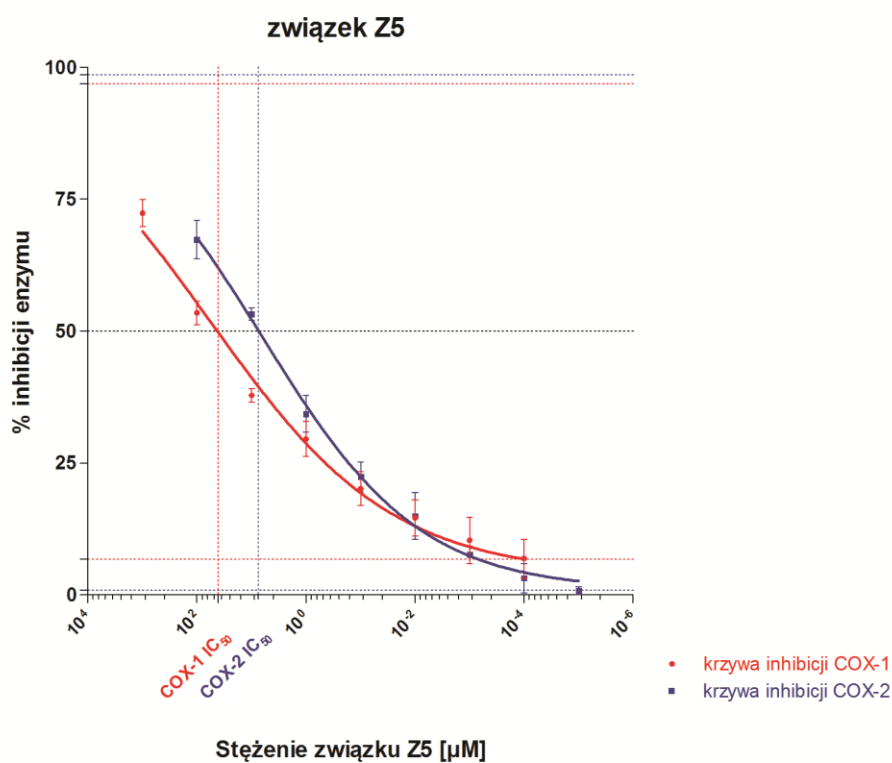


COX-1 IC<sub>50</sub> = **40,980 μM** (95% CI: 21,380 - 85,901 μM)

COX-2 IC<sub>50</sub> = **7,522 μM** (95% CI: 5,888 - 9,840 μM)

selektywność  
COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**5,45**  
(95% CI: 3,63 - 8,73)



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie związku Z5} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 6,77 % (2,34; 11,20)  
 B = 0,23 (0,19; 0,27)  
 C = 51,90 μM (29,56; 74,24)  
 D = 96,87 % (87,39; 106,35)

R<sup>2</sup> = 0,9849  
 R = 0,9924

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

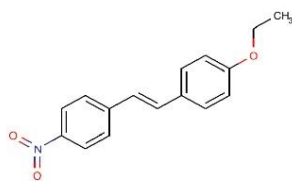
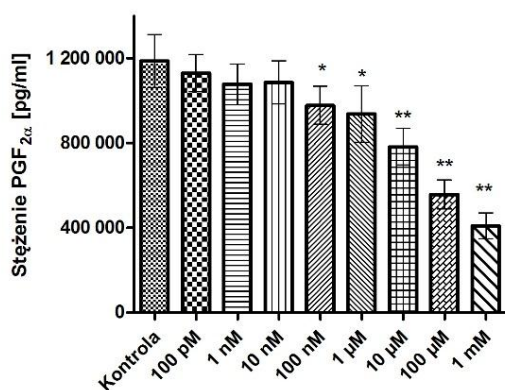
A = 0,86 % (-4,38; 5,24)  
 B = 0,29 (0,26; 0,32)  
 C = 6,34 μM (5,26; 7,42)  
 D = 98,54 % (92,12; 104,96)

R<sup>2</sup> = 0,9976  
 R = 0,9988

WYKRES 12.3

Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek **Z5**.

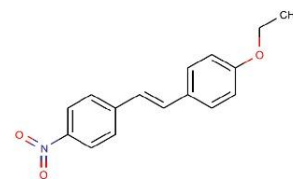
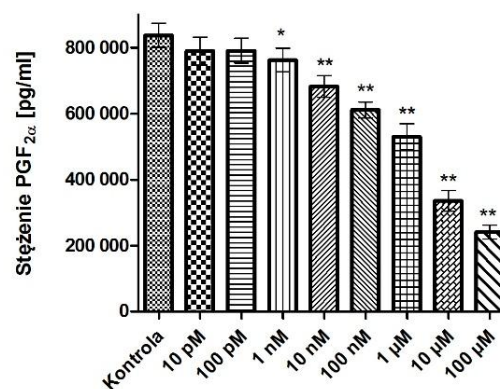
Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).

Związek nr **Z9****Z9 vs COX-1 - stężenie PGF<sub>2α</sub>**

Stężenie związku Z9

\*  $p \leq 0,05$   
 \*\*  $p \leq 0,01$

Metoda statystyczna:  
 jednoczynnikowa analiza wariancji  
 (one-way ANOVA)  
 z testem Dunnetta post hoc  
 (porównanie każdej kolumny z kontrolą)

**Z9 vs COX-2 - stężenie PGF<sub>2α</sub>**

Stężenie związku Z9

\*  $p \leq 0,05$   
 \*\*  $p \leq 0,01$

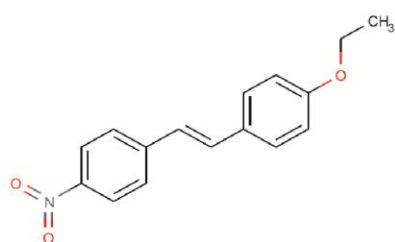
Metoda statystyczna:  
 jednoczynnikowa analiza wariancji  
 (one-way ANOVA)  
 z testem Dunnetta post hoc  
 (porównanie każdej kolumny z kontrolą)

## WYKRES 12.4

Wpływ związku **Z9** na aktywność **COX-1** oraz **COX-2** wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów ( $\pm$ SD).

Parametry aktywności biologicznej testowanej cząsteczki **Z9** zaprezentowano na stronie 132 oraz na WYKRESIE 12.5.

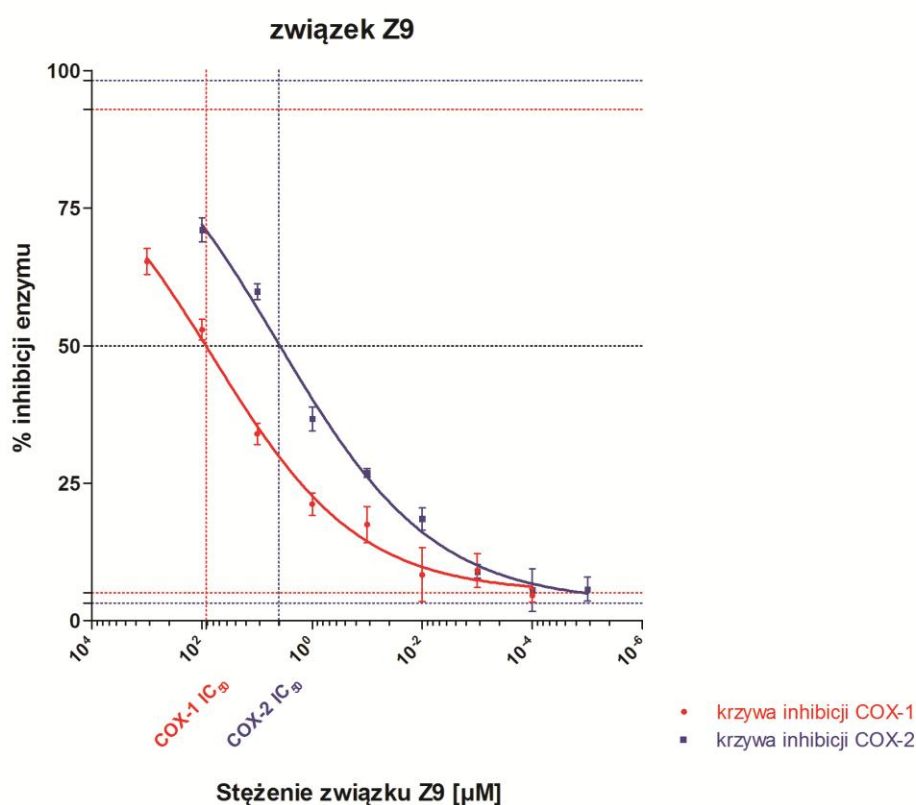


COX-1 IC<sub>50</sub> = **84,980 μM** (95% CI: 35,892 - 244,343 μM)

COX-2 IC<sub>50</sub> = **4,017 μM** (95% CI: 2,280 - 7,586 μM)

selektywność  
COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**21,16**  
(95% CI: 15,74 - 32,21)



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie związku Z9} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 5,09 % (-1,46; 11,64)  
 B = 0,33 (0,19; 0,47)  
 C = 64,61 μM (29,56; 74,24)  
 D = 92,93 % (80,39; 105,47)

R<sup>2</sup> = 0,9764  
 R = 0,9881

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

A = 3,22 % (-3,75; 10,19)  
 B = 0,31 (0,23; 0,39)  
 C = 4,28 μM (0,55; 8,01)  
 D = 98,21 % (92,55; 103,87)

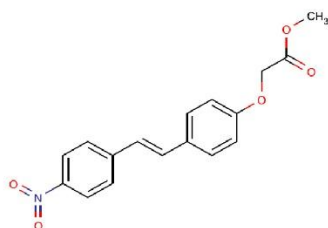
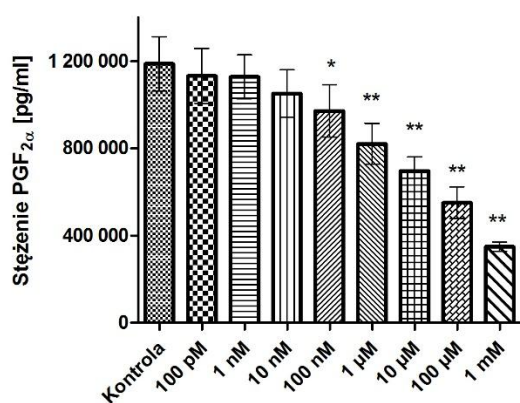
R<sup>2</sup> = 0,9889  
 R = 0,9944

#### WYKRES 12.5

Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek **Z9**.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).



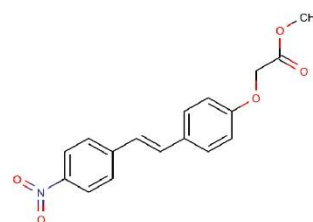
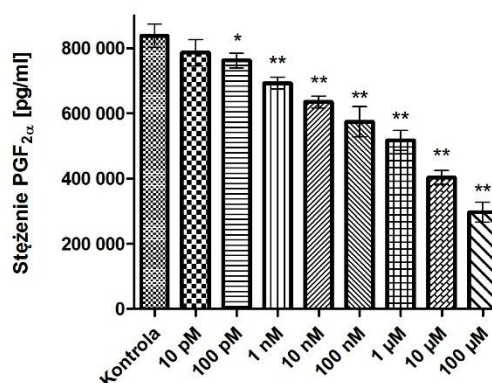
Związek nr **Z11****Z11 vs COX-1 - stężenie PGF<sub>2α</sub>**

Stężenie związku Z11

\* p ≤ 0,05

\*\* p ≤ 0,01

Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

**Z11 vs COX-2 - stężenie PGF<sub>2α</sub>**

Stężenie związku Z11

\* p ≤ 0,05

\*\* p ≤ 0,01

Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

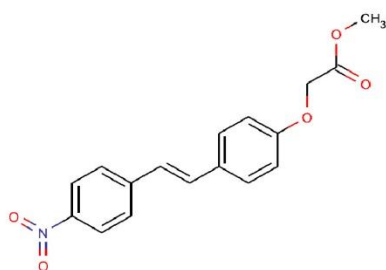
## WYKRES 12.6

Wpływ związku **Z11** na aktywność **COX-1** oraz **COX-2** wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (±SD).

Testowana cząsteczka **Z11** charakteryzuje się następującymi parametrami aktywności biologicznej [157–159]:

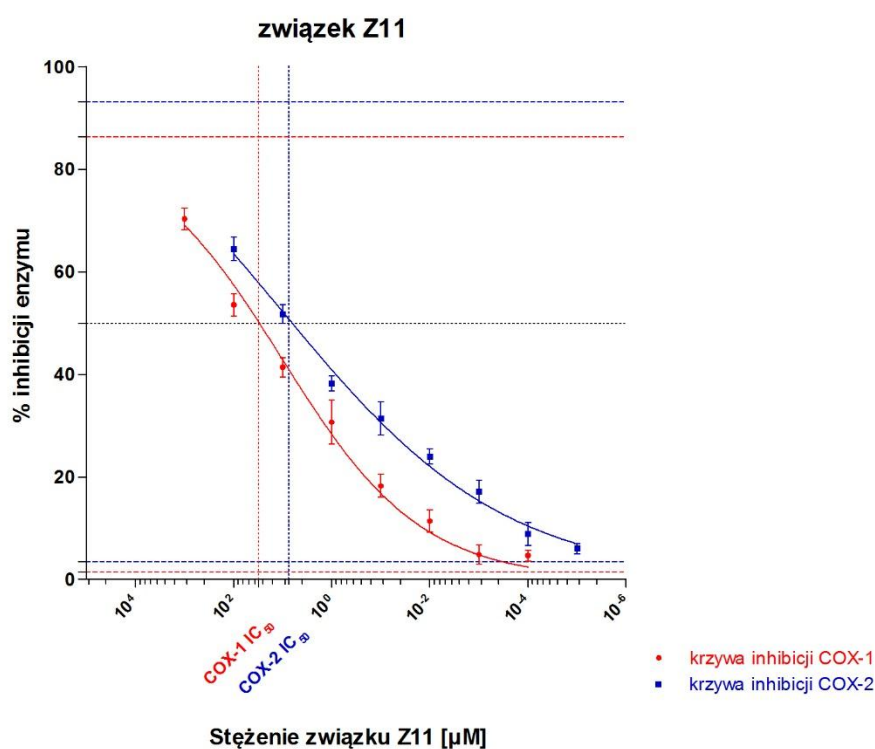
- COX-1 IC<sub>50</sub>: **30,830 μmol/l** (95% CI: 17,579 – 61,376)
- COX-2 IC<sub>50</sub>: **7,461 μmol/l** (95% CI: 4,613 – 12,162)
- selektywność względem COX-2: **4,13** (95% CI: 3,81 – 5,05)



COX-1 IC<sub>50</sub> = **30,830 μM** (95% CI: 17,579 - 61,376 μM)  
 COX-2 IC<sub>50</sub> = **7,461 μM** (95% CI: 4,613 - 12,162 μM)

selektywność  
 COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**4,13**  
 (95% CI: 3,81 - 5,05)



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie związku Z11} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 1,46 % (-2,77; 5,69)  
 B = 0,31 (0,19; 0,43)  
 C = 10,45 μM (4,78; 16,12)  
 D = 86,29 % (77,94; 94,64)

R<sup>2</sup> = 0,9912  
 R = 0,9956

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

A = 3,53 % (-1,61; 8,14)  
 B = 0,19 (0,04; 0,34)  
 C = 3,66 μM (1,34; 5,98)  
 D = 93,06 % (87,41; 98,71)

R<sup>2</sup> = 0,9905  
 R = 0,9952

WYKRES 12.7

Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek **Z11**.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).

### 12.1.3. Podsumowanie ETAPU I

Spośród 25 badanych związków wyselekcjonowano tylko trzy pochodne *trans*-stilbenu (**Z5**, **Z9** i **Z11**), które wykazywały umiarkowaną siłę działania ( $IC_{50} < 100 \mu\text{mol/l}$ ) i minimalną selektywność wobec COX-2 ( $COX-1 IC_{50} / COX-2 IC_{50} > 4$ ). Potencjalnie najlepszym związkiem okazał się 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilben (**Z9**), który hamował aktywność COX-2 ponad 20-krotnie silniej niż izoformę COX-1.

Dane dotyczące biologicznej aktywności wyselekcjonowanych cząsteczek zostały wykorzystane w kolejnym etapie badań, którego celem było komputerowe wyznaczenie zależności struktura-aktywność oraz wytypowanie nowych pochodnych *trans*-stilbenu o potencjalnej zdolności do hamowania aktywności COX-2.

## 12.2. Analiza 2D QSAR (ETAP II)

W analizie wykorzystano łącznie 40 pochodnych *trans*-stilbenu – trzy związki pochodzące z własnej syntezy (**Z5**, **Z9** i **Z11**) oraz 37 cząsteczek pochodzących z przeglądu literatury. Dane dotyczące budowy i aktywności tych cząsteczek przedstawiono w ROZDZIALE 8.2.

Zależność 2D QSAR wyznaczono stosując podstawowe metody matematyczno-statystyczne (SLR, MLR i PCA) oraz dedykowane oprogramowanie do obliczania wartości deskryptorów molekularnych (ROZDZIAŁ 8.3).

### 12.2.1. Prosta regresja liniowa (SLR)

Celem badania było określenie prostoliniowej i jednowymiarowej zależności między aktywnością biologiczną a podstawowymi deskryptorami molekularnymi testowanych związków.

Obliczenia przeprowadzono po przekształceniu wartości  $IC_{50}$  do postaci logarytmicznej  $pIC_{50}$  ( $-\log IC_{50}$ ), dzięki czemu zminimalizowano potencjalny błąd, jaki mógłby powstać przy wyznaczaniu zależności struktura-aktywność [140].

Ponadto, dla każdego równania wykonano *test istotności statystycznej współczynnika korelacji liniowej* (opis testu przedstawiono w SUPLEMENCIE).

W oparciu o uzyskane dane wyselekcjonowano modele 2D QSAR, które charakteryzują się równaniami liniowymi o najwyższej korelacji i akceptowalnymi parametrami walidacji [103].

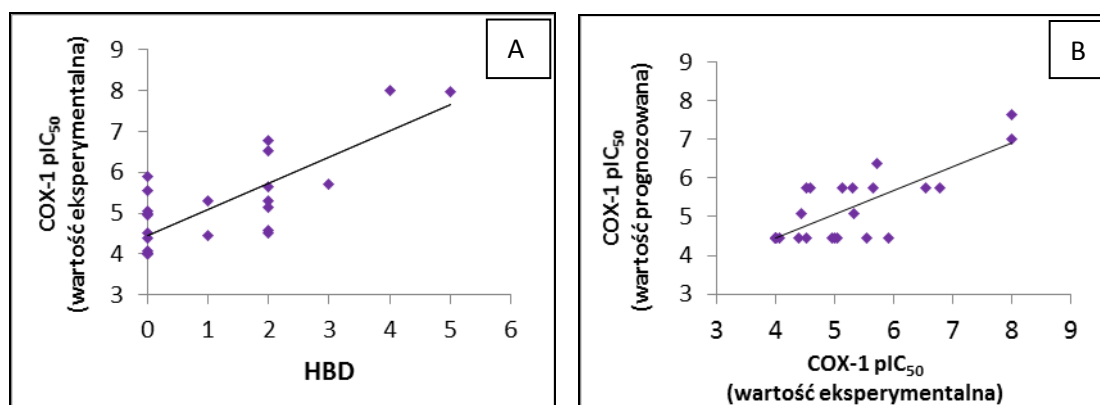
### **Wyznaczanie zależności pomiędzy deskryptorami molekularnymi a COX-1 $pIC_{50}$ [157; 159; 160]**

W toku przeprowadzonej analizy najlepsze wyniki uzyskano dla modeli zawierających następujące deskryptory: HBD, ClogP, logD (pH = 7,4), MR, TPSA oraz VdWSA.

***HBD vs COX-1 pIC<sub>50</sub>***

- zestaw związków treningowych (n = 25)
- zestaw związków testowych (n = 9)
- wzór równania liniowego ( $\pm 95\%$  CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-1 pIC}_{50} = 0,636 (\pm 0,218) * \text{HBD} + 4,462 (\pm 0,390)$$

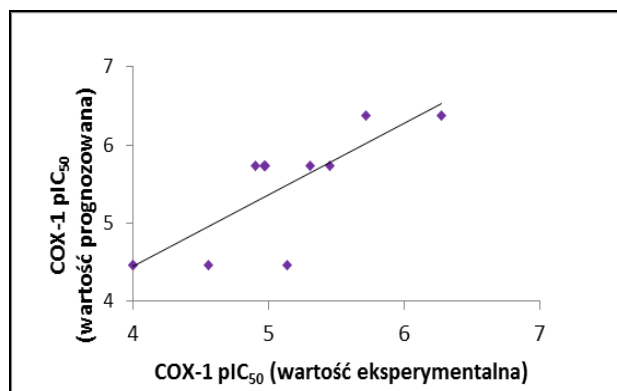


WYKRES 12.8

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC<sub>50</sub> a HBD, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $\text{COX-1 pIC}_{50} = f(\text{HBD})$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,613 (0,783)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,542 (0,736) \rightarrow$  walidacja wewnętrzna:  
parametr wyznaczony za pomocą walidacji krzyżowej  $k-1$  – metoda LOO
  - $DF = 23$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 35,456
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $3,704 * 10^{-6}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,037 > t_{kr} = 2,069$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.9

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}}$  ( $R_{\text{pred, test}}$ ) = 0,668 (0,817) – określenie determinancji (korelacji) między wartościami doświadczalnymi a predykcjami dla związków tworzących zestaw testowy;
- $Q^2_{\text{cv, external}}$  ( $Q_{\text{cv, external}}$ ) = 0,300 (0,548) → walidacja zewnętrzna – w oparciu o wyniki predykcji dla zestawu testowego.

Parametry  $R^2_{\text{pred, test}}$  oraz  $Q^2_{\text{cv, external}}$  wyznaczono wg wzorów zamieszczonych w ROZDZIALE 3.6.4.

#### ***Interpretacja modelu:***

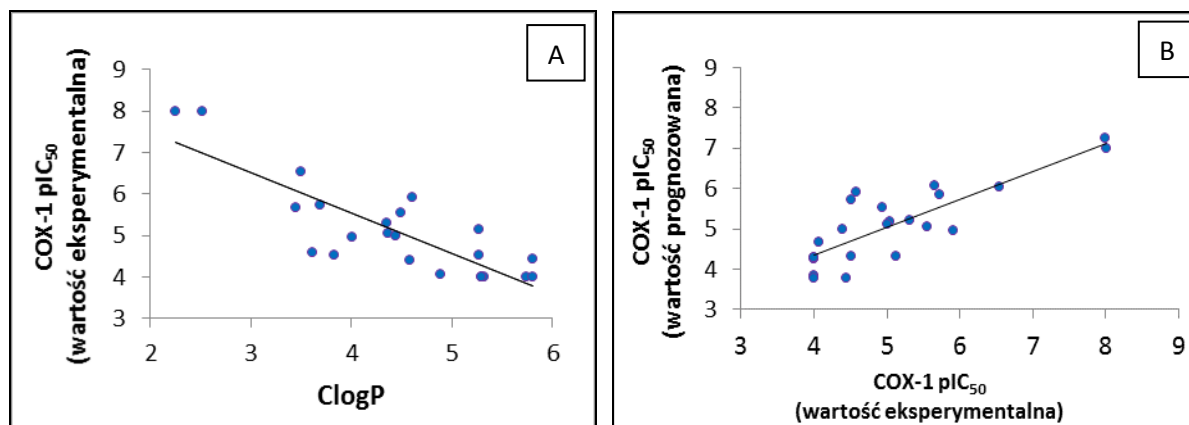
Związki o większej liczbie wiązań wodorowych (bardziej polarne, o większej liczbie grup –OH) charakteryzują się wyższymi wartościami parametru COX-1 pIC<sub>50</sub>, dlatego silniej hamują aktywność COX-1.

Niska wartość parametru walidacji zewnętrznej ( $Q^2_{\text{cv, external}} < 0,5$ ) świadczy o dość słabym dopasowaniu modelu i dlatego nie jest on zalecany w dalszych obliczeniach do przewidywania aktywności wobec COX-1.

#### **ClogP vs COX-1 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 23)
- zestaw związków testowych (n = 12)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-1 pIC}_{50} = -0,978 (\pm 0,293) * \text{ClogP} + 9,458 (\pm 1,335)$$

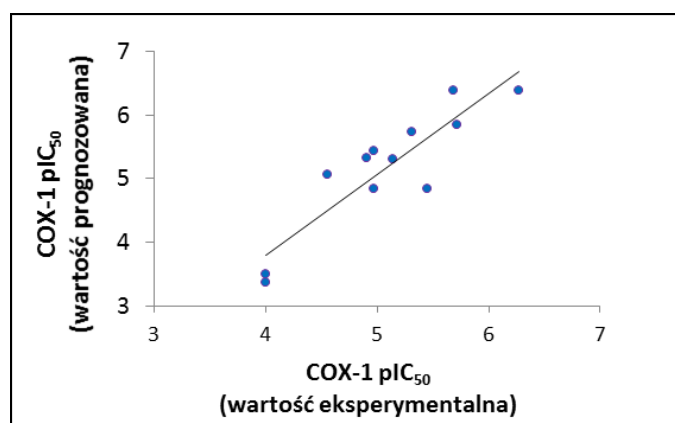


WYKRES 12.10

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC<sub>50</sub> a ClogP, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $COX-1\ pIC_{50} = f(ClogP)$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,697 (-0,835)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,621 (0,788)$
  - $DF = 21$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 48,199
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $7,389 \cdot 10^{-7}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) = 6,943 >  $t_{kr} = 2,080$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.11

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,804 (0,897)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,505 (0,710)$

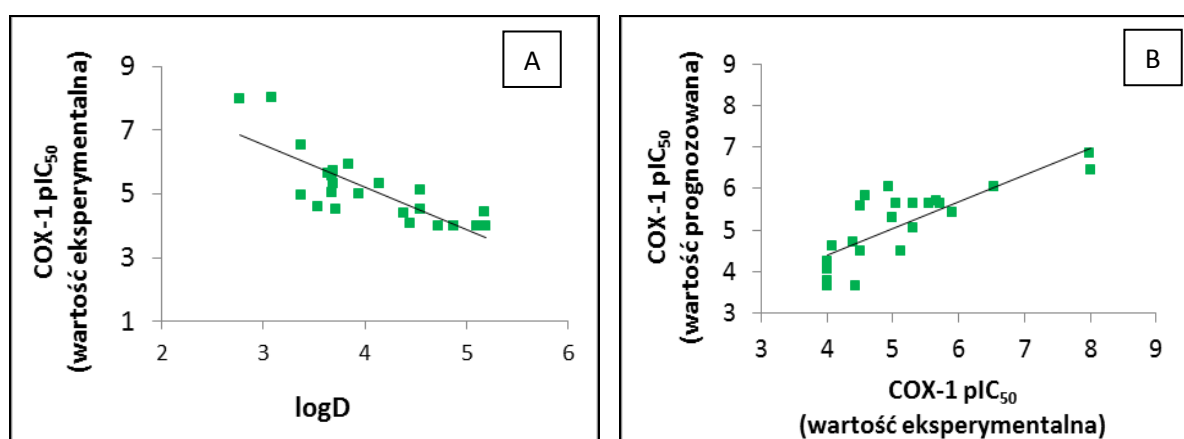
**Interpretacja modelu:**

Związki o wyższej wartości ClogP (bardziej lipofilne, mniej polarne) cechują się niższymi wartościami parametru COX-1 pIC<sub>50</sub>, dlatego są słabszymi inhibitorami COX-1.

**logD vs COX-1 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 24)
- zestaw związków testowych (n = 11)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-1 pIC}_{50} = -1,324 (\pm 0,434) * \log D + 10,516 (\pm 1,799)$$

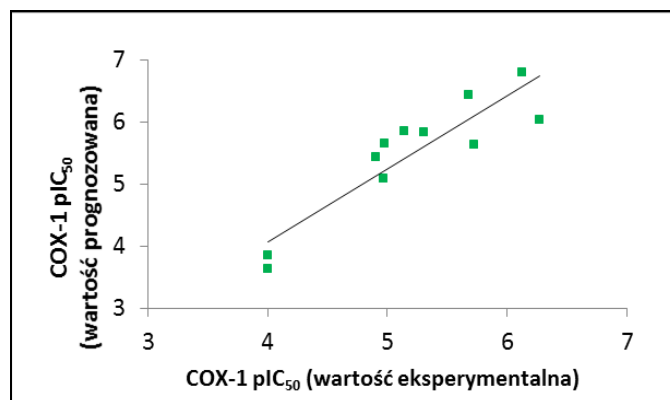


WYKRES 12.12

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC<sub>50</sub> a logD, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $\text{COX-1 pIC}_{50} = f(\log D)$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,665 (-0,803)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,555 (0,765)$
  - $DF = 22$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 39,878
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $2,352 * 10^{-6}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) = 6,315 >  $t_{kr} = 2,073$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.13

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,821 (0,906)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,511 (0,715)$

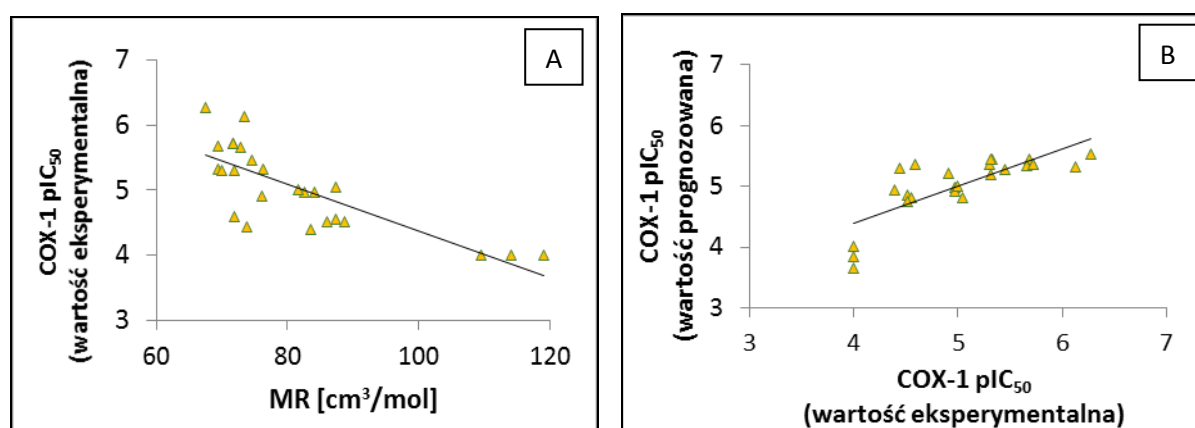
#### **Interpretacja modelu:**

Związki o wyższej wartości logD (bardziej lipofilne, mniej polarne) cechują się niższymi wartościami parametru COX-1 pIC<sub>50</sub>, dlatego są słabszymi inhibitorami COX-1. Zależność ta jest silniejsza niż w przypadku deskryptora ClogP.

#### **MR vs COX-1 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 25)
- zestaw związków testowych (n = 11)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-1 pIC}_{50} = -0,036 (\pm 0,012) * \text{MR} + 7,952 (\pm 1,021)$$



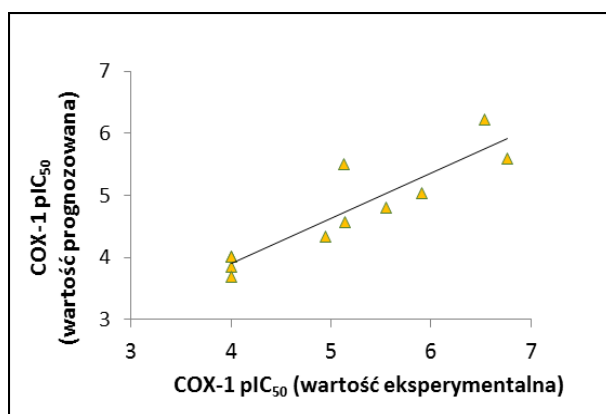
WYKRES 12.14

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC<sub>50</sub> a MR, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $\text{COX-1 pIC}_{50} = f(\text{MR})$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.



- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,610 (-0,781)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,553 (0,743)$
  - $DF = 23$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 36,023
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $4,040 * 10^{-6}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,002 > t_{kr} = 2,068$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.15

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,820 (0,906)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,908 (0,953)$

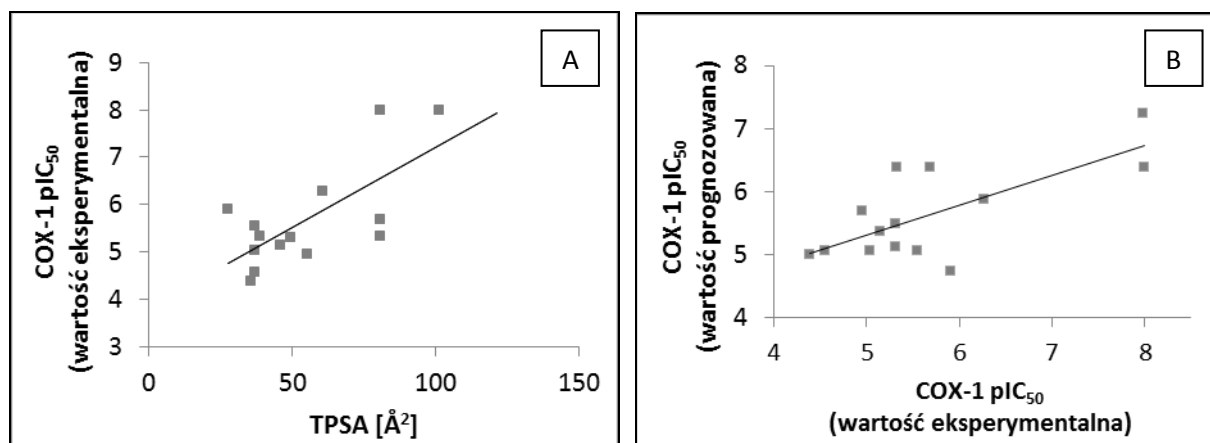
### ***Interpretacja modelu:***

Związki o wyższej wartości MR (większa masa i objętość molowa, silniejsza polaryzowalność w polu elektromagnetycznym) cechują się niższymi wartościami parametru COX-1 pIC<sub>50</sub>, dlatego są słabszymi inhibitorami COX-1.

### **TPSA vs COX-1 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 14)
- zestaw związków testowych (n = 13)
- wzór równania liniowego ( $\pm 95\%$  CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-1 pIC}_{50} = 0,034 (\pm 0,022) * \text{TPSA} + 3,804 (\pm 1,288)$$

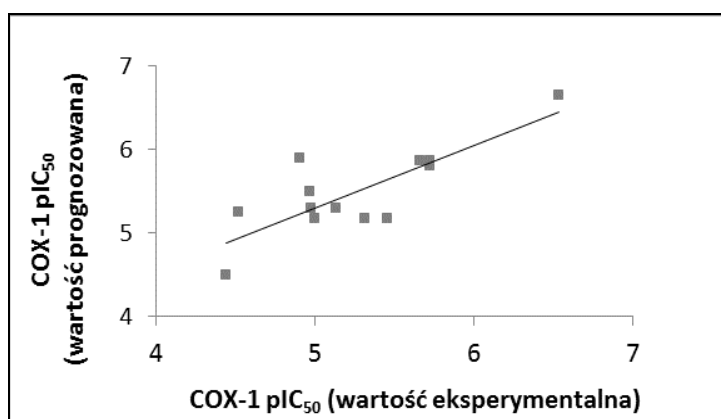


WYKRES 12.16

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC<sub>50</sub> a TPSA, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru COX-1 pIC<sub>50</sub> = f (TPSA).

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,503 (0,709)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,263 (0,513)$
  - DF = 12
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 11,573
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) = 0,005
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) = 3,402 >  $t_{kr} = 2,179$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.17

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,653 (0,808)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,651 (0,807)$

**Interpretacja modelu:**

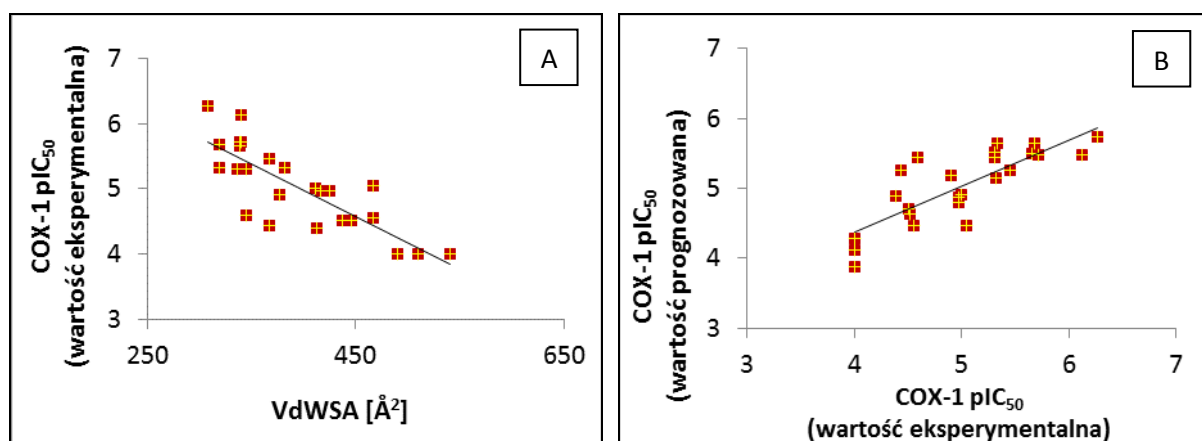
Związki o wyższej wartości TPSA (więcej grup polarnych zawierających atomy tlenu, siarki, azotu; większa polarna powierzchnia cząsteczki) cechują się wyższymi wartościami parametru COX-1  $pIC_{50}$ , dlatego wydają się być silniejszymi inhibitorami COX-1.

Niska wartość parametru walidacji wewnętrznej ( $Q^2_{cv, internal} < 0,3$ ) świadczy o dość słabym dopasowaniu modelu i dlatego nie jest on zalecany w dalszych obliczeniach do przewidywania aktywności wobec COX-1.

**VdWSA vs COX-1  $pIC_{50}$** 

- zestaw związków treningowych (n = 25)
- zestaw związków testowych (n = 13)
- wzór równania liniowego ( $\pm 95\%$  CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-1 } pIC_{50} = -0,008 (\pm 0,002) * \text{VdWSA} + 8,203 (\pm 0,986)$$



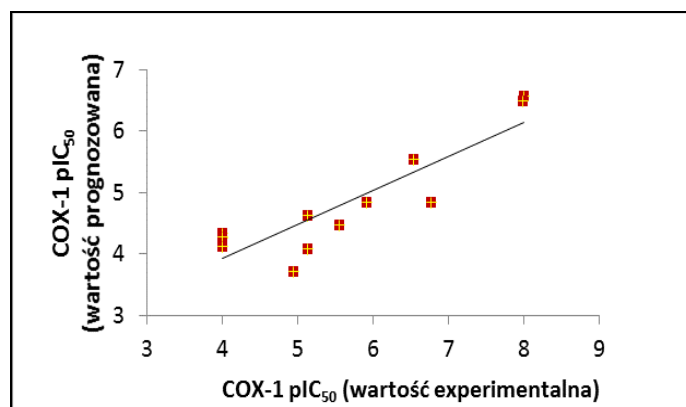
WYKRES 12.18

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1  $pIC_{50}$  a VdWSA, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $\text{COX-1 } pIC_{50} = f(\text{VdWSA})$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1  $pIC_{50}$  dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,664 (-0,815)$
  - $Q^2_{cv, internal} (Q_{cv, internal}) = 0,618 (0,782)$
  - $DF = 23$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 45,429
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $7,104 * 10^{-7}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,740 > t_{kr} = 2,069$

- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.19

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,785 (0,886)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,487 (0,698)$

#### ***Interpretacja modelu:***

Związki o wyższej wartości VdWSA (większa powierzchnia cząsteczki biorąca udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych typu Van der Waals'a) charakteryzują się niższymi wartościami parametru COX-1 pIC<sub>50</sub>, dlatego wydają się być słabszymi inhibitorami COX-1.

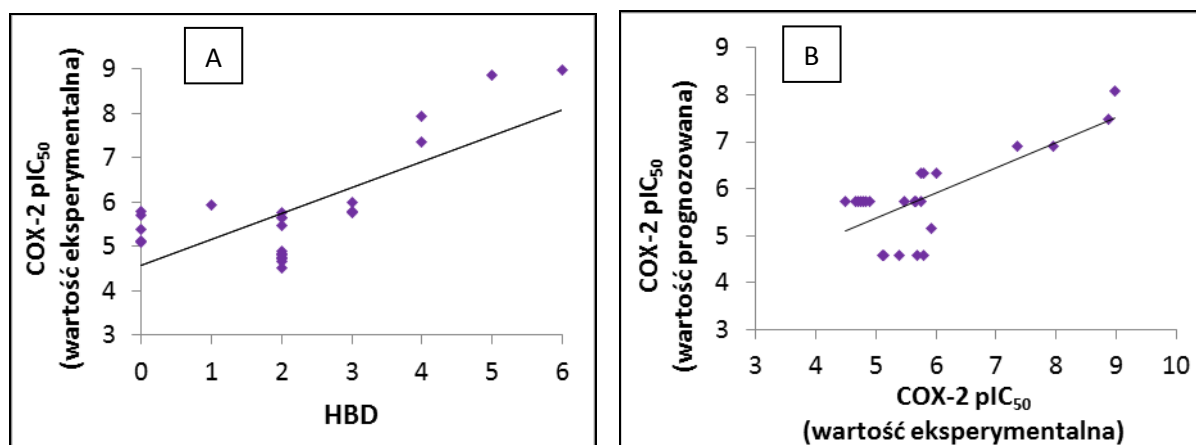
#### **Wyznaczanie zależności pomiędzy deskryptorami molekularnymi a COX-2 IC<sub>50</sub> [157; 159; 160]**

W wyniku przeprowadzonej analizy najlepsze rezultaty uzyskano dla modeli zawierających następujące deskryptory: HBD, ClogP oraz TPSA.

#### **HBD vs COX-2 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 24)
- zestaw związków testowych (n = 7)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-2 pIC}_{50} = 0,583 (\pm 0,239) * \text{HBD} + 4,457 (\pm 0,627)$$

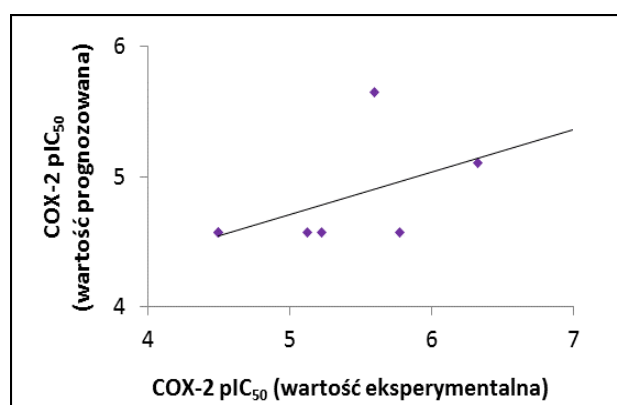


WYKRES 12.20

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC<sub>50</sub> a HBD, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $COX-2 pIC_{50} = f(HBD)$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,538 (0,734)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,425 (0,652)$
  - $DF = 22$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 25,615
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $4,543 \cdot 10^{-5}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) = 5,061 >  $t_{kr} = 2,074$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.21

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,269 (0,518)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,189 (0,438)$

**Interpretacja modelu:**

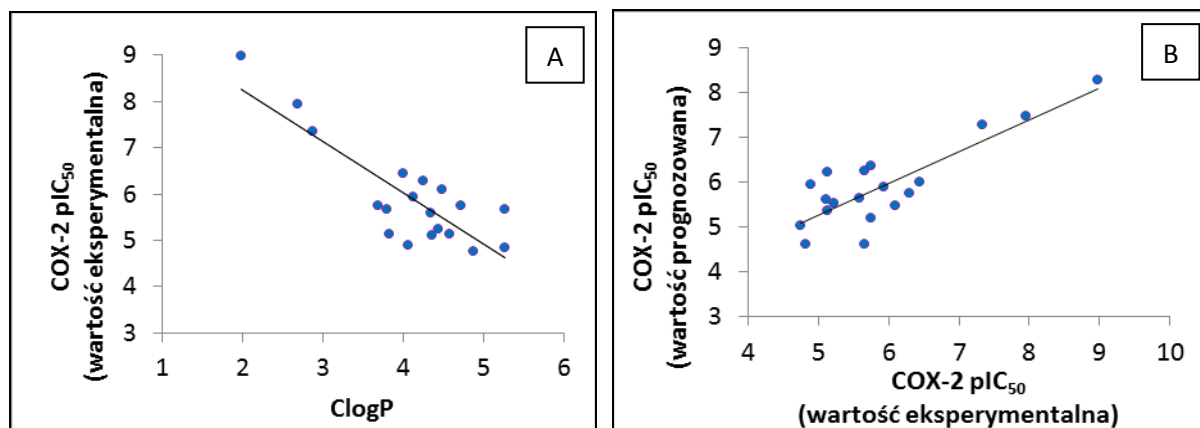
Związki o większej liczbie wiązań wodorowych (bardziej polarne, o większej liczbie grup –OH) charakteryzują się wyższymi wartościami parametru COX-1  $pIC_{50}$ , dlatego powinny silniej hamować aktywność COX-2.

Niska wartość parametrów dla zestawu testowego ( $R^2_{pred, test}$  oraz  $Q^2_{cv, external} < 0,3$ ) świadczy o niewystarczającej mocy predykcyjnej utworzonego modelu (słaba korelacja między wynikami doświadczalnymi i prognozowanymi) i dlatego nie jest on zalecany w dalszych obliczeniach do przewidywania aktywności wobec COX-2.

**ClogP vs COX-2  $pIC_{50}$** 

- zestaw związków treningowych (n = 19)
- zestaw związków testowych (n = 10)
- wzór równania liniowego ( $\pm 95\%$  CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$COX-2 pIC_{50} = -0,923 (\pm 0,368) * ClogP + 9,763 (\pm 1,535)$$



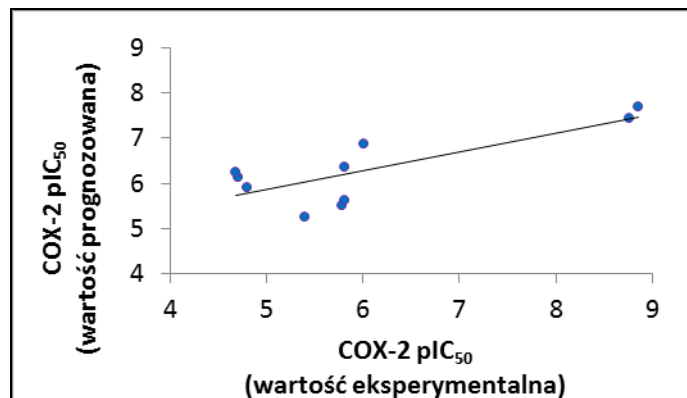
WYKRES 12.22

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2  $pIC_{50}$  a ClogP, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $COX-2 pIC_{50} = f(ClogP)$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2  $pIC_{50}$  dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{treningowe} (R_{treningowe}) = 0,704 (-0,839)$
  - $Q^2_{cv, internal} (Q_{cv, internal}) = 0,633 (0,793)$
  - $DF = 17$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 40,472
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $7,091 * 10^{-6}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,362 > t_{kr} = 2,110$

- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.23

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,622 (0,789)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,564 (0,751)$

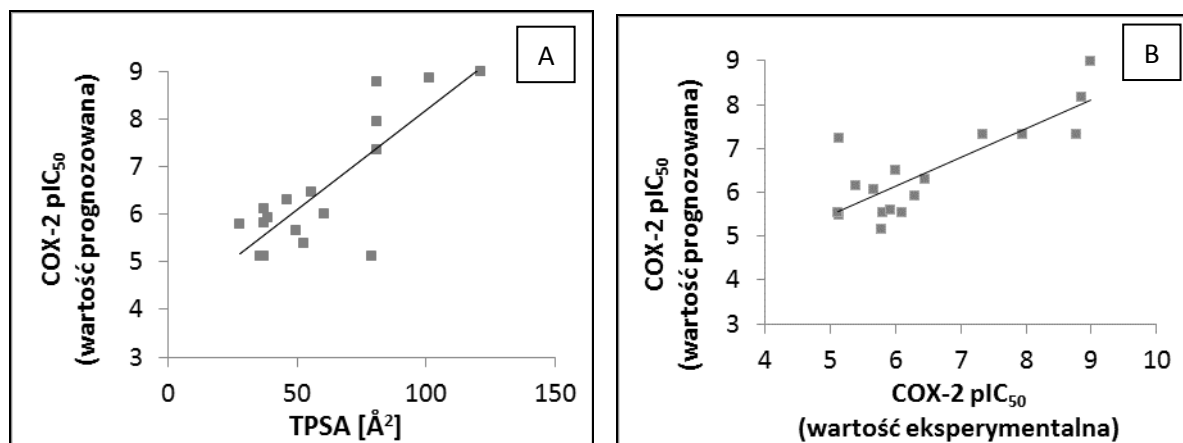
#### ***Interpretacja modelu:***

Związki o wyższej wartości ClogP (bardziej lipofilne, mniej polarne) cechują się niższymi wartościami parametru COX-2 pIC<sub>50</sub>, dlatego powinny wykazywać słabszą zdolność do hamowania aktywności COX-2.

#### **TPSA vs COX-2 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 17)
- zestaw związków testowych (n = 12)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy:

$$\text{COX-2 pIC}_{50} = 0,042 (\pm 0,016) * \text{TPSA} + 4,010 (\pm 1,060)$$

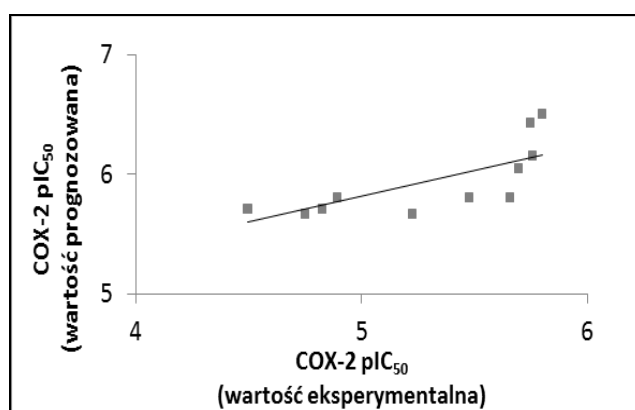


WYKRES 12.24

A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC<sub>50</sub> a TPSA, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $COX-2 pIC_{50} = f(TPSA)$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,666 (0,816)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,591 (0,769)$
  - $DF = 15$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 29,885
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,499 \cdot 10^{-5}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $5,468 > t_{kr} = 2,131$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.25

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,555 (0,745)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,690 (0,831)$



**Interpretacja modelu:**

Związki o wyższej wartości TPSA (więcej grup polarnych zawierających atomy tlenu, siarki, azotu; większa polarna powierzchnia cząsteczki) cechują się wyższymi wartościami parametru COX-2 pIC<sub>50</sub>, dlatego wydają się być silniejszymi inhibitorami COX-2.

**12.2.2. Wieloraka regresja liniowa (MLR)**

Celem analizy było określenie prostoliniowej i jednocześnie wielowymiarowej zależności między aktywnością biologiczną a podstawowymi deskryptorami molekularnymi testowanych związków.

Obliczenia wykonano po analogicznym przekształceniu wartości IC<sub>50</sub> do postaci logarymicznej pIC<sub>50</sub> (-logIC<sub>50</sub>) [140].

Ponadto dla każdego z równań wykonano *test istotności statystycznej współczynnika korelacji liniowej* (opis testu w SUPLEMENCIE).

W oparciu o uzyskane dane wyselekcjonowano modele 2D QSAR, które charakteryzują się równaniami liniowymi o najwyższej korelacji i akceptowalnymi parametrami walidacji [103].

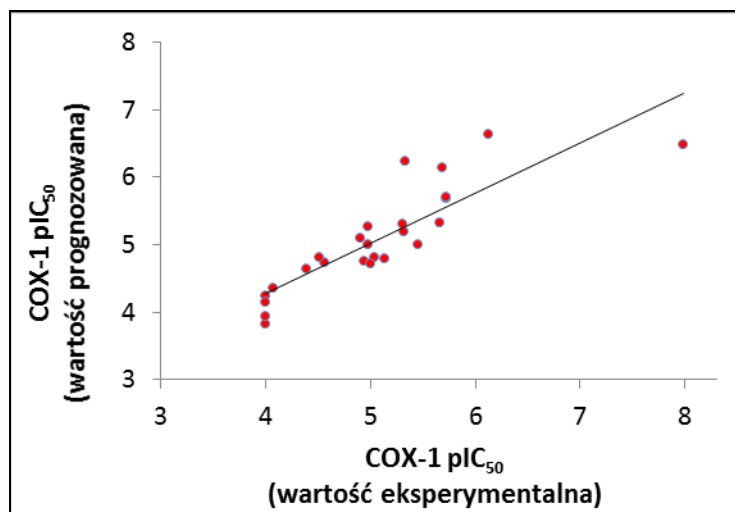
**Wyznaczanie zależności pomiędzy deskryptorami molekularnymi a COX-1 IC<sub>50</sub>** [159; 160]

W wyniku przeprowadzonej analizy najlepsze rezultaty uzyskano dla modelu zawierającego kombinację następujących deskryptorów: HBD, ClogP i TPSA.

**HBD + ClogP + TPSA vs COX-1 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 25)
- zestaw związków testowych (n = 13)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:

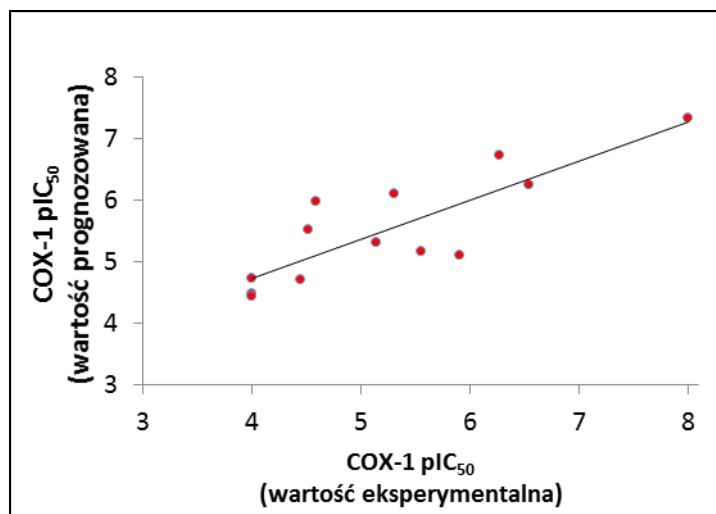
$$\text{COX-1 pIC}_{50} = 0,275 (\pm 0,237) * \text{HBD} - 0,538 (\pm 0,381) * \text{ClogP} - 0,013 (\pm 0,021) * \text{TPSA} + 7,641 (\pm 2,459)$$



WYKRES 12.26

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,743 (0,862)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,586 (0,766)$
  - $DF = 23$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 20,234
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,060 \cdot 10^{-8}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $8,154 > t_{kr} = 2,069$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.27

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,770 (0,877)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,669 (0,818)$

### ***Interpretacja modelu:***

W oparciu o wyniki wielorakiej regresji liniowej stwierdzono, że wyższymi wartościami parametru COX-1 pIC<sub>50</sub>, czyli silniejszą zdolnością do hamowania aktywności COX-1, powinny cechować się związki posiadające jednocześnie:

- większą liczbę wiązań wodorowych,
- niższą wartość ClogP,
- niższą wartość TPSA.

Tego rodzaju związki posiadają więcej grup -OH i są mniej lipofilowe, ale z drugiej strony charakteryzują się mniejszym udziałem powierzchni polarnej w stosunku do całkowitej powierzchni cząsteczki.

W odniesieniu do HBD i ClogP – rezultaty są zgodne z wynikami uzyskanymi za pomocą modelu prostoliniowej regresji liniowej.

W przypadku TPSA – wyniki otrzymane za pomocą modelu MLR są odwrotne niż w modelu SLR. Jednakże modelu SLR nie należy wykorzystywać do prognozowania aktywności potencjach inhibitorów COX-1 z uwagi na nieakceptowalne parametry walidacyjne.

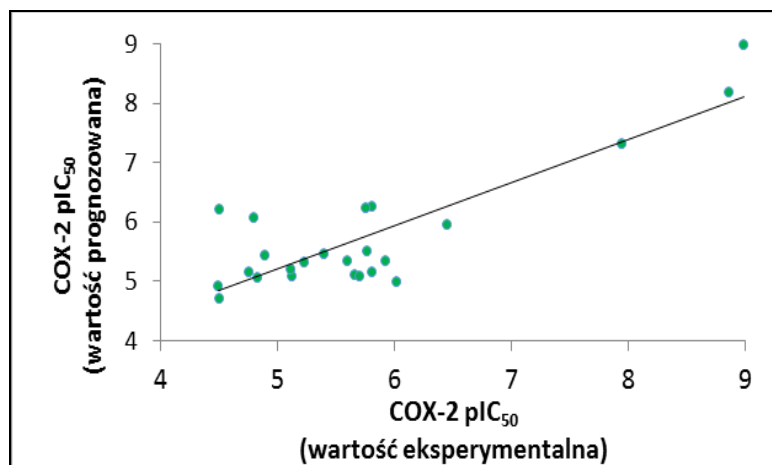
### **Wyznaczanie zależności pomiędzy deskryptorami molekularnymi a COX-2 IC<sub>50</sub>** [159; 160]

W wyniku przeprowadzonej analizy najlepsze wyniki uzyskano dla modelu zawierającego kombinację następujących deskryptorów: HBD, ClogP i TPSA.

#### **ClogP + TPSA vs COX-2 pIC<sub>50</sub>**

- zestaw związków treningowych (n = 24)
- zestaw związków testowych (n = 8)
- wzór równania liniowego (±95% CI) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>:

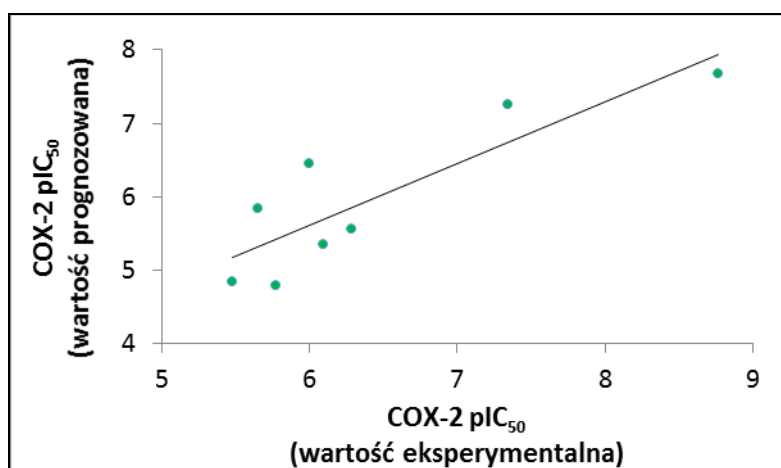
$$\text{COX-2 pIC}_{50} = -0,362 (\pm 0,524) * \text{ClogP} + 0,034 (\pm 0,025) * \text{TPSA} + 5,502 (\pm 3,511)$$



WYKRES 12.28

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,728 (0,853)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,666 (0,816)$
  - $DF = 22$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 28,142
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $1,576 \cdot 10^{-7}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) = 7,679 >  $t_{kr} = 2,074$
- weryfikacja modelu – w oparciu o zestaw testowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.29

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,746 (0,864)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,677 (0,823)$

**Interpretacja modelu:**

W oparciu o wyniki wielorakiej regresji liniowej stwierdzono, że wyższymi wartościami parametru COX-2 pIC<sub>50</sub>, czyli silniejszą zdolnością do hamowania aktywności COX-2, powinny cechować się związki posiadające jednocześnie:

- mniejszą wartość ClogP,
- większą wartość TPSA.

Tego rodzaju związki są mniej lipofilowe i charakteryzują się większą powierzchnią polarną (w cząsteczce jest więcej atomów i grup polarnych, takich jak O, N, -OH, -NO<sub>2</sub>).

W odniesieniu zarówno do ClogP jak i TPSA – wnioski są analogiczne do wyników uzyskanych za pomocą modelu prostoliniowej regresji liniowej.

**12.2.3. Analiza głównych składowych (PCA)**

Obliczenia wykonane metodą PCA, podobnie jak z zastosowaniem SLR i MLR, polegały na wyznaczeniu optymalnej zależności między aktywnością biologiczną (wyrażoną jako COX-1 pIC<sub>50</sub> lub COX-2 pIC<sub>50</sub>) a podstawowymi deskryptorami badanych związków. W odróżnieniu od poprzednio zastosowanych metod, zależność ta określana była za pomocą nowej zmiennej – tzw. głównej składowej (głównego czynnika), który odzwierciedlał dane zawarte w pierwotnie wykorzystywanych deskryptorach 1D i 2D.

**PCA – model określający aktywność potencjalnych inhibitorów COX-1 [159]**

- zestaw związków treningowych (n = 24)
- zestaw związków testowych (n = 14)
- deskryptory wykorzystane do obliczeń (6): HBD, ClogP, MR, VdWSA, TPSA i W.

*Ocena zasadności przeprowadzenia obliczeń metodą PCA:*

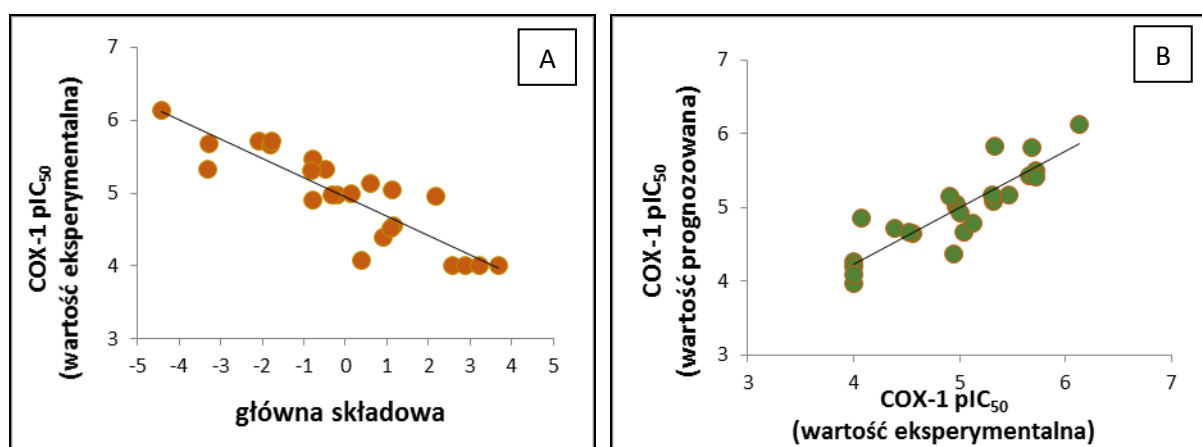
- test Bartletta (weryfikacji hipotezy o tym, że współczynniki korelacji pomiędzy deskryptorami są zerowe): wartość  $p$  ( $\alpha = 0,05$ )  $< 0,00001$ , co stanowi podstawę do odrzucenia tej hipotezy:  
→ istnieje silna korelacja między deskryptorami i zasadne jest przeprowadzenie obliczeń metodą PCA w celu redukcji ilości zmiennych (tzn. przekształcenia deskryptorów w postać głównych składowych);
- współczynnik Kaisera-Mayera-Olkina: 0,72  
→ wartość  $> 0,5$  świadczy o korelacji między deskryptorami, co również uzasadnia wykonanie PCA.

Wyniki analizy – zestaw treningowy:

- ilość wyznaczonych składowych: 6;
- ilość głównych składowych wytypowana do obliczeń: 1;
- wzór równania liniowego ( $\pm 95\%$  przedział ufności) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:

$$\text{COX-1 pIC}_{50} = -0,264 (\pm 0,064) * \text{główna składowa} + 4,952 (\pm 0,132)$$

$$\begin{aligned} \text{główna składowa} = & -0,255 (\pm 0,001) * \text{HBD} + 0,429 (\pm 0,001) * \text{ClogP} \\ & + 0,027 (\pm 0,001) * \text{MR} - 0,018 (\pm 0,001) * \text{TPSA} + 0,006 (\pm 0,001) * \text{VdWSA} \\ & + 0,002 (\pm 0,001) * \text{W} - 6,502 (\pm 0,003) \end{aligned}$$



WYKRES 12.30

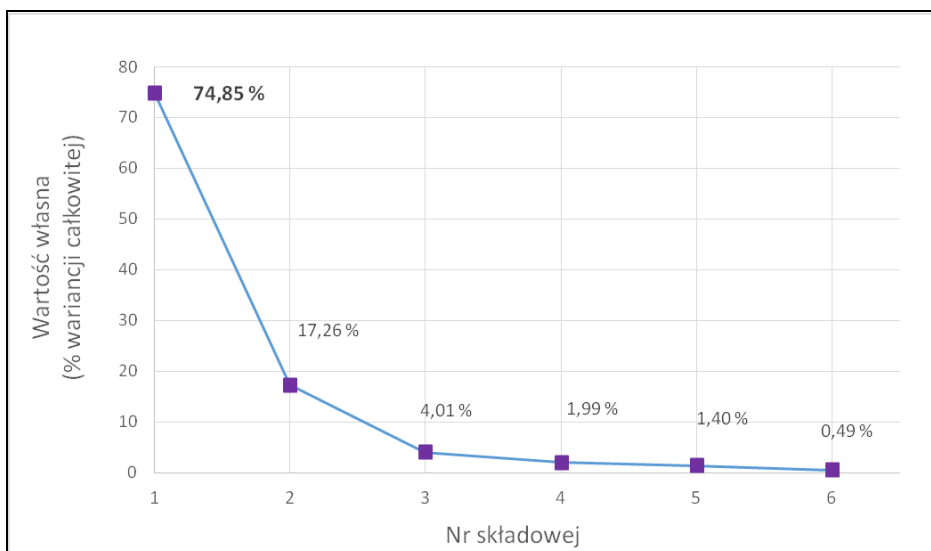
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC<sub>50</sub> a główną składową, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $\text{COX-1 pIC}_{50} = f(\text{główna składowa})$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,770 (-0,877)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,732 (0,856)$
  - $DF = 22$
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 73,589
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $1,818 * 10^{-8}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $8,578 > t_{kr} = 2,074$

Charakterystyka głównej składowej (składowa nr 1):

- wartość własna głównej składowej:  $4,49 : 6 = 74,85\%$  wariancji całkowitej



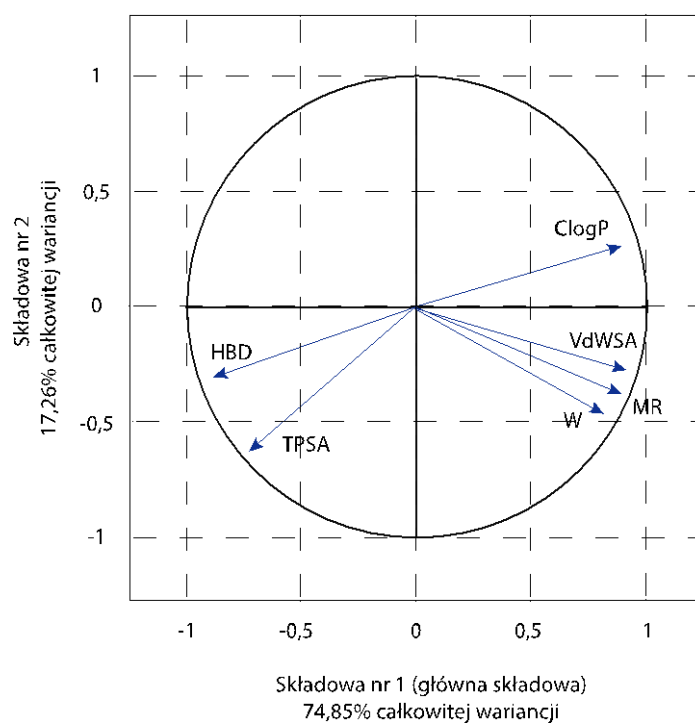
WYKRES 12.31

Wykres osypiska przedstawiający wartości własne poszczególnych składowych (główna składowa oznaczona jest cyfrą 1).

Jako główna składowa do kolejnych obliczeń została wytypowana tylko składowa nr 1.

- ładunki czynnikowe poszczególnych deskryptorów – współczynniki korelacji z główną składową i składową nr 2 (odzwierciedlenie wpływu deskryptorów na wartość składowych):

Nazwa deskryptora	Współczynnik korelacji z główną składową	Współczynnik korelacji ze składową nr 2
HBD	<b>-0,8855</b>	-0,3094
ClogP	<b>0,8925</b>	0,2683
MR	<b>0,8992</b>	-0,3820
VdWSA	<b>0,9242</b>	-0,2714
TPSA	<b>-0,7418</b>	-0,6475
W	<b>0,8351</b>	-0,4782



WYKRES 12.32

Wykres kołowy ładunków czynnikowych na płaszczyźnie głównej składowej (składowa nr 1) oraz składowej nr 2.

Współrzędne końca wektora to wartość ładunku czynnikowego danego deskryptora wobec składowych nr 1 i 2.

Główna składowa wykazuje silną korelację ze wszystkimi sześcioma deskryptorami, przy czym zależność ta ma charakter odwrotnie proporcjonalny z HBD i TPSA.

W oparciu o wyznaczone równanie liniowe oraz wartości ładunków czynnikowych stwierdzono, że biologiczna aktywność badanych związków (wyrażona jako COX-1 pIC<sub>50</sub>) koreluje ujemnie z główną składową, a zatem wykazuje jednocześnie:

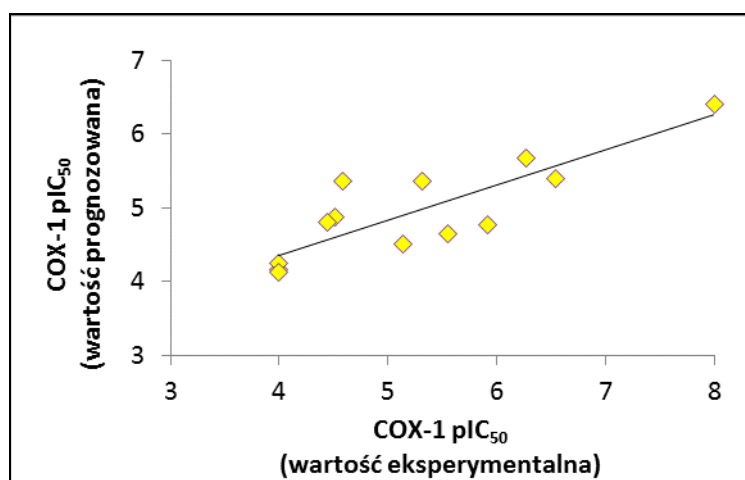
- dodatnią korelację z HBD i TPSA;
- ujemną korelację z ClogP, MR, VdWSA i W.

Uzyskane wyniki (charakter korelacji) są zgodne z danymi otrzymanymi w ramach obliczeń metodami SLR i MLR, przy czym analiza PCA dodatkowo uwzględnia zależność pomiędzy aktywnością biologiczną a tzw. indeksem Wienera (W).

*Weryfikacja modelu – zestaw testowy:*

- porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:





WYKRES 12.33

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,773 (0,879)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,619 (0,787)$

#### ***Interpretacja modelu:***

Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że silniejszymi inhibitorami COX-1 powinny być związki bardziej hydrofilowe, o polarnym charakterze, które posiadają więcej donorów wiązań wodorowych.

Ujemna korelacja z MR, VdWSA i W sugeruje, że związki małe, o niezbyt rozgałęzionej strukturze i mniejszej powierzchni oddziaływania z innymi cząsteczkami za pomocą sił Van der Waals'a – mogą cechować się większą zdolnością do hamowania aktywności COX-1 (wyższe wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>).

#### **PCA – model określający aktywność potencjalnych inhibitorów COX-2** [159]

- zestaw związków treningowych (n = 21)
- zestaw związków testowych (n = 10)
- deskryptory wykorzystane do obliczeń (4): HBD, ClogP, VdWSA i TPSA.

#### *Ocena zasadności przeprowadzenia obliczeń metodą PCA:*

- test Bartletta: wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) < 0,000001:
- współczynnik Kaisera-Mayera-Olkina: 0,75 → wartość > 0,5

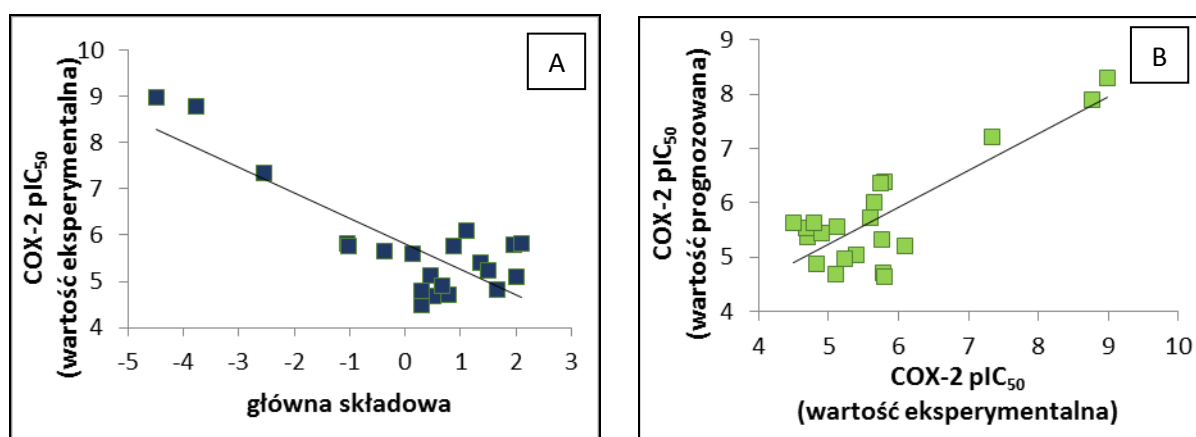
#### *Wyniki analizy – zestaw treningowy:*

- ilość wyznaczonych składowych: 4;
- ilość głównych składowych wytypowana do obliczeń: 1;

- wzór równania liniowego ( $\pm 95\%$  przedział ufności) – wyznaczony w oparciu o zestaw treningowy – porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC<sub>50</sub>:

$$\text{COX-2 pIC}_{50} = -0,554 (\pm 0,184) * \text{główna składowa} + 5,808 (\pm 0,326)$$

$$\begin{aligned} \text{główna składowa} = & -0,507 (\pm 0,166) * \text{HBD} + 0,958 (\pm 0,394) * \text{ClogP} \\ & - 0,007 (\pm 0,013) * \text{TPSA} + 0,003 (\pm 0,004) * \text{VdWSA} - 3,351 (\pm 0,497) \end{aligned}$$



WYKRES 12.34

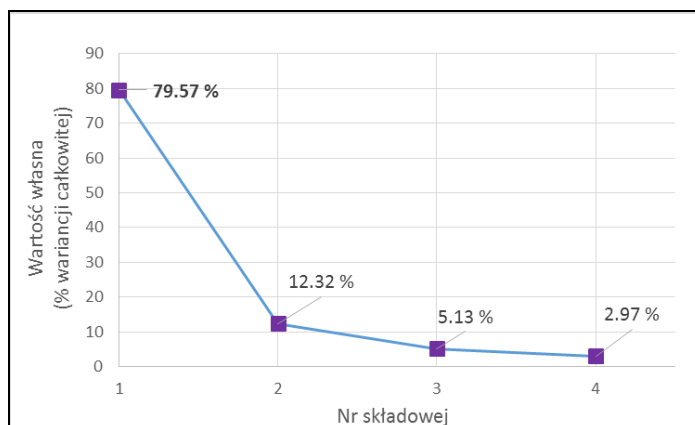
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC<sub>50</sub> a główną składową, wyznaczony dla zestawu treningowego na podstawie wzoru  $\text{COX-2 pIC}_{50} = f(\text{główna składowa})$ .

B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu treningowego.

- parametry równania:
  - $R^2_{\text{treningowe}} (R_{\text{treningowe}}) = 0,677 (-0,823)$
  - $Q^2_{\text{cv, internal}} (Q_{\text{cv, internal}}) = 0,732 (0,856)$
  - DF = 19
  - wartość F (poziom istotności  $\alpha = 0,05$ ) = 39,830
  - wartość p ( $\alpha = 0,05$ ) =  $4,668 * 10^{-6}$
  - wartość t ( $\alpha = 0,05$ ) =  $6,311 > t_{kr} = 2,093$

*Charakterystyka głównej składowej (składowa nr 1):*

- wartość własna głównej składowej:  $3,18 : 4 = 79,57\%$  wariancji całkowitej



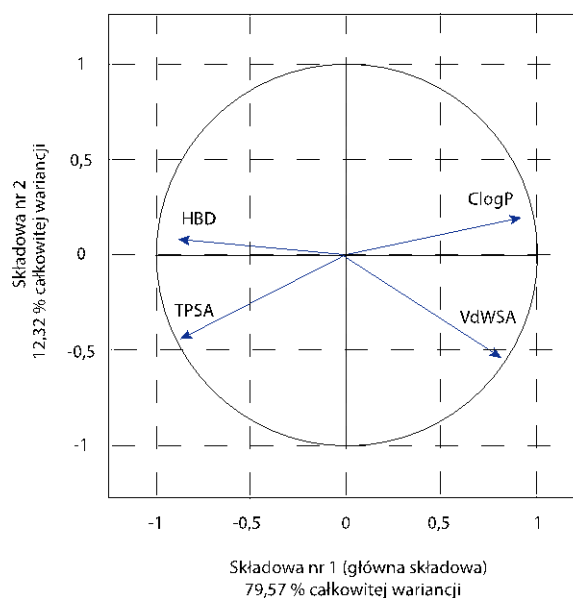
WYKRES 12.35

Wykres osypiska przedstawiający wartości własne poszczególnych składowych (główna składowa oznaczona jest cyfrą 1).

Jako główna składowa do kolejnych obliczeń została wytypowana tylko składowa nr 1.

- ładunki czynnikowe poszczególnych deskryptorów – współczynniki korelacji z główną składową i składową nr 2 (odzwierciedlenie wpływu deskryptorów na wartość składowych):

Nazwa deskryptora	Współczynnik korelacji z główną składową	Współczynnik korelacji ze składową nr 2
HBD	<b>-0,9210</b>	0,0920
ClogP	<b>0,9342</b>	0,1718
VdWSA	<b>0,8252</b>	-0,5336
TPSA	<b>-0,8837</b>	-0,4125



WYKRES 12.36

Wykres kołowy ładunków czynnikowych na płaszczyźnie głównej składowej (składowa nr 1) oraz składowej nr 2.

Współrzędne końca wektora to wartość ładunku czynnikowego danego deskryptora wobec składowych nr 1 i 2.

Główna składowa wykazuje silną korelację ze wszystkimi czterema deskryptorami, przy czym zależność ta jest odwrotnie proporcjonalna z HBD i TPSA (analogicznie do modelu dla COX-1).

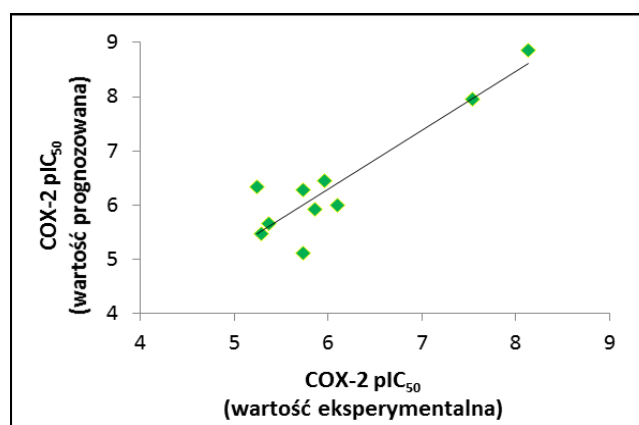
W oparciu o wyznaczone równanie liniowe oraz wartości ładunków czynnikowych stwierdzono, że biologiczna aktywność badanych związków (wyrażona jako COX-2 pIC<sub>50</sub>) koreluje ujemnie z główną składową, a zatem wykazuje jednocześnie:

- dodatnią korelację z HBD i TPSA;
- ujemną korelację z ClogP i VdWSA.

Uzyskane wyniki (charakter korelacji) są zgodne z danymi otrzymanymi w ramach obliczeń metodami SLR i MLR, przy czym analiza PCA dodatkowo uwzględnia zależność pomiędzy aktywnością biologiczną a VdWSA.

*Weryfikacja modelu – zestaw testowy:*

- porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>:



WYKRES 12.37

Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC<sub>50</sub> dla zestawu testowego.

- $R^2_{\text{pred, test}} (R_{\text{pred, test}}) = 0,839 (0,916)$
- $Q^2_{\text{cv, external}} (Q_{\text{cv, external}}) = 0,736 (0,858)$

#### ***Interpretacja modelu:***

Otrzymane rezultaty w dużym zakresie są podobne do danych wygenerowanych w modelu PCA dla inhibitorów COX-1.

Cząsteczki bardziej hydrofilowe, o polarnym charakterze, które posiadają więcej donorów wiązań wodorowych wydają się być również silniejszymi inhibitorami COX-2.

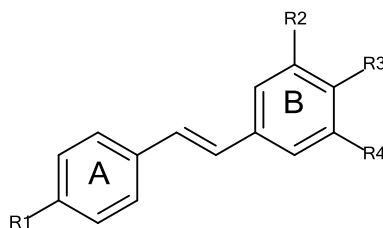
Mniejsza powierzchnia oddziaływania z innymi cząsteczkami za pomocą sił Van der Waals'a dodatkowo może wzmacniać ich zdolność do hamowania aktywności COX-2 (wyższe wartości COX-2 pIC<sub>50</sub>).

#### 12.2.4. Wytypowanie struktur nowych związków w oparciu o wyniki 2D QSAR i dane literaturowe

Dane otrzymane w różnych modelach 2D QSAR wskazują, że związki bardziej hydrofilowe oraz posiadające większą liczbę atomów polarnych (np. N, O, Cl) i donorów wiązań wodorowych (np. grupa -OH) – powinny charakteryzować się silniejszym i bardziej selektywnym działaniem wobec COX-2.

Otrzymane wyniki porównano z danymi literaturowymi, które również wskazują na silniejszą inhibicję COX-2 przez związki o podobnych właściwościach, szczególnie te zawierające grupy hydroksylowe. W niektórych przypadkach związki posiadające ugrupowania metoksyłowe również cechowały się silnym lub bardziej selektywnym działaniem wobec COX-2 [31, 33].

Na tej podstawie stworzono mini bibliotekę 16 związków, których struktura stanowiła kombinację trzech związków nr **Z5**, **Z9** i **Z11** (wytypowanych w badaniu przesiewowym i testowanych w 2D QSAR) oraz cząsteczek opisanych w piśmiennictwie (zawierających ugrupowania hydroksylowe lub metoksyłowe) – RYCINY 12.1 i 12.2.

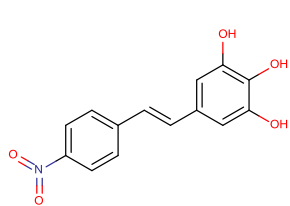


, gdzie:

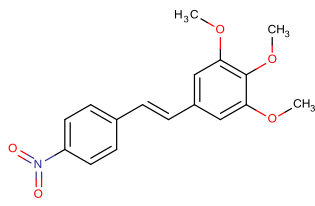
- |   |   |
|---|---|
| $R_1$ (poz. 4, pierścień A) = -Cl lub -NO <sub>2</sub>      | (podstawniki pochodzące od związków Z5, Z9 i Z11)   |
| $R_2$ (poz. 3', pierścień B) = -OH, -OCH <sub>3</sub> lub H | (podstawniki pochodzące od związków literaturowych) |
| $R_3$ (poz. 4', pierścień B) = -OH lub -OCH <sub>3</sub>    | (podstawniki pochodzące od związków literaturowych) |
| $R_4$ (poz. 5', pierścień B) = -OH, -OCH <sub>3</sub> lub H | (podstawniki pochodzące od związków literaturowych) |

#### RYCINA 12.1

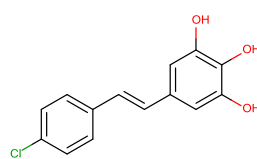
Szkieletowy model nowych związków.



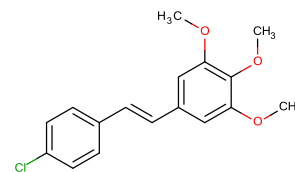
związek N1



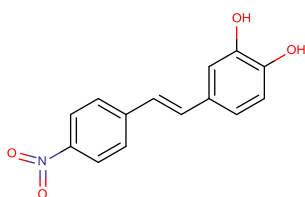
związek N2



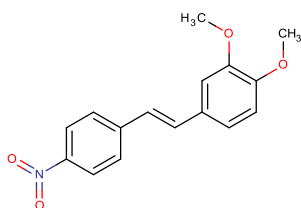
związek N3



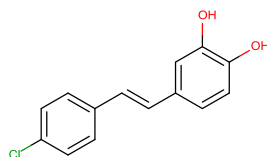
związek N4



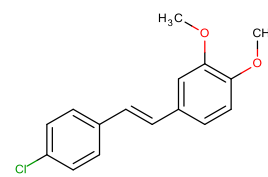
związek N5



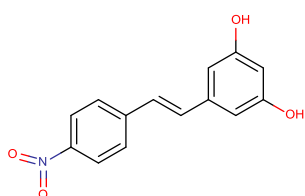
związek N6



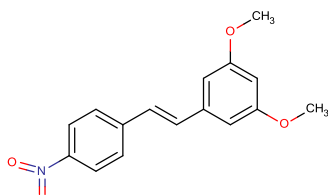
związek N7



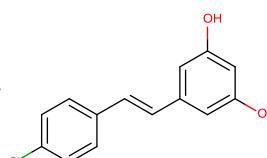
związek N8



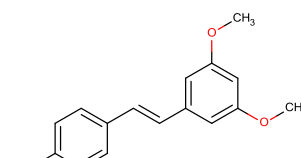
związek N9



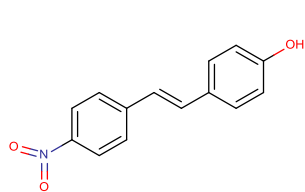
związek N10



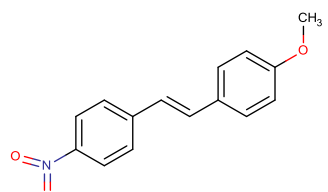
związek N11



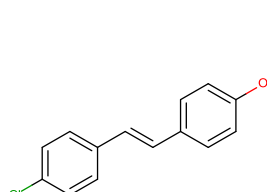
związek N12



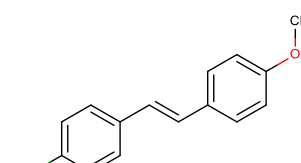
związek N13



związek N14



związek N15



związek N16

## RYCINA 12.2

Struktury 16 nowych pochodnych *trans*-stilbenu.

Prognozowaną aktywność biologiczną nowych cząsteczek wyznaczono w oparciu o zbudowane modele 2D QSAR, które spełniały kryteria walidacji. Parametry poszczególnych deskryptorów wyliczono za pomocą specjalistycznych programów komputerowych: ACD/ChemSketch, Marvin Suite oraz PADEL Descriptor. W oparciu o zebrane dane obliczono wartości COX-1 pIC<sub>50</sub> oraz COX-2 pIC<sub>50</sub>, które następnie przekształcono do postaci COX-1 IC<sub>50</sub> oraz COX-2 IC<sub>50</sub>. Uzyskane wyniki uśredniono i wyznaczono selektywność każdego związku wobec COX-2. Dodatkowo

wyznaczono prognozowaną aktywność celekoksybu wobec obydwóch izoform COX. Szczegółowe dane przedstawiono w TABELI 12.5.

TABELA 12.5

Prognozowana aktywność biologiczna nowych pochodnych *trans*-stilbenu wobec COX-1 i COX-2, obliczona z wykorzystaniem opracowanych modeli 2D QSAR (grubą czcionką zaznaczono związki wyselekcjonowane do dalszych badań).

Nr związku	COX-1				COX-2				Selektywność wobec COX-2*
	pIC <sub>50</sub>	SD	IC <sub>50</sub>	SD	pIC <sub>50</sub>	SD	IC <sub>50</sub>	SD	
<b>N1</b>	<b>5,49</b>	±0,34	<b>4,32</b>	±2,92	<b>7,11</b>	±0,25	<b>0,091</b>	±0,046	<b>47,46</b>
<b>N2</b>	<b>5,28</b>	±0,27	<b>6,11</b>	±2,80	<b>5,34</b>	±0,36	<b>5,85</b>	±3,02	<b>1,04</b>
N3	5,37	±0,21	4,75	±2,36	6,35	±0,44	0,66	±0,47	7,20
N4	4,84	±0,14	15,19	±4,22	4,97	±0,21	11,94	±4,90	1,27
N5	5,44	±0,08	3,69	±0,67	6,70	±0,31	0,26	±0,22	14,19
<b>N6</b>	<b>6,03</b>	±0,30	<b>1,14</b>	±0,71	<b>5,12</b>	±0,30	<b>9,37</b>	±5,09	<b>0,12</b>
N7	5,31	±0,26	5,97	±4,29	5,83	±0,43	2,18	±1,64	2,74
N8	4,91	±0,18	13,38	±6,43	4,94	±0,55	19,52	±13,80	0,69
N9	5,46	±0,31	4,56	±3,67	5,53	±0,23	3,41	±1,83	1,34
N10	5,47	±0,17	3,69	±1,56	5,37	±0,27	5,09	±2,60	0,72
N11	5,23	±0,34	8,02	±6,20	5,96	±0,51	1,70	±1,03	4,72
N12	4,92	±0,18	13,05	±5,84	4,63	±0,19	26,04	±11,05	0,50
N13	5,36	±0,22	5,01	±3,12	6,24	±0,08	0,59	±0,11	8,49
N14	5,20	±0,16	6,75	±2,69	5,78	±0,12	1,71	±0,51	3,95
N15	5,15	±0,23	8,24	±5,15	5,22	±0,21	6,75	±2,98	1,22
N16	5,01	±0,32	12,77	±9,00	4,83	±0,22	16,95	±8,05	0,75
CELEKOKSYB	4,89	±0,21	14,80	±7,12	7,09	±0,28	0,111	±0,057	132,97

\* Prognozowany stopień selektywności został wyznaczony jako iloraz COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>.

### 12.2.5. Badane związki – reguła Lipińskiego

Po wykonaniu obliczeń 2D QSAR zweryfikowano, czy pochodne *trans*-stilbenu **Z5**, **Z9**, **Z11**, **N1**, **N2** i **N6** spełniają regułę Lipińskiego [84]. Wyniki przedstawiono w TABELI 12.6.

TABELA 12.6

Związki testowe – zgodność z regułą Lipińskiego.

Związek nr	MW	HBD (suma wiązań -NH i -OH)	HBA (suma atomów N i O)	ClogP	Spełnia kryteria reguły Lipińskiego ?
<b>Z5</b>	302,75	0	3	4,68	TAK
<b>Z9</b>	269,29	0	4	4,89	TAK
<b>Z11</b>	313,30	0	6	3,83	TAK
<b>N1</b>	273,24	3	6	3,34	TAK
<b>N2</b>	315,36	0	6	3,78	TAK
<b>N6</b>	285,30	0	5	3,94	TAK

Wymienione związki charakteryzują się parametrami fizyko-chemicznymi zgodnymi z tzw. „regułą pieciu”. Na tej podstawie można wstępnie przypuszczać, że badane cząsteczki powinny cechować się korzystnym profilem farmakokinetycznym – tzn. dobrą biodostępnością po podaniu doustnym, co jest jednym z istotnych elementów branych pod uwagę przy projektowaniu nowych substancji leczniczych. W związku z tym zakwalifikowanie ich do kolejnych badań było zasadne.

### 12.2.6. Podsumowanie ETAPU II

Spośród analizowanych cząsteczek najsilniejszym i jednocześnie najbardziej selektywnym inhibitorem COX-2 powinien być związek **N1** (4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben). W związku z tym został on wytypowany do dalszych badań *in vitro*, mających na celu m.in. weryfikację prognozowanej aktywności biologicznej względem COX-1 i COX-2.

Dodatkowo do dalszych badań włączono jeden związek o potencjalnie najsilniejszym i najbardziej selektywnym działaniu wobec COX-1 oraz związek nieselektywny. Tymi cząsteczkami były odpowiednio **N6** (4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilben) oraz **N2** (4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben).

W odniesieniu do celekoksylu należy stwierdzić, że model 2D QSAR wskazał na jego silną aktywność i wysoką selektywność wobec COX-2, a uzyskane wartości nie odbiegają istotnie od danych literaturowych:

parametr	model 2D QSAR	Murias i wsp. [32]	Uddin i wsp. [35]	komentarz
COX-1 IC <sub>50</sub> [μmol/l]	14,80	19,026	33,1	różnica kilku – kilkunastu μmol/l
COX-2 IC <sub>50</sub> [μmol/l]	0,111	0,03482	0,07	2-3-krotna różnica na poziomie nmol/l
selektywność wobec COX-2	132,92	546,41	472,85	3-4-krotna różnica (wynikająca głównie z wartości COX-2 IC <sub>50</sub> ), ten sam rząd wielkości 100-1000

### 12.3. Synteza pochodnych *trans*-stilbenu (ETAP III)

Wykonano syntezę produktów pośrednich oraz docelowych zgodnie z opisem zaprezentowanym w ROZDZIALE 9.3.

Otrzymane związki zweryfikowano pod kątem tożsamości i struktury (ROZDZIAŁ 12.3.1).

Wydajność poszczególnych reakcji przedstawiono w poniższej TABELI 12.7.



TABELA 12.7

Wyniki wydajności reakcji dla poszczególnych produktów.

Nazwa związku	Wydajność reakcji (% wydajności teoretycznej)
4-chloro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilben (produkt pośredni dla związku nr Z5)	62 %
4-nitro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilben (produkt pośredni dla związków nr Z9 i Z11)	75 %
4-chloro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilben (związek nr Z5)	80 %
4-nitro-4'-etoksy- <i>trans</i> -stilben (związek nr Z9)	68,5 %
4-nitro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilben (związek nr Z11)	65,5 %
4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilben (związek nr N1)	67 %
4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilben (związek nr N2)	81 %
4-nitro-3',4',5'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilben (związek nr N6)	87 %

### 12.3.1. Wyniki badań tożsamości i struktury

Wyniki analiz oraz widma poszczególnych związków zaprezentowano w SUPLEMENCIE.

### 12.3.2 Podsumowanie ETAPU III

Przeprowadzono resyntezę związków nr Z5, Z9 i Z11 oraz syntezę trzech nowych pochodnych *trans*-stilbenu – oznaczonych jako N1, N2 i N6. Wydajność poszczególnych reakcji była powyżej 60%, co jest poziomem akceptowalnym w przypadku syntezy związków organicznych [161].

Otrzymane cząsteczki poddano klasycznej analizie fizyko-chemicznej (tj. elementarnej analizie pierwiastków, oznaczeniu temperatury topnienia i TLC), na podstawie której wyznaczono kilka parametrów charakteryzujących tożsamość badanych związków.

Wykonano również standardową analizę instrumentalną (tj. MS, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR oraz IR), w wyniku której potwierdzona została tożsamość i budowa testowanych cząsteczek.

Następnie uzyskane związki przekazano do badań *in vitro*.

### 12.4. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków nr N1, N2 i N6 wobec COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro* (ETAP IV)

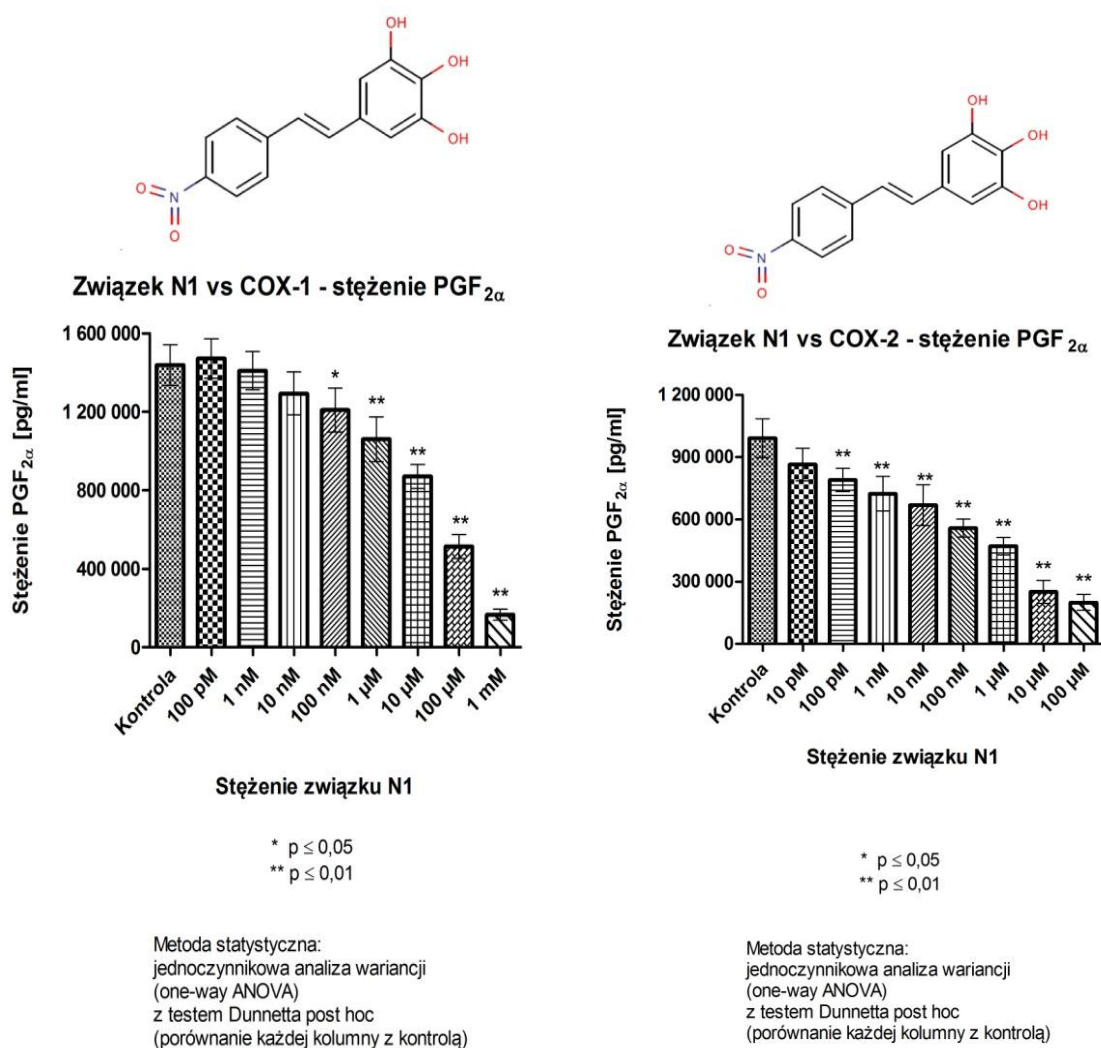
Analizowane związki poddano reakcji z obydwoma izoformami COX – analogicznie jak w przypadku związków nr Z5, Z9 i Z11, które zostały przebadane w ETAPIE I. Dodatkowo, jako związek referencyjny, zastosowano CELEKOKSYB.

W celu wykonania analiz wykorzystano ten sam test cEIA (komercyjny zestaw firmy Cayman [134]) i zastosowano te same rozcieńczenia seryjne (patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.3). Wykresy i parametry poszczególnych krzywych wzorcowych zaprezentowano w SUPLEMENCIE.

Obliczenia wykonywano w oparciu o wyniki absorbancji ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) w poszczególnych dołkach oraz parametry krzywych wzorcowych.

Wyniki oznaczeń zaprezentowano na WYKRESACH 12.38-45.

### Związek N1



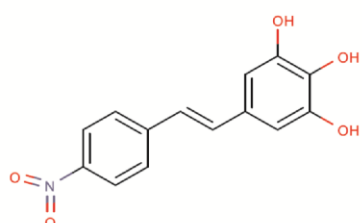
WYKRES 12.38

Wpływ związku N1 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów ( $\pm$ SD).

Testowana cząsteczka **N1** charakteryzuje się następującymi parametrami aktywności biologicznej:

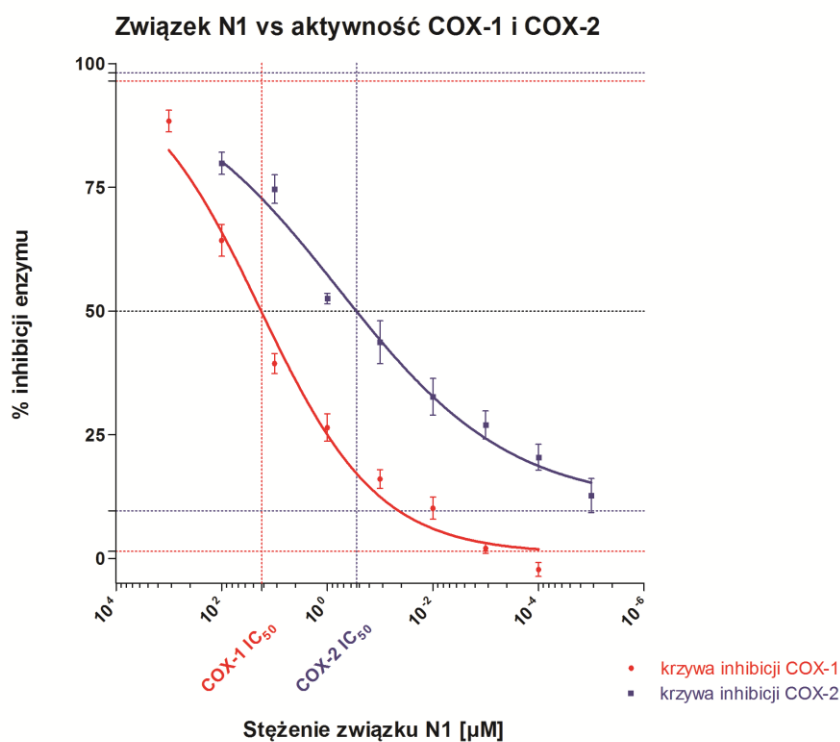
- COX-1 IC<sub>50</sub>: **17,498 μmol/l** (95% CI: 8,995 – 34,041)
- COX-2 IC<sub>50</sub>: **0,279 μmol/l** (95% CI: 0,111 – 0,703)
- selektywność względem COX-2: **62,81** (95% CI: 48,42 – 81,28)



COX-1 IC<sub>50</sub> = **17,498 μM** (95% CI: 8,995 - 34,041 μM)  
 COX-2 IC<sub>50</sub> = **0,279 μM** (95% CI: 0,111 - 0,703 μM)

selektywność  
 COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**62,81**  
 (95% CI: 48,42 - 81,28)



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie związku N1} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 1,45 % (-5,62; 8,52)  
 B = 0,37 (0,29; 0,45)  
 C = 17,41 μM (10,94; 23,88)  
 D = 96,47 % (90,25; 102,69)

R<sup>2</sup> = 0,9837  
 R = 0,9918

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

A = 9,64 % (4,06; 15,82)  
 B = 0,27 (0,21; 0,33)  
 C = 0,61 μM (0,21; 1,01)  
 D = 98,16 % (92,21; 104,11)

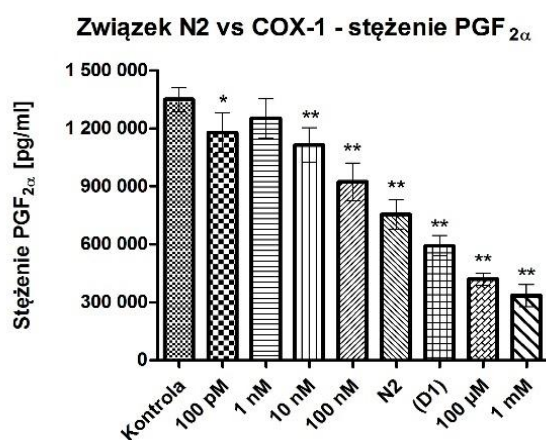
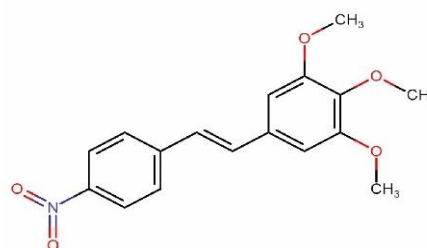
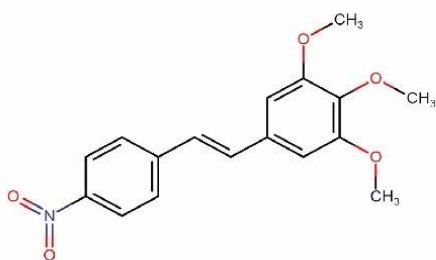
R<sup>2</sup> = 0,9853  
 R = 0,9926

#### WYKRES 12.39

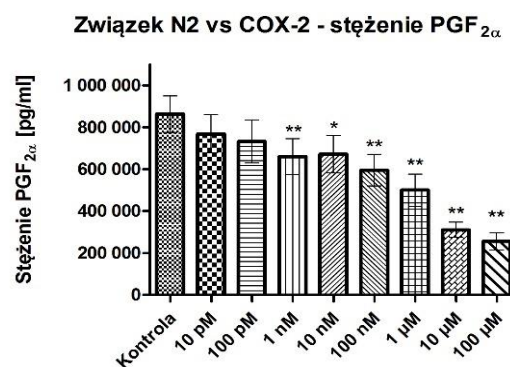
Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek **N1**.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).

## Związek N2



Stężenie związku N2

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

Stężenie związku N2

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

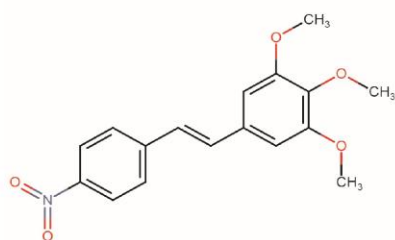
## WYKRES 12.40

Wpływ związku N2 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (±SD).

Testowana cząsteczka N2 charakteryzuje się następującymi parametrami aktywności biologicznej:

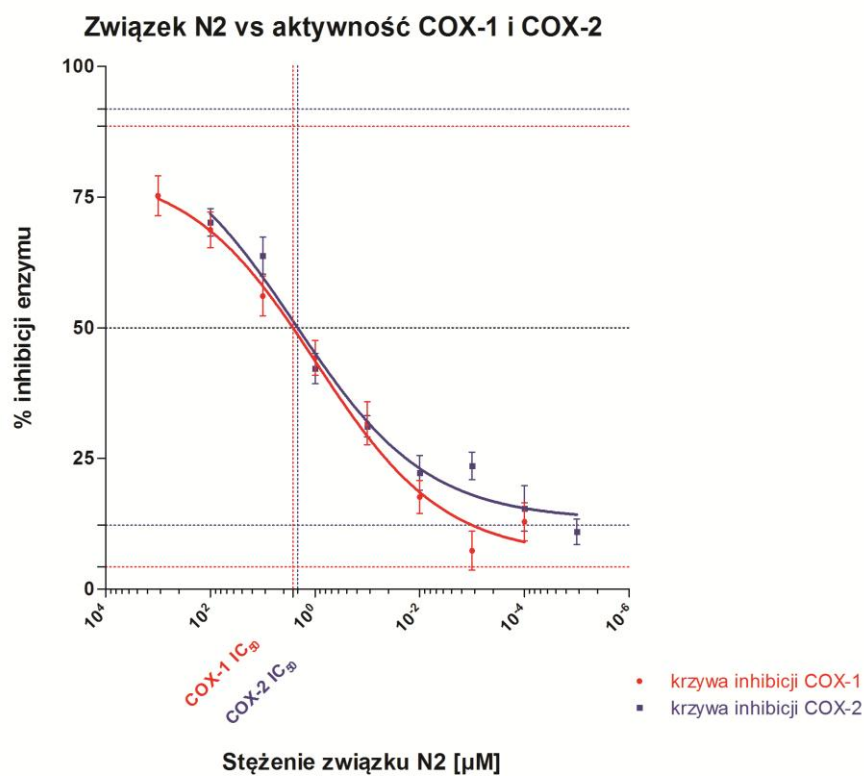
- COX-1 IC<sub>50</sub>: **2,667 μmol/l** (95% CI: 1,361 – 5,383)
- COX-2 IC<sub>50</sub>: **2,168 μmol/l** (95% CI: 0,703 – 8,831)
- selektywność względem COX-2: **1,23** (95% CI: 0,61 – 1,94)



COX-1 IC<sub>50</sub> = **2,667 μM** (95% CI: 1,361 - 5,383 μM)  
 COX-2 IC<sub>50</sub> = **2,168 μM** (95% CI: 0,703 - 8,831 μM)

selektywność  
 COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**1,23**  
 (95% CI: 0,61 - 1,94)



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie związku N2} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 4,25 % (-4,03; 12,53)  
 B = 0,35 (0,15; 0,55)  
 C = 0,96 μM (0,13; 21,05)  
 D = 88,50 % (90,25; 102,69)

R<sup>2</sup> = 0,9893  
 R = 0,9946

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

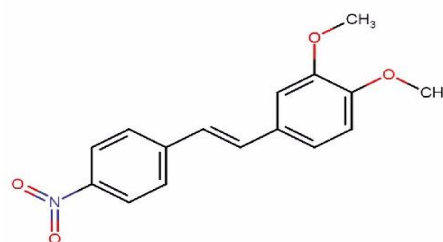
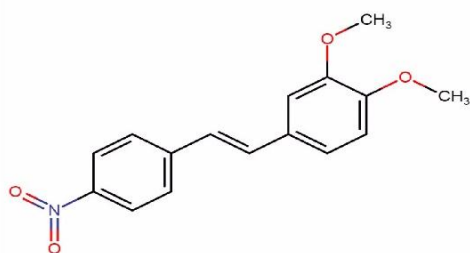
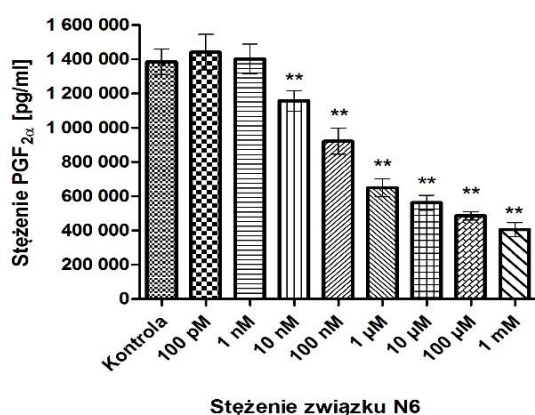
A = 12,22 % (3,81; 20,63)  
 B = 0,35 (0,06; 0,64)  
 C = 2,34 μM (0,41; 4,27)  
 D = 91,78 % (81,15; 102,41)

R<sup>2</sup> = 0,9791  
 R = 0,9895

WYKRES 12.41

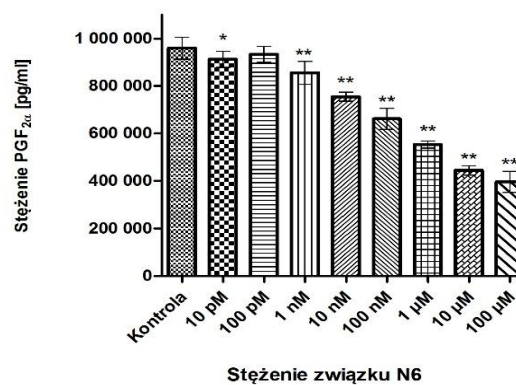
Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek **N2**.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).

Związek N6Związek N6 vs COX-1 - stężenie PGF<sub>2α</sub>

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01

Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

Związek N6 vs COX-2 - stężenie PGF<sub>2α</sub>

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01

Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

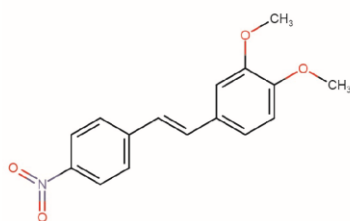
## WYKRES 12.42

Wpływ związku **N6** na aktywność **COX-1** oraz **COX-2** wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (±SD).

Testowana cząsteczka **N6** charakteryzuje się następującymi parametrami aktywności biologicznej:

- COX-1 IC<sub>50</sub>: **0,659 μmol/l** (95% CI: 0,239 – 2,153)
- COX-2 IC<sub>50</sub>: **4,688 μmol/l** (95% CI: 2,286 – 10,116)
- selektywność względem COX-2: **0,14** (95% CI: 0,11 – 0,21)

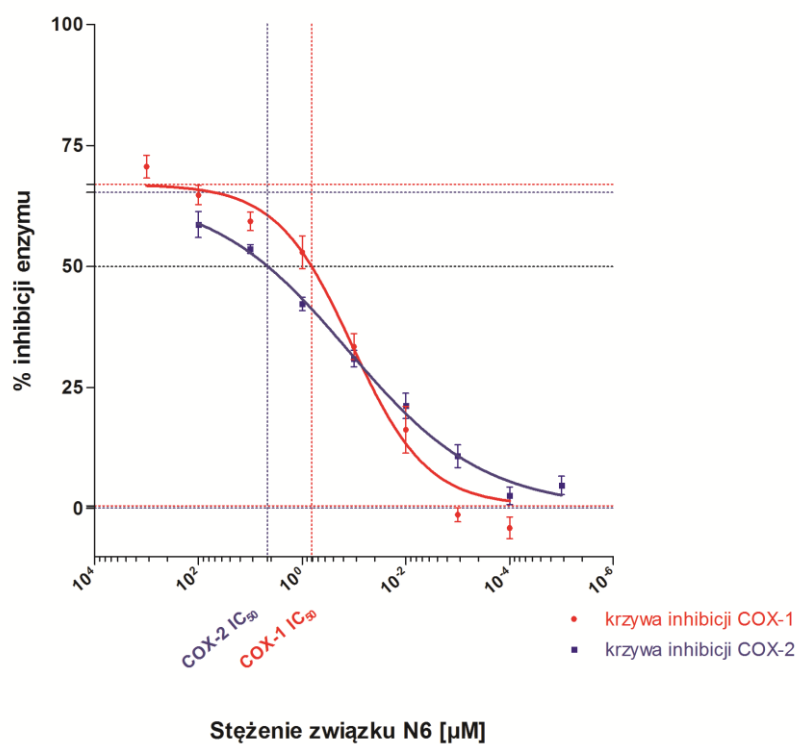


COX-1 IC<sub>50</sub> = **0,659 μM** (95% CI: 0,239 - 2,153 μM)  
 COX-2 IC<sub>50</sub> = **4,688 μM** (95% CI: 2,286 - 10,116 μM)

selektywność  
 COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**0,14**  
 (95% CI: 0,11 - 0,21)

### Związek N6 vs aktywność COX-1 i COX-2



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie związku N6} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 0,54 % (-5,84; 6,92)  
 B = 0,59 (0,42; 0,76)  
 C = 0,11 μM (0,03; 0,18)  
 D = 66,95 % (58,50; 75,40)

R<sup>2</sup> = 0,9851  
 R = 0,9925

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

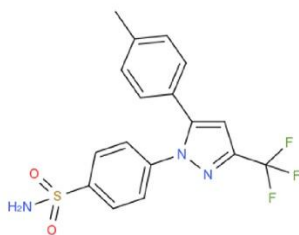
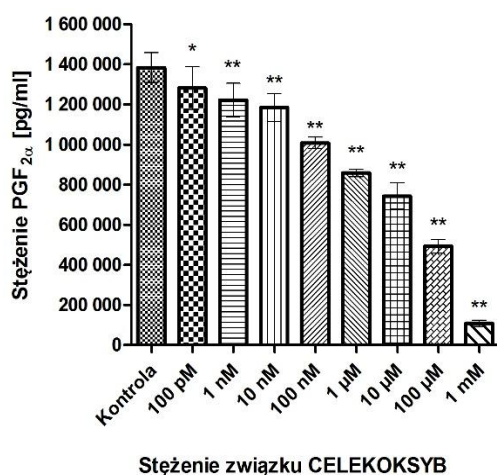
A = 0,06 % (-5,10; 5,22)  
 B = 0,33 (0,24; 0,42)  
 C = 0,13 μM (0,03; 0,23)  
 D = 65,30 % (55,49; 75,11)

R<sup>2</sup> = 0,9949  
 R = 0,9974

#### WYKRES 12.43

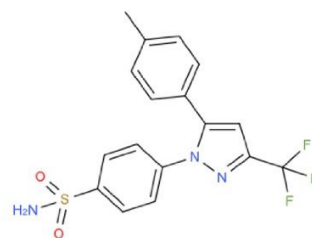
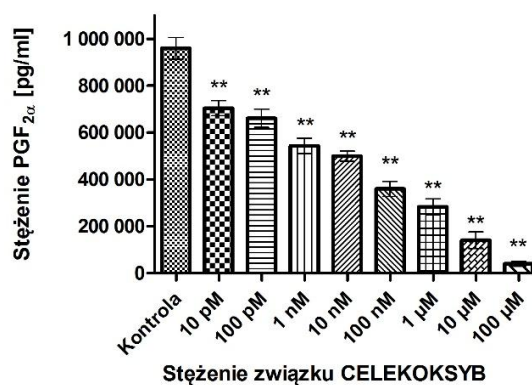
Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek **N6**.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).

CELEKOKSYBCELEKOKSYB vs COX-1 - stężenie PGF<sub>2α</sub>

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01

Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

CELEKOKSYB vs COX-2 - stężenie PGF<sub>2α</sub>

\* p ≤ 0,05  
\*\* p ≤ 0,01

Metoda statystyczna:  
jednoczynnikowa analiza wariancji  
(one-way ANOVA)  
z testem Dunnetta post hoc  
(porównanie każdej kolumny z kontrolą)

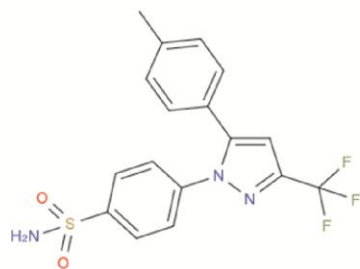
## WYKRES 12.44

Wpływ **CELEKOKSYBU** na aktywność **COX-1** oraz **COX-2** wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF<sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (±SD).

Testowana cząsteczka **CELEKOKSYB** charakteryzuje się następującymi parametrami aktywności biologicznej:

- COX-1 IC<sub>50</sub>: **8,222 μmol/l** (95% CI: 3,365 – 21,379)
- COX-2 IC<sub>50</sub>: **0,012 μmol/l** (95% CI: 0,006 – 0,025)
- selektywność względem COX-2: **685,16** (95% CI: 559,50 – 857,16)





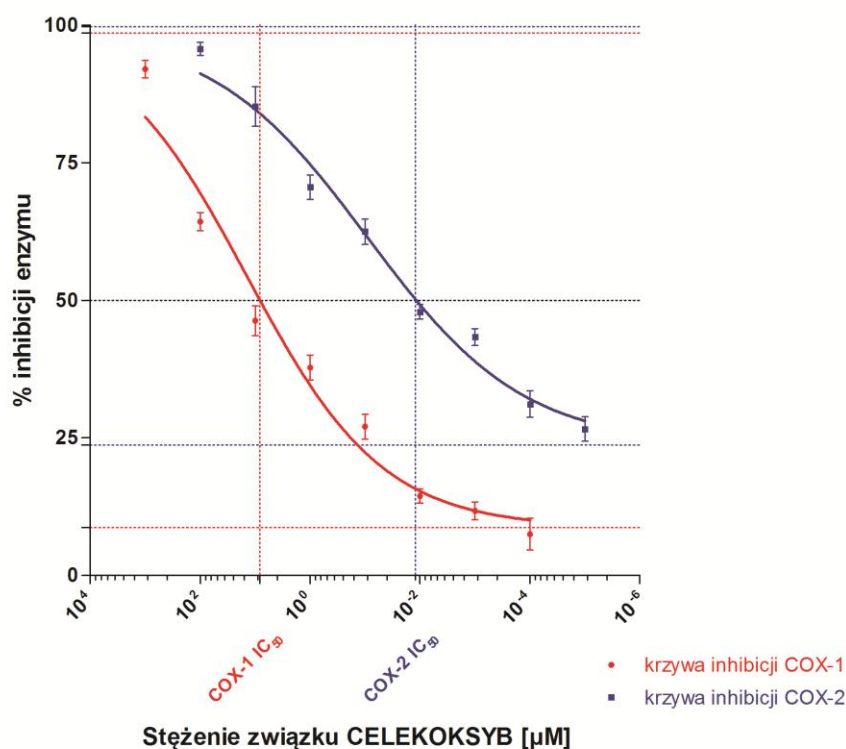
COX-1 IC<sub>50</sub> = **8,222 μM** (95% CI: 3,365 - 21,379 μM)

COX-2 IC<sub>50</sub> = **0,012 μM** (95% CI: 0,006 - 0,025 μM)

selektywność  
COX-1 IC<sub>50</sub> / COX-2 IC<sub>50</sub>

**685,16**  
(95% CI: 559,50 - 857,16)

### CELEKOKSYB vs aktywność COX-1 i COX-2



$$\% \text{ inhibicji enzymu} = (A - D) / (1 + (\text{stężenie celekoksylu} / C)^B) + D$$

Parametry krzywej inhibicji COX-1:

A = 8,65 % (2,61; 14,61)

B = 0,35 (0,21; 0,49)

C = 14,11 μM (4,92; 23,63)

D = 98,56 % (93,91; 102,37)

R<sup>2</sup> = 0,9715

R = 0,9856

Parametry krzywej inhibicji COX-2:

A = 23,69 % (17,65; 29,73)

B = 0,31 (0,18; 0,43)

C = 0,09 μM (0,02; 0,17)

D = 99,73 % (97,21; 102,25)

R<sup>2</sup> = 0,9856

R = 0,9928

#### WYKRES 12.45

Krzywe hamowania aktywności **COX-1** oraz **COX-2** przez związek referencyjny **CELEKOKSYB**. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie dwóch niezależnych eksperymentów (95% CI).

### 12.4.1. Podsumowanie ETAPU IV

Wśród trzech nowych pochodnych *trans*-stilbenu najsilniejszym i jednocześnie najbardziej selektywnym inhibitorem COX-2 okazał się być związek nr **N1**. Pozostałe cząsteczki cechowały się dużo słabszym działaniem wobec COX-2, przy czym związek nr **N2** nie wykazywał selektywności wobec którejkolwiek z izoform cyklooksygenazy, a związek nr **N6** można określić jako preferencyjny inhibitor COX-1.

Porównanie wartości prognozowanych (2D QSAR, ETAP II) oraz wyznaczonych wartości eksperymentalnych zaprezentowano w TABELI 12.8.

TABELA 12.8

Porównanie prognozowanych i eksperymentalnych wartości  $IC_{50}$  badanych związków względem COX-1 i COX-2 oraz ich selektywności.

Nr związku	COX-1 $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]		COX-2 $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]		Selektywność względem COX-2	
	wartość PRE	wartość EKS	wartość PRE	wartość EKS	wartość PRE	wartość EKS
<b>N1</b>	4,32	17,498	0,091	0,279	47,46	62,81
<b>N2</b>	6,11	2,667	5,85	2,163	1,04	1,23
<b>N6</b>	1,14	0,659	9,37	4,688	0,12	0,14

wartość PRE – dane predykcyjne z badań *in silico* (ETAP II)

wartość EKS – dane eksperymentalne z badań *in vitro* (ETAP IV)

W przypadku **CELEKOKSYBU** uzyskane wyniki porównano z danymi literaturowymi:

parametr	badanie <i>in vitro</i>	Murias i wsp. [32]	Uddin i wsp. [35]	komentarz
COX-1 $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	8,222	19,026	33,1	2-4-krotna różnica na poziomie $\mu\text{mol/l}$
COX-2 $IC_{50}$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	0,012	0,03482	0,07	3-6-krotna różnica na poziomie $\text{nmol/l}$
selektywność wobec COX-2	685,16	546,41	472,85	1,5-krotna różnica

Analizując dane otrzymane komputerowo oraz doświadczalnie należy stwierdzić, że w obydwóch przypadkach wyniki badań względem COX-1 i COX-2 są podobne, co świadczyć może m.in. o dobrych parametrach prognostycznych modeli 2D QSAR. Jedynie w przypadku związku nr **N1** wynik uzyskany wobec COX-1 jest nieco odmienny, co rzutuje na 2-krotną różnicę w selektywności wobec COX-2. Rozbieżności te są jednak nieistotne z punktu widzenia potencjalnego działania farmakologicznego, gdyż charakter testowanych cząsteczek jest taki sam, tzn. związek **N1** jest selektywny wobec COX-2, związek **N2** jest nieselektywny, a związek **N6** silniej hamuje aktywność COX-1.

Podobna sytuacja występuje w przypadku **CELEKOKSYBU**, dla którego uzyskano rezultaty zbliżone względem wcześniej opublikowanych danych [32; 35].

## 12.5. Naiwny model Bayesa (ETAP V)

### 12.5.1. Model inhibitorów COX-1

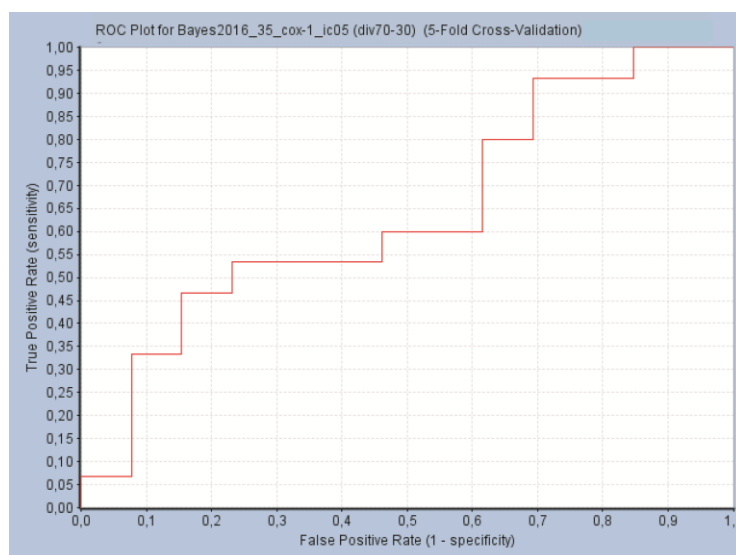
Naiwny model Bayesa dla potencjalnych inhibitorów COX-1 stworzono przy pomocy pakietu Discovery Studio 4.0 – korzystając z protokołu „Create bayesian model”.

Badane związki zostały losowo i proporcjonalnie podzielone na zestaw treningowy (70% związków) i zestaw testowy (pozostałe 30%).

W celu przypisania badanym cząsteczkom statusu „aktywne” lub „nieaktywne” przyjęto granicą wartość ich biologicznej aktywności na poziomie 5  $\mu\text{mol/l}$ . Związki charakteryzujące się wartością COX-1  $\text{IC}_{50}$  poniżej 5  $\mu\text{mol/l}$  zaliczono do grupy aktywnych, a pozostałe do nieaktywnych.

Zestaw treningowy:

- ilość związków  $n = 25$
- parametry krzywej ROC:
  - pole powierzchni pod krzywą (AUC) = 0,641
  - klasa prawdziwie pozytywna TP = 9
  - klasa prawdziwie negatywna TN = 10
  - klasa fałszywie pozytywna FP = 0
  - klasa fałszywie negatywna FN = 6
  - czułość  $\text{TP}/(\text{TP}+\text{FN}) = 0,600$
  - specyficzność  $\text{TN}/(\text{TN}+\text{FP}) = 1,000$
  - dokładność  $(\text{TP}+\text{TN})/(\text{TP}+\text{FN}+\text{TN}+\text{FP}) = 0,760$

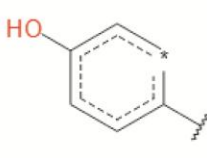
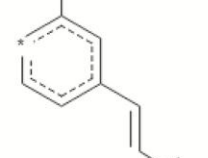
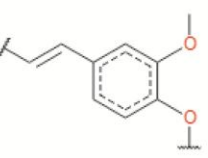
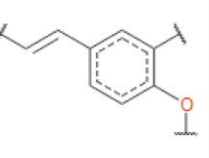
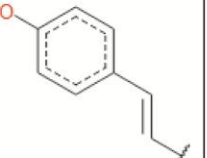
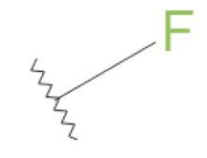
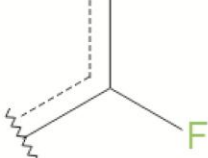
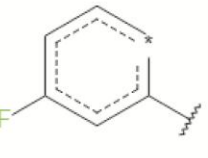
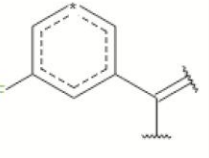



WYKRES 12.46

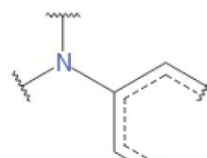
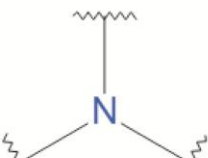
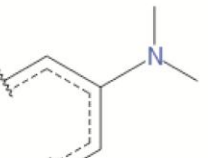
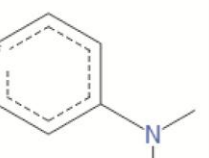
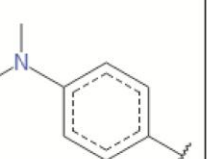
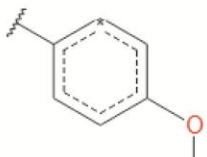
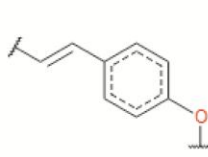
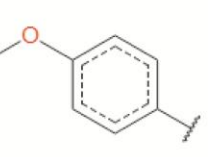
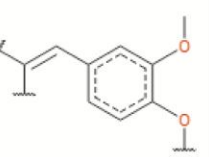
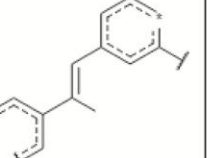
Krzywa ROC dla zestawu treningowego – model inhibitorów COX-1.

Fragmety budowy analizowanych związków wpływające korzystnie („good features”) oraz niekorzystnie („bad features”) na aktywność biologiczną względem COX-1:

Category Bayes2016\_35\_cox-1\_ic05 (div70-30): good features from ECFP\_6

				
G1: -790637051 5 out of 5 good Bayesian Score: 0.418	G4: 1119903506 4 out of 4 good Bayesian Score: 0.398	G7: -225136438 3 out of 3 good Bayesian Score: 0.368	G8: -1905779405 3 out of 3 good Bayesian Score: 0.368	G10: -177264957 3 out of 3 good Bayesian Score: 0.368
				
G13: -1046436026 2 out of 2 good Bayesian Score: 0.320	G14: 220735655 2 out of 2 good Bayesian Score: 0.320	G18: -1560646374 2 out of 2 good Bayesian Score: 0.320	G19: -1954586762 2 out of 2 good Bayesian Score: 0.320	G22: 2007300961 2 out of 2 good Bayesian Score: 0.320

Category Bayes2016\_35\_cox-1\_ic05 (div70-30): bad features from ECFP\_6

				
B1: -175985444 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.779	B2: -1072294614 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.779	B5: 1754935594 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.779	B6: -1753117496 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.779	B8: 257345465 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.779
				
B9: 425403071 1 out of 5 good Bayesian Score: -0.680	B12: -180418888 1 out of 4 good Bayesian Score: -0.518	B14: 693720869 1 out of 4 good Bayesian Score: -0.518	B15: -222949654 0 out of 1 good Bayesian Score: -0.464	B18: -99968937 0 out of 1 good Bayesian Score: -0.464

### RYCINA 12.3

Korzystne oraz niekorzystne struktury badanych związków (wytypowane w oparciu o fingerprint molekularny ECFP\_6) – model inhibitorów COX-1.

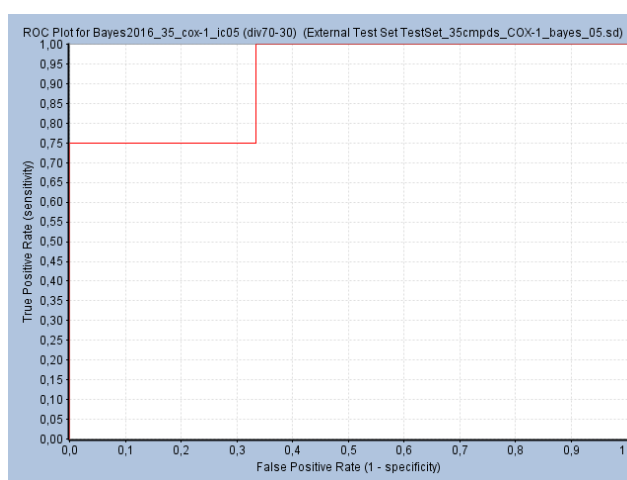
Fragmety budowy uznane za „dobre” występują częściej w strukturach związków oznaczonych jako aktywne (inhibitory, COX-1 IC<sub>50</sub> < 5 μmol/l).

Fragmety budowy uznane za „złe” występują częściej w związkach oznaczonych jako nieaktywne (nie-inhibitory, COX-1 IC<sub>50</sub> ≥ 5 μmol/l).

Gwiazdki (\*) i wstęgi (vww) oznaczają dowolne atomy leżące poza obszarem fingerprintu i tworzące dozwolone wiązania wewnątrzcząsteczkowe.

*Zestaw testowy:*

- ilość związków  $n = 10$
- parametry krzywej ROC:
  - $AUC = 0,917$
  - klasa prawdziwie pozytywna  $TP = 3$
  - klasa prawdziwie negatywna  $TN = 6$
  - klasa fałszywie pozytywna  $FP = 0$
  - klasa fałszywie negatywna  $FN = 1$
  - czułość  $TP/(TP+FN) = 0,750$
  - specyficzność  $TN/(TN+FP) = 1,000$
  - dokładność  $(TP+TN)/(TP+FN+TN+FP) = 0,900$



WYKRES 12.47

Krzywa ROC dla zestawu testowego – model inhibitorów COX-1.

***Interpretacja modelu:***

Na podstawie wyselekcjonowanych fragmentów budowy stwierdzono, że obecność pojedynczej grupy hydroksylowej w pozycji 4 lub dwóch grup metoksylowych w pozycji 3' i 4' (związek **N6**), lub obecność atomu fluoru w pozycji 3 może sprzyjać silniejszej aktywności analizowanych cząsteczek względem COX-1.

Z kolei obecność grupy dimetyloaminowej w pozycji 4 lub grupy metoksylowej w pozycji 4', lub podstawnik alkilowy w mostku etylenowym może osłabiać aktywność biologiczną badanych związków w stosunku do COX-1.

Parametry krzywej ROC są akceptowalne ( $>0,5$ ), mimo że czułość modelu oraz powiązana z nią wartość AUC w przypadku zestawu treningowego nie osiąga wysokich wartości ( $>0,8$ ), które świadczą o dużej mocy prognostycznej tego modelu.

**Porównanie wyników z analizą 2D QSAR:**

Wyniki otrzymane za pomocą prognostycznego modelu Bayesa oraz klasycznej analizy QSAR (ROZDZIAŁ 12.2) są w pewnym zakresie podobne.

W obydwóch badaniach wykazano, że korzystny wpływ na biologiczną aktywność potencjalnych inhibitorów COX-1 ma obecność podstawników o hydrofilowym charakterze, w tym przede wszystkim grupy hydroksylowej, będącej jednocześnie źródłem wiązań wodorowych. Model Bayesa typuje również podstawniki lipofilowe (grupa  $-OCH_3$ , atom fluoru) jako zwiększające zdolność badanych związków do hamowania aktywności COX-1, co jest rozbieżne z wynikami 2D QSAR wskazującymi na osłabienie aktywności pochodnych *trans*-stilbenu zawierających tego rodzaju ugrupowania.

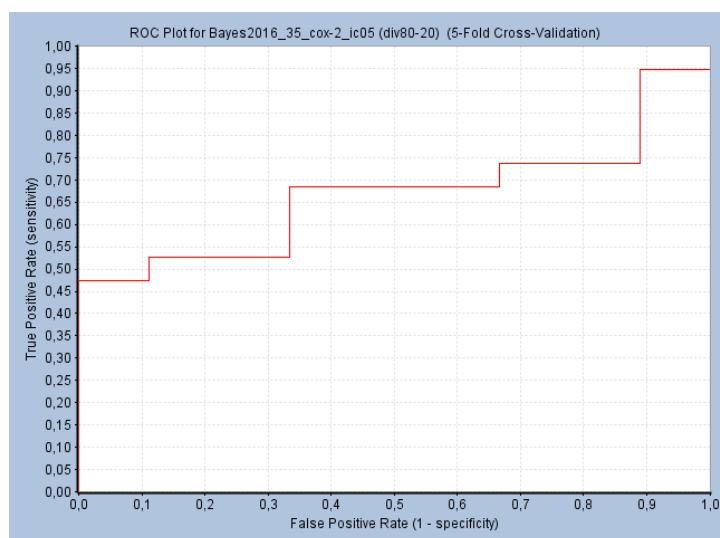
Należy zaznaczyć, że wyniki obliczeń charakteryzują się większym podobieństwem w przypadku struktur mogących osłabiać aktywność testowanych związków. Tzw. „złe” podstawniki wyselekcjonowane za pomocą modelu Bayesa zwiększają lipofilność ( $\uparrow \log P$ ), masę i objętość cząsteczek ( $\uparrow MR$ ), stopień rozgałęzienia ( $\uparrow W$ ) oraz powierzchnię oddziaływań Van der Waals'a ( $\uparrow VdWSA$ ), co koreluje z wynikami obliczeń 2D QSAR.

**12.5.2. Model inhibitorów COX-2**

Model Bayesa dla potencjalnych inhibitorów COX-2 stworzono w sposób analogiczny, z tym że najlepsze parametry krzywej ROC uzyskano w przypadku podziału związków na zestaw treningowy i zestaw testowy w proporcji 80% : 20%. Jako graniczą wartość ich biologicznej aktywności przyjęto również  $IC_{50} = 5 \mu\text{mol/l}$ .

*Zestaw treningowy:*

- ilość związków  $n = 28$
- parametry krzywej ROC:
  - $AUC = 0,667$
  - klasa prawdziwie pozytywna  $TP = 13$
  - klasa prawdziwie negatywna  $TN = 9$
  - klasa fałszywie pozytywna  $FP = 0$
  - klasa fałszywie negatywna  $FN = 6$
  - czułość  $TP/(TP+FN) = 0,684$
  - specyficzność  $TN/(TN+FP) = 1,000$
  - dokładność  $(TP+TN)/(TP+FN+TN+FP) = 0,786$

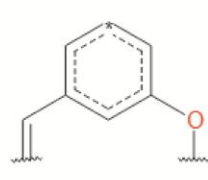
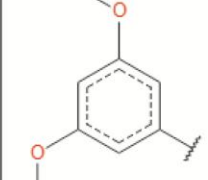
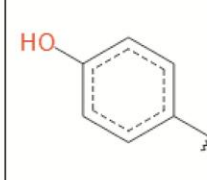
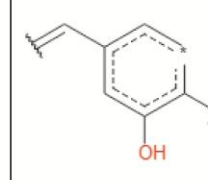
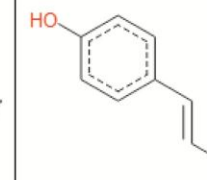
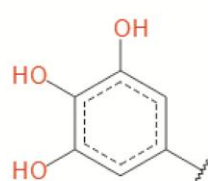
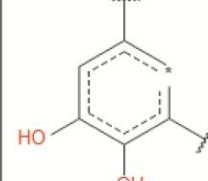
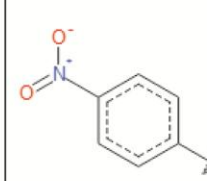
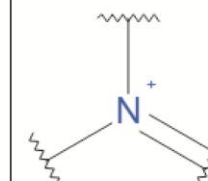
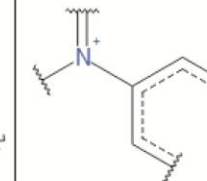


WYKRES 12.48

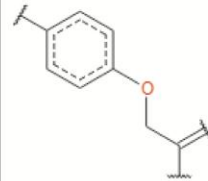
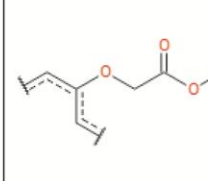
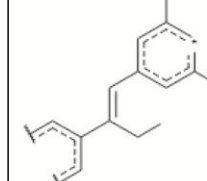
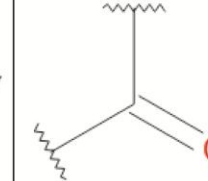
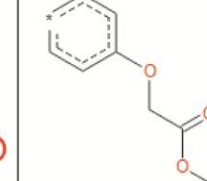
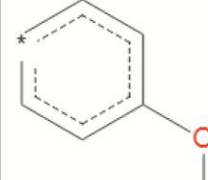
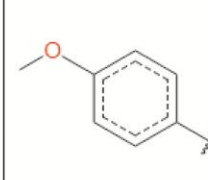
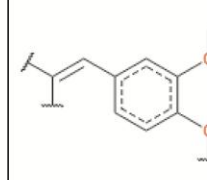
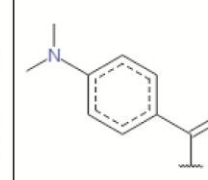
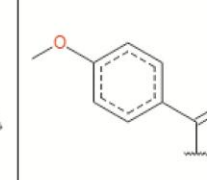
Krzywa ROC dla zestawu treningowego – model inhibitorów COX-2.

Fragmety budowy analizowanych związków wpływające korzystnie („good features”) oraz niekorzystnie („bad features”) na aktywność biologiczną względem COX-2:

Category Bayes 2016\_35\_cox-2\_ic05 (div80-20): good features from ECFP\_6

 G1: -1431636759 6 out of 6 good Bayesian Score: 0.367	 G5: 812549537 5 out of 5 good Bayesian Score: 0.354	 G10: 1419645508 5 out of 5 good Bayesian Score: 0.354	 G11: -1553278795 4 out of 4 good Bayesian Score: 0.337	 G14: -177264957 3 out of 3 good Bayesian Score: 0.313
 G16: 22695581 3 out of 3 good Bayesian Score: 0.313	 G20: -1553987716 3 out of 3 good Bayesian Score: 0.313	 G21: 59903095 3 out of 4 good Bayesian Score: 0.285	 G27: 1043790491 3 out of 4 good Bayesian Score: 0.285	 G30: -179073144 3 out of 4 good Bayesian Score: 0.285

Category Bayes 2016\_35\_cox-2\_ic05 (div80-20): bad features from ECFP\_6

 B1: 770725138 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.826	 B2: -1447117732 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.826	 B3: 1552674161 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.826	 B8: 2099970318 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.826	 B13: 1844173165 0 out of 2 good Bayesian Score: -0.826
 B16: -1271104377 1 out of 4 good Bayesian Score: -0.579	 B17: 693720869 1 out of 4 good Bayesian Score: -0.579	 B19: -222949654 0 out of 1 good Bayesian Score: -0.525	 B20: 2117664957 0 out of 1 good Bayesian Score: -0.525	 B24: -359474828 0 out of 1 good Bayesian Score: -0.525

## RYCINA 12.4

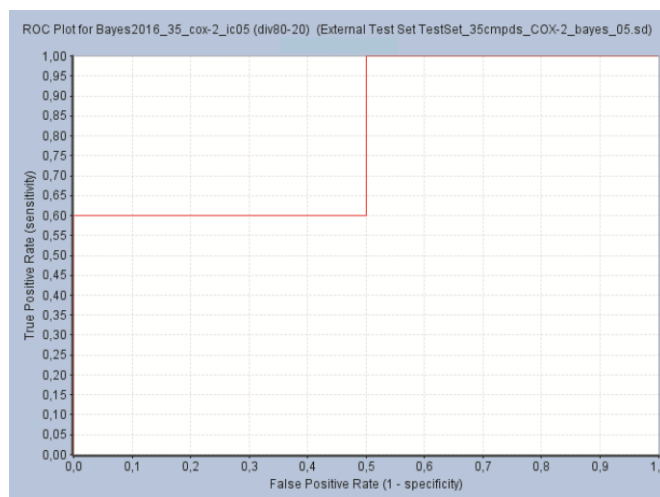
Korzystne oraz niekorzystne struktury badanych związków (wytypowane w oparciu o fingerprint molekularny ECFP\_6) – model inhibitorów COX-2.

Zestaw testowy:

- ilość związków  $n = 7$
- parametry krzywej ROC:
  - AUC = 0,917
  - klasa prawdziwie pozytywna TP = 4



- klasa prawdziwie negatywna TN = 1
- klasa fałszywie pozytywna FP = 1
- klasa fałszywie negatywna FN = 1
- czułość  $TP/(TP+FN) = 0,800$
- specyficzność  $TN/(TN+FP) = 0,500$
- dokładność  $(TP+TN)/(TP+FN+TN+FP) = 0,714$



WYKRES 12.49

Krzywa ROC dla zestawu testowego – model inhibitorów COX-2.

### **Interpretacja modelu:**

Wyniki typowania struktur mogących sprzyjać silniejszej aktywności pochodnych *trans*-stilbenu w stosunku do COX-2 pokrywają się częściowo z rezultatami uzyskanymi w poprzednim modelu. W obydwóch przypadkach preferowane są podstawniki hydroksylowe i metoksyłowe. Istotną różnicą jest występowanie tutaj nie jednej, ale aż trzech grup –OH w pozycjach 3', 4' i 5' oraz grupy nitrowej w pozycji 4, czyli fragmentów budowy charakterystycznych dla związku **N1**.

Do ugrupowań o potencjalnie negatywnym wpływie na aktywność analizowanych cząsteczek wobec COX-2 zaklasyfikowano przede wszystkim podstawnik 4-karboksymetyloametoksyłowy (występuje w związkach **Z5** i **Z11**) oraz struktury wyznaczone w modelu inhibicji COX-1, tj. grupę dimetyloaminową w pozycji 4, metoksyłową w pozycjach 3' i 4' (związek **N6**) oraz podstawnik alkilowy w mostku etylenowym.

Parametry krzywej ROC są akceptowalne (>0,5), mimo że czułość modelu oraz powiązana z nią wartość AUC w przypadku zestawu treningowego nie osiąga wysokich wartości (>0,8). Niska wartość parametru specyficzność dla zestawu testowego wynika z typowania jednego ze związków do klasy fałszywie pozytywnych (FP).

### **Porównanie wyników z analizą 2D QSAR:**

Dane uzyskane na podstawie obliczeń modelu Bayesa są podobne do wniosków płynących z badania 2D QSAR (ROZDZIAŁ 12.2).

Otrzymany model Bayesa wyselekcjonował przede wszystkim podstawniki hydrofilowe (grupa –OH i –NO<sub>2</sub>) jako zwiększające zdolność pochodnych *trans*-stilbenu do inhibicji COX-2. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami analizy 2D QSAR wskazującymi na dodatnią korelację pomiędzy polarnością (↑TPSA, ↓logP) a biologiczną aktywnością ocenianych związków względem tego enzymu. Co istotne, obecność kilku grup hydroksylowych, czyli donora wiązań wodorowych (↑HBD), powinna również zwiększać zdolność tych cząsteczek do inhibicji COX-2 poprzez oddziaływanie z miejscem aktywnym enzymu za pomocą tego typu wiązań.

Należy jednak zaznaczyć, że wśród struktur typowanych jako „dobre” występują również 2 grupy –OCH<sub>3</sub> w pozycjach 3 i 5, co jest rozbieżne z wynikami wcześniejszej analizy wskazującymi na osłabienie aktywności pochodnych *trans*-stilbenu zawierających ugrupowania lipofilowe.

W odniesieniu do fragmentów budowy typowanych jako „złe”, otrzymane wyniki częściowo korelują z wcześniejszymi prognozami *in silico*. Obecność grupy metoksylowej lub dimetyloaminowej zwiększa lipofilność (↑logP) oraz powierzchnię oddziaływań van der Waals'a (↑VdWSA) badanych cząsteczek, co w konsekwencji może wpływać niekorzystnie na ich zdolność do inhibicji COX-2. Z kolei podstawnik karboksymetylometoksylowy z jednej strony zwiększa znacznie wartość VdWSA (↓inhibicji), ale z drugiej strony powoduje zmniejszenie logP i zwiększenie TPSA (↑inhibicji), dlatego nie można w sposób jednoznaczny określić jego wpływu na biologiczną aktywność potencjalnych inhibitorów COX-2 z grupy pochodnych *trans*-stilbenu.

### **12.6. Oznaczanie aktywności cytotoksycznej pochodnych *trans*-stilbenu wobec linii komórkowej MCF-7 – badanie *in vitro* – test MTT (ETAP VI)**

Cytotoksyczność badanych związków oznaczano w trzech niezależnych eksperymentach za pomocą testu MTT. Do właściwej oceny działania cytotoksycznego pochodnych *trans*-stilbenu wykorzystano tylko dolny zakres stężeń 0 – 12,5 μmol/l – ze względu na ograniczoną rozpuszczalność tych związków w medium hodowlanym (DMEM). Jedynie w przypadku CELEKOKSYBU aktywność biologiczną przebadano w pełnym zakresie stężeń.

Wyniki badania przedstawiono w TABELACH 12.9-10 oraz na WYKRESIE 12.50.

TABELA 12.9

Wyniki testu MTT – inkubacja komórek MCF-7 z pochodnymi *trans*-stilbenu (średnia z trzech eksperymentów).

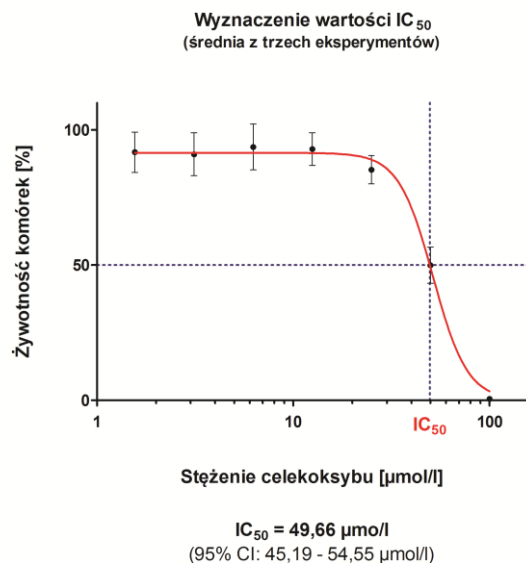
	kontrola (n=18)	1,56 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	3,12 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	6,25 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	12,5 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)
<b>Z5</b>					
Żywotność komórek [%]	100,00	93,18	91,77	89,65	87,03
SD [%]	$\pm 9,63$	$\pm 3,76$	$\pm 4,46$	$\pm 3,96$	$\pm 4,60$
<b>Z9</b>					
Żywotność komórek [%]	100,00	89,68	84,98	79,87	75,30
SD [%]	$\pm 4,79$	$\pm 3,40$	$\pm 3,58$	$\pm 4,08$	$\pm 3,53$
<b>Z11</b>					
Żywotność komórek [%]	100,00	91,49	89,97	83,34	85,09
SD [%]	$\pm 6,66$	$\pm 3,40$	$\pm 6,11$	$\pm 5,22$	$\pm 5,57$
<b>N1</b>					
Żywotność komórek [%]	100,00	87,22	79,13	74,57	<b>66,60*</b>
SD [%]	$\pm 5,74$	$\pm 7,02$	$\pm 7,65$	$\pm 5,85$	$\pm 4,11$
<b>N2</b>					
Żywotność komórek [%]	100,00	83,90	77,65	73,95	<b>69,02*</b>
SD [%]	$\pm 4,50$	$\pm 4,24$	$\pm 2,75$	$\pm 4,01$	$\pm 3,43$
<b>N6</b>					
Żywotność komórek [%]	100,00	90,81	89,66	85,69	82,13
SD [%]	$\pm 4,19$	$\pm 4,03$	$\pm 5,54$	$\pm 5,24$	$\pm 5,62$

\* ponad 30% obniżenie żywotności komórek MCF-7

TABELA 12.10

Wyniki testu MTT – inkubacja komórek MCF-7 ze związkiem CELEKOKSYB (średnia z trzech eksperymentów).

	Kontrola (n=18)	1,56 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	3,12 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	6,25 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	12,5 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	25 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	50 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)	100 $\mu\text{mol/l}$ (n=18)
Żywotność komórek [%]	100,00	91,71	90,96	93,64	92,84	85,23	<b>49,91</b>	<b>0,53</b>
SD [%]	$\pm 4,73$	$\pm 7,43$	$\pm 7,92$	$\pm 8,47$	$\pm 6,03$	$\pm 5,22$	$\pm 6,70$	$\pm 0,31$



WYKRES 12.50

Wyznaczenie wartości IC<sub>50</sub> dla związku CELEKOKSYB (test MTT).

### 12.6.1. Podsumowanie ETAPU VI

Zbiórzenie zestawienie wyników zaprezentowano na WYKRESIE 12.51.

Wykazano, że związki badane nr **Z5**, **Z9**, **Z11** oraz **N6** charakteryzują się słabym działaniem cytotoksycznym w zakresie analizowanych stężeń, gdyż spowodowały zmniejszenie żywotności komórek do poziomu 93 – 75 % względem próby kontrolnej.

Związki nr **N1** oraz **N2** wykazywały podobne działanie w stężeniach 1,56 – 6,25  $\mu\text{mol/l}$ . Obniżenie żywotności komórek o ponad 30% obserwowano tylko przy najwyższym stężeniu tych związków, tj. 12,5  $\mu\text{mol/l}$ .

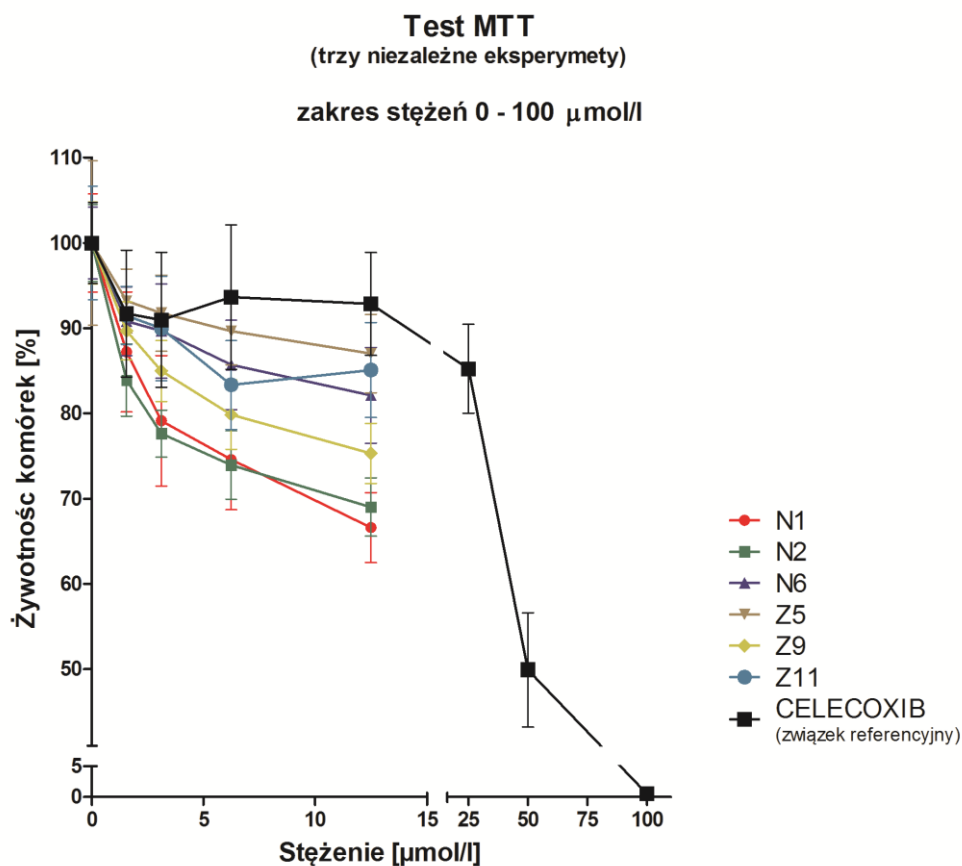
Norma PN-EN ISO 10993-5:2009 klasyfikuje cząsteczki jako potencjalnie cytotoksyczne w przypadku obniżenia żywotności komórek do poziomu <70% względem próby kontrolnej [162]. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że to kryterium spełniają jedynie związki nr **N1** i **N2** w stężeniu 12,5  $\mu\text{mol/l}$ .

**CELEKOKSYB** poddano analogicznemu badaniu, z jednoczesnym zastosowaniem wyższych stężeń (1,56 – 100  $\mu\text{mol/l}$ ).

W zakresie mniejszych stężeń (1,56 – 25  $\mu\text{mol/l}$ ), związek ten, podobnie jak pochodne *trans*-stilbenu, wykazywał słabe działanie, gdyż powodował zmniejszenie liczby żywych komórek o zaledwie 10 – 15%.

W najwyższych analizowanych stężeniach działanie celekoksylu było znacznie silniejsze. Obniżenie żywotności komórek o ok. 50% zaobserwowano przy stężeniu 50  $\mu\text{mol/l}$ .

Wyznaczono wartość IC<sub>50</sub> = 49,66  $\mu\text{mol/l}$  (95% CI: 45,19 – 54,55) – WYKRES 12.50.



WYKRES 12.51

Podsumowanie testu MTT – zbiorcze zestawienie wyników.

### 12.7. Oznaczenie aktywności biologicznej związku nr N1 – badanie *in vitro* – ocena stopnia hamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII)

Stężenie PGE<sub>2</sub> oznaczono w supernatacie komórek MCF-7 inkubowanych ze związkiem nr N1 (6,25  $\mu\text{mol/l}$  oraz 12,5  $\mu\text{mol/l}$ ) za pomocą zestawu *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express ELISA Kit* firmy Cayman Chemical Company, USA [136].

Parametry krzywej wzorcowej zaprezentowano w SUPLEMENCIE.

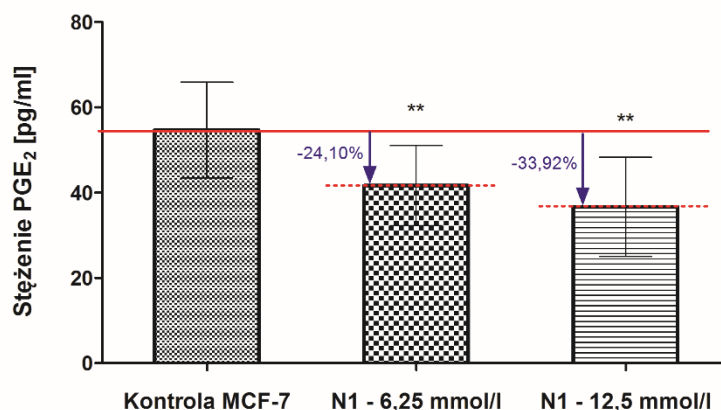
Wyniki przedstawiono w TABELI 12.11 oraz na WYKRESIE 12.52.

TABELA 12.11

Stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórek MCF-7.

PGE <sub>2</sub> [pg/ml]					
Kontrola (n=16)		Związek nr N1 6,25 μmol/l (n=16)		Związek nr N1 12,5 μmol/l (n=16)	
75,95	47,22	42,26	46,56	35,38	40,68
59,04	64,03	41,47	49,63	32,51	38,36
49,81	46,37	25,84	37,56	29,09	48,94
43,88	68,21	58,08	25,38	41,47	22,76
52,48	57,12	32,51	33,15	47,22	28,43
78,27	50,69	39,90	47,90	58,08	31,12
45,53	44,70	46,37	55,57	26,48	23,36
40,68	46,37	43,88	34,66	54,31	17,06
średnia (± SD)		średnia (± SD)		średnia (± SD)	
<b>54,40</b> (± 11,65)		<b>41,29</b> (± 9,51)		<b>35,95</b> (± 11,83)	

## Inkubacja związku nr N1 z komórkami linii MCF-7

MCF-7 : 20 000 komórek / dołek  
czas inkubacji : 72 h

Kontrola MCF-7 (n=16)

PGE<sub>2</sub> = 54,40 (± 11,65 pg/ml)wartość p  
względem kontroli

\*\* p &lt; 0,01

N1 - 6,25 μmol/l (n=16)

PGE<sub>2</sub> = 41,29 (± 9,51) pg/ml

N1 - 12,5 μmol/l (n=16)

PGE<sub>2</sub> = 35,95 (± 11,83) pg/ml

WYKRES 12.52

Stopień zahamowania aktywności COX-2 w komórkach MCF-7 po 72 h inkubacji ze związkiem nr N1.

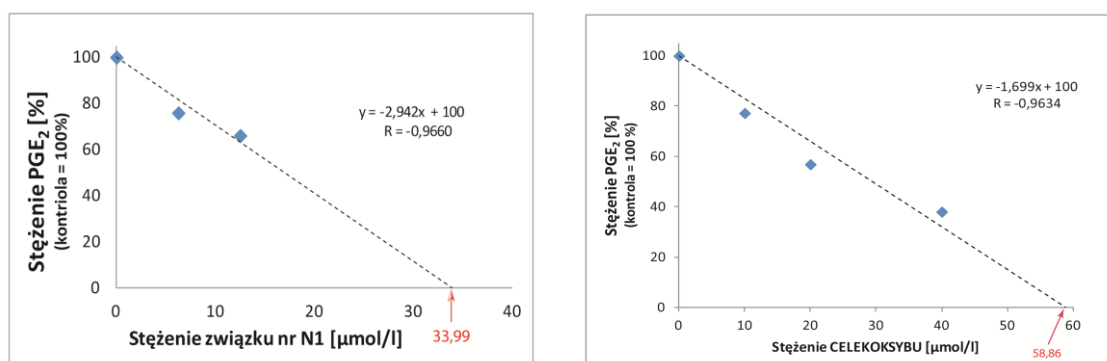
### 12.7.1. Podsumowanie ETAPU VII

Wykazano, że związek nr **N1** charakteryzuje się umiarkowaną siłą hamowania aktywności COX bezpośrednio w komórkach nowotworowych. W zastosowanych stężeniach – 6,25  $\mu\text{mol/l}$  oraz 12,5  $\mu\text{mol/l}$  – jego działanie powodowało zmniejszenie stężenia prostaglandyny  $E_2$  odpowiednio o 24,10% ( $\pm 17,48$ ) i 33,92% ( $\pm 21,75$ ) względem próby kontrolnej.

Zaobserwowano, że stopień inhibicji COX ma charakter liniowy ( $r = -0,9660$ ) w zakresie analizowanych stężeń: 0 – 12,5  $\mu\text{mol/l}$ . Ekstrapolując wyniki można zakładać, że całkowite zahamowanie syntezy  $PGE_2$  w komórkach MCF-7 (a co za tym idzie efekt cytotoksyczny) mógłby wystąpić po inkubacji komórek ze związkiem nr **N1** w stężeniu ok. 34  $\mu\text{mol/l}$ .

Podobne obserwacje można poczynić w odniesieniu do **CELEKOKSYBU**, w przypadku którego stopień zahamowania aktywności COX ma również liniowy przebieg ( $r = -0,9634$ ) dla stężeń 0 – 40  $\mu\text{mol/l}$ . Ekstrapolacja wyników zakłada jednak całkowitą redukcję syntezy  $PGE_2$  przy stężeniu wyższym niż dla związku nr **N1**, tj. ok. 59  $\mu\text{mol/l}$ .

Porównanie zaprezentowano na WYKRESIE 12.53.



WYKRES 12.53

Ekstrapolacja wyników inkubacji związku nr **N1** oraz **CELEKOKSYBU** z komórkami MCF-7 – prognoza całkowitego zahamowania syntezy  $PGE_2$ .

## 12.8. Dokowanie związku N1 i celekoksybu do miejsca aktywnego COX-1 i COX-2 (ETAP VIII)

Procedurę dokowania przeprowadzono za pomocą oprogramowania Discovery Studio 4.0 – korzystając z protokołu „*CDOCKER*” w sekcji „*Receptor-Ligand Interaction*” (metodykę tego badania przedstawiono w ROZDZIALE 8.5).

### 12.8.1. Związek nr N1: 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso-*trans*-stilben

#### COX-1 (PDB ID: 1EQH)

W wyniku przeprowadzonej symulacji komputerowej stwierdzono, że badana cząsteczka wiąże się z centrum katalitycznym cyklooxygenazy poprzez różnego rodzaju wiązania niekowalencyjne:

wodorowe, elektrostatyczne, hydrofobowe oraz oddziaływania van der Waals'a. W tworzenie tych wiązań zaangażowane są zarówno obydwa pierścienie aromatyczne *trans*-stilbenu, jak również grupa nitrowa oraz hydroksylowa w pozycji 3'.

Z kolei w cząsteczce enzymu aminokwasami odpowiedzialnymi za tego rodzaju interakcję wydają się być m.in.: Arg120, Tyr355, Tyr385, Gly526 oraz Ala527. Należy podkreślić, że pierwsze trzy reszty aminokwasowe są niezbędne do katalitycznej przemiany kwasu arachidonowego do PGH<sub>2</sub> [2; 5]. Co istotne, związek **N1** tworzy z tymi resztami trzy wiązania wodorowe (dwa silne i jedno umiarkowane) oraz dwa elektrostatyczne, jednakże są one dość słabe, gdyż odległości między atomami wynoszą ponad 4,0 Å (RYCINA 12.5) [80; 84; 163].

Szczegółowe informacje na temat poszczególnych oddziaływań pomiędzy związkiem **N1** a centrum aktywnym COX-1 przedstawiono w TABELI 12.12.

TABELA 12.12

Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy związkiem **N1** a miejscem aktywnym COX-1.

Rodzaj wiązania	Fragmenty struktury/podstawniki tworzące wiązanie	
	Związek N1 [grupa, atom wiążący]	Reszta aminokwasowa COX-1 [grupa, atom wiążący]
wodorowe	3'-OH	Arg120 [H <sub>2</sub> NC(N+H <sub>2</sub> )NH-] Tyr355 [-OH]
	4-NO <sub>2</sub> [O]	Tyr385 [-OH]
elektrostatyczne: Π – kation Π – anion	4-NO <sub>2</sub> [N <sup>+</sup> ; O <sup>-</sup> ]	Tyr385 [Ar]
hydrofobowe: Π – grupa alkilowa	Ar <sup>I</sup>	Leu352 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Ala527 [=CH-CH <sub>3</sub> ]
	Ar <sup>II</sup>	Val116 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Ala527 [=CH-CH <sub>3</sub> ]
hydrofobowe: Π – grupa amidowa, oddziaływania warstwowe typu „stacking”	Ar <sup>I</sup>	Gly526–Ala527 [wiązanie peptydowe]
oddziaływania typu van der Waals'a	różne struktury cząsteczki	Met113, Tyr348, Val349, Ser353, Leu357, Leu359, Phe381, Leu384, Trp387, Phe518, Met522, Ile523, Ser530, Leu531

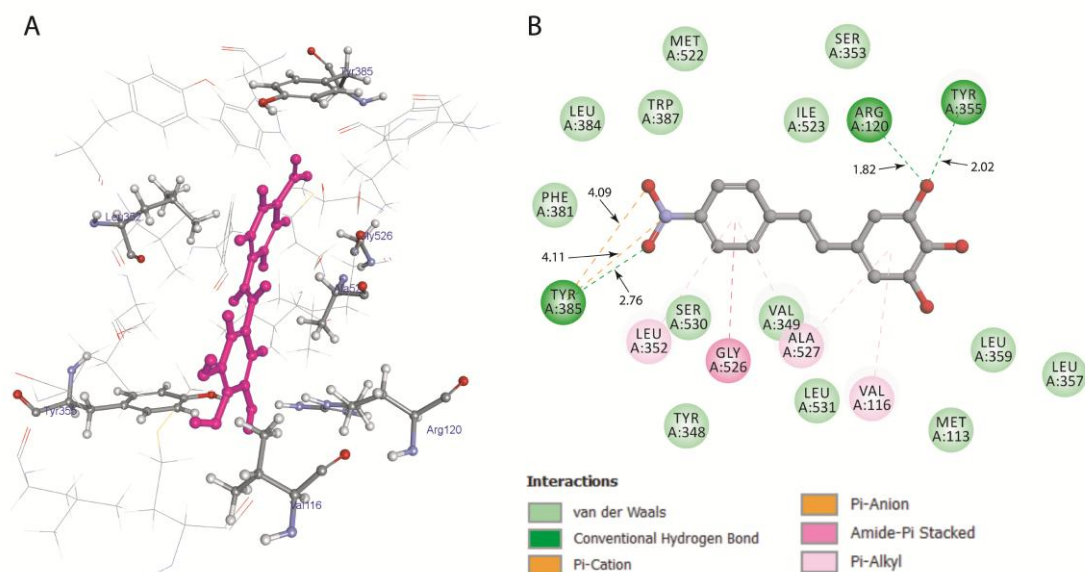
Ar = pierścień aromatyczny reszty aminokwasowej;

Ar<sup>I</sup> = pierścień aromatyczny *trans*-stilbenu (C1-C6);

Ar<sup>II</sup> = pierścień aromatyczny *trans*-stilbenu (C1'-C6')

Analizując przestrzenne umiejscowienie cząsteczki **N1** w centrum aktywnym COX-1 stwierdzono, że preferowana konformacja tego związku jest położona wzdłuż głównego kanału hydrofobowego, przy czym pierścień aromatyczny połączony z grupą nitrową znajduje się głębiej. Świadczą o tym oddziaływania grupy hydroksylowej z Arg120 i Tyr355, które tworzą „wrota” do centrum aktywnego. Podstawnik nitrowy wchodzi natomiast w interakcję z Tyr385 położoną na „szczytce” głównego kanału hydrofobowego [8; 9; 27–29; 159] (RYCINA 12.5).





RYCINA 12.5

Dokowanie związku **N1** w miejscu aktywnym COX-1 – projekcja przestrzenna (A) oraz diagram 2D (B) (w przypadku wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych podano również ich długości, Å).

Z punktu widzenia termodynamiki utworzony kompleks związek **N1**-COX-1 jest korzystny energetycznie, o czym świadczą dodatnie wartości parametrów  $-CDOCKER ENERGY$  oraz  $-CDOCKER INTERACTION ENERGY$ , które wynoszą odpowiednio 16,3235 kcal/mol oraz 30,9868 kcal/mol.

Komputerowa symulacja procesu dokowania wskazuje, że w wyniku umieszczenia preferowanej konformacji związku **N1** w centrum aktywnym enzymu dochodzi do wzajemnego przyciągania się atomów cząsteczki *trans*-stilbenu oraz reszt aminokwasowych COX-1, z jednoczesnym obniżeniem stanu energetycznego takiego układu poprzez wydzielenie się energii w trakcie tworzenia oddziaływań.

#### COX-2 (PDB ID: 4COX)

Interakcja związku **N1** z centrum aktywnym COX-2 prowadzi do utworzenia podobnego „wachlarza” wiązań niekowalencyjnych jak w przypadku pierwszej izoforny. W tworzenie tych oddziaływań zaangażowane są te same struktury cząsteczki **N1** co w symulacji dotyczącej COX-1, czyli obydwa pierścienie aromatyczne, grupa nitrowa oraz hydroksylowa w pozycji 3'. Do aminokwasów COX-2 odpowiedzialnych za wyżej wymienione interakcje należą m.in.: Arg120, Tyr355, Tyr385, Met522, Gly526 oraz Ala527 (RYCINA 12.6).

Zasadnicze różnice w przypadku dokowania cząsteczki **N1** do miejsca aktywnego COX-2 obejmują:

- występowanie tylko jednego silnego wiązania wodorowego ( $\sim 2$  Å) pomiędzy 3'-OH i Tyr355 w porównaniu do trzech wiązań tego typu utworzonych pomiędzy **N1** i COX-1 [163],

- dodatkowe, umiarkowane silne oddziaływanie siarka-tlen pomiędzy Met522 i tlenem grupy nitrowej,
- dodatkowe, słabe wiązanie elektrostatyczne typu  $\Pi$  – kation pomiędzy pierścieniem aromatycznym (C1'-C6') związku **N1** i azotem Arg120.

Inna, mniej istotna obserwacja dotyczy mniejszej ilości oddziaływań typu van der Waals'a (8 vs 14).

Szczegółowe informacje na temat poszczególnych oddziaływań pomiędzy związkiem **N1** a centrum aktywnym COX-2 przedstawiono w poniższej TABELI 12.13.

TABELA 12.13

Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy związkiem **N1** a miejscem aktywnym COX-2.

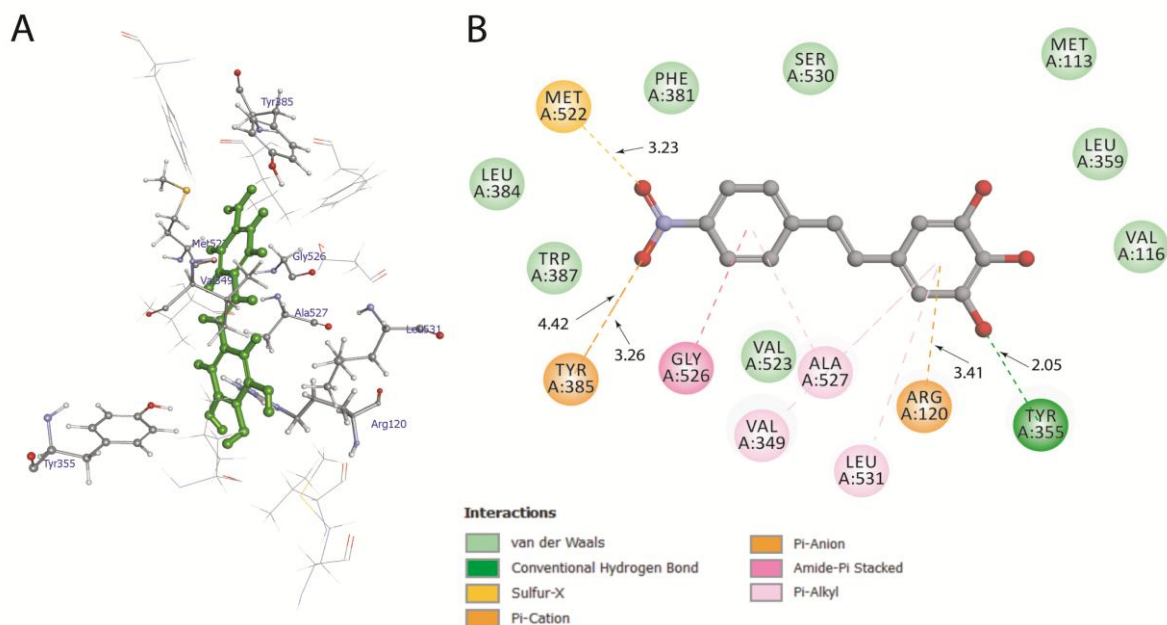
Rodzaj wiązania	Fragmenty struktury/podstawniki tworzące wiązanie	
	Związek N1 [grupa, atom wiążący]	Reszta aminokwasowa COX-2 [grupa, atom wiążący]
wodorowe	3'-OH	Tyr355 [-OH]
elektrostatyczne: $\Pi$ – kation $\Pi$ – anion	4-NO <sub>2</sub> [N <sup>+</sup> ; O <sup>-</sup> ]	Tyr385 [Ar]
elektrostatyczne: $\Pi$ – kation	Ar <sup>II</sup>	Arg120 [=N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> ]
siarka – tlen	4-NO <sub>2</sub> [O]	Met522 [-SCH <sub>3</sub> ]
hydrofobowe: $\Pi$ – grupa alkilowa	Ar <sup>I</sup>	Ala527 [=CH-CH <sub>3</sub> ] Val349[-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
	Ar <sup>II</sup>	Ala527 [=CH-CH <sub>3</sub> ] Leu531 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
hydrofobowe: $\Pi$ – grupa amidowa, oddziaływania warstwowe typu „stacking”	Ar <sup>I</sup>	Gly526–Ala527 [wiązanie peptydowe]
oddziaływania typu van der Waals'a	różne struktury cząsteczki	Met113, Val116, Leu359, Phe381, Leu384, Trp387, Val523, Ser530

Ar = pierścień aromatyczny reszty aminokwasowej;

Ar<sup>I</sup> = pierścień aromatyczny *trans*-stilbenu (C1-C6);

Ar<sup>II</sup> = pierścień aromatyczny *trans*-stilbenu (C1'-C6')

Orientacja przestrzenna analizowanej pochodnej *trans*-stilbenu w centrum aktywnym COX-1 i COX-2 jest bardzo podobna. W oparciu o przeprowadzoną symulację dokowania można stwierdzić, że badana cząsteczka położona jest również wzdłuż głównego kanału hydrofobowego, a większość aminokwasów odpowiedzialnych za podstawowe oddziaływania jest identyczna jak w przypadku COX-1 (RYCINA 12.6).



RYCINA 12.6

Dokowanie związku N1 w miejscu aktywnym COX-2 – projekcja przestrzenna (A) oraz diagram 2D (B) (w przypadku wiązania wodorowego, siarka-tlen i oddziaływań elektrostatycznych podano również długości, Å).

W wyniku przeprowadzonej symulacji uzyskano następujące wartości parametrów dokowania:

- –CDOCKER ENERGY = 26,9004 kcal/mol,
- –CDOCKER INTERACTION ENERGY = 36,7097 kcal/mol.

Obliczone parametry energetyczne wskazują na nieco bardziej korzystną interakcję cząsteczki **N1** z centrum aktywnym COX-2 niż COX-1. Na tej podstawie można prognozować, że badany związek powinien łatwiej dopasowywać się i silniej oddziaływać z drugą izoformą, czyli w efekcie powinien wykazywać większą zdolność do hamowania aktywności COX-2.

### 12.8.2. Związek referencyjny - celekoksyb

#### COX-1 (PDB ID: 1EQH)

Oddziaływanie CELEKOKSYBU z centrum aktywnym COX-1 cechuje się dużą liczbą interakcji niekowalencyjnych, z których najistotniejsze są wiązania wodorowe, hydrofobowe oraz siarkowe. W tworzenie tych wiązań zaangażowane są wszystkie struktury cząsteczki, zarówno pierścienie aromatyczne jak i podstawniki.

Do aminokwasów wchodzących w interakcję ze związkiem referencyjnym należą m.in.: Phe205, Tyr385, Met522, Ile523, Gly526, Ala527 oraz Ser530. Co istotne, CELEKOKSYB tworzy z tymi resztami trzy silne wiązania wodorowe oraz wiele oddziaływań hydrofobowych (RYCINA 12.7).

Szczegółowe informacje na temat przedstawiono w TABELI 12.14.

TABELA 12.14

Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy CELEKOKSYBEM a miejscem aktywnym COX-1.

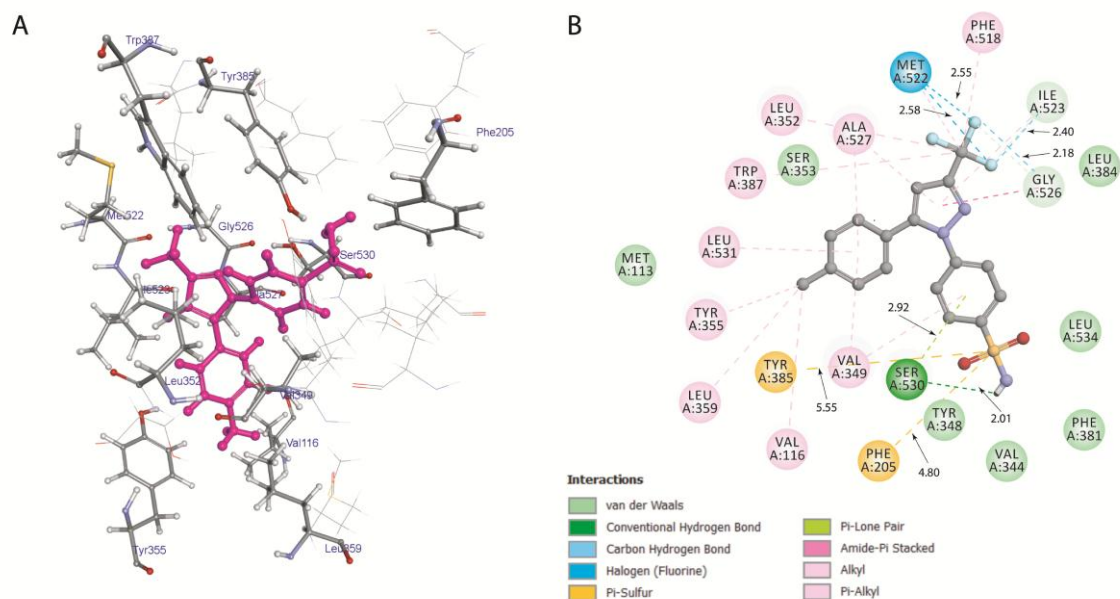
Rodzaj wiązania	Fragmety struktury/podstawniki tworzące wiązanie	
	CELEKOKSYB [grupa, atom wiążący]	Reszta aminokwasowa COX-1 [grupa, atom wiążący]
wodorowe	4-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Ser530 [-CH <sub>2</sub> OH]
	3-CF <sub>3</sub>	Ile523 [-NHCH(R)C(O)-]
		Gly526 [-CH <sub>2</sub> -]
hydrofobowe: Π – grupa alkilowa	Ar <sup>I</sup>	Ile523 [-CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ] Ala527 [-CH <sub>3</sub> ]
	Ar <sup>II</sup>	Val349 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
	Ar <sup>III</sup>	Val349 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
		Ala527 [-CH <sub>3</sub> ]
	3-CF <sub>3</sub>	Trp387 [Ar]
		Phe518 [Ar]
4-CH <sub>3</sub>	Tyr355 [Ar]	
hydrofobowe: grupa alkilowa – grupa alkilowa	3-CF <sub>3</sub>	Leu352 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Met522 [-SCH <sub>3</sub> ]
		Val116 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Leu359 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
hydrofobowe: Π – grupa amidowa, oddziaływania warstwowe typu „stacking”	Ar <sup>I</sup>	Gly526–Ala527 [wiązanie peptydowe]
Π <sub>(Ar)</sub> – tlen (wolna para elektronów)	Ar <sup>II</sup>	Ser530 [-CH <sub>2</sub> OH]
Π <sub>(Ar)</sub> – siarka	4-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Phe205 [Ar] Tyr385 [Ar]
fluor – tlen (wiązanie halogenowe)	3-CF <sub>3</sub>	Met522 [-NHCH(R)CO-]
oddziaływania typu van der Waals’a	różne struktury cząsteczki	Met113, Phe209, Val344, Tyr348, Ser353, Phe381, Leu384, Leu531, Leu534

Ar = pierścień aromatyczny reszty aminokwasowej;

Ar<sup>I</sup> = pierścień pirazolu;Ar<sup>II</sup> = pierścień fenylu podstawiony grupą sulfoamidową;Ar<sup>III</sup> = pierścień fenylu podstawiony grupą metylową.

Na podstawie przeprowadzonej symulacji stwierdzono, że najbardziej korzystna konformacja CELEKOKSYBU umiejscowiona jest w głównym kanale hydrofobowym (pierścień pirazolu oraz fenylu z grupą metylową) oraz bocznym kanale hydrofobowym (pierścień fenylu z grupą sulfonamidową) centrum aktywnego COX-1, czyli odmiennie niż w przypadku związków należących do grupy *trans*-stilbenów [32]. Należy jednak zaznaczyć, że ta różnica wynika bezpośrednio z innej budowy koksytów, w których zamiast mostka etylenowego (tworzącego liniową strukturę z 2 podstawnikami feylowymi) występuje pierścień pirazolu łączący obydwa pierścienie benzenu pod kątem ok. 90°, przez co rdzeń tych związków zajmuje większą przestrzeń. W rezultacie cząsteczkom o takiej strukturze trudniej jest się wpasować do miejsca aktywnego COX-1, które cechuje się mniejszą objętością niż w przypadku COX-2.

Preferowane położenie CELEKOKSYBU w centrum aktywnym COX-1 zaprezentowano na RYCINIE 12.7.



### RYCINA 12.7

Dokowanie CELEKOKSYBU w miejscu aktywnym COX-1 – projekcja przestrzenna (A) oraz diagram 2D (B)

(w przypadku wiązań wodorowych,  $\Pi$ -siarka i oddziaływań fluor – siarka podano również długości, Å).

Obliczone parametry energetyczne również wskazują, że oddziaływanie CELEKOKSYBU z centrum aktywnym COX-1 ma charakter wysoce niekorzystny. Świadczy o tym przede wszystkim bardzo niska, ujemna wartość  $-CDOCKER$  ENERGY wynosząca  $-81.0490$  kcal/mol. Drugi z parametrów,  $-CDOCKER$  INTERACTION ENERGY, cechuje się również niską wartością rzędu  $4,0978$  kcal/mol.

Na uzyskane wyniki mają wpływ następujące czynniki:

- brak bocznej „kieszeni” hydrofilowej, w której mógłby „zakotwiczyć” pierścień fenylu podstawiony grupą sulfonamidową,
- antagonistyczna interakcja pomiędzy aminokwasami tworzącymi hydrofobową boczna kieszeń a podstawnikiem hydrofilowym, którym jest sulfonamid,
- mała przestrzeń miejsca aktywnego oraz sztywna struktura enzymu (tzw. dokowanie półgiętkie) dodatkowo utrudniają przyjęcie optymalnej konformacji przez związek badany.

Na tej podstawie można stwierdzić, że „wpasowanie się” związku referencyjnego do cząsteczki cyklooksygenazy 1 i przyjęcie w jej miejscu aktywnym optymalnej konformacji przestrzennej wymaga bardzo dużego nakładu energii. W rezultacie utworzony kompleks wykazuje słabe oddziaływanie niewiążące pomimo utworzenia różnego rodzaju wiązań.

### COX-2 (PDB ID: 4COX)

Wynik dokowania tego związku do miejsca aktywnego drugiej izoforny cyklooksygenazy sugeruje jego korzystną konformację. Związane jest to przede wszystkim z zastąpieniem Ile przez Val

w pozycji 523, dzięki czemu pojawia się dostęp do bocznej „kieszeni” hydrofilowej i zwiększa się przestrzeń do oddziaływań enzymu z ligandami o rozgałęzionej strukturze.

W efekcie cząsteczka CELEKOKSYBU przyjmuje zupełnie inną konformację przestrzenną niż w COX-1. W wykonanej symulacji zaobserwowano, że poszczególne jej fragmenty wchodziły w interakcję z następującymi strukturami COX-2 (TABELA 12.15, RYCINA 12.8):

- pierścień benzenu z grupą metylową oraz pierścień pirazolu są umieszczone wzdłuż głównego kanału hydrofobowego,
- pierścień pirazolu oraz podstawnik trifluorometylowy wchodzi w oddziaływania z aminokwasami znajdującymi się u podstawy głównego kanału hydrofobowego (m.in. z Arg120) oraz tworzącymi boczny kanał hydrofobowy,
- drugi pierścień benzenu (z podstawnikiem sulfonamidowym) oddziałuje z aminokwasami bocznego kanału hydrofobowego,
- grupa sulfonamidowa tworzy aż pięć silnych i umiarkowanie silnych wiązań wodorowych z aminokwasami „kieszeni” hydrofilowej (His90 i Gln192) oraz budującymi boczny i główny kanał hydrofobowy (Leu352, Ser353 i Phe518).

Uzyskane wyniki są podobne do wyników analizy kompleksu celekoksyb-COX-2 przedstawionych w ROZDZIALE 1.3.1 [8; 9; 27–30]. Pewne rozbieżności dotyczące aminokwasów lub struktur inhibitora zaangażowanych w tworzenie wiązań mogą wynikać z zastosowania różnych programów komputerowych oraz innych algorytmów dokowania, jednak nie ma to istotnego znaczenia dla interpretacji danych.

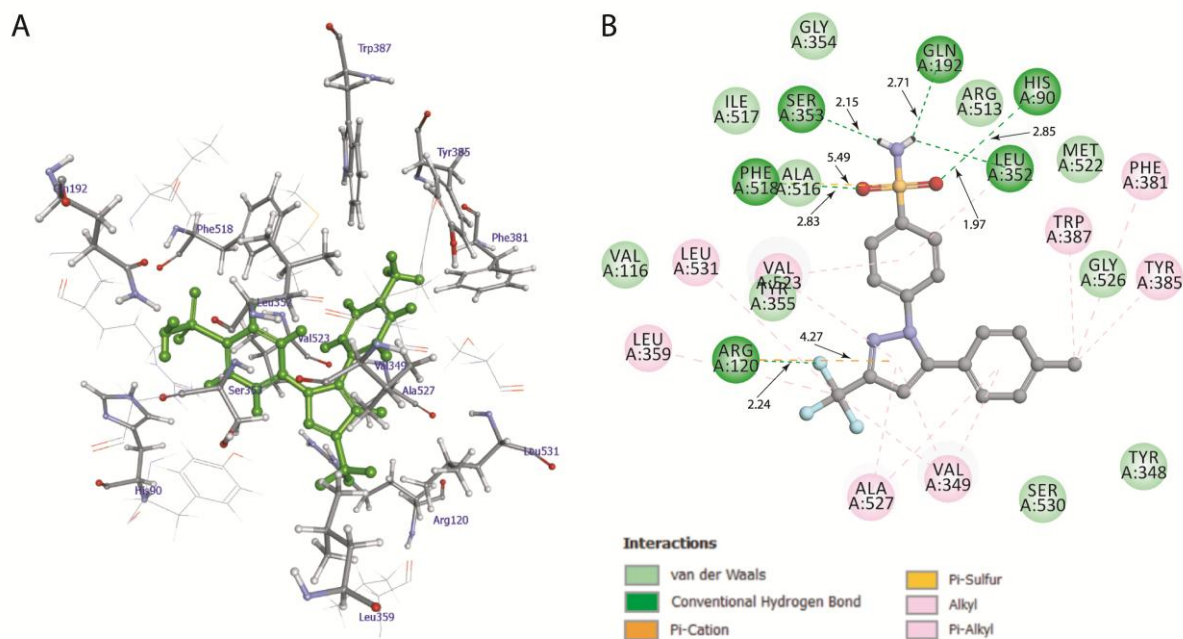
TABELA 12.15

Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy **CELEKOKSYBEM** a miejscem aktywnym COX-2.

Rodzaj wiązania	Fragmenty struktury/podstawniki tworzące wiązanie	
	CELEKOKSYB [grupa, atom wiążący]	Reszta aminokwasowa COX-2 [grupa, atom wiążący]
wodorowe	4-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	His90 [-ArN <sub>1</sub> -H] Phe518 [-NHCH(R)C(O)-] Gln192 [-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> ] Leu352 [-NHCH(R)C(O)-] Ser353 [-CH <sub>2</sub> OH]
	4-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Arg120 [=N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> ]
	3-CF <sub>3</sub>	Arg120 [=N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> ]
elektrostatyczne: Π – kation	Ar <sup>I</sup>	Arg120 [=N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> ]
hydrofobowe: Π – grupa alkilowa	Ar <sup>I</sup>	Val349 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Val523 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Ala527 [-CH <sub>3</sub> ]
	Ar <sup>II</sup>	Leu352 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Val523 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
	Ar <sup>III</sup>	Val349 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Ala527 [-CH <sub>3</sub> ]
	4-CH <sub>3</sub>	Phe381 [Ar] Tyr385 [Ar] Trp387 [Ar]

hydrofobowe: grupa alkilowa – grupa alkilowa	3-CF <sub>3</sub>	Val349 [-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Leu359 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] Leu531 [-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]
Π(Ar) – siarka	4-SO <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	Phe518 [Ar]
oddziaływania typu van der Waals'a	różne struktury cząsteczek	Val116, Tyr348, Gly354, Tyr355, Arg513, Ala516, Ile517, Met522, Gly526, Ser530

Ar = pierścień aromatyczny reszty aminokwasowej;  
Ar<sup>I</sup> = pierścień pirazolu;  
Ar<sup>II</sup> = pierścień fenylu podstawiony grupą sulfoamidową;  
Ar<sup>III</sup> = pierścień fenylu podstawiony grupą metylową.



RYCINA 12.8

Dokowanie CELEKOKSYBU w miejscu aktywnym COX-2 – projekcja przestrzenna (A) oraz diagram 2D (B) (w przypadku wiązań wodorowych oraz Π-siarka podano również długości, Å).

Na łatwiejsze dopasowanie się związku do centrum aktywnego COX-2 niż COX-1 oraz silniejsze oddziaływanie z aminokwasami tej izoforny wskazują również wyniki obliczeń obydwóch parametrów energetycznych. Wartość –CDOCKER ENERGY wyniosła 11,2467 kcal/mol, co sugeruje, że do uzyskania preferowanej konformacji CELEKOKSYBU wymagany jest dużo mniejszy wydatek energetyczny niż w przypadku oddziaływania z miejscem aktywnym COX-1. Wartość drugiego parametru –CDOCKER INTERACTION ENERGY została obliczona natomiast na poziomie 47,7623 kcal/mol. Tak wysoki wynik świadczyć może o występowaniu silnych interakcji polegających na wzajemnym przyciąganiu się atomów cząsteczki inhibitora oraz reszt aminokwasowych COX-2, z jednoczesnym obniżeniem stanu energetycznego takiego układu poprzez wydzielenie się energii w trakcie tworzenia oddziaływań niekwalencyjnych. Szczególną rolę w tym wypadku należy przypisać licznym wiązaniom wodorowym.

### 12.8.3. Podsumowanie ETAPU VIII

Celem analizy komputerowej było określenie sposobu i siły wiązania związku **N1** oraz CELEKOKSYBU z centrum katalitycznym COX-1/-2 o aktywności cyklooksygenazy, jak również porównanie uzyskanych wyników z rezultatami badań *in vitro*.

W przypadku pochodnej *trans*-stilbenu **N1** otrzymane dane nie wskazują jednoznacznie na jego selektywne działanie wobec izoformy COX-2, gdyż przestrzenna orientacja tej cząsteczki w obydwóch centrach aktywnych jest bardzo podobna, a parametry energetyczne nie różnią się istotnie mimo korzystniejszego oddziaływania z COX-2.

W odniesieniu do CELEKOSYBU dane z uzyskane na podstawie symulacji komputerowej są zbieżne z wynikami badań *in vitro* oraz danymi literaturowymi wskazującymi na selektywne działanie tego inhibitora wobec COX-2 [4; 18; 20].



## 13. Dyskusja

Do niedawna nowotwory złośliwe stanowiły drugą po chorobach sercowo-naczyniowych przyczynę zgonów na świecie, w tym również w Polsce [164; 165]. Obecnie stają się one pierwszą przyczyną śmiertelności w Europie Zachodniej oraz w Polsce, szczególnie w populacji osób poniżej 65. roku życia. Należy podkreślić, że u kobiet przed 65. rokiem życia zgony z przyczyn nowotworowych występują dwa razy częściej niż z powodu chorób układu krążenia [165]. Na zmianę tego trendu epidemiologicznego wpływ mają nie tylko behawioralne i środowiskowe czynniki rakotwórcze (np. otyłość, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu, brak aktywności fizycznej, zakażenia wirusowe HPV i HBV), ale także znaczący postęp medycyny w zakresie leczenia i profilaktyki chorób serca i układu krążenia [164–167].

Od wielu lat rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem w populacji kobiet w Polsce i na całym świecie [40; 164; 165]. Wprowadzenie badań przesiewowych, poprawa diagnostyki oraz postępy w farmakoterapii przyczyniły się do stopniowego zmniejszenia umieralności na ten rodzaj nowotworu. Niemniej jednak, prognozy dotyczące zapadalności na raka piersi w kolejnych latach nadal nie są optymistyczne, a ma to związek nie tylko z jego wcześniejszą i wyższą wykrywalnością, ale również z zmianami w profilu demograficznym ludności. Wydłużenie przeciętnej długości życia powoduje, że przypadków raka piersi będzie więcej, gdyż ryzyko zachorowania na tę chorobę rośnie wraz z wiekiem [40; 165].

Rozwój nowotworów złośliwych to złożony i wieloetapowy proces, często trwający wiele lat. Na poziomie komórkowym obejmuje on m.in. mutację genów, aktywację czynników wzrostu i szlaków sygnałowych oraz nadekspresję enzymów i białek antyapoptycznych. W tkankach natomiast powiązany jest z przewlekłym stanem zapalnym, upośledzeniem funkcji lokalnego układu odpornościowego oraz angiogenezą [37–39; 51; 52; 165]. Dlatego też strategia poszukiwania, selekcji i badania nowych związków chemicznych w kierunku potencjalnego zastosowania w terapii przeciwnowotworowej obejmuje różne mechanizmy działania, do których zalicza się również aktywność przeciwzapalną.

W przypadku raka piersi punkt uchwytu dla tego typu związków może stanowić cyklooksigenaza-2 (COX-2) i produkty jej aktywności (głównie PGE<sub>2</sub>), które odgrywają istotną rolę w patomechanizmie tej choroby [50; 168]. Nadekspresja COX-2 w raku piersi występuje często i koreluje z agresywniejszym charakterem guza oraz większą opornością na standardową chemioterapię [45; 46; 48; 168]. Dotychczas przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować co najmniej kilka prawdopodobnych mechanizmów proonkogenego działania COX-2, wśród których można wyróżnić aktywację szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR związanego z przeżyciem i proliferacją, stymulowanie angiogenezy zależnej od VEGF, immunosupresję oraz hamowanie apoptozy poprzez regulację ekspresji białek pro- i antyapoptycznych [12; 45–50; 62; 65; 168].

W związku z powyższym wprowadzenie do standardów terapii onkologicznej selektywnych lub preferencyjnych inhibitorów COX-2 wydaje się być obiecującą metodą walki z rakiem. Dotychczasowe wyniki eksperymentów przedklinicznych z zastosowaniem selektywnych inhibitorów COX-2 z grupy koksymbów, głównie celekoksybu wydają się potwierdzać słuszność tej koncepcji [45; 58; 59; 60; 135; 169]. Należy jednak zaznaczyć, że wpływ na uzyskane wyniki mają również inne mechanizmy działania koksymbów, jak np. aktywacja wewnątrzpochodnej ścieżki apoptozy, zahamowania cyklu komórkowego w fazie G0/G1 i zmniejszenie liczby komórek w fazie S [45; 135]. Niestety istotnym ograniczeniem w powszechnym stosowaniu tego typu leków są poważne działania niepożądane, w tym udary i zawały mięśnia sercowego będące skutkiem zachwiania równowagi hemostatycznej organizmu i stanowiące powód wycofania kilku leków z obrotu [4; 20–22].

W ostatnich latach pojawiło się wiele interesujących doniesień o związkach pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego z grupy *trans*-stilbenów, które mogłyby w przyszłości stanowić alternatywę wobec leków przeciwzapalnych z grupy NLPZ oraz koksymbów. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje resweratrol oraz jego metabolity i pochodne (np. DMU-212, DMU-214, piceatannol, pterostilben,), które, oprócz hamowania aktywności COX-2, wykazują również właściwości chemoprewencyjne, antyoksydacyjne i proapoptyczne [31–33; 170]. Niestety niska biodostępność tych związków po podaniu doustnym może stanowić istotny czynnik ograniczający skuteczność i możliwość ich wykorzystania w terapii onkologicznej [171]. W związku z tym kolejne prace badawcze skupione były na syntezie nowych pochodnych *trans*-stilbenu oraz oznaczeniu ich aktywności biologicznej względem COX-2 [32, 34; 35]. Na podstawie dostępnych danych literaturowych literaturowej stwierdzono jednak, że ilość związków tego typu nadal jest niewielka, a zakres wykonanych analiz przedklinicznych niewystarczający, aby móc określić ich potencjał terapeutyczny. Dlatego też w niniejszej pracy doktorskiej ocenie działania biologicznego poddano nowe pochodne *trans*-stilbenu. Ponadto, przeanalizowano wstępnie związki pokrewne zawierające szkielet *trans*-stilbazolu pod kątem zdolności do hamowania aktywności COX-2.

W pierwszym etapie pracy wykonano badanie przesiewowe *in vitro* polegające na bezpośredniej reakcji COX-1 lub COX-2 z badanymi związkami w stężeniu 100  $\mu\text{mol/l}$ . Związki, które hamowały aktywność obydwóch izoform w co najmniej 50% były poddawane dalszym testom w celu wyznaczenia wartości  $\text{IC}_{50}$  oraz współczynnika selektywności względem COX-2. Projekt badania został opracowany na podstawie analizy metodyki i wyników podobnych badań *in vitro* z udziałem pochodnych resweratrolu [34] i 1,1,2-triaryloetenu [35], w których nie raportowano wartości  $\text{IC}_{50}$  odpowiednio powyżej 10  $\mu\text{g/ml}$  (co odpowiada ok. 43  $\mu\text{mol/l}$  resweratrolu) oraz 100  $\mu\text{mol/l}$ .

W wyniku przeprowadzonego testu immunoenzymatycznego wytypowano trzy związki z grupy pochodnych *trans*-stilbenu, które wykazywały przynajmniej 50% zdolność do hamowania aktywności COX-1 i COX-2. Następnie wyznaczono dla nich wartości  $\text{IC}_{50}$  wobec obydwóch izoform. Potencjalnymi inhibitorami COX-1/-2 okazały się cząsteczki o symbolach Z5, Z9 oraz Z11, które zawierają chlor lub grupę nitrową w pozycji 4. W niniejszej pracy doktorskiej wykazano,

że najsilniejsze i najbardziej selektywne działanie hamujące COX-2 posiada związek Z9 (4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilben), dla którego uzyskano następujące wyniki: COX-2 IC<sub>50</sub> = 4,017 μmol/l (95% CI: 2,280 – 7,586), selektywność względem COX-2 = 21,16 (95% CI: 15,74 – 32,21). W porównaniu do dwóch pozostałych cząsteczek Z5 i Z11, selektywność tego związku względem indukowanej izoformy COX jest 5-krotnie wyższa, co może wynikać m.in. z zastąpienia ugrupowania karboksymetyloetoksyloвого podstawnikiem etoksylowym w pozycji 4' [159]. Biorąc pod uwagę klasyfikację zaproponowaną przez Warnera i wsp. (2004) [172], pochodną Z9 można zaliczyć do preferowanych inhibitorów COX-2 (wskaźnik selektywności pomiędzy 5 – 50), podobnie jak nimesulide, meloksykam i etodolak. Przypuszcza się, że w przypadku nimesulidu oraz związku Z9 porównywalna selektywność może wiązać się m.in. z obecnością pierścienia benzenu podstawionego grupą nitrową w pozycji *para*.

Co istotne, związki o strukturze *trans*-stilbazolu (Z20 – Z25) charakteryzowały się mniejszą aktywnością, powodując 3-5-krotnie słabszą inhibicję COX-2. W przypadku cząsteczek Z20 – Z22 prawdopodobną przyczyną słabszego działania może być brak podstawnika będącego donorem elektronów (np. atomu tlenu grupy nitrowej lub hydroksylowej, atomu chloru) przy węglach C2-C5. Symulacje komputerowe wykonane dla różnych inhibitorów COX wykazały, że tego typu podstawniki mogą tworzyć wiązania wodorowe z kluczowymi aminokwasami odpowiedzialnymi za katalityczną przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyny H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), tj. Arg120, Tyr355 i Tyr385 [2; 5; 32, 173]. Z kolei cząsteczki Z23 – Z25 występują w postaci jonowej (jako chlorki), co może utrudniać ich interakcję z hydrofobowym kanałem tworzącym centrum aktywne cyklooksygenazy. Należy podkreślić, że wśród obecnie stosowanych leków z grupy koksycybów [18; 19; 20; 24; 26] oraz dotychczas przebadanych pochodnych *trans*-stilbenu [32, 34; 35] nie występują cząsteczki o jonowym charakterze, co może dodatkowo tłumaczyć słabsze działanie pochodnych *trans*-stilbazolu. Dlatego przeprowadzenie badań nad nowymi cząsteczkami o tej strukturze wydaje się niezbędne w celu potwierdzenia bądź odrzucenia powyższej hipotezy.

Wyniki uzyskane dla związków Z5, Z9 i Z11 zostały następnie wykorzystane w analizie 2D QSAR mającej na celu wytypowanie struktur odpowiedzialnych za selektywne działanie względem COX-2. Do utworzenia komputerowych modeli predykcyjnych wykorzystano nie tylko pochodne *trans*-stilbenu zawierające różnego rodzaju podstawniki (głównie hydroksylowe, metoksylowe i nitrowe) [32; 34], ale również 1,1,2-triaryloeteny posiadające szkielet *trans*-stilbenu oraz trzeci pierścień aromatyczny przy mostku etylenowym [35]. W przypadku tego rodzaju analizy QSAR różnice w budowie przestrzennej można pominąć, ponieważ zależność struktura-aktywność rozpatrywana jest jedynie w odniesieniu do właściwości fizykochemicznych analizowanych cząsteczek. Na podstawie przeprowadzonych obliczeń stwierdzono, że pochodne *trans*-stilbenu o mniejszej lipofilności (↓ClogP), posiadające więcej donorów wiązań wodorowych (↑HBD) oraz zawierające więcej atomów polarnych, jak np. tlen, azot, siarka lub fluor (↑TPSA) powinny charakteryzować się silniejszym i bardziej selektywnym działaniem wobec COX-2 niż COX-1.

W związku z tym przy projektowaniu i syntezie nowych *trans*-stilbenu powinno się uwzględnić przede wszystkim podstawniki nitrowe i hydroksylowe, jak również amidowe, sulfonowe i trifluorometylowe [159]. Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki uzyskane przez Muriasa i wsp. (2004), którzy wykazali, że obecność grup hydroksylowych, czyli wyższa wartość deskryptora TPSA, powinna sprzyjać silniejszej zdolności analogów resweratrolu do inhibicji COX-2 [32]. Natomiast cząsteczki o większej powierzchni i objętości, czyli mające podstawniki metoksyłowe, powinny raczej być bardziej aktywne względem COX-1. W odniesieniu do lipofilności rezultaty obliczeń są zgodne z wynikami otrzymanymi w pracy doktorskiej. Autorzy tego badania sugerują, że związki o niższych wartościach logP powinny silniej hamować aktywność COX-2 niż COX-1, aczkolwiek selektywność tego działania nie była statystycznie istotna w analizowanym zestawie związków ( $r = -0,588$ ). Jedną z przyczyn tej rozbieżności może być mała ilość cząsteczek, jaką mogli wykorzystać Murias i wsp. do stworzenia modelu obliczeniowego (zaledwie 14). Ponadto, wpływ na ten wynik mogła mieć odmienna selektywność niektórych związków o zbliżonej wartości logP względem COX-2, np. dla 3,3',5,5'-tertahydrokso-*trans*-stilbenu oraz 3,4',5,5'-tertahydrokso-*trans*-stilbenu wyniosła odpowiednio 5,83 i 417,08 [32].

W pracy doktorskiej po raz pierwszy przeprowadzono probabilistyczną analizę *in silico* pochodnych *trans*-stilbenu za pomocą naiwnego modelu Bayesa. Na podstawie utworzonego modelu komputerowego określono fragmenty budowy mogące sprzyjać silniejszej lub słabszej aktywności tych związków względem COX-2. Wykazano, że obecność podstawników hydrofilowych, takich jak np. grupa hydroksylowa lub nitrowa, może zwiększać aktywność potencjalnych inhibitorów COX-2. Podstawniki lipofilowe, do których zalicza się przede wszystkim grupę metoksyłową i dimetyloaminową, mogą natomiast powodować skutek odwrotny. Obserwacje te są zgodne z wynikami analizy 2D QSAR wskazującymi na dodatnią korelację pomiędzy polarnością tych związków a biologiczną aktywnością względem indukowanej izoformy COX. Co istotne, obecność kilku grup hydroksylowych (jak w związku **N1**) powinna w sposób znaczący zwiększać zdolność tych cząsteczek do inhibicji COX-2, np. poprzez tworzenie wiązań wodorowych z miejscem aktywnym cyklooksygenazy. Otrzymane wyniki *in silico* mogą zostać wykorzystane podczas projektowania kolejnych inhibitorów COX-2 z grupy *trans*-stilbenu.

W oparciu o wyniki analizy 2D QSAR zaprojektowano i zsyntezowano 3 nowe pochodne *trans*-stilbenu. Spośród tych związków najsilniejsze i jednocześnie wybiórcze działanie wobec COX-2 wykazywał 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso-*trans*-stilben (oznaczony symbolem **N1**), dla którego uzyskano następujące wartości: COX-2 IC<sub>50</sub> = 0,279 μmol/l (95% CI: 0,111 – 0,703), selektywność względem COX-2 = 62,81 (95% CI: 48,42 – 81,28). Zgodnie z klasyfikacją związek ten można zaliczyć do preferencyjnych lub wybiórczych inhibitorów COX-2, podobnie jak celekoksyb [172]. Pozostałe dwa związki (pochodne metoksyłowe), zgodnie z prognozami badania *in silico*, charakteryzowały się ok. 10-15-krotnie słabszym działaniem i brakiem selektywności wobec tej izoformy. Potwierdzeniem tego są wyniki badań Muriasa i wsp. (2004), którzy wykazali,

że aktywność i selektywność analogów resweratrolu względem COX-2 związana jest przede wszystkim z obecnością podstawników hydroksylowych [32]. Przedmiotem badań Sale i wsp. (2005) był natomiast 3,4,4',5-tetrametoksy-*trans*-stilben (DMU-212) oraz jego metabolity. Również w tym przypadku autorzy zaobserwowali, że zdolność DMU-212 do hamowania aktywności COX-2 uwarunkowana jest jej metabolizmem, na drodze O-demetylacji, do pochodnych hydroksylowych [174]. Podobne wnioski poczynili w swoich badaniach Kang i wsp. (2009), którzy stwierdzili korzystny wpływ pierścienia rezorcynowego na siłę działania względem COX-2. Selektywne właściwości tych związków przypisali jednakże nie tyle grupie nitrowej (typowanej w analizie 2D QSAR), ale innym podstawnikom bogatym w elektrony, jak np. grupa trifluorometylowa lub hydroksylowa w pozycji 4. Ponadto, dla 3',5'-dihydroksy-4-nitro-*trans*-stilbenu, czyli związku różniącego się od cząsteczki **N1** brakiem grupy hydroksylowej przy węglu C4', oznaczona wartość IC<sub>50</sub> była niższa względem COX-1 niż COX-2 [34]. Tego typu rozbieżności mogą wskazywać, że obecność podstawnika 4'-OH może mieć kluczową rolę w interakcji z COX-2. Świadczyć o tym mogą również wyniki badań dla 3,3',4,5,5'-pentaohydroksy-*trans*-stilbenu (PHS) oraz 3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy-*trans*-stilbenu (HHS), których selektywność działania względem COX-2 różni się aż 100-krotnie, dla PHS wynosi 7,44, a dla HHS ma wartość 719,23 [32]. Siarczanowe koniugaty resweratrolu były przedmiotem badania Hoshiho i wsp. (2010), którzy wykazali, że wprowadzenie tego hydrofilowego podstawnika do cząsteczki macierzystej powoduje ok. 10-krotnie osłabienie jej potencjału do hamowania aktywności COX-2 [175]. W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono również reakcje *in vitro* celekoksylu (związku referencyjnego) z COX-1 i COX-2. Uzyskano wyniki podobne do danych literaturowych, co potwierdza silne i wysoce wybiórcze działanie celekoksylu wobec COX-2 [32; 35].

Dostępne dane literaturowe wskazują na nadekspresję COX (w szczególności indukowanej izoformy COX-2) w wielu różnych nowotworowych liniach komórkowych [135; 155; 156]. Jedną z nich jest estrogenozależna ludzka linia komórkowa raka piersi MCF-7, która stanowiła model doświadczalny w badaniach aktywności potencjalnych inhibitorów COX-2, tj. celekoksylu [135], NS398 [168], resweratrolu, DMU-212 [176] oraz 3'-hydroksy-DMU-212 (DMU-214) [177]. W związku z powyższym również ta linia komórkowa została wybrana w niniejszej rozprawie doktorskiej do oceny właściwości cytotoksycznych sześciu nowych inhibitorów COX, wytypowanych na podstawie wyników badania skryningowego (związki **Z5**, **Z9** i **Z11**) oraz zsyntezowanych *de novo* (cząsteczki **N1**, **N2** i **N6**). Jako kontrolę pozytywną zastosowano celekoksyl. W wyniku przeprowadzonego testu MTT wykazano, że wszystkie analizowane związki w niższych stężeniach (1,56 – 12,5 μmol/l) wykazują silniejsze działanie cytotoksyczne w porównaniu do celekoksylu. Nie analizowano wyższych stężeń pochodnych *trans*-stilbenu z uwagi na częściową krystalizację tych związków w medium hodowlanym, nawet po zwiększeniu stężenia DMSO do 0,5 % (v/v). Niemniej jednak stwierdzono, że dwie pochodne 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben (**N1**) oraz 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben (**N2**), powodują co najmniej 30% obniżenie żywotności komórek

przy stężeniu 12,5  $\mu\text{mol/l}$ , co spełnia kryteria cytotoksyczności wg standardów ISO [162]. Pomimo znacznych różnic w hamowaniu aktywności COX-2, wpływ obydwóch związków na żywotność komórek był podobny. Przypuszcza się, że to zjawisko może być związane z biotransformacją pochodnej metoksylowej **N2** do hydroksylowej **N1** poprzez O-demetylację w komórkach MCF-7. Podobne wnioski zostały przedstawione przez Sale i wsp. (2005) w odniesieniu do cytotoksycznego działania DMU-212 w komórkach raka okrężnicy HCA-7. Autorzy tego badania sugerują, że za biologiczną aktywność tego związku odpowiadają jego metabolity hydroksylowe, które posiadają zdolność do inhibicji COX [174]. Inne pochodne resweratrolu, zawierające dwie lub trzy grupy siarczanowe w stężeniu 20  $\mu\text{mol/l}$  również nie wykazują działania cytotoksycznego wobec komórek MCF-7 oraz KB (linia komórkowa raka jamy nosowo-gardłowej). Z kolei monopodstawiony koniugat charakteryzuje się działaniem słabszym od związku macierzystego. Przyczyną zmniejszonej aktywności tych związków jest niższa biodostępność i brak hydrolizy do resweratrolu w komórkach nowotworowych [175]. Ponadto, liczne badania dotyczące metoksyloowanych flawonoidów (związków o podobnej budowie) wykazały, że za ich przeciwnowotworową aktywność odpowiadają w dużym stopniu hydroksylowe pochodne powstające w wyniku biotransformacji związków macierzystych pod wpływem enzymów cytochromu P450 z rodziny CYP1 [178; 179]. Jednym z takich związków jest naturalnie występująca eupatoryna, która w komórkach gruczołakoraka piersi MDA-MB-468 ulega konwersji do hydroksylowej pochodnej – cirsiliolu – w wyniku reakcji katalizowanej przede wszystkim przez CYP1A1. Cirsiliol, podobnie jak celekoksyb w komórkach MCF-7, powodował zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M [135; 178]. Tego zjawiska nie obserwuje się jednak w nienowotworowych komórkach nabłonka piersi MCF-10A, które nie wykazują ekspresji białek CYP1 [179]. Innym przykładem jest pro-lek *Oncamex*, który wykazuje silne działanie cytotoksyczne w różnych liniach komórkowych raka piersi (MCF-7, MDA-MB-231, BT-549 i HBL-100) prawdopodobnie w wyniku biotransformacji do analogu hydroksylowego [180]. Autorzy tych badań nie wykluczają możliwości zastosowania metoksyloowanych związków jako proleków w chemoprewencji lub terapii różnych nowotworów.

Za właściwości cytotoksyczne badanych związków może również odpowiadać grupa nitrowa. W przeprowadzonym teście MTT zaobserwowano, że wszystkie pięć cząsteczek posiadających tę grupę (tj. **Z9**, **Z11**, **N1**, **N2** i **N6**) wykazuje wyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek MCF-7 niż pochodna chlorowa **Z5**. Prawdopodobny mechanizm wyjaśniający tę obserwację związany jest z dużą reaktywnością grupy nitrowej w komórkach guza, szczególnie w warunkach hipoksji. Niedobór tlenu może zwiększać ekspresję nitroreduktazy cytochromu P450 [181; 182], pod wpływem której dochodzi do stopniowej redukcji aromatycznej grupy nitrowej do rodnika nitrowego i dalej do pochodnych – nitrozowej, hydroksyaminowej i aminowej. Powstające produkty pośrednie oraz końcowy mogą uszkadzać DNA i inne makromolekuły poprzez atak rodnikowy lub interakcje z ich centrami nukleofilowymi, co w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórki [183–186]. Przeciwnowotworowe właściwości związków nitrowych były przedmiotem badań Cenas i wsp.

(2006). Wykazali oni, że dinitrochlorobenzen (DNCB) wykazuje silne właściwości cytotoksyczne poprzez aktywację kaspaz wykonawczych 3 i 7 w komórkach raka szyjki macicy HeLa. Co więcej, związek ten indukował apoptozę w komórkach HeLa oraz komórkach raka płuc A549, które wykazywały nadekspresję antyapoptycznego białka Bcl-2. Mechanizm aktywności DNCB był ściśle związany z alkilowaniem reduktazy tioredoksyny przez produkty powstałe w wyniku redukcji grup nitrowych [185]. Warto również podkreślić, że analogiczny sposób toksycznego działania aromatycznych związków nitrowych wykorzystywany już jest w leczeniu zakażeń bakteryjnych pochodnymi nitroimidazolu (np. metronidazolem) i nitrofuranu (np. nitrofurantoiną) [184; 187; 188]. W celu dokładniejszego wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznej aktywności związków testowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej należałoby przeprowadzić dodatkowe badania w warunkach hipoksji, jak również oznaczyć poziom ekspresji genów oraz białek z rodziny CYP1, które odpowiedzialne są m.in. za O-demetylację związków aromatycznych.

W przypadku celekoksybu  $IC_{50}$  wyznaczone za pomocą testu MTT wyniosło 49,66  $\mu\text{mol/l}$  (95% CI: 45,19 – 54,55) i było wyższe od wartości uzyskanej przez Dai i wsp. (2012),  $IC_{50} \sim 20 \mu\text{mol/l}$  [135]. W mniejszych stężeniach (10 – 20  $\mu\text{mol/l}$ ) celekoksyb wykazywał słabsze działanie cytotoksyczne wobec komórek MCF-7 niż w badaniu wykonanym przez Dai i wsp., ale w wyższych stężeniach (40 – 50  $\mu\text{mol/l}$ ) działanie to było podobne. Należy jednak zauważyć, że wskazane różnice nie zmieniają istotnie charakteru tego związku – w obydwóch przypadkach wykazuje on silne działanie cytotoksyczne względem komórek MCF-7. Odmienne wyniki (dotyczące mniejszych stężeń) mogą wynikać m.in. z zastosowania różnych podłoży hodowlanych (DMEM vs RPMI-1640), liczby komórek ( $2 \cdot 10^4$  vs  $5 \cdot 10^3$ ) oraz długości fali stosowanej do pomiaru absorbancji (570 nm vs 490 nm).

Najważniejszym mediatorem prokancerogenego działania COX-2 jest prostaglandyna  $E_2$ , której zwiększone stężenia stwierdzono w nowotworach różnego typu, jak np. glejak, oponiak [189], rak oskrzeli [190], wątrobowokomórkowy [191] oraz jelita grubego [192]. Podwyższony poziom  $PGE_2$  występuje również w nowotworze piersi i razem z nadekspresją COX-2 stanowi negatywny czynnik rokowniczy tej choroby [45; 49; 155; 193]. W świetle powyższych danych zbadano w niniejszej pracy doktorskiej wpływ najsilniejszego inhibitora COX-2, tj. związku **N1** na produkcję  $PGE_2$  przez komórki raka piersi MCF-7 z nadekspresją COX-2. Podobnie jak w przypadku testu MTT zakres stężeń badanej cząsteczki nie przekraczał 12,5  $\mu\text{mol/l}$ . Wykazano ponad 30% zmniejszenie stężenia  $PGE_2$  w supernatancie komórkowym po 72-godzinnej inkubacji komórek z najwyższym stężeniem związku **N1**, co koreluje z redukcją żywotności komórek wykazaną w teście MTT. Zaobserwowane zjawisko zależne jest wprost od stężenia pochodnej *trans*-stilbenu. Podobne badanie przeprowadzili Dai i wsp. (2012), którzy analizowali wpływ 48-godzinnej inkubacji celekoksybu na biosyntezę  $PGE_2$  również w komórkach raka piersi MCF-7 [135]. Porównując wyniki obydwóch doświadczeń zaobserwowano, że związek **N1** w stężeniu 6,25  $\mu\text{mol/l}$  oraz celekoksyb w stężeniu 10  $\mu\text{mol/l}$  powodują niemal identyczne, 23-24% zmniejszenie poziomu  $PGE_2$ . Pomimo zastosowania różnych parametrów stężenia i czasu analizy, można stwierdzić, że związek **N1** wykazuje

porównywalny do celekokoxybu wpływ na aktywność indukowanej izoformy COX w analizowanej linii komórkowej. Nadmienić należy, że stężeniach wynoszących 20 i 40  $\mu\text{mol/l}$ , czyli wykraczających poza zakres oceniany dla cząsteczki **N1**, siła działania koksytu była znacznie większa, powodując odpowiednio 43 i 62% redukcję stężenia  $\text{PGE}_2$ . Wartości uzyskane w tym eksperymencie były również zbliżone do wyników testu MTT, co dodatkowo wskazuje na istotną rolę COX-2 w mechanizmie związanym z przeżyciem i proliferacją komórek nowotworowych [135]. Badania nad wpływem pochodnych *trans*-stilbenu na pozakomórkowe stężenie  $\text{PGE}_2$  prowadzili również Sale i wsp. (2005) [174] oraz Jäger i wsp. (2011) [194]. W pierwszym z wymienionych doświadczeń wykazano, że DMU-212 (analog resweratrolu) powoduje obniżenie stężenia  $\text{PGE}_2$  w komórkach raka okrężnicy HCA-7, pomimo braku zdolności do hamowania ekspresji COX-2. Na podstawie dalszych analiz autorzy tego badania postawili hipotezę, że za zmniejszenie poziomu  $\text{PGE}_2$  odpowiadają produkty biotransformacji tego związku, takie jak 4'-hydrokso-3,4,5-trimetoksytilben (DMU-281), 4-hydrokso-3,4',5-trimetoksytilben (DMU-291) oraz 3-hydrokso-4,4',5-trimetoksytilben (DMU-807), które w badaniu *in vitro* wykazywały zdolność do hamowania aktywności COX [174]. Jäger i wsp. oceniali natomiast wpływ resweratrolu w stężeniu 100  $\mu\text{mol/l}$  na poziom  $\text{PGE}_2$  w supernatancie dwóch linii komórkowych raka piersi. Drastyczne zmniejszenie stężenia prostaglandyny  $\text{E}_2$  (>99%) zaobserwowano w komórkach MDA-MB-231. W przypadku komórek MCF-7 efekt był słabszy i wiązał się jedynie z 65% obniżeniem poziomu  $\text{PGE}_2$  [194].

Przedmiotem rozważań niniejszej pracy doktorskiej są również rezultaty dokowania związku **N1**, czyli najbardziej selektywnego inhibitora COX-2, do centrum katalicznego cyklooksygenazy obydwóch izoform. W wyniku symulacji komputerowej wykazano, że badana cząsteczka przyjmuje niemal identyczną orientację przestrzenną w obydwóch centrach aktywnych, układając się wzdłuż głównego kanału hydrofobowego i wiążąc się elektrostatycznie z Tyr385. Murias i wsp. również wykazali, że 3,3',4,5,5'-pentahydrokso-*trans*-stilben przyjmuje analogiczne położenie w miejscu aktywnym COX-2. W obydwóch symulacjach nie występuje oddziaływanie z hydrofilową „kieszenią” boczną, jak ma to miejsce w przypadku koksytów [9; 32; 153]. Pomimo większej ilości wiązań wodorowych utworzonych z COX-1, obliczone wartości energii dokowania wskazują na lepsze dopasowanie i silniejszą interakcję cząsteczki **N1** z centrum aktywnym COX-2. Nie są to jednak różnice, które w sposób wystarczający wyjaśniają selektywne właściwości tej cząsteczki wobec indukowanej izoformy COX. Przepuszczalnie wybiórcze działanie tego związku wynikać może z dodatkowego lub silniejszego blokowania centrum aktywnego peroksydazy COX-2 niż COX-1 lub allosterycznego wiązania się z indukowaną izoformą w pobliżu „wejścia” do głównego kanału hydrofobowego. Podobne wnioski zostały wysunięte wcześniej w odniesieniu do hydroksylowych pochodnych resweratrolu [32]. Akaho i wsp. (1999) wykazali natomiast, że klasyczne niesteroidowe leki przeciwzapalne tworzą jedno do trzech wiązań wodorowych z centrum aktywnym COX-2 [173]. Hydroksylowe analogi resweratrolu wiążą się z tym enzymem za pomocą takiej samej liczby wiązań [32]. Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki są zgodne z powyższymi obserwacjami, ponieważ związek



**N1** tworzy przynajmniej jedno silne wiązanie wodorowe z Tyr355. Kang i wsp. (2009) dodatkowo sugerują, że podstawniki bogate w elektrony powinny silniej oddziaływać z centrum aktywnym COX-2 poprzez interakcję typu pi-kation [34]. Przeprowadzona symulacja tylko częściowo potwierdza wyniki badań Kang i wsp., ponieważ tego typu oddziaływanie pomiędzy azotem grupy nitrowej a pierścieniem aromatycznym Tyr385 obserwuje się w symulacji dokowania do obydwóch izoform. W celu potwierdzenia prognozowanego sposobu wiązania się związku **N1** z centrum aktywnym COX-1 oraz COX-2 należy przeprowadzić badania krystalograficzne kompleksów enzym-inhibitor. W przypadku celekoksylu otrzymane rezultaty są zgodnie z doniesieniami literaturowymi [9; 25; 153]. Na selektywne wiązanie się tego inhibitora z COX-2 wskazuje nie tylko wiązanie się podstawnika sulfonamidowego z aminokwasami „kieszni” hydrofilowej takimi jak His90 i Gln192, ale również znaczna różnica w obliczonej energii dokowania sugerująca silniejszą interakcję i dużo łatwiejsze dopasowanie się celekoksylu do centrum aktywnego tej izoformy.

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono badania nad nowymi pochodnymi *trans*-stilbenu zarówno w modelu *in vitro*, jak i *in silico*. Wśród analizowanych związków najsilniejsze właściwości cytotoksyczne prezentują dwie cząsteczki zawierające aromatyczną grupę nitrową w pozycji 4 oraz trzy grupy hydroksylowe lub metoksyłowe w pozycjach 3'-5'. Największą zdolnością do hamowania aktywności prozapalnej cyklooksygenazy-2 charakteryzuje się 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben (**N1**), który jest zarazem najbardziej selektywnym inhibitorem tego enzymu. Inna pochodna, 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben (**N2**), wykazuje porównywalną siłę cytotoksycznego działania do związku **N1**, co prawdopodobnie jest wynikiem biotransformacji do cząsteczki **N1** poprzez O-demetylację katalizowaną przez enzymy z rodziny CYP1. Przypuszcza się, że badane związki mogą również powodować uszkodzenie struktur komórek nowotworowych i w konsekwencji ich śmierć w wyniku działania toksycznych produktów, takich jak np. rodniki nitrowe lub aminy aromatyczne, powstające podczas stopniowej redukcji grupy nitrowej. Dokładne wyjaśnienie mechanizmu działania analizowanych związków wymaga jednak dalszych badań. Wyniki badań uzyskane w ramach pracy doktorskiej mogą posłużyć do zaprojektowania nowych pochodnych *trans*-stilbenu o korzystniejszych właściwościach biologicznych. Impulsem do opracowania nowych inhibitorów COX-2 są nie tylko rezultaty badań przedklinicznych, ale również wyniki metanalizy wykonanej przez de Pedro i wsp. (2015), którzy wykazali, że tego rodzaju związki mogą zmniejszać ryzyko rozwoju inwazyjnego nowotworu piersi nawet o 20% [195]. Niestety stosowanie tego rodzaju inhibitorów może wiązać się z ryzykiem wystąpienia poważnych działań niepożądanych, co obserwowano już w przypadku leków z grupy koksylów. Ponadto, obecność grupy nitrowej może powodować zmiany mutagenne i uszkadzać system detoksykacji w komórkach prawidłowych. Potwierdzeniem tego niekorzystnego działania są m.in. doniesienia o hepatotoksyczności dwóch aromatycznych związków nitrowych stosowanych w terapii raka prostaty – flutamidu i nilutamidu [196; 197]. Terapia celowana polegająca na podawaniu tych związków bezpośrednio do tkanki nowotworowej może stanowić jeden ze sposobów zminimalizowania ogólnoustrojowych działań niepożądanych.

W świetle przedstawionych danych należy stwierdzić, że istnieje pilna potrzeba zaprojektowania, syntezy i badań nowych związków, które w przyszłości mogłyby zostać wykorzystane w profilaktyce i leczeniu nowotworów. Tego typu cząsteczek warto poszukiwać między innymi wśród pochodnych *trans*-stilbenu.

## 14. Podsumowanie i wnioski

1. Najsilniejsze i najbardziej selektywne działanie wobec COX-2 wykazywał związek **N1**, tj. 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben, dla którego otrzymano następujące wyniki: COX-2 IC<sub>50</sub> = 0,279 μmol/l (95% CI: 0,111 – 0,703) i selektywność względem COX-2 = 62,81 (95% CI: 48,42 – 81,28). Związek **N1** jest jednak słabszym i mniej wybiórczym inhibitorem COX-2 niż celekoksyb (związek referencyjny).
2. Dane uzyskane za pomocą analizy 2D QSAR sugerują, że związki bardziej hydrofilowe oraz posiadające większą liczbę atomów polarnych (np. N, O, Cl) i donorów wiązań wodorowych (np. grupa –OH) powinny charakteryzować się silniejszym i bardziej selektywnym działaniem wobec COX-2.
3. Analiza *in silico* wykonana z wykorzystaniem modeli Bayesa pozwoliła wytypować podstawniki hydrofilowe (grupa –OH i –NO<sub>2</sub>) jako zwiększające zdolność pochodnych *trans*-stilbenu do inhibicji COX-2. Obecność kilku grup hydroksylowych, czyli donorów wiązań wodorowych, powinna również zwiększać siłę hamowania aktywności COX-2. Ta obserwacja jest zgodna z wynikami analizy 2D QSAR.
4. Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek raka piersi MCF-7 wykazywały dwie związki: 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy-*trans*-stilben (**N1**) oraz 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben (**N2**). Siła działania tych związków była podobna do celekoksybu w zakresie stężeń 0 – 12,5 μmol/l. Pomimo znacznych różnic w hamowaniu aktywności COX-2, wpływ obydwóch związków na żywotność komórek był podobny. Przypuszcza się, że to zjawisko może być związane z biotransformacją pochodnej metoksylowej **N2** do hydroksylowej **N1** poprzez O-demetylację w komórkach MCF-7.
5. Za właściwości cytotoksyczne badanych związków może również odpowiadać aromatyczna grupa nitrowa. Prawdopodobny mechanizm wyjaśniający tę obserwację związany jest z dużą reaktywnością grupy nitrowej, która może ulegać redukcji do rodnika nitrowego i innych pochodnych cytotoksycznych – nitrozowej, hydroksyaminowej i aminowej.
6. Wykazano, że związek **N1** hamuje aktywność COX-2 również w komórkach MCF-7. Związek ten powodował ponad 30% zmniejszenie stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie uzyskanym z hodowli komórkowych. Wynik ten koreluje z redukcją żywotności komórek wykazaną w teście MTT, co wskazuje na istotną rolę indukowanej izoformy COX w mechanizmie związanym z przeżyciem i proliferacją komórek nowotworowych. Zaobserwowane zjawisko zależne jest

wprost od stężenia pochodnej *trans*-stilbenu. Wpływ związku **N1** na aktywność COX-2 w komórkach MCF-7 jest podobny do celekoksybu.

7. Na podstawie komputerowej symulacji dokowania cząsteczki związku **N1** stwierdzono, że przyjmuje ona niemal identyczną orientację przestrzenną w centrum katalitycznym cyklooksygenazy obydwu izoform COX i układa się wzdłuż głównego kanału hydrofobowego.
8. Obliczone wartości energii dokowania wskazują na lepsze dopasowanie i silniejszą interakcję cząsteczki **N1** z centrum aktywnym COX-2, ale nie są to różnice, które w sposób wystarczający wyjaśniają selektywne właściwości tej cząsteczki wobec COX-2. Przepuszczalnie wybiórcze działanie tego związku wynikać może z dodatkowego lub silniejszego blokowania centrum aktywnego peroksydazy COX-2 niż COX-1 lub allosterycznego wiązania się z indukowaną izoformą w pobliżu „wejścia” do głównego kanału hydrofobowego.

## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>1-metoksyPMS, 1-metoksyP</b>	metylosiarczan 1-metoksy-5-metylofenazyny, 1-metoksy-5-metylofenazyna (ang. <i>1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate</i> , <i>1-methoxy-5-methylphenazinium</i> )
<b>3,3',4,4',5,5'-HHS</b>	3,3',4,4',5,5'-heksahydroksy- <i>trans</i> -stilben (ang. <i>3,3',4,4',5,5'-heksahydroxy-trans-stilbene</i> )
<b>95% CI</b>	95% przedział ufności (ang. <i>95% confidence interval</i> )
<b><math>\alpha</math></b>	polaryzowalność cząsteczkowa (ang. <i>molecular polarizability</i> )
<b>B/B<sub>0</sub></b>	stosunek absorbancji zmierzonej dla dołka próbki testowej lub dołka wzorcowego stężenia prostaglandyn do absorbancji zmierzonej dla dołka B <sub>0</sub> [ang. <i>Bound/Maximum Bound (B/B<sub>0</sub>)</i> ]
<b>ABAM</b>	roztwór antybiotyków i antymykotyku (ang. <i>Antibiotic-Antimycotic solution</i> )
<b>AChE</b>	acetylocholinoesteraza (ang. <i>acetylcholinesterase</i> )
<b>Ang1, Ang2</b>	angiopoetyna 1, angiopoetyna 2 (ang. <i>angiopoietin 1</i> , <i>angiopoietin 2</i> )
<b>ANN</b>	sztuczne sieci neuronowe (ang. <i>Artificial Neural Networks</i> )
<b>AP-2</b>	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>activating enhancer-binding protein 2</i> )
<b>Apaf-1</b>	czynnik 1 aktywujący proteazę apoptyczną (ang. <i>apoptotic protease activating factor 1</i> )
<b>APOL</b>	suma polaryzowalności atomów (ang. <i>sum of atomic polarizabilities</i> )
<b>ATP</b>	adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine 5'-triphosphate</i> )
<b>Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1</b>	białka antyapoptotyczne z rodziny Bcl-2 ( <i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i> )
<b>BID, BAX, BAK</b>	białka proapoptotyczne z rodziny Bcl-2 ( <i>B-cell leukemia/lymphoma-2</i> )
<b>BRCA1, BRCA2</b>	geny człowieka, których mutacje mogą stać się przyczyną dziedzicznych form raka piersi (ang. <i>breast cancer 1, early onset; breast cancer 2, early onset</i> )
<b>BSA</b>	surowicza albumina wołowa (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
<b>BT-549</b>	estrogenoniezależna, ludzka linia komórkowa nowotworu piersi (ang. <i>estrogen-independent human breast cancer cell line</i> )
<b>C</b>	stężenie liganda (ang. <i>ligand concentration</i> )
<b>CADD</b>	komputerowe wspomaganie projektowania leków (ang. <i>Computer-Aided Drug Design</i> )
<b>cAMP</b>	3',5'-cykliczny adenosinomonofosforan (ang. <i>3'-5'-cyclic adenosine monophosphate</i> )
<b>CBB</b>	błękit kumassi (ang. <i>Coomassie Brilliant Blue</i> )
<b>CDK</b>	kinazy cyklinozależne (ang. <i>cyclin-dependent kinases</i> )
<b>cEIA</b>	kompetycyjny test immunoenzymatyczny (ang. <i>competitive enzyme immunoassay</i> )
<b>-CDOCKER ENERGY</b>	suma energii oddziaływań niewiążących ligand-receptor oraz zmiany wewnętrznej energii ligandu (związanej z jego naprężeniem sterycznym, indukowanym podczas wiązania przez receptor)
<b>-CDOCKER INTERACTION ENERGY</b>	suma energii oddziaływań niewiążących pomiędzy ligandem a receptorem (oddziaływania Van der Waals'a, elektrostatyczne, wodorowe, odpychanie steryczne)
<b>CHARMM</b>	pole siłowe mechaniki molekularnej (ang. <i>Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics</i> )

<b>COMBINE</b>	metoda porównawczej analizy energii wiązań (ang. <i>Comparative Binding Energy Analysis</i> )
<b>CoMFA</b>	metoda porównawczej analizy pól molekularnych (ang. <i>Comparative Molecular Field Analysis</i> )
<b>CoMSIA</b>	metoda porównawczej analizy indeksów podobieństwa molekularnego (ang. <i>Comparative Molecular Similarity Indexes Analysis</i> )
<b>COX</b>	cyklooksygenaza (ang. <i>cyclooxygenase</i> )
<b>CRE</b>	regulatorowe sekwencje DNA wiążące czynniki transkrypcyjne aktywowane w odpowiedzi na cAMP (ang. <i>cAMP response elements</i> )
<b>CYP450</b>	Cytochrom P450 (ang. <i>cytochrome P450</i> )
<b>DAG</b>	diacyloglicerol (ang. <i>diacylglycerol</i> )
<b>DAPI</b>	4',6-diamidyno-2-fenylindol (ang. <i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i> )
<b>DDC</b>	N,N-dietyloditiokarbaminian sodu (ang. <i>diethyldithiocarbamate sodium</i> )
<b>DF</b>	stopnie swobody (ang. <i>degrees of freedom</i> )
<b>DMEM</b>	podłoże hodowlane Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMBA</b>	dimetylobenz[a]antracen (ang. <i>dimethylbenz[a]anthracene</i> )
<b>DMSO</b>	dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i> )
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	deuterowany dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide-d6</i> )
<b>DNA</b>	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DNCB</b>	dinitrochlorobenzen (ang. <i>dinitrochlorbenzene</i> )
<b>E-box</b>	kaseta E, sekwencja DNA wiążąca białko Myc (5'-CACGTG-3')
<b>EC<sub>50</sub></b>	stężenie efektywne liganda, które powoduje 50% zmianę aktywności receptora (ang. <i>half maximal effective concentration</i> )
<b>ECFP_6</b>	fingerpint molekularny składający się z 2048 deskryptorów (ang. <i>extended-connectivity fingerprint of depth 6</i> )
<b>ED<sub>50</sub></b>	dawka efektywna ligandu, która powoduje 50% zmianę aktywności receptora (ang. <i>half maximal effective dose</i> )
<b>EDTA</b>	kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EGF</b>	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor</i> )
<b>EGR-1</b>	białko odpowiedzi wczesnego wzrostu komórki (ang. <i>early growth response protein 1</i> )
<b>ELISA</b>	test immunoenzymatyczny (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>EPA</b>	kwas eikozapentaenowy (ang. <i>eicosapentaenoic acid</i> )
<b>EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub></b>	receptory prostaglandyny E (ang. <i>prostaglandin E receptors</i> )
<b>ER</b>	receptory estrogenowe (ang. <i>estrogen receptors</i> )
<b>F</b>	wartość wyznaczona testem Fishera (ang. <i>Fisher value</i> )
<b>FasL</b>	ligand apoptotycznego receptora Fas (ang. <i>Fas receptor ligand</i> )
<b>FBS</b>	plodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
<b>FGF</b>	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>fibroblast growth factor</i> )
<b>Flk1</b>	kinaza wątroby płodowej 1, receptor błonowy dla VEGF (ang. <i>fetal liver kinase 1</i> )
<b>Flt-1</b>	kinaza tyrozynowa FMS-podobna 1, receptor błonowy dla VEGF (ang. <i>FMS-like tyrosine kinase 1</i> )
<b>FN</b>	klasa fałszywie negatywna (ang. <i>false negative</i> )
<b>FP</b>	klasa fałszywie pozytywna (ang. <i>false positive</i> )
<b>FTIC</b>	izotiocyjanian fluoresceiny (ang. <i>fluorescein isothiocyanate</i> )

<b>GADD45A</b>	białko naprawcze, powodujące zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M i biorące udział w naprawie DNA (ang. <i>growth arrest and DNA damage inducible protein 45 alpha</i> )
<b>G<sub>bind</sub></b>	energia (entalpia) swobodna wiązania (oddziaływania) ligandu z receptorem
<b>G<sub>i</sub></b>	rodzina białek G hamująca cyklazę adenylową (ang. <i>G<sub>i</sub> protein</i> )
<b>G<sub>q</sub></b>	rodzina białek G aktywująca fosfolipazę C (ang. <i>G<sub>q</sub> protein</i> )
<b>G<sub>s</sub></b>	rodzina białek G aktywująca cyklazę adenylową (ang. <i>G<sub>s</sub> protein</i> )
<b>GSK3</b>	kinaza 3 syntazy glikogenu (ang. <i>glycogen synthase kinase 3</i> )
<b>HBA</b>	ilość akceptorów wiązań wodorowych (ang. <i>H-bond acceptors</i> )
<b>HBD</b>	ilość donorów wiązań wodorowych (ang. <i>H-bond donors</i> )
<b>HBL-100</b>	ludzka linia komórkowa raka piersi (ang. <i>human breast cancer cell line</i> )
<b>HCA-7</b>	ludzka linia komórkowa raka okrężnicy (ang. <i>human colon adenocarcinoma cell line</i> )
<b>HER2, HER2/neu</b>	receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> )
<b>HETE</b>	kwas hydroksyeikosatetraenowy (ang. <i>hydroxyeicosatetraenoic acid</i> )
<b>HIF<math>\alpha</math></b>	czynnik transkrypcyjny indukowany hipoksją $\alpha$ (ang. <i>hypoxia inducible factor <math>\alpha</math></i> )
<b>Hoechst 33258, Hoechst 33342</b>	barwniki fluorescencyjnych, pochodne bis-benzimidazoli, wybarwiające DNA na zasadzie interkalacji
<b>HOMO</b>	najwyższy obsadzony orbital molekularny (ang. <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> )
<b>IC<sub>50</sub></b>	połowicze maksymalne stężenie hamujące, stężenie hamujące w 50% aktywność enzymu / żywotność komórek (ang. <i>half maximal inhibitory concentration</i> )
<b>IL-1<math>\beta</math>, -2, -4, -8, -10, 11, -13</b>	interleukiny, grupa prozapalnych cytokin (ang. <i>interleukins</i> )
<b>INT</b>	chlorek jodonitrotetrazoliny (ang. <i>iodonitrotetrazolium chloride</i> )
<b>IP<sub>3</sub></b>	inozytolo-1,4,5-trifosforan (ang. <i>inositol 1,4,5-trisphosphate</i> )
<b>JNK</b>	kinaza domeny N-końcowej białka c-Jun, N-terminalna kinaza c-Jun (ang. <i>c-Jun N-terminal kinase</i> )
<b>KB</b>	błękit kenacidu (ang. <i>Kenacid Blue</i> )
<b>KB</b>	ludzka linia komórkowa raka jamy nosowo-gardłowej (ang. <i>human nasopharyngeal carcinoma cell line</i> )
<b>K<sub>m</sub></b>	stała Michaelisa, stężenie liganda, przy którym aktywność receptora wynosi 50% aktywności maksymalnej (ang. <i>the Michaelis constant</i> )
<b>LD<sub>50</sub></b>	dawka związku powodują śmierć 50% komórek (ang. <i>the median lethal dose, lethal dose 50%</i> )
<b>LDH</b>	dehydrogenaza mleczanowa (ang. <i>lactate dehydrogenase</i> )
<b>logP</b>	współczynnik podziału (ang. <i>partition coefficient</i> )
<b>LOO</b>	walidacja krzyżowa typu „wyrzucić jeden obiekt” (ang. <i>leave-one-out cross validation</i> )
<b>logD</b>	współczynnik dystrybucji (ang. <i>distribution coefficient</i> )
<b>LUMO</b>	najniższy nieobsadzony orbital molekularny (ang. <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> )
<b>MAP</b>	białko aktywowane mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein</i> )

<b>MAPK</b>	kinaza białkowa aktywowana mitogenem (ang. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>MCF-7</b>	estrogenozależna, ludzka linia komórkowa raka piersi (ang. <i>estrogen-dependent Michigan Cancer Foundation-7 human breast cancer cell line</i> )
<b>MCF-10A</b>	nienowotworowa, ludzka linia komórkowa nabłonka gruczołu piersiowego (ang. <i>non-neoplastic, human breast epithelial cell line</i> )
<b>MDA</b>	malonodialdehyd (ang. <i>malondialdehyde</i> )
<b>MDA-MB-231,</b> <b>MDA-MB-468</b>	estrogenoniezależna, ludzka linia komórkowa raka piersi (ang. <i>estrogen-independent human breast cancer cell line</i> )
<b>μ</b>	elektryczny moment dipolowy (ang. <i>electric dipole moment</i> )
<b>MIC</b>	minimalne stężenie związku hamujące wzrost komórek (ang. <i>minimum inhibitory concentration</i> )
<b>MLR</b>	wielokrotna regresja liniowa (ang. <i>multilinear regression</i> )
<b>MMP-2,-9</b>	metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej 2, 9; matryksyna 2, 9 (ang. <i>matrix metalloproteinase-2, -9</i> )
<b>MR</b>	refraktywność molowa (ang. <i>molar refractivity</i> )
<b>MTD</b>	maksymalna tolerowana dawka związku (ang. <i>maximum tolerated dose</i> )
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenylo)-2-(4-sulfofenylo)- 2H-tetrazolina (ang. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium</i> )
<b>MTT</b>	bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliny (ang. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> )
<b>MW</b>	masa cząsteczkowa (ang. <i>molecular weight</i> )
<b>N</b>	ilość stopni swobody (ang. <i>number of degrees of freedom</i> )
<b>NAD<sup>+</sup>, NADH</b>	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy – forma utleniona, forma zredukowana (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide – oxidized form, reduced form</i> )
<b>NADP<sup>+</sup>, NADPH</b>	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego – forma utleniona, forma zredukowana (ang. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – oxidized form, reduced form</i> )
<b>NAR</b>	liczba pierścieni aromatycznych (ang. <i>number of aromatic rings</i> )
<b>NF-IL-6</b>	jądrowy czynnik transkrypcyjny IL-6 (ang. <i>nuclear factor interleukin-6</i> )
<b>NF-κB</b>	jądrowy czynnik transkrypcyjny <i>NF kappa B</i> (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> )
<b>NLPZ</b>	niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. <i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> )
<b>NMU</b>	N-nitrozometylomocznik (ang. <i>N-nitrosomethyl urea</i> )
<b>NR</b>	czerwień obojętna (ang. <i>neutral red dye</i> ); liczba pierścieni (ang. <i>number of rings</i> )
<b>P</b>	wartość prawdopodobieństwa (ang. <i>probability value</i> )
<b>p38 MAPK</b>	<i>białko p38</i> (jedna z kinaz białkowych aktywowanych miogenem) (ang. <i>p38 mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>PBS</b>	bufor fosforanowy (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PCA</b>	analiza czynników (składowych) głównych (ang. <i>Principal Component Analysis</i> )



<b>PDB</b>	baza danych strukturalnych białek i kwasów nukleinowych (ang. <i>Protein Data Bank</i> )
<b>PDGF</b>	plytkopochodny czynnik wzrostu (ang. <i>platelet-derived growth factor</i> )
<b>PG</b>	prostaglandyny (ang. <i>prostaglandins</i> )
<b>PGA<sub>2</sub>-J<sub>2</sub></b>	prostaglandyny A <sub>2</sub> -J <sub>2</sub> (ang. <i>prostaglandins A<sub>2</sub>-J<sub>2</sub></i> )
<b>PGHS</b>	syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego, COX (ang. <i>prostaglandin G/H synthase</i> )
<b>PGI<sub>2</sub></b>	prostacyklina (ang. <i>prostacyclin, prostaglandin I<sub>2</sub></i> )
<b>PhIP</b>	2-amino-1-metylo-6-fenylimidazo[4,5-b]pirydyna (ang. <i>2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine</i> )
<b>PI</b>	jodek propidyny (ang. <i>propidium iodide</i> )
<b>PI3K</b>	kinaza fosfatydylo-3-inozytolu (ang. <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> )
<b>PI3K/Akt/mTOR</b>	szlak sygnałowy kinaz zawierający kinazy PI3K/Akt/mTOR (ang. <i>PI3K/Akt/mTOR kinase signaling pathway</i> )
<b>PKA</b>	kinaza białkowa A (ang. <i>protein kinase A</i> )
<b>PKC</b>	kinaza białkowa C (ang. <i>protein kinase C</i> )
<b>PR</b>	receptory progesteronowe (ang. <i>progesteron receptors</i> )
<b>PRESS</b>	przewidywana suma kwadratów reszt (ang. <i>predicted residual sum of squares</i> )
<b>R<sup>2</sup>, r<sup>2</sup></b>	współczynnik determinacji, kwadrat współczynnika korelacji (ang. <i>squared correlation coefficient</i> )
<b>R<sup>2</sup><sub>pred</sub></b>	przewidywany współczynnik determinacji (ang. <i>predicted coefficient of determination</i> )
<b>RBN</b>	liczba wiązań pojedynczych (rotalnych) (ang. <i>number of rotatable bonds</i> )
<b>ROC</b>	krzywa charakterystyki operacyjnej odbiornika (ang. <i>Receiver Operating Characteristic curve</i> )
<b>RPMI-1640</b>	podłoże hodowlane RPMI, typ 1640 (ang. <i>Roswell Park Memorial Institute culture medium, type 1640</i> )
<b>Q<sup>2</sup>, q<sup>2</sup></b>	współczynnik krzyżowej walidacji (ang. <i>cross-validation coefficient</i> )
<b>QSAR</b>	ilościowa zależność struktura-aktywność (ang. <i>quantitative structure-activity relationship</i> )
<b>RANKL</b>	ligand aktywatora receptora czynnika jądrowego κB (ang. <i>Receptor Activator for Nuclear Factor κB Ligand</i> )
<b>Ras/Raf/Mek/ERK</b>	szlak sygnałowy kinaz aktywowanych mitogenami zawierający kinazy Ras/Raf/Mek/ERK (ang. <i>Ras/Raf/Mek/ERK mitogen activated kinase signaling pathway</i> )
<b>RECK</b>	białko hamujące inwazyjność i angiogenezę nowotworu, inhibitor białek MMP (ang. <i>reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs</i> )
<b>SAR</b>	zależność struktura-aktywność (ang. <i>structure-activity relationship</i> )
<b>SASA</b>	powierzchnia dostępności dla rozpuszczalnika (ang. <i>solvent accessible surface area</i> )
<b>SBB</b>	sulforodamina B (ang. <i>sulforhodamine B</i> )
<b>SD</b>	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i> )
<b>SLR</b>	prosta regresja liniowa (ang. <i>simple linear regression</i> )
<b>SP1</b>	czynnik transkrypcyjny, białko specyficzności 1 (ang. <i>specificity protein 1</i> )
<b>TATA box</b>	kaseta TATA, sekwencja DNA wiążąca białko TBP (5'-TATAAA-3')

<b>TGF<math>\alpha</math>, TGF<math>\beta</math></b>	transformujący czynnik wzrostu alfa/beta (ang. <i>transforming growth factor alpha/beta</i> )
<b>TIMP1-3</b>	białko hamujące inwazyjność i angiogenezę nowotworu, tkankowy inhibitor białek MMP (ang. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 1-3</i> )
<b>TMS</b>	tetrametylosilan (ang. <i>tetramethylsilane</i> )
<b>TN</b>	klasa prawdziwie negatywna (ang. <i>true negative</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	kacheksyna, czynnik martwicy guza alfa (ang. <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
<b>TP</b>	klasa prawdziwie pozytywna (ang. <i>true positive</i> )
<b>Tris-HCl</b>	chlorowodorek tri(hydroksymetylo)aminometanu [ang. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i> ]
<b>TXA<sub>2</sub>-B<sub>2</sub></b>	tromboksany (ang. <i>thromboxanes</i> )
<b>TPSA</b>	topologiczna polarna powierzchnia cząsteczki (ang. <i>topological polar surface area</i> )
<b>VEGF</b>	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VdWSA</b>	powierzchnia Van der Waals'a (ang. <i>Van der Waals surface area</i> )
<b>W</b>	wskaźnik Wiener'a (ang. <i>Wiener index</i> )
<b>WTS</b>	sole tetrazolowe rozpuszczalne we wodzie (ang. <i>Water-soluble tetrazolium salts</i> )
<b>WTS-1</b>	sól sodowa 2-(4-iodofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazoliny (ang. <i>2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium</i> )
<b>XTT</b>	sól sodowa 2,3-bis(2-metoksy-4-nitro-5-sulfofenylo)-2H-tetrazolio-5-karboksyanilidu (ang. <i>sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium</i> )

## SPIS RYCIN

RYCINA 1.1	
Schemat biosyntezy prostanoidów z udziałem cyklooksygenazy .....	17
RYCINA 1.2.A i 1.2.B	
Budowa indukowanej COX-2 .....	19
RYCINA 1.3	
Schemat katalitycznej przemiany kwasu arachidonowego do prostaglandyny H <sub>2</sub> przy udziale centrum aktywnego cyklooksygenazy i peroksydazy COX-2.....	21
RYCINA 1.4	
Różnice w budowie centrum aktywnego cyklooksygenazy pomiędzy COX-1 i COX-2.....	22
RYCINA 1.5	
Struktura związku DuP-697 .....	26
RYCINA 1.6	
Schemat wiązania celekoksylu z COX-2.....	27
RYCINA 1.7	
Struktura <i>trans</i> -resweratrolu.....	27
RYCINA 1.8	
Schemat dokowania związku 10c w miejscu aktywnym COX-2.....	30
RYCINA 2.1	
Uproszczony schemat apoptozy indukowanej drogą zewnątrz- i wewnątrzkomórkową .....	37
RYCINA 2.2	
Rola COX-2 w procesie angiogenezy nowotworowej .....	40
RYCINA 3.1	
Ogólny schemat idei badania QSAR.....	46
RYCINA 3.2	
Porównanie korelacji między logP (wartość doświadczalna) a logP (wartość predykcyjna) .....	52
RYCINA 3.3	
Obrazowe przedstawienie różnicy między sposobem wyznaczania powierzchni cząsteczki, powierzchni Van der Waals'a (VdWSA) oraz powierzchni dostępności rozpuszczalnika (SASA) .....	56
RYCINA 3.4	
Schemat tworzenia i analizy macierzy korelacji danych.....	59
RYCINA 3.5	
Model PCA o f czynnikach głównych.....	60
RYCINA 3.6	
Schemat procedury walidacji krzyżowej 5-krotnej .....	61
RYCINA 3.7	
Przykładowy wykres krzywej ROC .....	70
RYCINA 3.8	
Graficzny przykład dokowania pochodnej diarylo-1,2,4-triazolu w miejscu aktywnym COX-2 .....	71

RYCINA 3.9	
Schemat budowania grafu ligand-receptor .....	72
RYCINA 4.1	
Przykładowa krzywa wyznaczania cytotoksyczności z zaznaczoną wartością IC <sub>50</sub> .....	77
RYCINA 4.2	
Metody oznaczania cytotoksyczności komórkowej w oparciu o budowę i funkcję poszczególnych organelli.....	79
RYCINA 4.3	
Redukcja MTT do formazanu przy udziale dehydrogenazy mitochondrialnej .....	80
RYCINA 7.1	
Schemat oznaczania aktywności COX w obecności inhibitora za pomocą metody cEIA .....	93
RYCINA 9.1	
Schemat syntezy 4-chloro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilbenu .....	109
RYCINA 9.2	
Schemat syntezy 4-nitro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	110
RYCINA 9.3	
Schemat syntezy 4-chloro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	110
RYCINA 9.4	
Schemat syntezy 4-nitro-4'-etoksy- <i>trans</i> -stilbenu .....	111
RYCINA 9.5	
Schemat syntezy 4-nitro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilbenu .....	112
RYCINA 9.6	
Schemat syntezy 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	112
RYCINA 9.7	
Schemat syntezy 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu .....	113
RYCINA 9.8	
Schemat syntezy 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	114
RYCINA 11.1	
Ogólny schemat oznaczania stężenia PGE <sub>2</sub> w supernatancie komórkowym po reakcji inhibitora z cyklooksygenazą-2 .....	122
RYCINA 12.1	
Szkieletowy model nowych związków .....	165
RYCINA 12.2	
Struktury 16 nowych pochodnych <i>trans</i> -stilbenu.....	166
RYCINA 12.3	
Korzystne oraz niekorzystne struktury badanych związków – model inhibitorów COX-1. ....	180
RYCINA 12.4	
Korzystne oraz niekorzystne struktury badanych związków – model inhibitorów COX-2 .....	184
RYCINA 12.5	
Dokowanie związku N1 w miejscu aktywnym COX-1 – projekcja przestrzenna (A) oraz diagram 2D (B).....	193

RYCINA 12.6

Dokowanie związku N1 w miejscu aktywnym COX-2 – projekcja przestrzenna (A)  
oraz diagram 2D (B).....195

RYCINA 12.7

Dokowanie CELEKOKSYBU w miejscu aktywnym COX-1 – projekcja przestrzenna (A)  
oraz diagram 2D (B).....197

RYCINA 12.8

Dokowanie CELEKOKSYBU w miejscu aktywnym COX-2 – projekcja przestrzenna (A)  
oraz diagram 2D (B).....199

**SPIS TABEL**

TABELA 1.1	
Biologiczne efekty prostaglandyn i tromboksanów .....	23
TABELA 1.2	
Pochodne <i>trans</i> -stilbenu selektywnie (>50x) i/lub silnie ( $IC_{50} < 2 \mu\text{mol/l}$ ) hamujące aktywność COX-2 .....	30
TABELA 3.1	
Naiwny model Bayesa – badane związki (przykład) .....	66
TABELA 3.2	
Macierz klasyfikacji .....	68
TABELA 4.1	
Charakterystyka podstawowych testów do oznaczania cytotoksyczności komórkowej .....	78
TABELA 6.1	
Struktura badanych pochodnych <i>trans</i> -stilbenu. ....	85
TABELA 6.2	
Struktura badanych pochodnych <i>trans</i> -stilbazolu .....	86
TABELA 6.3	
Struktura nowych pochodnych <i>trans</i> -stilbenu.....	87
TABELA 8.1	
Struktura oraz aktywność biologiczna badanych i literaturowych pochodnych <i>trans</i> -stilbenu .....	98
TABELA 8.2	
Struktura oraz aktywność biologiczna celekoksylu.....	101
TABELA 12.1	
Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-1 (związki nr Z1 – Z16) .....	125
TABELA 12.2	
Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-1 (związki nr Z17 – Z25) .....	127
TABELA 12.3	
Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-2 (związki nr Z1 – Z16) .....	128
TABELA 12.4	
Wyniki badania przesiewowego 25 związków w reakcji z COX-1 (związki nr Z17 – Z25) .....	130
TABELA 12.5	
Prognozowana aktywność biologiczna nowych pochodnych <i>trans</i> -stilbenu wobec COX 1 i COX-2, obliczona z wykorzystaniem opracowanych modeli 2D QSAR .....	167
TABELA 12.6	
Związki testowe – zgodność z regułą Lipińskiego.....	167
TABELA 12.7	
Wyniki wydajności reakcji dla poszczególnych produktów .....	169

---

TABELA 12.8	
Porównanie prognozowanych i eksperymentalnych wartości $IC_{50}$ badanych związków względem COX-1 i COX-2 oraz ich selektywności.....	178
TABELA 12.9	
Wyniki testu MTT – inkubacja komórek MCF-7 z pochodnymi <i>trans</i> -stilbenu.....	187
TABELA 12.10	
Wyniki testu MTT – inkubacja komórek MCF-7 ze związkiem CELEKOKSYB .....	187
TABELA 12.11	
Stężenia $PGE_2$ w supernatancie komórek MCF-7.....	190
TABELA 12.12	
Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy związkiem N1 a miejscem aktywnym COX-1. ....	192
TABELA 12.13	
Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy związkiem N1 a miejscem aktywnym COX-2. ....	194
TABELA 12.14	
Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy CELEKOKSYBEM a miejscem aktywnym COX-1. ....	196
TABELA 12.15	
Charakterystyka wiązań utworzonych pomiędzy CELEKOKSYBEM a miejscem aktywnym COX-2. ....	198

## SPIS WYKRESÓW

WYKRES 12.1	
Zbiorcze zestawienie wyników badania przesiewowego – porównanie stopnia zahamowania aktywności COX-1 i COX-2 przez badane związki.....	131
WYKRES 12.2	
Wpływ związku Z5 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia $\text{PGF}_{2\alpha}$ względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	133
WYKRES 12.3	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek Z5 .....	134
WYKRES 12.4	
Wpływ związku Z9 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia $\text{PGF}_{2\alpha}$ względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	135
WYKRES 12.5	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek Z9 .....	136
WYKRES 12.6	
Wpływ związku Z11 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia $\text{PGF}_{2\alpha}$ względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	137
WYKRES 12.7	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek Z11 .....	138
WYKRES 12.8	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 $\text{pIC}_{50}$ a HBD, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $\text{COX-1 } \text{pIC}_{50} = f(\text{HBD})$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 $\text{pIC}_{50}$ dla zestawu treningowego.....	140
WYKRES 12.9	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 $\text{pIC}_{50}$ dla zestawu testowego...141	
WYKRES 12.10	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 $\text{pIC}_{50}$ a ClogP, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $\text{COX-1 } \text{pIC}_{50} = f(\text{ClogP})$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 $\text{pIC}_{50}$ dla zestawu treningowego.....	142
WYKRES 12.11	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 $\text{pIC}_{50}$ dla zestawu testowego...142	
WYKRES 12.12	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 $\text{pIC}_{50}$ a $\log D$ , wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $\text{COX-1 } \text{pIC}_{50} = f(\log D)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 $\text{pIC}_{50}$ dla zestawu treningowego.....	143



WYKRES 12.13	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	144
WYKRES 12.14	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC <sub>50</sub> a MR, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-1 pIC_{50} = f(MR)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	144
WYKRES 12.15	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	145
WYKRES 12.16	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC <sub>50</sub> a TPSA, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-1 pIC_{50} = f(TPSA)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	146
WYKRES 12.17	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	146
WYKRES 12.18	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC <sub>50</sub> a VdWSA, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-1 pIC_{50} = f(VdWSA)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	147
WYKRES 12.19	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	148
WYKRES 12.20	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC <sub>50</sub> a HBD, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-2 pIC_{50} = f(HBD)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	149
WYKRES 12.21	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	149
WYKRES 12.22	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC <sub>50</sub> a ClogP, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-2 pIC_{50} = f(ClogP)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	150
WYKRES 12.23	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	151

WYKRES 12.24	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC <sub>50</sub> a TPSA, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-2 pIC_{50} = f(TPSA)$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	152
WYKRES 12.25	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	152
WYKRES 12.26	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	154
WYKRES 12.27	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	154
WYKRES 12.28	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	156
WYKRES 12.29	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	156
WYKRES 12.30	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-1 pIC <sub>50</sub> a główną składową, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-1 pIC_{50} = f(\text{główna składowa})$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	158
WYKRES 12.31	
Wykres osypiska przedstawiający wartości własne poszczególnych składowych.....	159
WYKRES 12.32	
Wykres kołowy ładunków czynnikowych na płaszczyźnie głównej składowej (składowa nr 1) oraz składowej nr 2.	
Współrzędne końca wektora to wartość ładunku czynnikowego danego deskryptora wobec składowych nr 1 i 2 .....	160
WYKRES 12.33	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	161
WYKRES 12.34	
A. Wykres zależności pomiędzy eksperymentalnymi wartościami COX-2 pIC <sub>50</sub> a główną składową, wyznaczony dla zestawu treningowego na postawie wzoru $COX-2 pIC_{50} = f(\text{główna składowa})$ .	
B. Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-2 pIC <sub>50</sub> dla zestawu treningowego.....	162
WYKRES 12.35	
Wykres osypiska przedstawiający wartości własne poszczególnych składowych.....	163

---

WYKRES 12.36	
Wykres kołowy ładunków czynnikowych na płaszczyźnie głównej składowej (składowa nr 1) oraz składowej nr 2.	
Współrzędne końca wektora to wartość ładunku czynnikowego danego deskryptora wobec składowych nr 1 i 2 .....	163
WYKRES 12.37	
Porównanie eksperymentalnych i prognozowanych wartości COX-1 pIC <sub>50</sub> dla zestawu testowego...	164
WYKRES 12.38	
Wpływ związku N1 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF <sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	170
WYKRES 12.39	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek N1 .....	171
WYKRES 12.40	
Wpływ związku N2 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF <sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	172
WYKRES 12.41	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek N2.....	173
WYKRES 12.42	
Wpływ związku N6 na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF <sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	174
WYKRES 12.43	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek N6.....	175
WYKRES 12.44	
Wpływ CELEKOKSYBU na aktywność COX-1 oraz COX-2 wyrażony zmniejszeniem stężenia PGF <sub>2α</sub> względem próby kontrolnej, którą była 100% aktywność enzymu bez inhibitora.....	176
WYKRES 12.45	
Krzywe hamowania aktywności COX-1 oraz COX-2 przez związek referencyjny CELEKOKSYB. ....	177
WYKRES 12.46	
Krzywa ROC dla zestawu treningowego – model inhibitorów COX-1 .....	179
WYKRES 12.47	
Krzywa ROC dla zestawu testowego – model inhibitorów COX-1 .....	181
WYKRES 12.48	
Krzywa ROC dla zestawu treningowego – model inhibitorów COX-2 .....	183
WYKRES 12.49	
Krzywa ROC dla zestawu testowego – model inhibitorów COX-2.....	185
WYKRES 12.50	
Wyznaczenie wartości IC <sub>50</sub> dla związku CELEKOKSYB (test MTT). ....	188

WYKRES 12.51	
Podsumowanie testu MTT – zbiorcze zestawienie wyników.....	189
WYKRES 12.52	
Stopień zahamowania aktywności COX-2 w komórkach MCF-7 po 72 h inkubacji ze związkiem nr N1.....	190
WYKRES 12.53	
Ekstrapolacja wyników inkubacji związku nr N1 oraz CELEKOKSYBU z komórkami MCF-7 – prognoza całkowitego zahamowania syntezy PGE <sub>2</sub> . ....	191

## PIŚMIENNICTWO

1. Burdan F, Chałas A, Szumiło J: Cyklooksygenaza i prostanoidy – znaczenie biologiczne. *Postepy Hig Med Dosw.* (online). 2006; 60: 129-141
2. Simmons DL, Botting RM, Hla T: Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(3): 387-437
3. Turini ME, DuBois RN: Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med.* 2002; 53: 35-57
4. Clària J: Cyclooxygenase-2 biology. *Curr. Pharm. Des.* 2003; 9: 2177-2190
5. Chandrasekharan NV, Simmons DL: Protein family review: The cyclooxygenases. *Genome Biology.* 2004; 5(9); 241: 1-7
6. P23219 (PGH1\_HUMAN): Prostaglandin G/H synthase 1. <http://www.uniprot.org/uniprot/P23219> (data wejścia: 22.05.2014)
7. P35354 (PGH2\_HUMAN): Prostaglandin G/H synthase 2. <http://www.uniprot.org/uniprot/P35354> (data wejścia: 24.05.2014)
8. Structure of celecoxib bound at the COX-2 active site. PDB ID: 3LN1 <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3LN1> (data wejścia: 24.05.2014)
9. Wang JL, Limburg D, Graneto MJ i wsp.: The novel benzopyran class of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. Part 2: The second clinical candidate having a shorter and favorable human half-life. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010; 20: 7159-7163
10. Hinz B, Brune K: Cyclooxygenase-2–10 years later. *J Pharmacol Exp. Ther.* 2002; 300: 367-375
11. Narumiya S, FitzGerald GA: Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest.* 2001; 108(1): 25-30
12. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M i wsp.: The role of Cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *International Journal of Cell Biology.* 2010; Article ID 215158, 21 pages
13. Zarghi A, Arfaei S: Selective COX-2 inhibitors: a review of their structure-activity relationships. *Iran J Pharm Res.* 2011; 10(4): 655-683
14. Breyer RM, Bagdassarian CK, Myers SA, Breyer MD: Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 2001; 41: 661-690
15. Kundu N, Ma X, Kochel T i wsp.: Prostaglandin E receptor EP4 is a therapeutic target in breast cancer cells with stem-like properties. *Breast Cancer Res Treat.* 2014; 143(1): 19-31
16. Reader J, Holt D, Fulton A: Prostaglandin E<sub>2</sub> EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30(3-4): 449-463
17. Ma X, Kundu N, Ioffe OB. i wsp.: Prostaglandin E receptor EP<sub>1</sub> suppresses breast cancer metastasis and is linked to survival differences and cancer disparities. *Mol Cancer Res.* 2010; 8(10): 1310-1318
18. FDA, Center for Drug Evaluation and Research (1998). FDA approved drug products – Celebrex. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/98/20998.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/20998.cfm) (data wejścia: 02.06.2014)
19. FDA, Center for Drug Evaluation and Research (1999). FDA approved drug products – Vioxx. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/021042\\_52\\_Vioxx.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/021042_52_Vioxx.cfm) (data wejścia: 02.06.2014)
20. Praticò D, Dogné JM: Selective cyclooxygenase-2 inhibitors development in cardiovascular medicine. *Circulation.* 2005; 112(7): 1073-1079
21. Merck: Merck Announces Voluntary Worldwide Withdrawal of VIOXX. <http://www.pbm.va.gov/vacenterformedicationsafety/vioxx/DearHealthcareProfessional.pdf> (data wejścia: 03.06.2014)

22. European Medicines Agency (EMA): EMEA/265602/2005. Public statement on Valdyn (valdecoxib) – Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Public\\_statement/2009/12/WC500018326.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2009/12/WC500018326.pdf)  
(data wejścia: 03.06.2014)
23. European Medicines Agency (EMA): Doc. Ref. EMEA/CHMP/579301/2007. European Medicines Agency recommends withdrawal of the marketing authorisations for lumiracoxib-containing medicines. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Press\\_release/2009/11/WC500010995.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Press_release/2009/11/WC500010995.pdf)  
(data wejścia: 03.06.2014)
24. Mattia C, Coluzzi F: COX-2 inhibitors: Pharmacological data and adverse effects. *Minerva Anestesiologica*. 2005; 71: 461-470
25. Marnett LJ, Kalgutkar AS: Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1999; 20(11): 465-469
26. Zarghi A, Rao PN i wsp.: Design and synthesis of new rofecoxib analogs as selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: replacement of the methanesulfonyl pharmacophore by a N-acetylsulfonamido bioisostere. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2007; 10(2): 159-167
27. Llorens O, Perez JJ i wsp.: Structural basis of the dynamic mechanism of ligand binding to cyclooxygenase. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999; 9(19): 2779-2784
28. Michaux C, Charlier C: Structural approach for COX-2 inhibition. *Mini Rev Med Chem*. 2004; 4(6): 603-615
29. Walker MC, Kurumbail RG: A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors. *Biochem J*. 2001; 357(3): 709-718
30. PoseView. ZBH - Center for Bioinformatics. University of Hamburg. Celecoxib bound to COX-2 active site (PDB ID: 3LN1). <http://poseview.zbh.uni-hamburg.de>  
(data wejścia: 10.06.2014)
31. Zykova TA, Zhu F, Zhai X i wsp.: Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis. *Mol. Carcinog*. 2008; 47: 797-805
32. Murias M, Handler N, Erker T i wsp.: Resveratrol analogues as selective cyclooxygenase-2 inhibitors: Synthesis and structure-activity relationship. *Bioorg Med Chem*. 2004; 12(21): 5571-5578
33. Piotrowska H, Kucinska M, Murias M: Biological activity of piceatannol: Leaving the shadow of resveratrol. *Mutat. Res. Rev*. 2012; 750(1): 60-82
34. Kang S, Cuendet M, Endringer DC i wsp.: Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF-kappaB. *Bioorg Med Chem*. 2009; 17(3): 1044-1054
35. Uddin MJ, Rao PN, McDonald R, Knaus EE: Design and synthesis of (E)-1,1,2-triarylethenes: novel inhibitors of the cyclooxygenase-2 (COX-2) isozyme. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005; 15(2): 439-442
36. Całkosiński I, Dobrzyński M, Całkosińska M i wsp. Characterization of an inflammatory response. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2009; 63: 395-408
37. Stasik Z, Skotnicki P, Nowak-Sadzikowska J, Kulpa JK: Białko C-reaktywne u chorych na nowotwory złośliwe. *Nowotwory. Journal of Oncology*; 58(5): 441-446
38. Triantafyllidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA: Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Res*. 2009; 29(7): 2727-2737
39. Howe LR: Inflammation and breast cancer. *Cyclooxygenase/prostaglandin signaling and breast cancer. Breast Cancer Res*. 2007; 9(4): 210
40. Kordek R: *Onkologia: podręcznik dla studentów i lekarzy*. Wydanie 4 popr. i uzupełn. Gdańsk 2013
41. Dyzmann-Sroka A, Myślińska W i wsp.: Biuletyn nr 9 "Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce w 2010 roku". Wielkopolskie Centrum Onkologii. Poznań 2012

42. Janssens JP, Vandeloos M: Rak piersi: bezpośrednie i pośrednie czynniki ryzyka związane z wiekiem i stylem życia. Nowotwory. *Journal of Oncology* 2009; 59(3): 159-167
43. Piekarski J: Receptory estrogenowe i progesteronowe w raku piersi – współczesny stan wiedzy. *Współczesna Onkol* 2005; 9(9) 371-379
44. Howe LR, Subbaramaiah K, Brown AM, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2001; 8(2): 97-114
45. Yoshinaka R, Shibata MA, Morimoto J i wsp.: COX-2 inhibitor celecoxib suppresses tumor growth and lung metastasis of a murine mammary cancer. *Anticancer Res*. 2006; 26(6B): 4245-4254
46. Ranger GS, Mokbel K: COX-2 inhibitors and breast cancer. *ANZ J Surg*. 2003; 73(8): 565-566
47. Subbaramaiah K, Norton L, Gerald W, Dannenberg AJ: Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem*. 2002; 277(21): 18649-18657
48. Dannenberg AJ, Howe LR: The role of COX-2 in breast and cervical cancer. W: COX-2. A new target for cancer prevention and treatment (Progress in Tumor Research, Tom 37). 2003; 90-106
49. Singh B, Berry JA, Shohar A i wsp.: COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene*. 2007; 26(26): 3789-3796
50. Gupta GP, Nguyen DX, Chiang AC i wsp.: Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 2007; 446(7137): 765-770
51. Pai SI, Lin YY, Macaes B i wsp.: Prospects of RNA interference therapy for cancer. *Gene Ther*. 2006; 13(6): 464-477
52. Dabbagh A, Rajaei S: The role of anesthetic drugs in liver apoptosis. *Hepat Mon*. 2013; 13(8): e13162
53. Glynn SA, Prueitt RL, Ridnour LA i wsp.: COX-2 activation is associated with Akt phosphorylation and poor survival in ER-negative, HER2-positive breast cancer. *BMC Cancer*. 2010;10: 626
54. Cao Y, Prescott SM: Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol*. 2002; 190(3): 279-286
55. Yamasaki L: Role of the RB tumor suppressor in cancer. W: Signal Transduction in Cancer. Volume 115 of the series Cancer Treatment and Research. Kluwer Academic Publishers Boston 2003; 115: 209-239
56. Siedlecki JA, Limon J: IX.3 Choroby nowotworowe. W: *Biologia molekularna w medycynie – Elementy genetyki klinicznej*, pod redakcją J. Bala. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007; 225-281
57. Lim SC: Role of COX-2, VEGF and cyclin D1 in mammary infiltrating duct carcinoma. *Oncol Rep*. 2003 Sep-Oct;10(5):1241-1249
58. Im S-A, Kim DY, Nam E i wsp.: Expression of cyclooxygenase-2 in Korean breast cancer patients and the in vitro growth inhibitory effect of celecoxib in breast cancer cells. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). 2004; 22(14S): 9715
59. Liu W, Chen Y, Wang W i wsp.: Combination of radiation and Celebrex (Celecoxib) reduce mammary and lung tumor growth. *Am J Clin Oncol*. 2003; 26(4): S103-109
60. Brandão RD, Veeck J, Van de Vijver KK i wsp.: A randomised controlled phase II trial of pre-operative celecoxib treatment reveals anti-tumour transcriptional response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013; 15(2): R29
61. Huang Z, Bao SD: Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(4): 463-470
62. Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL: Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Curr Med Chem*. 2000; 7(11): 1163-1170
63. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG i wsp.: Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett*. 2004 ; 215(1): 1-20
64. Divvela AKC, Challa SR, Tagaram IK: Pathogenic role of cyclooxygenase-2 in cancer. *Journal of Health Science*. 2010; 56(5): 502-516
65. Fosslie E: Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci*. 2001; 31(4): 325-348

66. Visscher DW, Smilanetz S, Drozdowicz S, Wykes SM: Prognostic significance of image morphometric microvessel enumeration in breast carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol.* 1993; 15(2): 88-92
67. Zhang Y, Daaka Y: PGE<sub>2</sub> promotes angiogenesis through EP4 and PKA C $\gamma$  pathway. *Blood.* 2011; 118(19): 5355-5564
68. Liu CH, Chang SH, Narko K i wsp.: Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2001; 276(21): 18563-18569
69. Markosyan N, Chen EP, Evans RA i wsp.: Mammary carcinoma cell derived cyclooxygenase 2 suppresses tumor immune surveillance by enhancing intratumoral immune checkpoint activity. *Breast Cancer Res.* 2013; 15(5): R75
70. Jarząbek K, Wołczyński W: Rola aromatazy w raku sutka. *Prz Menopauz* 2003, 5: 12-16
71. Harris RE, Beebe-Donk J, Alshafie GA: Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer.* 2006; 6: 27
72. Kapetanovic IM: Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. *Chem Biol Interact.* 2008; 171(2): 165-176
73. Selassie CD: History of Quantitative Structure-Activity Relationships, w: Abraham DJ: *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*, Wydanie 6., Tom 1.: Drug Discovery. Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy. 2003: 1-48
74. Singh A, Singh R: QSAR and its role in target-ligand interaction. *The Open Bioinformatics Journal* 2013; 7: 63-67
75. Puzyn T, Leszczyński J, Cronin MTD: Recent advances in QSAR studies. *Methods and applications.* W: Leszczyński J: *Challenges and advances in computational chemistry and physics*, Tom 8., Springer Dordrecht Heidelberg London New York; 2010: 1-413
76. Hansch C, Maloney PP, Fujita T, Muir RM: Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with hammett substituent constants and partition coefficients. *Nature* 1962; 194: 178-180
77. Maciejewska D, Zołek T, Herold F: CoMFA methodology in structure-activity analysis of hexahydro- and octahydropyrido[1,2-c]pyrimidine derivatives based on affinity towards 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and alpha1-adrenergic receptors. *J Mol Graph Model.* 2006; 25(3): 353-362
78. Leszczyński J, Puzyn T: towards efficient designing of safe nanomaterials. *Innovative merge of computational approaches and experimental techniques.* RCS Nanoscience & Nanotechnology. Royal Society of Chemistry. Cambridge 2012; 1-362
79. Silverman RB, Holladay MW: Chapter 2: Lead discovery and lead modification. W: *The organic chemistry of drug design and drug action*, Wydanie 3. Elsevier; 2014: 19-122
80. Todeschini R, Consonni V: *Handbook of molecular descriptors.* W: *Methods and principles in medicinal chemistry*, Tom 11; Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy. 2000; 1-668
81. Wiener H: Correlation of heat of isomerization, and difference in heats of vaporization of isomers among the paraffin hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* 1947, 69(11): 2636-2638
82. Wiener H: Influence of interatomic forces on paraffin properties. *J. Chem. Phys.* 1947, 15: 766-766
83. Wiener H: Structural determination of paraffin boiling points. *J. Am. Chem. Soc.* 1947, 69(1): 17-20
84. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug. Delivery Rev.* 2001; 46(1-3): 3-26
85. Nau R, Fritz Sörgel F, Helmut Eiffert H: Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010, 23(4): 858-883
86. Souza ES, Zaramello L, Kuhnen CA: Estimating the octanol/water partition coefficient for aliphatic organic compounds using semi-empirical electrotopological index. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12: 7250-7264
87. Molinspiration Cheminformatics (Bratislava University). Interactive logP calculator. <http://www.molinspiration.com/services/logp.html>  
(data wejścia: 12.07.2014)



88. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ: A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem.* 1999; 1(1): 55-68
89. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y i wsp.: Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J.Med.Chem.* 2002; 45: 2615-2623
90. Garg R, Kurup A, Mekapati SB, Hansch C: Cyclooxygenase (COX) inhibitors: a comparative QSAR study. *Chem Rev.* 2003; 103(3): 703-732
91. Galano JJ, Sancho J: QSAR Models for prediction of binding and inhibitory properties of [(E)-2-R-vinyl]benzene derivatives with therapeutic effects against *Helicobacter pylori*. *Med chem.* 2013; 4(1): 306-312
92. Ertl P, Rohde B, Selzer P: Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *J.Med.Chem.* 2000; 43: 3714-3717
93. Gutman I, Körtyvélyesi T: Wiener indices and molecular surfaces. *Zeitschrift für Naturforschung.* 1995; 50a: 669-671
94. Koehl P, Levitt M, Edelsbrunner H: ProShape – Understanding the shapes of protein molecules. Volume, surface and pockets of proteins. <http://csb.stanford.edu/~koehl/ProShape/protsurf.php> (data wejścia: 29.07.2014)
95. Benigni R: Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) models of mutagens and carcinogens. Raton B.CRC Press. 2003; 267-286
96. Bajorath J: Methods in molecular biology. Volume 275: Chemoinformatics: Concepts, Methods, and Tools for Drug Discovery. Humana Press. 2004; 1-524
97. Pearson K: LIII. On lines and planes of closest fit to system of points in space. *Philosophical Magazine.* 1901; 2: 559-572
98. Wold S, Esbensen K, Geladi P: Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems.* 1987; 2: 37-52
99. Daszykowski M, Walczak B: Analiza czynników głównych i inne metody eksploracji danych. W: Zuba D, Parczewski A: *Chemometria w analityce.* Wydawnictwo – Instytut Ekspertyz Sądowych IES, Kraków. 2008; 1-328
100. Lauria A, Ippolito M, Almerico AM: Combined use of PCA and QSAR/QSPR to predict the drugs mechanism of action. An application to the NCI ACAM database. *QSAR Comb. Sci.* 2009, 28(4): 387-395
101. Cramer III RD, Patterson DE, Bunce JD: Comparative molecular field analysis (CoMFA). 1. Effect of shape on binding of steroids to carrier proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 1988; 110: 5959-596
102. Kubinyi H: X.4 Drug Design: Chapter 4.3. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). W: *Handbook of Chemoinformatics: From Data to Knowledge in 4 Volumes.* Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy. 2003; Volume 4: 1555-1575
103. Veerasamy R, Rajak H, Jain A i wsp.: Validation of QSAR models - strategies and importance. *International Journal of Drug Design and Discovery.* 2011; 2(3): 511-519
104. Roy PP, Paul S, Mitra I, Roy K: On two novel parameters for validation of predictive QSAR models. *Molecules.* 2009; 14: 1660-1701
105. Mitchell JBO: Machine learning methods in chemoinformatics. *WIREs Comput Mol Sci* 2014; 4: 468-481
106. Lee KO, Park HJ, Kim YH i wsp.: CoMFA and CoMSIA 3D QSAR studies on pimarane cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Arch Pharm Res.* 2004; 27(5): 467-470
107. Livingstone DJ: Methods in molecular biology. Volume 458: Artificial Neural Networks. Humana Press. 2008; 1-254
108. Dehmer M, Varmuza K, Bonchev D: Quantitative and network biology. Volume 2: Statistical modelling of molecular descriptors in QSAR/QSPR. Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy 2012; 1-447
109. Singh N, Chaudhury S, Liu R i wsp.: QSAR Classification Model for Antibacterial Compounds and Its Use in Virtual Screening. *J Chem Inf Model.* 2012; 52(10): 2559-2569

110. Bayes Thomas Mr., Price Mr.: An essay towards solving a problem in the Doctrine of Chances. By the late rev. Mr. Bayes, F. R. S. communicated by Mr. Price, in a Letter to John Canton, A. M. F. R. S. Phil. Trans. 1763; 53: 370-418
111. Liu L, Lu J, Lu Y i wsp.: Novel Bayesian classification models for predicting compounds blocking hERG potassium channels. Acta Pharmacol Sin. 2014; 35(8): 1093-1102
112. Xia X, Maliski EG, Paul Gallant P, Rogers D: Classification of kinase inhibitors using a Bayesian model. J. Med. Chem. 2004; 47(18): 4463-4470
113. Harańczyk G: Krzywe ROC, czyli ocena jakości klasyfikatora i poszukiwanie klasyfikatora i poszukiwanie optymalnego punktu odcięcia. StatSoft Polska 2010. [www.statsoft.pl/czytelnia.html](http://www.statsoft.pl/czytelnia.html) (data wejścia 21.07.2014)
114. Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J: Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. Nat Rev Drug Discov. 2004; 3(11): 935-949
115. Jiang B, Huang X, Yao H i wsp.: Discovery of potential anti-inflammatory drugs: diaryl-1,2,4-triazoles bearing N-hydroxyurea moiety as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. Org Biomol Chem. 2014; 12(13): 2114-2127
116. Setny P: Projektowanie leków. Centrum Nauk Obliczeniowych. Interdyscyplinarne Centrum Modelowania Matematycznego i Komputerowego Uniwersytetu Warszawskiego. [https://www.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie\\_leków](https://www.icm.edu.pl/kdm/Projektowanie_leków) (data wejścia: 21.07.2014)
117. Muegge I, Rarey M: Small molecule docking and scoring. W: Reviews in computational chemistry. wyd.: Lipkowitz KB, Boyd DB. John Wiley & Sons Inc., Nowy Jork, USA. 2001; 17: 1-60
118. Alberts IL, Todorov NP, Dean PM: Receptor flexibility in de novo ligand design and docking. J Med Chem. 2005; 48(21): 6585-6596
119. Anuszevska EL: Badanie aktywności cytotoksycznej produktów leczniczych i wyrobów medycznych. Gaz. Farm. 2010; 5: 36-38
120. European Medicines Agency (EMA): Scientific guidelines. Non-clinical guidelines: Toxicology. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000083.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000083.jsp) (data wejścia: 22.07.2014)
121. Ehrich M, Sharova L: Chapter 2. Assessment of cell toxicity. Unit 2.6. *In vitro* methods for detecting cytotoxicity. W: current protocols in toxicology. wyd.: Costa LG, Hodgson E, Lawrence DA, Reed DJ. John Wiley & Sons, Inc. USA, Nowy Jork. 2005; 2.6.1-2.6.27
122. Vichai V, Kirtikara K: Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nat Protoc. 2006; 1(3):1112-1116.
123. Putnam KP, Bombick DW, Doolittle DJ: Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. Toxicology in Vitro 2002; 16: 599-607
124. Fotakis G, Timbrell JA: In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters 2006; 160: 171-177
125. Ní Shúilleabháin S, Mothersill C, Sheehan D i wsp.: In vitro cytotoxicity testing of three zinc metal salts using established fish cell lines. Toxicology in Vitro 2004; 18; 365-376
126. Rode H-J: Chapter 6: Cytotoxicity – Introduction. Chapter 7: Cytotoxicity in cell populations. W: Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. 4<sup>th</sup> Edition. Roche Diagnostics GmbH. Niemcy, Mannheim 2008; 88-109
127. Xenometrix IN CYTOTOX - Cytotoxicity Screening Test Systems. BioAntares LLC. [http://www.bioantares.com/Cytotoxicity\\_Screening.html](http://www.bioantares.com/Cytotoxicity_Screening.html) (data wejścia: 20.08.2014)
128. Zhang Y, Cai X, Wang Y i wsp.: Noninvasive photoacoustic microscopy of living cells in two and three dimensions through enhancement by a metabolite dye. Angew. Chem. 2011; 123: 7497-7501
129. Berridge MV, Herst PM, Tan AS: Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. Biotechnol Annu Rev. 2005; 11: 127-152

130. Wyrzykiewicz E, Kępką J, Pukała W: New (E)-4'-halo substituted stilbenylalkanoic acids and their derivatives. *Pol. J. Chem.* 1988; 62: 251-255
131. Wyrzykiewicz E, Pukała W, Kędzia B: Synthesis and antimicrobial properties of N-substituted derivatives of (E)- $\alpha$ -(or  $\gamma$ )-azastilbenols. *Il Farmaco* 1994; 49(2): 127-131
132. Pukała W, Kędzia B: Antimicrobial activity of some N-alkyl and N-nitrobenzyl substituted halides of (E)-4'-hydroxy-3'-methoxystilbazoles-4. *Il Farmaco* 1999; 54(9): 584-587
133. Pukała W, Wyrzykiewicz E, Kędzia B: Synthesis and antimicrobial properties of N-substituted halides of (E)-azastilbenols. *Il Farmaco* 1995; 50(11): 779-782
134. Cayman Chemical Company (USA): COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (nr katalogowy 560131).  
<https://www.caymanchem.com/pdfs/560131.pdf>  
(data wejścia: 25.09.2014)
135. Dai ZJ, Ma XB, Kang HF i wsp.: Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. *Cancer Cell Int.* 2012; 12(1): 53
136. Cayman Chemical Company (USA): Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Kit (nr katalogowy 500141).  
<https://www.caymanchem.com/pdfs/500141.pdf>  
(data wejścia: 16.02.2015)
137. Advanced Chemistry Development: ACD/ChemSketch v. 12.01.  
<http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>  
(data wejścia: 10.03.2015)
138. ChemAxon Ltd.: Marvin Suite v. 6.0.2.  
<https://www.chemaxon.com/products/marvin/>  
(data wejścia: 19.03.2015)
139. GraphPad Prism: GraphPad v. 5.0.  
<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>  
(data wejścia: 27.03.2015)
140. Taha MO, Atallah N, Al-Bakri AG i wsp.: Discovery of new MurF inhibitors via pharmacophore modeling and QSAR analysis followed by in-silico screening. *Bioorg Med Chem.* 2008; 16(3): 1218-1235
141. Pharmaceutical Data Exploration Laboratory, Wydział Farmacji, Narodowy Uniwersytet w Singapurze: PADEL Descriptor v. 2.21. <http://www.yapcsoft.com/dd/padeldescriptor/>  
(data wejścia: 04.05.2015)
142. Yap CW: PaDEL-Descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J Comput Chem.* 2011; 32(7): 1466-1474
143. PQStat Software: PQStat wersja 1.6.  
<http://pqstat.pl>  
(data wejścia: 13.05.2015)
144. Ghose AK, Crippen GM: Atomic physicochemical parameters for three-dimensional structure-directed Quantitative Structure-Activity Relationships I. partition coefficients as a measure of hydrophobicity. *J Chem Inf Comput Sci.* 1986; 7(4): 565-577
145. BIOVIA: Discovery Studio v. 4.0.  
<http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/>  
(data wejścia: 24.05.2015)
146. Wu G, Robertson DH, Brooks CL 3rd, Vieth M: Detailed analysis of grid-based molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm. *J Comput Chem.* 2003; 24(13): 1549-1562
147. Borhani DW, Shaw DE: The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. *J Comput Aided Mol Des.* 2012; 26(1): 15-26
148. Durrant JD, McCammon JA: Molecular dynamics simulations and drug discovery. *BMC Biol.* 2011; 9: 71
149. The Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB): Protein Data Bank (PDB).  
<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>  
(data wejścia: 11.09.2015)

150. Structure of flurbiprofen bound at the COX-1 active site. PDB ID: 1EQH.  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EQH>  
(data wejścia: 11.09.2015)
151. Selinsky BS, Gupta K, Sharkey CT, Loll PJ: Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. *Biochemistry* 2001; 40(17): 5172-5180
152. Structure of indomethacin bound at the COX-2 active site. PDB ID: 4COX.  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4COX>  
(data wejścia: 11.09.2015)
153. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK i wsp.: Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996; 384(6610): 644-648
154. Likhtenshtein GI: Stilbenes preparation and analysis. W: *Stilbenes. Applications in chemistry, life sciences and materials science*. wyd.: Likhtenshtein GI. Wiley-VCH, Weinheim, Niemcy. 2010: 1-42
155. Thill M, Fischer D, Becker S i wsp.: Prostaglandin metabolizing enzymes in correlation with vitamin D receptor in benign and malignant breast cell lines. *Anticancer Res.* 2009; 29(9): 3619-3625
156. Bocca C, Ievolella M, Autelli R i wsp.: Expression of Cox-2 in human breast cancer cells as a critical determinant of epithelial-to-mesenchymal transition and invasiveness. *Expert Opin Ther Targets.* 2014; 18(2): 121-135
157. Regulski M, Pukała W, Murias M: Stilbene and stilbazole derivatives as potential and selective COX-2 inhibitors: ELISA screening versus QSAR study. W: 25<sup>th</sup> Bilateral Poznań-Halle Symposium "Perspectives and challenges in medicine". Poznań, Poland, 13-15 IX 2013. Programme and abstracts. Wydaw. Nauk. Univ. Med. im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu 2013: 114-115
158. Regulski M, Piotrowska H, Regulska K i wsp.: Biologiczna aktywność nowych pochodnych trans-stilbenu – w poszukiwaniu inhibitorów COX-2 o działaniu przeciwnowotworowym. W: *Materiały Konferencji "Współczesna analityka farmaceutyczna i biomedyczna w ochronie zdrowia"*. Poznań, 17-18 IX 2015r., s. 83
159. Regulski M, Regulska K, Pukała W i wsp.: COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. *Drug Discov. Today* 2016; 21 (4): 598-615
160. Regulski M, Pukała W, Murias M: 2D QSAR analysis of trans-stilbene derivatives as COX-1/COX-2 inhibitors. W: 8<sup>th</sup> Polish-German Symposium on Pharmaceutical Science "Retrospects, insights and prospects". Kiel, Germany, 29<sup>th</sup> - 30<sup>th</sup> May 2015. Abstract str. PH-04
161. Vogel AI, Furniss BS, Hannaford AJ i wsp.: *Vogel's textbook of practical organic chemistry*. Wydanie 5. Longman Scientific & Technical; 1996
162. Polski Komitet Normalizacyjny (PKN). PN-EN ISO 10993-5:2009. Biologiczna ocena wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności in vitro
163. Jeffrey GA. *An introduction to hydrogen bonding*. Wydanie 1. Oxford University Press Inc.; 1997
164. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R i wsp.: Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136(5): E359-E386
165. Zatoński W, Sulkowska U, Przewoźniak K, Zatoński M: Rozdział 2. Epidemiologia nowotworów złośliwych w Polsce. W: *Zachorowalność i umieralność na nowotwory a sytuacja demograficzna Polski*, pod redakcją L. Kwiatkowskiej. Rządowa Rada Ludnościowa, Warszawa 2014, 30-49
166. Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR i wsp.: Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 386 (10010): 2287-2323
167. Plummer M, de Martel C, Ferlay J i wsp.: Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Glob Heal.* 2012; 13(6): 607-615
168. Kang J-H, Song K-H, Jeong K-C i wsp.: Involvement of COX-2 in the metastatic potential of chemotherapy-resistant breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2011; 11(1): 334

169. Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, Seibert K. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a cyclooxygenase 2 inhibitor. *Cancer Res.* 2000; 60(8): 2101-2103
170. Fulda S. Resveratrol and derivatives for the prevention and treatment of cancer. *Drug Discov Today.* 2010; 15(17-18): 757-765
171. Saiko P, Szakmary A, Jäger W, Szekeres T. Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res.* 2008; 658(1-2): 68-94
172. Warner TD. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J.* 2004; 18(7): 790-804
173. Akaho E, Fujikawa C, Runion HI i wsp.: A Study on binding modes of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to COX1 and COX2 as obtained by Dock4.0. *J Chem Softw.* 1999; 5(4): 147-162
174. Sale S, Tunstall RG, Ruparelia KC i wsp.: Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the *Apc<sup>Min+</sup>* mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells. *Int J Cancer.* 2005; 115(2): 194-201
175. Hoshino J, Park E-J, Kondratyuk TP i wsp.: Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *J Med Chem.* 2010; 53(13): 5033-5043
176. Ma Z, Molavi O, Haddadi A i wsp.: Resveratrol analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) mediates anti-tumor effects via mechanism different from that of resveratrol. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008; 63(1): 27-35
177. Androutsopoulos VP, Ruparelia KC, Papakyriakou A i wsp.: Anticancer effects of the metabolic products of the resveratrol analogue, DMU-212: Structural requirements for potency. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(6): 2586-2595
178. Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D i wsp.: Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacol Ther.* 2010; 126(1): 9-20
179. Arroo RRJ, Androutsopoulos V, Beresford K i wsp.: Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: dietary flavonoids. *Phytochem Rev.* 2009; 8(2): 375-386
180. Martínez-Pérez C, Ward C, Turnbull AK, et al. Antitumour activity of the novel flavonoid Oncamex in preclinical breast cancer models. *Br J Cancer.* 2016; 114(8): 905-916
181. Li Z, Li X, Gao X i wsp.: Nitroreductase detection and hypoxic tumor cell imaging by a designed sensitive and selective fluorescent probe, 7-[(5-Nitrofuranyl)methoxy]-3 H -phenoxazin-3-one. *Anal Chem.* 2013; 85(8): 3926-3932
182. Li Y, Sun Y, Li J i wsp.: Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for in vivo nitroreductase imaging. *J Am Chem Soc.* 2015; 137(19): 6407-6416
183. Wardman P, Dennis MF, Everett SA i wsp.: Radicals from one-electron reduction of nitro compounds, aromatic N-oxides and quinones: the kinetic basis for hypoxia-selective, bioreductive drugs. *Biochem Soc Symp.* 1995; 61: 171-194
184. Wardman P. Electron transfer and oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hypoxia. *Curr Med Chem.* 2001; 8(7): 739-761
185. Cenas N, Prast S, Nivinskas H i wsp. Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(9): 5593-5603
186. Lopes M, de Andrade Sena C, Silva B i wsp.: Synthesis of nitroaromatic compounds as potential anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015; 15(2): 206-216
187. Spain JC. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annu Rev Microbiol.* 1995; 49(1): 523-555
188. Purohit V, Basu AK. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. *Chem Res Toxicol.* 2000; 13(8): 673-692
189. Kökoğlu E, Tüter Y, Sandıkçı KS i wsp.: Prostaglandin E2 levels in human brain tumor tissues and arachidonic acid levels in the plasma membrane of human brain tumors. *Cancer Lett.* 1998; 132(1-2): 17-21

190. Elkhoully G, Abd SM, Mohamed AS i wsp.: The level of bronchoalveolar lavage fluid prostaglandine E<sub>2</sub>; is it diagnostic of bronchogenic carcinoma? *Egypt J Chest Dis Tuberc.* 2012; 61(3): 167-170
191. Zang S, Ma X, Wu Y i wsp.: PGE<sub>2</sub> synthesis and signaling in malignant transformation and progression of human hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol.* 2017; 63: 120-127
192. Wang D, Fu L, Sun H i wsp.: Prostaglandin E<sub>2</sub> promotes colorectal cancer stem cell expansion and metastasis in mice. *Gastroenterology.* 2015; 149(7): 1884-1895.e4
193. Kochel TJ, Golubeva OG, Fulton AM. Upregulation of cyclooxygenase-2/prostaglandin E<sub>2</sub> (COX-2/PGE<sub>2</sub>) pathway member multiple drug resistance-associated protein 4 (MRP4) and downregulation of prostaglandin transporter (PGT) and 15-prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) in triple-negative breast. *Breast Cancer Basic Clin Res.* 2016; 10: 61-70
194. Jäger W, Gruber A, Giessrigl B i wsp.: Metabolomic analysis of resveratrol-induced effects in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Omi A J Integr Biol.* 2011; 15(1-2): 9-14
195. de Pedro M, Baeza S, Escudero M-T i wsp.: Effect of COX-2 inhibitors and other non-steroidal inflammatory drugs on breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2015; 149(2): 525-536
196. Núñez-Vergara LJ, Farias D, Bollo S, Squella J. An electrochemical evidence of free radicals formation from flutamide and its reactivity with endo/xenobiotics of pharmacological relevance. *Bioelectrochemistry.* 2001; 53(1): 103-110
197. Ask K, Dijols S, Giroud C i wsp.: Reduction of nilutamide by NO synthases: implications for the adverse effects of this nitroaromatic antiandrogen drug. *Chem Res Toxicol.* 2003; 16(12): 1547-1554

## STRESZCZENIE

Dane epidemiologiczne wskazują, że nowotwory stają się pierwszą przyczyną śmiertelności w Polsce i innych krajach europejskich, szczególnie w populacji osób poniżej 65. roku życia. Pomimo coraz lepszej diagnostyki i nowych metod leczenia, współczesna terapia onkologiczna w wielu przypadkach nadal jest bezradna. W związku z tym wyzwaniem dla współczesnych nauk medycznych jest znalezienie nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. Wyniki badań przedklinicznych sugerują, że cząsteczek o takiej aktywności biologicznej należy poszukiwać między innymi wśród pochodnych *trans*-stilbenu. Najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy związków jest resweratrol, który hamuje proces nowotworowy na wszystkich trzech etapach jego rozwoju. Podobne właściwości posiadają jego metabolity oraz pochodne. Wymienione związki są również inhibitorami cyklooksygenazy 2 (COX-2), która odgrywa ważną rolę w procesie onkogenezy.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena nowych pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu jako cząsteczek o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych. Wybrane związki poddano badaniom *in vitro*, w których oznaczono zdolność do hamowania aktywności COX-2 oraz ich działanie cytotoksyczne względem linii komórkowej raka piersi MCF-7. Przeprowadzono również analizy *in silico*, w ramach których określono właściwości fizyko-chemiczne oraz zidentyfikowano fragmenty budowy odpowiedzialne za aktywność badanych związków względem COX-2. Wykonano także symulację dokowania, której celem była próba wyjaśnienia, w jaki sposób najbardziej selektywny inhibitor COX-2 może wiązać się z centrum aktywnym tego enzymu.

Analizowane związki poddano inkubacji z COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro*, a następnie oznaczono ich aktywność za pomocą testu immunoenzymatycznego, w którym mierzono stężenie prostaglandyny F<sub>2α</sub>. Spośród tych cząsteczek najsilniejszym inhibitorem prozapalnej cyklooksygenazy-2 był 4-nitro-3',4',5'-trihydroksi-*trans*-stilben, oznaczony symbolem N1 (COX-2 IC<sub>50</sub> = 0,279 μmol/l, 95% CI: 0,111 – 0,703), który jednocześnie był najbardziej selektywnym inhibitorem tego enzymu (wskaźnik selektywności powyżej 60). W badanym zakresie stężeń związek N1 hamował aktywność COX-2 również w komórkach MCF-7, które wykazują silną ekspresję tego enzymu. Potwierdzeniem tego działania było ponad 30% zmniejszenie stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie hodowlanym. Badany związek wykazywał jednak słabszą i mniej selektywną aktywność wobec COX-2 niż celekoksyb.

Działanie cytotoksyczne analizowanych związków oznaczono za pomocą testu MTT w komórkach raka piersi MCF-7. Równolegle zbadano aktywność celekoksybu jako związku referencyjnego. Najsilniejsze właściwości cytotoksyczne wykazywały dwie cząsteczki: 4-nitro-3',4',5'-trihydroksi-*trans*-stilben oraz 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben. Obydwa związki

w stężeniu 12,5  $\mu\text{mol/l}$  spowodowały ponad 30% obniżenie żywotności komórek, co spełnia kryteria cytotoksyczności wg standardów ISO. Należy zaznaczyć, że siła działania obydwóch związków była podobna, pomimo wcześniej wykazanych znacznych różnic w bezpośrednim hamowaniu aktywności COX-2. Przypuszcza się, że porównywalna aktywność pochodnej metoksylowej może być wynikiem biotransformacji (O-demetylacji) do pochodnej hydroksylowej w komórkach MCF-7. Za właściwości cytotoksyczne badanych związków może również odpowiadać grupa nitrowa. W przeprowadzonym teście MTT zaobserwowano, że wszystkie pięć cząsteczek posiadających tę grupę wykazywało większą aktywność niż pochodna chlorowa. Prawdopodobny mechanizm wyjaśniający tę obserwację może wynikać z redukcji grupy nitrowej do jej toksycznych pochodnych uszkadzających białka i DNA. Nie badano aktywności pochodnych *trans*-stilbenu w stężeniach powyżej 12,5  $\mu\text{mol/l}$  z uwagi na ograniczoną rozpuszczalność w medium hodowlanym. Celekoksyb w identycznym zakresie stężeń charakteryzował się słabszym działaniem, ale w większych stężeniach wykazywał silny efekt cytotoksyczny ( $\text{IC}_{50} = 49,66 \mu\text{mol/l}$ , 95% CI: 45,19 – 54,55).

Na podstawie analizy 2D QSAR stwierdzono, że pochodne *trans*-stilbenu o mniejszej lipofilności oraz zawierające więcej donorów wiązań wodorowych i atomów polarnych powinny charakteryzować się silniejszym i bardziej selektywnym działaniem wobec COX-2 niż COX-1. Mniejsza masa, objętość i powierzchnia całkowita tych cząsteczek oraz obecność mniej rozgałęzionych podstawników może sprzyjać natomiast silniejszej aktywności względem COX-1. Na tej podstawie zaprojektowano trzy nowe pochodne *trans*-stilbenu, które następnie zsyntezowano i poddano wyżej wymienionym badaniom *in vitro*.

Przeprowadzono również inne badanie *in silico*, wykorzystujące naiwny model Bayesa. Wykazano w nim, że obecność podstawników hydrofilowych, takich jak np. grupa hydroksylowa lub nitrowa, może zwiększać aktywność potencjalnych inhibitorów COX-2. Podstawniki lipofilowe, do których zalicza się przede wszystkim grupę metoksyłową i dimetyloaminową, mogą powodować natomiast skutek odwrotny. Wnioski te są zbieżne z wynikami obliczeń 2D QSAR.

W wyniku przeprowadzonej symulacji dokowania zaobserwowano, że 4-nitro-3',4',5'-trihydroksi-*trans*-stilben (N1) przyjmuje niemal identyczną orientację przestrzenną w miejscu aktywnym COX-1 i COX-2, układając się wewnątrz głównego kanału hydrofobowego. Pomimo większej ilości wiązań wodorowych utworzonych z COX-1, obliczone wartości energii dokowania wskazują na lepsze dopasowanie i silniejszą interakcję tej cząsteczki z centrum aktywnym COX-2. Nie są to jednak różnice, które w sposób wystarczający mogą wyjaśniać selektywne właściwości tego związku wobec indukowanej izoforny COX. Przypuszcza się, że wybiórcze działanie związku N1 może wynikać z dodatkowego lub silniejszego blokowania miejsca aktywnego peroksydazy COX-2 niż COX-1 lub allosterycznego wiązania się z COX-2 w pobliżu „wejścia” do centrum aktywnego. Niezbędne jest wykonanie badań krystalograficznych, na podstawie których



zostanie zweryfikowany sposób wiązania się badanego związku z miejscem aktywnym obydwóch izoform.

Wyniki otrzymane w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwoliły wytypować 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso-*trans*-stilben, który w przeprowadzonych badaniach wykazywał działanie cytotoksyczne oraz silnie i selektywnie hamował aktywność COX-2. Dokładne wyjaśnienie mechanizmu działania tej cząsteczki wymaga jednak dalszych badań. Uzyskane dane mogą również posłużyć do zaprojektowania nowych pochodnych *trans*-stilbenu o korzystniejszych właściwościach biologicznych.

**ABSTRACT****Title:**

”*trans*-Stilbene and *trans*-stilbazole derivatives as cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors with potential anticancer and chemopreventive and properties”

**Keywords:**

*trans*-stilbene, *trans*-stilbazole, cyclooxygenase-2, inflammation, breast cancer

Epidemiological data indicate that cancer diseases are the leading cause of mortality in Poland and other European countries, especially in the population under 65 years of age. Despite improved diagnostic methods and new treatment options, modern oncologic therapy is still helpless in many cases. Therefore, the challenge for modern medical sciences is to find new compounds with anticancer properties. Preclinical studies suggest that molecules with such biological activity should be sought among *trans*-stilbene derivatives. The most famous representative of this chemical group is resveratrol, which inhibits cancer process at various stages of its development. Similar properties have its metabolites and derivatives. These compounds are also inhibitors of cyclooxygenase 2 (COX-2), which plays an important role in oncogenesis.

The aim of this PhD thesis was to evaluate new *trans*-stilbene and *trans*-stilbazole derivatives as potential anticancer and anti-inflammatory agents. The selected compounds were subjected to *in vitro* assays, which determined ability to inhibit COX-2 activity as well as their cytotoxic properties against the MCF-7 breast cancer cell line. In addition, *in silico* analyses were carried out in order to define physico-chemical properties and identify structural moieties responsible for the investigated compounds activity against COX-2. A docking simulation was also performed to try to explain how the most selective COX-2 inhibitor may bind to the active site of this enzyme.

The analyzed compounds were incubated *in vitro* with COX-1 and COX-2, and then their activity was determined by an enzyme-linked immunosorbent assay based on the measurement of prostaglandin F<sub>2α</sub> concentration. Among these molecules the strongest inhibitor of the pro-inflammatory cyclooxygenase-2 was 4-nitro-3',4',5'- trihydroxy-*trans*-stilbene, marked as N1 (COX-2 IC<sub>50</sub> = 0.279 μmol/l; 95% CI: 0.111 – 0.703) which was also the most selective inhibitor of this enzyme (selectivity ratio above 60). Within the tested concentrations, the compound N1 inhibited COX-2 also in MCF-7 cells which are known for a strong expression of this enzyme. The confirmation of this activity was over 30% reduction in PGE<sub>2</sub> concentration in cell culture supernatant. However, the tested compound exhibited weaker and less selective COX-2 activity than celecoxib.

Cytotoxic activity of the compounds were determined by the use of MTT assay. The activity of celecoxib was tested in parallel. The MCF-7 cell line was also used for the study. The strongest cytotoxic properties exhibited two molecules: 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbene and 4-nitro-3',4',5'-trimethoxy-*trans*-stilbene. Both compounds at 12.5 μmol/l caused decrease in cell viability

by over 30%, meeting the criteria of cytotoxicity according to ISO standards. It should be noted that the potency of both compounds was similar, despite previously demonstrated significant differences in the direct inhibition of COX-2 activity. It is assumed that comparable activity of the methoxy derivative may be a result of its biotransformation (O-demethylation) to the hydroxyl one in MCF-7 cells. The nitro group may also be responsible for cytotoxic properties of the tested compounds. In the MTT test, It was found that all five molecules bearing this group exhibited greater activity than the chlorine derivative. The probable mechanism explaining this observation may associated with reduction of nitro group to its toxic derivatives that can damage proteins and DNA. The activity of *trans*-stilbene derivatives was not tested at concentrations exceeding 12.5  $\mu\text{mol/l}$  due to poor solubility in cell culture medium. Celecoxib in the same concentration range was less active, but at higher concentrations showed a strong cytotoxic effect ( $\text{IC}_{50} = 49.66 \mu\text{mol/l}$ ; 95% CI: 45.19 – 54.55).

Based on the results of 2D QSAR analysis, it was found that *trans*-stilbene derivatives with lower lipophilicity, possessing more hydrogen bond donors and more polar atoms should be a stronger and more selective inhibitors of COX-2 than COX-1. On the other hand, a smaller mass, volume and total surface area of these molecules as well as presence of less branched substituents may promote stronger activity against COX-1. The results were used to design three new *trans*-stilbene derivatives, which subsequently were synthesized and subjected to the above-mentioned *in vitro* studies.

Another *in silico* study using a naive Bayesian model was also conducted. It was shown that presence of hydrophilic moieties, such as hydroxyl or nitro groups, may increase the activity of potential COX-2 inhibitors. Lipophilic substituents like methoxy and dimethylamino group may cause the opposite effect. These conclusions coincide with the 2D QSAR calculations.

The molecular docking simulation revealed that the 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbene (N1) adopts almost identical spatial orientation in the cyclooxygenase active site of COX-1 and COX-2, laying inside the main hydrophobic channel. Despite the more number of hydrogen bonds with COX-1, the calculated docking energy values indicate a better fit and a stronger interaction of this molecule with the COX-2 active site. However, these differences are not sufficient to explain the selective properties of this compound against the inducible isoform of COX. It is presumed that the selective action of the compound N1 may result from additional or stronger blocking of the peroxidase active site in COX-2 than COX-1, or allosteric binding with COX-2 near "entrance" of its active centre. Crystallographic studies are essential to verify the binding mode of the investigated compound to the active site of both izoforms.

The results obtained in this PhD thesis enabled selection of the 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbene, which exhibited cytotoxic activity as well as strong and selective inhibitory effect against COX-2. Exact explanation of the mechanism of action of this molecule, however, requires further investigation. The gathered data can also be used to design new *trans*-stilbene derivatives with more favorable biological properties.

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KATEDRA I ZAKŁAD TOKSYKOLOGII



MIŁOSZ JAKUB REGULSKI

---

POCHODNE *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
JAKO SELEKTYWNE INHIBITORY AKTYWNOŚCI  
CYKLOOKSYGENAZY-2 (COX-2) O WŁAŚCIWOŚCIACH  
PRZECIWNOWOTWOROWYCH I CHEMOPREWENCYJNYCH

---

Rozprawa doktorska

**SUPPLEMENT**

POZNAŃ 2017

# SPIS TREŚCI SUPLEMENTU

<b>7. Oznaczanie aktywności inhibicyjnej pochodnych <i>trans</i>-stilbenu i <i>trans</i>-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach <i>in vitro</i> (ETAP I oraz IV) .....</b>	<b>4</b>
7.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie.....	4
7.4. Metodyka badania.....	5
7.4.1. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA) .....	5
7.4.1.4. Procedura inkubacji COX z badanymi związkami oraz oznaczenie stężenia prostaglandyn .....	5
<b>9. Synteza pochodnych <i>trans</i>-stilbenu (ETAP III).....</b>	<b>18</b>
9.4. Potwierdzenie tożsamości i struktury zsyntezowanych związków .....	18
9.4.1. Metody badań analitycznych.....	18
<b>11. Oznaczanie stopnia zahamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII).....</b>	<b>24</b>
11.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie.....	24
11.3.2. Oznaczanie stężenia PGE <sub>2</sub> w supernatancie komórkowym .....	24
11.4. Metodyka badania.....	25
11.4.2. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA) .....	25
11.4.2.5 Procedura oznaczania stężenia prostaglandyny E2 w supernatancie hodowlanym .....	25
<b>12. Wyniki.....</b>	<b>29</b>
<b>12.1. Oznaczanie aktywności inhibicyjnej pochodnych <i>trans</i>-stilbenu i <i>trans</i>-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach <i>in vitro</i> (ETAP I).....</b>	<b>29</b>
12.1.1. Badanie przesiewowe.....	29
12.1.2. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków Z5, Z9 i Z11 .....	30
<b>12.2. Analiza 2D QSAR (ETAP II) .....</b>	<b>33</b>
12.2.1. Prosta regresja liniowa (SLR) .....	33
12.2.2. Wieloraka regresja liniowa (MLR) .....	33
<b>12.3. Synteza pochodnych <i>trans</i>-stilbenu (ETAP III) .....</b>	<b>34</b>
12.3.1. Wyniki badań tożsamości i struktury .....	34
12.3.1.1. Produkt pośredni dla związku nr Z5: 4-chloro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilben.....	34
12.3.1.2. Produkt pośredni dla związków nr Z9 i Z11: 4-nitro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilben .....	37
12.3.1.3. Związek nr Z5: 4-chloro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilben .....	41
12.3.1.4. Związek nr Z9: 4-nitro-4'-etoksy- <i>trans</i> -stilben.....	43
12.3.1.5. Związek nr Z11: 4-nitro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilben .....	46
12.3.1.6. Związek nr N1: 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilben.....	49

12.3.1.7. Związek nr N2: 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilben .....	54
12.3.1.8 Związek nr N6: 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilben.....	59
<b>12.4. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków nr N1, N2 i N6 wobec COX-1 i COX-2 w warunkach <i>in vitro</i> (Etap IV) .....</b>	<b>65</b>
<b>12.7. Oznaczenie aktywności biologicznej związku nr N1 – badanie <i>in vitro</i> – ocena stopnia hamowania syntezy PGE2 w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII).....</b>	<b>68</b>
<b>WYKAZ RYCIN.....</b>	<b>69</b>
<b>WYKAZ TABEL .....</b>	<b>71</b>
<b>WYKAZ WYKRESÓW .....</b>	<b>72</b>
<b>PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>73</b>

## 7. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro* (ETAP I oraz IV)

### 7.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie

Do badania aktywności potencjalnych inhibitorów COX-1 i COX-2 wykorzystano komercyjny zestaw *COX Inhibitor Screening Assay Kit* firmy Cayman Chemical Company, USA [1].

Zestaw ten składa się z następujących materiałów i odczynników:

#### a) materiały:

- COX-1 (owcza):
  - roztwór w buforze o pH 8,0: Tris-HCl, polisorbata 20, BSA i DDC;
- COX-2 (ludzka rekombinowana):
  - roztwór w buforze o pH 8,0: Tris-HCl, polisorbata 20, BSA i DDC;
- antyserum specyficzne dla prostaglandyn (ang. *PG Screening EIA Antiserum*), liofilizat:
  - anty-PG królicze przeciwciało IgG;
- znacznik – prostaglandyna E<sub>2</sub> związana z acetylocholinoesterazą (ang. *PG Screening AChE Tracer*), liofilizat:
  - koniugat PGE<sub>2</sub> z AChE wyizolowaną z narządu elektrycznego strętwy (łac. *Electrophorus electricus*);
- płytka 96-dołkowa pokryta mysim anty-króliczym przeciwciałem IgG;
- folia do przykrycia płytki 96-dołkowej;

#### b) odczynniki:

- koncentrat buforu do inkubacji COX z inhibitorem (ang. *Reaction Buffer (10X)*), bezbarwna ciecz:
  - bufor o pH 8,0: Tris-HCl 1 mol/l, EDTA 50 mmol/l i fenol 20 mmol/l;
- hem, 5% roztwór w DMSO;
- kwas arachidonowy – substrat do reakcji, 10% roztwór w etanolu;
- wodorotlenek potasu, roztwór 0,1 mol/l;
- kwas solny, roztwór 1 mol/l;
- chlorek cyny 250 mg, krystaliczny;
- wzorec prostaglandyn w ilości 10 ng (ang. *PG Screening EIA Standard*), liofilizat;
- koncentrat buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA (ang. *EIA Buffer Concentrate (10X)*), bezbarwna ciecz;

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)

---

- bufor fosforanowy 1 mol/l zawierający BSA 1%, chlorek sodu 4 mol/l, EDTA sól czterosodowa 10 mmol/l i azydek sodu 0,1%;
- koncentrat buforu do przemywania płytki (ang. *Wash Buffer Concentrate (400X)*), bezbarwna ciecz:
  - bufor fosforanowy 4 mol/l o pH 7,4;
- polisorbat 20 (Tween 20), oleista, żółtawa ciecz;
- odczynnik Ellman'a (ang. *Ellman's Reagent*), liofilizat:
  - jodek acetylotiocholiny, kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy, chlorek sodu, wodorofosforan potasu, diwodorofosforan potasu.

## 7.4. Metodyka badania

### 7.4.1. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA)

#### 7.4.1.4. Procedura inkubacji COX z badanymi związkami oraz oznaczenie stężenia prostaglandyn

##### 1. Przygotowanie materiałów i odczynników do wykonania inkubacji

###### *Bufor do inkubacji z COX z inhibitorem*

Przygotowano 10-krotne rozcieńczenie *koncentratu buforu do inkubacji COX z inhibitorem*.

W tym celu odmierzone 5 ml *koncentratu* i dodano 45 ml *wody ultraczystej*, całość wymieszano.

Rozcieńczony bufor jest trwały przez jeden miesiąc w temperaturze pokojowej.

###### *COX-1 (owcza)*

Gotowy *roztwór COX-1* rozmrożono i przechowywano na lodzie podczas wykonywania reakcji.

Roztwór ten zużyto w ciągu jednej godziny, a niewykorzystaną ilość ponownie zamrożono w -80°C.

###### *COX-2 (ludzka rekombinowana)*

Gotowy *roztwór COX-2* rozmrożono i przechowywano na lodzie podczas wykonywania reakcji.

Roztwór ten zużyto w ciągu jednej godziny, a niewykorzystaną ilość ponownie zamrożono w -80°C.

###### *Hem*

100 µl *roztworu hemu w DMSO* rozcieńczono 5-krotnie *buforem do inkubacji COX z inhibitorem*, całość wymieszano.

Rozcieńczony roztwór hemu jest trwały przez 12 godzin w temperaturze pokojowej.



*Kwas arachidonowy – substrat do reakcji*

Odmierzono 50  $\mu\text{l}$  *etanolowego roztworu kwasu arachidonowego*, a następnie dodano 50  $\mu\text{l}$  0,1 mol/l roztworu wodorotlenku potasu oraz 400  $\mu\text{l}$  *wody ultraczystej*, całość wymieszano.

Przygotowany roztwór zawiera kwas arachidonowy o stężeniu 10 mmol/l, a jego trwałość wynosi jedną godzinę.

*Wodorotlenek potasu*

0,1 mol/l roztwór wodorotlenku potasu jest przygotowany jako gotowy do użycia.

*Kwas solny*

Przygotowano 0,1 mol/l roztwór kwasu solnego poprzez rozcieńczenie 1 mol/l roztworu kwasu solnego.

Obydwa roztwory kwasu solnego (1 mol/l oraz 0,1 mol/l) są trwałe przez jeden miesiąc w temperaturze pokojowej.

*Chlorek cyny*

Odważono 250 mg *krystalicznego chlorku cyny* i rozpuszczono w 5 ml 0,1 mol/l roztworu kwasu solnego.

Nasycony roztwór chlorku cyny w kwasie solnym jest trwały osiem godzin w temperaturze pokojowej.

## **2. Inkubacja COX-1 oraz COX-2 z badanymi związkami**

1. Przygotowano łaźnię wodną i ustawiono temperaturę ogrzewania na 37°C.
2. Przygotowano szklane probówki, korki silikonowe, pipety i końcówki do przeprowadzenia reakcji.
3. Podzielono szklane probówki na:
  - probówki testowe (z inhibitorem) – po 1 szt. na każde badane stężenie inhibitora wobec COX-1 lub COX-2,
  - probówki do wyznaczenia 100% aktywności COX-1 lub COX-2 (bez inhibitora) – po 2 szt. na izoformę,
  - probówki tła (z inaktywowanym COX-1 lub COX-2) – po 1 szt. na izoformę.

*Probówki testowe oraz probówki do wyznaczenia 100% aktywności COX-1 lub COX-2*

1. Odmierzono do każdej szklanej probówki po 950  $\mu\text{l}$  *buforu do inkubacji COX z inhibitorem* i wstawiono do łaźni celem uzyskania temperatury 37°C.

2. Dodano po 10  $\mu$ l *rozcieńzonego roztworu hemu* do każdej szklanej probówki, wymieszano.
3. Dodano po 10  $\mu$ l *roztworu COX-1 lub COX-2* do odpowiednich szklanych probówek, wymieszano.
4. Probówki testowe – dodano 20  $\mu$ l *rozcieńzonego roztworu inhibitora*, wymieszano i inkubowano zawartość przez 10 minut w temperaturze 37°C.  
Probówki do wyznaczenia 100% aktywności COX-1 lub COX-2 – dodano 20  $\mu$ l *DMSO*, wymieszano i inkubowano zawartość przez 10 minut w temperaturze 37°C.
5. Dodano po 10  $\mu$ l *rozcieńzonego roztworu kwasu arachidonowego* do każdej szklanej probówki celem zainicjowania reakcji katalitycznej, wymieszano i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze 37°C. 10  $\mu$ l roztworu odpowiadało docelowemu stężeniu 100  $\mu$ mol/l kwasu arachidonowego w probówce. Całkowita objętość roztworu reakcji wynosiła 1 ml.
6. Dodano po 50  $\mu$ l *1 mol/l roztworu kwasu solnego* do każdej szklanej probówki w celu zatrzymania reakcji katalitycznej.
7. Wyjęto probówki z łaźni i do każdej dodano po 100  $\mu$ l *nasyconego roztworu chlorku cyny*, co umożliwiło redukcję otrzymanej, labilnej PGH<sub>2</sub> do stabilnej PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Inkubowano zawartość probówek przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Ostateczna objętość roztworu reakcji wyniosła 1,15 ml.
8. Szczelnie zatkało probówki korkami silikonowymi i przystąpiono do oznaczania zawartości PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  metodą cEIA lub wstawiono je do lodówki. Otrzymana PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  jest trwała przez siedem dni w temperaturze 2-8°C.

#### *Probówki tła*

1. Przygotowano łaźnię wodną i ustawiono temperaturę ogrzewania na 100°C.
2. Przygotowano plastikową probówkę o pojemności 500  $\mu$ l.
3. Odmierzono 20  $\mu$ l roztworu COX-1 lub COX-2, przeniesiono do probówki i szczelnie zamknięto.
4. Wstawiono probówkę do wrzącej wody na 3 minuty w celu inaktywacji COX, potem wyjęto i ochłodzono.
5. Ustawiono ogrzewanie łaźni na 37°C.
6. Przygotowano dwie szklane probówki, korki silikonowe, pipety i końcówki do przeprowadzenia reakcji.
7. Odmierzono do każdej szklanej probówki po 950  $\mu$ l *buforu do inkubacji COX z inhibitorem* i wstawiono do łaźni celem uzyskania temperatury 37°C.
8. Dodano po 10  $\mu$ l *rozcieńzonego roztworu hemu* do każdej szklanej probówki, wymieszano.
9. Dodano po 10  $\mu$ l *roztworu z inaktywowanym COX-1 lub COX-2* do odpowiednich szklanych probówek, wymieszano.

10. Dodano 20  $\mu$ l *DMSO*, wymieszano i inkubowano zawartość przez 10 minut w temperaturze 37°C.
11. Dodano po 10  $\mu$ l *rozcieńzonego roztworu kwasu arachidonowego* do każdej szklanej probówki celem zainicjowania reakcji katalitycznej, wymieszano i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze 37°C. 10  $\mu$ l roztworu odpowiadało docelowemu stężeniu 100  $\mu$ mol/l kwasu arachidonowego w probówce. Całkowita objętość roztworu reakcji wynosiła 1 ml.
12. Dodano po 50  $\mu$ l 1 mol/l *roztworu kwasu solnego* do każdej szklanej probówki w celu zatrzymania reakcji katalitycznej.
13. Wyjęto probówki z łaźni i do każdej dodano po 100  $\mu$ l *nasyconego roztworu chlorku cyny*, co umożliwiło redukcję otrzymanej, labilnej PGH<sub>2</sub> do stabilnej PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Inkubowano zawartość probówek przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Ostateczna objętość roztworu reakcji wyniosła 1,15 ml.
14. Szczelnie zatkało probówki korkami silikonowymi i przystąpiono do oznaczania zawartości PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  metodą cEIA lub wstawić je do lodówki. Otrzymana PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  jest trwała przez siedem dni w temperaturze 2-8°C.

*Probówki do oceny interferencji badanego związku na wynik analizy*

1. Wykonano wszystkie czynności opisane powyżej – w punktach 1.-14. dla *Probówki tła* – za wyjątkiem jednej zmiany w punkcie 10. polegającej na zastąpieniu *DMSO* przez *rozcieńczony roztwór inhibitora* lub jego najwyższe stężenie (w przypadku badania zakresu stężeń inhibitora).

### **3. Przygotowanie wzorców, materiałów i odczynników do oznaczania zawartości prostaglandyn**

*Bufor do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*

Przygotowano 10-krotne rozcieńczenie *koncentratu buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.

W tym celu odmierzone 10 ml *koncentratu* i dodano 90 ml *wody ultraczystej*, całość wymieszano.

Rozcieńczony bufor jest trwały przez dwa miesiące w temperaturze 2-8°C.

*Bufor do przemywania płytki*

Przygotowano 400-krotne rozcieńczenie *koncentratu buforu do przemywania płytki*.

W tym celu należy odmierzone 5 ml *koncentratu*, 1 ml *polisorbatu 20* i dodano 2000 ml *wody ultraczystej*, całość wymieszano.

Rozcieńczony bufor jest trwały przez dwa miesiące w temperaturze 2-8°C.

*Antyserum specyficzne dla prostaglandyn*

Do fiołki z *liofilizatem* dodano 6 ml *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*, wymieszano.

Roztwór antyserum jest trwały przez cztery tygodnie w temperaturze 2-8°C.

*Znacznik – prostaglandyna E<sub>2</sub> związana z acetylocholinoesterazą*

Do fiołki z *liofilizatem* dodano 6 ml *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*, wymieszano.

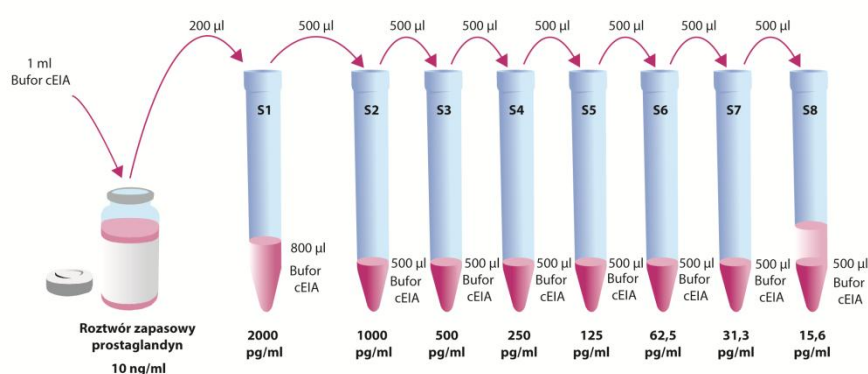
Roztwór znacznika jest trwały przez dwa tygodnie w temperaturze 2-8°C.

*Zakres stężeń prostaglandyn do krzywej wzorcowej*

1. Rozpuszczono 10 ng *wzorca prostaglandyn* w 1 ml *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*, wymieszano.  
Otrzymany roztwór zapasowy o stężeniu 10 ng/ml jest trwały przez sześć tygodni w temperaturze 2-8°C.
2. Do przygotowania rozcieńczeń wykorzystano osiem szklanych probówek i oznaczono je symbolami S1-S8.
3. Do probówki S1 przeniesiono 800 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.
4. Do probówek S2-S8 przeniesiono po 500 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.
5. Pobrano 200 µl *roztworu zapasowego o stężeniu 10 ng/ml* i przeniesiono do probówki S1, wymieszano. Uzyskany roztwór miał stężenie 2000 pg/ml.
6. Następnie odmierzono 500 µl *roztworu z probówki S1* i przeniesiono do probówki S2, wymieszano. Czynność powtórzono dla kolejnych probówek S2-S8.
7. Uzyskane roztwory S1-S8 są trwałe przez 24 godziny w temperaturze 2-8°C.

Sposób przygotowania roztworów oraz wartości stężeń do krzywej wzorcowej przedstawiono na RYCINIE 7.1-suplement.

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)



RYCINA 7.1-suplement

Procedura przygotowania stężeń prostaglandyn do krzywej wzorcowej [1].

#### 4. Wykonanie rozcieńczeń roztworów prostaglandyn, które otrzymano w wyniku inkubacji

*Probówki testowe – roztwory po inkubacji COX-1 i COX-2 z inhibitorami*

1. Przygotowano plastikowe probówki, pipety i końcówki do wykonania rozcieńczeń.  
Na jedną szklaną probówkę zawierającą 1,15 ml *roztworu po inkubacji COX-1 lub COX-2 z inhibitorem* przypadały dwie plastikowe probówki.
2. Oznaczono plastikowe próbówki symbolami C1-C2, osobno dla reakcji COX-1 i COX-2.
3. Do każdej probówki C1 dodano 990 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.
4. Do odpowiednich probówek C1 dodano po 10 µl *roztworów po inkubacji COX-1 lub COX-2 z inhibitorem*, wymieszano. Uzyskane roztwory stanowiły rozcieńczenie 1:100.
5. Do każdej probówki C2 dodano 950 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.
6. Z każdej probówki C1 odmierzone 50 µl *roztworu 1:100* i przeniesiono do odpowiedniej probówki C2, wymieszano. Uzyskane roztwory stanowiły rozcieńczenie 1:2000 i posłużyły do oznaczenia zawartości prostaglandyn metodą cEIA.

*Probówki do wyznaczenia 100% aktywności COX-1 lub COX-2*

1. Przygotowano plastikowe probówki, pipety i końcówki do wykonania rozcieńczeń.  
Na jedną szklaną probówkę zawierającą 1,15 ml *roztworu COX-1 lub COX-2 bez inhibitora* przypadały dwie plastikowe probówki.
2. Oznaczono plastikowe próbówki symbolami IA1-IA2, osobno dla *roztworu COX-1 i COX-2 bez inhibitora*.
3. Do każdej probówki IA1 dodano 990 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.

4. Do odpowiednich probówek IA1 dodano po 10 µl *roztworów COX-1 lub COX-2 bez inhibitora*, wymieszano. Uzyskane roztwory stanowiły rozcieńczenie 1:100.
5. Do każdej probówki IA2 dodano 950 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.
6. Z każdej probówki IA1 odmierzone 50 µl *roztworu 1:100* i przeniesiono do odpowiedniej probówki IA2, wymieszano. Uzyskane roztwory stanowiły rozcieńczenie 1:2000 i posłużyły do oznaczenia zawartości prostaglandyn metodą cEIA.

#### *Probówki tła*

1. Przygotowano plastikowe probówki, pipety i końcówki do wykonania rozcieńczeń.  
Na jedną szklaną probówkę zawierającą 1,15 ml *roztworu inaktywowanego COX-1 lub COX-2* przypadała jedna plastikowa probówka.
2. Oznaczono plastikowe próbówki symbolami BC1 dla COX-1 i BC2 dla COX-2.
3. Do probówki BC1 i BC2 dodano 990 µl *buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*.
4. Do probówki BC1 dodano 10 µl *roztworu inaktywowanego COX-1*, a do probówki BC2 dodano 10 µl *roztworu inaktywowanego COX-2*, wymieszano. Uzyskane roztwory stanowiły rozcieńczenie 1:100 i posłużyły do oznaczenia zawartości prostaglandyn metodą cEIA.

#### *Probówki do oceny interferencji badanego związku na wynik analizy*

1. Wykonano wszystkie czynności opisane powyżej – w punktach 1.-4. dla *Probówki tła* – stosując odpowiednio *roztwór inaktywowanego COX-1 lub COX-2 z inhibitorem* oraz oznakowanie plastikowych probówek jako BC1 + inhibitor i BC2 + inhibitor.

#### **5. Przygotowanie 96-dółkowej płytki do inkubacji, nanoszenie odczynników do odpowiednich dołków**

##### Pojęcia:

##### *Blank (Blk)*

Absorbancja dla próby ślepej, zmierzona po dodaniu odczynnika Ellman'a do pustego dołka i wywołaniu ewentualnej barwnej reakcji. Wartość absorbancji dla wszystkich pozostałych dołków należy pomniejszyć o absorbancję próby ślepej.

##### *Total Activity (TA)*

Całkowita aktywność enzymatyczna AChE (składowej znacznika), bez obecności antyserum i wolnego analitu (tj. prostaglandyny PGF<sub>2α</sub> uzyskanej w reakcji COX) w dołku. Zmierzona po dodaniu odczynnika Ellman'a i wywołaniu barwnej reakcji. Wartość absorbancji stanowi narzędzie diagnostyczne do oceny poprawności uzyskanych wyników metodą cEIA.

#### *Non-Specific Binding (NSB)*

Nie-immunologiczne wiązanie się znacznika z powierzchnią dołka. Niewielka ilość znacznika może wiązać się z białkami izolacyjnymi powlekającymi dołek lub mysim anty-króliczym przeciwciałem IgG nawet przy braku obecności antyserum i wolnego analitu.

NSB stanowi pomiar absorbancji takiej możliwości wiązania, zmierzonej po dodaniu odczynnika Ellman'a do dołka i wywołaniu barwnej reakcji.

#### *Maximum Binding ( $B_0$ )*

Maksymalna ilość znacznika, jaka może zostać związana przez antyserum przy braku obecności wolnego analitu. Tak uzyskany kompleks znacznik-antyserum wiązany jest przez mysie anty-królicze przeciwciało IgG na powierzchni dołka.

Absorbancja mierzona jest po dodaniu odczynnika Ellman'a do dołka i wywołaniu barwnej reakcji.

#### *Bound/Maximum Bound ( $B/B_0$ )*

Stosunek absorbancji zmierzonej dla dołka danej próbki testowej lub dołka wzorcowego stężenia prostaglandyn do absorbancji zmierzonej dla dołka  $B_0$ .

#### Nanoszenie rozcieńczeń próbek (C2 i IA2), stężeń wzorcowych (S1-S8) i odczynników do dołków:

1. *Bufor do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*  
Dodano po 100  $\mu$ l buforu do każdego dołka NSB oraz po 50  $\mu$ l buforu do każdego dołka  $B_0$ .
2. *Stężenia prostaglandyn do krzywej wzorcowej (S1-S8)*  
Stężenia nanoszono od najmniejszego (S8) do największego (S1) do dwóch kolumn po osiem dołków.  
Dodano po 50  $\mu$ l stężenia S8 do dwóch dołków. Czynność powtórzono dla kolejnych stężeń S7-S1.
3. *Probówki tła (BC)*  
Dodano po 50  $\mu$ l roztworu BC1 do dwóch dołków oraz po 50  $\mu$ l roztworu BC2 również do dwóch dołków.
4. *Probówki do oceny interferencji badanego związku na wynik analizy (BC + inhibitor)*  
Dodano 50  $\mu$ l roztworu BC1 + inhibitor do jednego dołka oraz 50  $\mu$ l roztworu BC1 + inhibitor również do jednego dołka.
5. *Probówki do wyznaczenia 100% aktywności COX-1 i COX-2 (IA2)*  
Dodano po 50  $\mu$ l roztworu IA2 COX-1 do dwóch dołków oraz po 50  $\mu$ l roztworu IA2 COX-2 również do dwóch dołków.

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)

6. *Próbówki testowe reakcji COX-1 i COX-2 z udziałem inhibitora (C2)*

Dodano po 50 µl każdego roztworu C2 COX-1 oraz C2 COX-2 do odpowiednich dwóch dołków.

Zgodnie z zaleceniami producenta zestawu – wykonano przynajmniej dwa oznaczenia dla danej próbówki testowej C2.

7. *Znacznik – prostaglandyna E<sub>2</sub> związana z acetylocholinoesterazą*

Dodano po 50 µl roztworu znacznika do każdego dołka za wyjątkiem dołków Blk i TA.

5 µl roztworu znacznika dodano do każdego dołka TA dopiero na etapie rozwijania płytki z użyciem odczynnika Ellman'a.

8. *Antyserum specyficzne dla prostaglandyn*

Dodano po 50 µl roztworu znacznika do każdego dołka za wyjątkiem dołków Blk, TA i NSB.

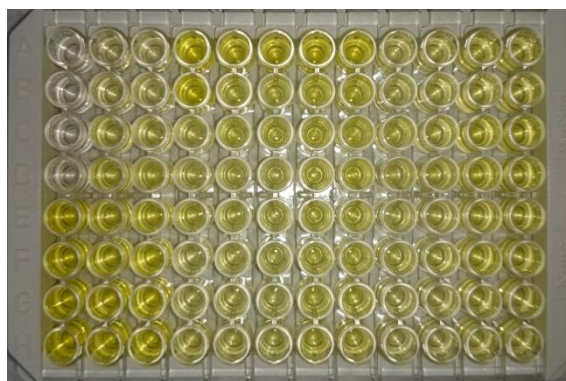
TABELA 7.1-suplement

Uproszczony schemat dodawania reagentów do poszczególnych dołków [1].

Próbówka, odczynnik Dołek	Bufor cEIA	BC(+inhibitor), S1-S8, IA2, C2	Znacznik	Antyserum
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 µl(etap rozwijania płytki)	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
B <sub>0</sub>	50 µl	-	50 µl	50 µl
BC (+inhibitor), S1-S8, IA2, C2	-	50 µl	50 µl	50 µl

Przykładowe oznakowanie dołków dla oznaczania aktywności jednej izoforny COX zaprezentowano na RYCINIE 7.2-suplement.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	BC1	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
B	Blk	S2	S2	BC1	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
C	NSB	S3	S3	BC1 +inhi Tazol	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
D	NSB	S4	S4	IA2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
E	B <sub>0</sub>	S5	S5	IA2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
F	B <sub>0</sub>	S6	S6	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
G	B <sub>0</sub>	S7	S7	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2
H	TA	S8	S8	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2	C2



RYCINA 7.2-suplement

Wzór oznakowania 96-dołkowej płytki do oznaczania aktywności inhibitorów COX oraz zdjęcie płytki po inkubacji z odczynnikiem Ellman'a [1].



## 6. Inkubacja płytki oraz pomiar absorpcji

### Etap inkubacji I (z reagentami):

1. Przykryto płytkę folią ochronną po wypełnieniu wszystkich dołków wymaganymi reagentami.
2. Wstawiono płytkę do wytrząsarki rotacyjnej, ustawiono szybkość obrotów na 250 / minutę.
3. Inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej, przez 18 godzin.

### Etap inkubacji II (z odczynnikiem Ellman'a):

1. Przygotowano roztwór odczynnika Ellman'a.  
W tym celu rozpuszczono jedną fiolkę *liofilizatu* w 20 ml *wody ultraczystej*.  
Uzyskany roztwór przechowywano w ciemności do momentu dodawania do dołków.
2. Wyjęto płytkę z wytrząsarki i usunięto folię ochronną.
3. Wstawiono płytkę do płuczki, opróżniono zawartość dołków i przemyto 5-krotnie za pomocą *buforu do przemywania płytki*.
4. Wyjęto płytkę z płuczki i naniesiono po 200  $\mu$ l *roztworu odczynnika Ellman'a* do każdego dołka.
5. Dodano po 5 $\mu$ l roztworu znacznika do każdego dołka TA.
6. Przykryto płytkę folią ochronną, wstawiono do wytrząsarki rotacyjnej i ustawiono szybkość obrotów na 250 / minutę.
7. Inkubowano w ciemności, w temperaturze pokojowej, przez 60-90 minut – w celu otrzymania barwnych, żółtych roztworów.
8. Wyjęto płytkę z wytrząsarki i usunięto folię ochronną.
9. Zmierzono absorpcję żółtego roztworu w każdym dołku za pomocą czytnika, przy długości fali 405 nm.

*Optymalna wartość absorpcji dla dołków  $B_0$  winna mieścić się w zakresie 0,3 – 0,8 (pomniejszona o wartość próby ślepej).*

*W przypadku wartości  $B_0 < 0,3$  – przedłużyć inkubację o kolejne 15 min lub do uzyskania wartości progowej 0,3.*

*W przypadku wartości  $B_0 > 1,5$  – przemyć płytkę ponownie 5 razy i powtórzyć etap rozwijania z nowym roztworem odczynnika Ellman'a.*

## 7. Obliczenia

### Obliczenia podstawowe:

1. Uśredniono wartości absorpcji dla dołków Blk.
2. Od wartości absorpcji każdego dołka odjęto średnią wartość Blk.
3. Uśredniono wartości absorpcji dla dołków NSB.

4. Uśredniono wartości absorbancji dla dołków  $B_0$ .
5. Od średniej wartości  $B_0$  odjęto średnią wartość NSB. Otrzymana wartość to skorygowane  $B_0$ .
6. Uśredniono wartości absorbancji dla dołków TA.
7. Od średniej wartości TA odjęto średnią wartość NSB i pomnożono przez 10. Otrzymana wartość to faktyczne TA.
8. Podzielono skorygowane  $B_0$  przez faktyczne TA i pomnożono przez 100%. Uzyskana wartość to faktyczny stopień wiązania się kompleksu znacznik-antyserum z mysim anti-króliczym przeciwciałem IgG na powierzchni dołka.

Obliczenia danych do krzywej wzorcowej:

Obliczono wartość  $B/B_0$  dla dołków S1-S8.

W tym celu od wartości S1 odjęto średnią wartość NSB i następnie uzyskany wynik podzielono przez skorygowane  $B_0$ .

Analogiczne obliczenia powtórzono dla pozostałych dołków S2-S8.

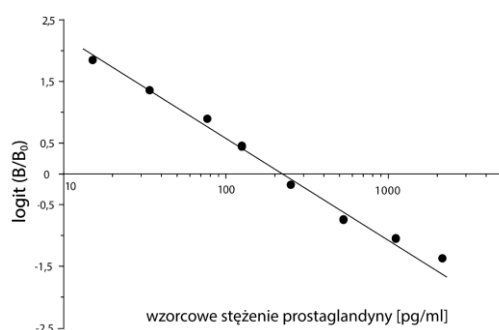
Wyznaczenie krzywej wzorcowej:

Wykreślono krzywą liniową opisującą zależność wartości  $\text{logit}(B/B_0)$  dla dołków S1-S8 od wzorcowych stężeń prostaglandyn S1-S8:

1. Dokonano transformacji logitowej wartości  $B/B_0$ :

$$\text{logit}(B/B_0) = \ln \frac{(B/B_0)}{[1 - (B/B_0)]}$$

2. Oś  $y$  przyjęło wartości  $\text{logit}(B/B_0)$  (skala liniowa), a oś  $x$  stanowiły wzorcowe stężenia prostaglandyny (skala logarytmiczna).
3. W oparciu o uzyskane wyniki wykreślono krzywą liniową w skali półlogarytmicznej na podstawie wzoru (WYKRES 7.1-suplement)



$$\text{logit}(B/B_0) = a * \ln(\text{stężenie PG}) + b$$
$$\text{logit}(B/B_0) = a * 2,303 * \log(\text{stężenie PG}) + b$$

WYKRES 7.1-suplement

Krzywa liniowa  $\text{logit}(B/B_0) = f[\log(\text{stężenie PG})]$  [1].

Obliczenia wyników dla próbek testowych C2, próbek IA2 oraz próbek tła (BC):

*BC*

1. Obliczono wartość  $B/B_0$  dla dołków BC.  
W tym celu od wartości BC odjąć średnią wartość NSB i następnie uzyskany wynik podzielić przez skorygowane  $B_0$ .
2. Wyznaczono stężenie prostaglandyn w próbce z inaktywowanym COX-1 lub COX-2 wykorzystując wykres i wzór krzywej liniowej  $\text{logit}(B/B_0) = f[\log(\text{stężenie PG})]$ .
3. Uzyskany wynik pomnożono przez krotność rozcieńczenia, czyli 100.

*BC + inhibitor*

1. Obliczono wartość  $B/B_0$  dla dołka BC + inhibitor – analogicznie jak dla BC.
2. Wyznaczono stężenie prostaglandyn w próbce z inaktywowanym COX-1 lub COX-2 – analogicznie jak dla BC.
3. Uzyskany wynik pomnożono przez krotność rozcieńczenia, czyli 100.  
*Badany związek uważa się za powodujący interferencję, jeśli uzyskany wynik jest >20% wyższy niż dla BC. W takim przypadku roztwór uzyskany w wyniku reakcji inhibitora z COX należy oczyścić i poddać ponownemu oznaczeniu metodą cEIA. Do tego celu można zastosować kartridże do ekstrakcji w fazie stałej oraz radioaktywnie znakowaną prostaglandynę (np. [<sup>3</sup>H]-PGE<sub>2</sub>) do oceny stopnia odzysku oczyszczonej próbki.*

*IA2*

1. Obliczono wartość  $B/B_0$  dla dołków IA2 – analogicznie jak dla BC.
2. Wyznaczono stężenie prostaglandyn w próbce z COX-1 lub COX-2 bez inhibitora – analogicznie jak dla BC.
3. Uzyskany wynik pomnożono przez krotność rozcieńczenia, czyli 2000.
4. Od otrzymanej wartości stężenia prostaglandyn odjęto wartość stężenia wyznaczoną dla BC. Otrzymany wynik to *stężenie PG powstałych w próbce bez inhibitora (PG<sub>100% aktywności COX</sub>)*.

*C2*

1. Obliczono wartość  $B/B_0$  dla dołków C2 – analogicznie jak dla BC.
2. Wyznaczono stężenie prostaglandyn powstałych podczas inkubacji inhibitora z COX-1 lub COX-2 – analogicznie jak dla BC.
3. Uzyskany wynik pomnożono przez krotność rozcieńczenia, czyli 2000.  
*Dla danej próbki testowej C2 różnica w wynikach uzyskanych dla dwóch dołków nie powinna być większa niż 10%. Jeśli wynosi >20% – reakcję z COX lub oznaczenie metodą cEIA należy powtórzyć.*

7. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI INHIBICYJNEJ POCHODNYCH *TRANS*-STILBENU I *TRANS*-STILBAZOLU  
WOBEC COX-1 I COX-2 W WARUNKACH IN VITRO (ETAP I ORAZ IV)

---

4. Od otrzymanej wartości stężenia prostaglandyn odjęto wartość stężenia wyznaczoną dla BC. Otrzymany wynik to *stężenie PG powstałych w próbówce z inhibitorem (PG<sub>inhibitor COX</sub>)*.
5. Wyznaczono stopień zahamowania aktywności COX-1 lub COX-2 przez określone stężenie badanego inhibitora na podstawie poniższego wzoru.

$$\text{zahamowanie aktywności COX [\%]} = \frac{\text{PG}_{100\% \text{ aktywności COX}} - \text{PG}_{\text{inhibitor COX}}}{\text{PG}_{100\% \text{ aktywności COX}}} * 100 \%$$

6. W przypadku analizy kilku stężeń inhibitora sporządzono tzw. krzywą sigmoidalną opisującą zależność *stopnia zahamowania aktywności COX* (oś y) od *zakresu stężeń badanego inhibitora* (oś x, skala półlogarytmiczna).

W oparciu o uzyskane wykresy wyznaczono wartości IC<sub>50</sub> badanego inhibitora wobec COX-1 lub COX-2.

## 9. Synteza pochodnych *trans*-stilbenu (ETAP III)

### 9.4. Potwierdzenie tożsamości i struktury zsyntezowanych związków

#### 9.4.1. Metody badań analitycznych

##### Elementarna analiza organiczna

*Oznaczanie procentowej zawartości węgla, wodoru i azotu (C, H i N) [2]*

1. Do wykonania oznaczenia wykorzystano mikronaważki (10-12 mg) badanych związków.
2. Odważoną próbkę umieszczono w analizatorze i poddano katalitycznemu spalaniu w rurze w temperaturze 1200°C.
3. W wyniku tego procesu powstały gazy (CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O), które rozdzielano na specjalnych kolumnach adsorpcyjnych i oznaczano kolejno za pomocą detektora przewodności cieplnej (TCD, *ang. thermal conductivity detector*).
4. Wynik zawartości C, H i N podano w procentach wagowych.

*Sprzęt:*

Do wykonania analizy wykorzystano następujące urządzenia:

- mikrowaga Sartorius M2P o zakresie 0,1 – 2000 mg (Sartorius AG, Niemcy);
- analizator elementarny Vario EL III (Elementar Analysensysteme GmbH, Niemcy).

##### Oznaczenie temperatury topnienia

1. Do wykonania oznaczenia wykorzystano mikronaważki (6-8 mg) badanych związków.
2. Odważoną próbkę umieszczono w 3 szklanych kapilarach i poddano ogrzewaniu w zakresie temperatur 50 – 250°C.
3. Zakres temperatury topnienia (początek i koniec) oceniano wizualnie.

*Sprzęt:*

Do wykonania analizy wykorzystano następujące urządzenia:

- mikrowaga Sartorius M2P o zakresie 0,1 – 2000 mg (Sartorius AG, Niemcy);
- aparat kapilarny do pomiaru zakresu temperatury topnienia Digi-Melt MPA160 (Stanford Research Systems, USA) [3].

##### Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) – wyznaczenie współczynnika R<sub>f</sub>

Analizę TLC wykonano stosując standardową metodologię [4; 5].

1. Do wykonania oznaczenia wykorzystano niewielkie naważki (15-20 mg) badanych związków.
2. Odważoną próbkę rozpuszczono w małej objętości (ok. 0,5 mL) rozpuszczalnika DMSO.

3. Następnie przy pomocy szklanej kapilary naniesiono roztwór związku na wcześniej przygotowaną szklaną płytkę chromatograficzną (żel krzemionkowy lub celuloza) lub na bibułę.
4. Płytkę lub bibułę osuszono i umieszczono w komorze zawierającej układ rozwijający.
5. Analizę prowadzono do momentu osiągnięcia linii końcowej przez czoło układu rozwijającego.
6. Następnie płytkę lub bibułę osuszono z pozostałości układu za pomocą suszarki.
7. Otrzymaną płytkę poddano wizualizacji w świetle lampy UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) i wyznaczono wartość współczynnika opóźnienia  $R_f$ .

$R_f = \text{odległość przebyta przez badany związek} / \text{odległość przebyta przez czoło układu rozwijającego}$

#### *Sprzęt:*

- szklana komora chromatograficzna z pokrywą (biostep, Niemcy);
- suszarka ręczna (Braun, Niemcy);
- urządzenia do obserwacji płytek do TLC, model CN-6 (Vilber Lourmat, Niemcy);
- przenośna lampa UV 254 nm, model VL-6.C (Vilber Lourmat, Niemcy);
- szklane płytki chromatograficzne:
  - pokryte żelem krzemionkowym z fluorescencją UV<sub>254</sub>, wymiary 10 x 10 cm, grubość warstwy 0,25 mm (SIL G-25 UV 254, Macherey-Nagel, Niemcy);
  - pokryte celulozą z fluorescencją UV<sub>254</sub>, wymiary 20 x 20 cm, grubość warstwy 0,25 mm (CEL 300-25 UV 254, Macherey-Nagel, Niemcy);
- bibuła chromatograficzna, wymiary 15 x 15 cm (3MM CHR, Whatman, Wielka Brytania)

#### *Odczynniki (układ rozwijający):*

- chloroform, cz.d.a., 98,5% (Avantor, Polska)
- metanol, cz.d.a., 99,8% (Avantor, Polska)
- n-butanol, cz.d.a., 99,5% (Avantor, Polska)
- kwas octowy, cz.d.a., 99,5% (Avantor, Polska)
- woda, HPLC grade,  $\leq 2 \mu\text{S/cm}$  (Avantor, Polska)

#### **Spektrometria mas (MS)**

Zsyntezowane związki poddano standardowej analizie MS, w której próbki poddano jonizacji metodą elektrorozpylania (ESI, ang. *Electrospray Ionization*) [6].

1. Do wykonania oznaczenia wykorzystano mikronażki (0,5-1 mg) badanych związków.
2. Odważoną próbkę rozpuszczono w małej objętości (ok. 8-10 mL) rozpuszczalnika, którym był metanol lub mieszanina metanol/woda 1:1 (v/v). W razie konieczności do roztworu dodawano 1% kwas mrówkowy.

3. Następnie za pomocą pompy strzykawkowej i stalowej kapilary wprowadzono roztwór związku do komory jonizacyjnej, w której cząsteczki ulegały jonizacji poprzez elektrorozpylanie (w wyniku zastosowania wysokiego napięcia i gazu rozpylającego).
4. Powstałe jony były suszone za pomocą gazu i przepuszczane przez separator stożkowy celem dalszej analizy.
5. Jony podlegały analizie za pomocą układu kwadrupol – analizator czasu przelotu jonów, a następnie były identyfikowane za pomocą detektorów.
6. Uzyskane widmo masowe było przetwarzane przy pomocy specjalistycznego oprogramowania komputerowego.

*Parametry analizy MS:*

- zakres analizowanych mas: 100 – 1000 m/z;
- szybkość nastrzyku pompy: 5  $\mu$ L/min;
- temperatura źródła jonów: 80°C;
- napięcie stalowej kapilary:
  - +3,0 kV (jonizacja dodatnia),
  - -2,7 kV (jonizacja ujemna);
- gaz rozpylający (nebulizacja): azot
  - szybkość przepływu: 100 L/h,
  - ciśnienie 20 psi;
- gaz suszący (desolwatacja): azot:
  - temperatura: 250°C,
  - ciśnienie: 50 psi,
  - szybkość przepływu podczas desolwatacji: 400 L/h,
  - szybkość przepływu przez stożek: 50 L/h;
- napięcie separatora stożkowego:
  - -30 V (jonizacja dodatnia),
  - +30 V (jonizacja ujemna);
- napięcie ekstraktora: 3 V;
- napięcie soczewek RF: 0,5 V.

*Sprzęt i oprogramowanie:*

- spektrometr mas z jonizacją typu ESI oraz kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu jonów (quadrupole-time of flight, Q-tof): Waters/Micromass Q-tof Premier mass spectrometer (Waters, Wielka Brytania);
- oprogramowanie do spektrometru mas: MassLynx V4.1(Waters, Wielka Brytania);
- pompa strzykawkowa: Pump 11 Elite Infusion Only Single Syringe (Harvard, Wielka Brytania).

*Odczynniki:*

- metanol, LC-MS Ultra Chromasolv,  $\geq 99,9\%$  (Sigma Aldrich, Niemcy);
- woda, LC-MS LiChrosolv,  $\geq 99,9\%$  (Merck Millipore, Niemcy);
- kwas mrówkowy, LC-MS Ultra,  $\geq 98,0\%$  (Sigma Aldrich, Niemcy);
- azot, LC-MS grade,  $\geq 99,999\%$  (Linde, Polska).

**Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)**

Otrzymane pochodne *trans*-stilbenu poddano badaniu NMR, uzyskując jednowymiarowe widma  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR [6].

1. Do wykonania oznaczenia wykorzystano niewielkie naważki (15-20 mg) badanych związków.
2. Odważoną próbkę rozpuszczono w małej objętości (ok. 1 mL) rozpuszczalnika, którym był deuterowany dimetylosulfotlenek (DMSO- $d_6$ ).
3. Do próbki dodano wzorzec wewnętrzny, którym był TMS (tetrametylosilan).
4. Następnie roztwór badanego związku przeniesiono do próbki kwarcowej, którą umieszczono w próbniku spektrometru NMR.
5. Probówkę opuszczono do środka magnesu i wykonano analizę względem wzorca.
6. Uzyskane widmo było przetwarzane przy pomocy specjalistycznego oprogramowania komputerowego.

*Parametry analizy NMR:* $^1\text{H}$  NMR:

- częstotliwość rezonansowa pola magnetycznego: 300 MHz lub 400 MHz;
- natężenie pola magnetycznego: 7,049 T lub 9,397 T;
- temperatura pomiaru: 25°C;
- zakres przesunięcia chemicznego  $\delta$ : 0 – 13ppm.

 $^{13}\text{C}$  NMR:

- częstotliwość rezonansowa pola magnetycznego: 75 MHz lub 101 MHz;
- natężenie pola magnetycznego: 7,049 T lub 9,397 T;
- temperatura pomiaru: 25°C;
- zakres przesunięcia chemicznego  $\delta$ : 0 – 220 ppm.

*Sprzęt i oprogramowanie:*

- dwukanałowy spektrometr NMR: VARIAN Mercury 300 MHz (Varian, USA), wyposażony w:
  - magnes nadprzewodzący Oxford 300 MHz ( $^1\text{H}$ ), 75 MHz ( $^{13}\text{C}$ );



- sonda szerokopasmowa BB  $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$  czterojądrowa  $f=5$  mm;
- układ chłodzący magnes: ciekły hel ( $-269^\circ\text{C}$ ) i ciekły azot ( $-196^\circ\text{C}$ );
- czterokanałowy spektrometr NMR: VARIAN VNMR-S 400 MHz (Varian, USA), wyposażony w:
  - magnes nadprzewodzący 400/54 Premium Shielded 400 MHz ( $^1\text{H}$ ), 100 MHz ( $^{13}\text{C}$ );
  - sondy szerokopasmowa BB  $^1\text{H}/^{19}\text{F}/^{13}\text{C}/^{31}\text{P}$  czterojądrowa  $f=5$  mm;
  - układ chłodzący magnes: ciekły hel ( $-269^\circ\text{C}$ ) i ciekły azot ( $-196^\circ\text{C}$ );
- komputer PC z oprogramowaniem ACD/NMR Processor Academic Edition – wersja 12.01

*Odczynniki:*

- DMSO- $d_6$  (dimethyl sulfoxide- $d_6$ ; 99,9 atom % D) (Sigma Aldrich, Niemcy);
- TMS (tetramethylsilane ACS reagent, NMR grade,  $\geq 99,9\%$ ) (Sigma Aldrich, Niemcy).

**Spektroskopia w podczerwieni (IR)**

Zsyntezowane związki poddano również klasycznej analizie spektralnej w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR) [6].

1. Do wykonania oznaczenia wykorzystano niewielkie naważki (1,2-1,3 mg) badanych związków zmieszanych ze 100 mg KBr.
2. Odważone składniki ucierano w moździerz agatowym i poddano pastylkowaniu w celu uzyskania pastylek o średnicy ok. 13 mm.
3. Następnie pastylki umieszczano w spektrometrze i wykonywano pomiar widma.
4. Uzyskane widmo było przetwarzane przy pomocy specjalistycznego oprogramowania komputerowego.

*Parametry analizy FT-IR:*

- zakres pomiarowy:  $4000\text{ cm}^{-1} - 400\text{ cm}^{-1}$ ;
- rozdzielczość:  $2\text{ cm}^{-1}$ ;
- temperatura:  $25^\circ\text{C}$ .

*Sprzęt i oprogramowanie:*

- spektrometr próżniowy FT-IR Bruker IFS 66v/S (Bruker Optics, Niemcy), wyposażony w:
  - pompę olejową Edwards 18,
  - źródło promieniowania: GLOBAR (pręt z węgliku krzemu),
  - detektor DTGS (deuterowany siarczan trójglicyny),
  - interferometr Michelsona z beamsplitterem KBr lub  $\text{CaF}_2$ ,
  - uchwyt do pastylek z KBr o średnicy 13mm;
- komputer PC z programem OPUS/IR – wersja 7.0;

- pastylkarka KBr 13 mm Maassen 54KB1300M (Maassen, Niemcy);
- moździerz agatowy.

*Odczynniki:*

- bromek potasu: Potassium bromide FT-IR grade,  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich, Niemcy).

## 11. Oznaczenie stopnia zahamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII)

### 11.3. Materiały, odczynniki, sprzęt i oprogramowanie

#### 11.3.2. Oznaczenie stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym

W celu oznaczenia poziomu PGE<sub>2</sub>, wytworzonej przez COX-2 obecną w komórkach MCF-7, wykorzystano gotowy zestaw *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express ELISA Kit* firmy Cayman Chemical Company, USA [7].

Zestaw ten składa się z następujących materiałów i odczynników:

#### a) materiały:

- antyserum – przeciwciało monoklonalne specyficzne dla prostaglandyny E<sub>2</sub> (ang. *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Monoclonal Antibody*), liofilizat;
- znacznik – prostaglandyna E<sub>2</sub> związana z acetylocholinoesterazą (ang. *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express AChE Tracer*), liofilizat:
  - koniugat PGE<sub>2</sub> z AChE wyizolowaną z narządu elektrycznego strętywy (łac. *Electrophorus electricus*);
- płytka 96-dółkowa pokryta kozim anty-mysim przeciwciałem IgG;
- folia do przykrycia płytki 96-dółkowej;

#### b) odczynniki:

- wzorzec PGE<sub>2</sub> w ilości 10 ng (ang. *Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Standard*), liofilizat;
- koncentrat buforu do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA (ang. *EIA Buffer Concentrate (10X)*), bezbarwna ciecz:
  - bufor fosforanowy 1 mol/l zawierający BSA 1%, chlorek sodu 4 mol/l, EDTA czterosodowa sól 10 mmol/l i azydek sodu 0,1%;
- koncentrat buforu do przemywania płytki (ang. *Wash Buffer Concentrate (400X)*), bezbarwna ciecz:
  - bufor fosforanowy 4 mol/l o pH 7,4;
- polisorbitat 20 (Tween 20), oleista, żółtawa ciecz;
- odczynnik Ellman'a (ang. *Ellman's Reagent*), liofilizat:
  - jodek acetylotiocholiny, kwas 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesowy, chlorek sodu, wodorofosforan potasu, diwodorofosforan potasu;
- barwnik do identyfikacji znacznika (ang. *EIA Tracer Dye*), czerwona ciecz;
- barwnik do identyfikacji antyserum (ang. *EIA Antiserum Dye*), niebieska ciecz.

## 11.4. Metodyka badania

### 11.4.2. Kompetycyjny test immunoenzymatyczny (cEIA)

#### 11.4.2.5 Procedura oznaczania stężenia prostaglandyny E<sub>2</sub> w supernatancie hodowlanym

##### 1. Przygotowanie wzorców, materiałów i odczynników do oznaczania zawartości prostaglandyny E<sub>2</sub>

*Bufor do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

*Bufor do przemywania płytki*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

*Antyserum specyficzne dla prostaglandyn*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

Dodatkowo do przygotowanego antyserum można dodać niebieski barwnik w ilości 60 µl (rozcieńczenie 1:100), co ułatwia identyfikację dołków, do których dodano antyserum.

*Znacznik – prostaglandyna E<sub>2</sub> związana z acetylocholinoesterazą*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

Dodatkowo do przygotowanego znacznika można dodać czerwony barwnik w ilości 60 µl (rozcieńczenie 1:100), co ułatwia identyfikację dołków, do których dodano znacznik.

*Zakres stężeń prostaglandyny E<sub>2</sub> do krzywej wzorcowej*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

##### 2. Przygotowanie 96-dółkowej płytki do inkubacji, nanoszenie odczynników do odpowiednich dołków

Pojęcia:

*Blank (Blk), Total Activity (TA), Non-Specific Binding (NSB), Maximum Binding (B<sub>0</sub>), Bound/Maximum Bound (B/B<sub>0</sub>)*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

Nanoszenie supernatantu, stężeń wzorcowych (S1-S8) i odczynników do dołków:

*Bufor do oznaczania zawartości prostaglandyn metodą cEIA*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

*Stężenia prostaglandyn do krzywej wzorcowej (S1-S8)*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

*Kontrola (supernatant bez inhibitora)*

Dodać po 50 µl roztworu do odpowiednich 24 dołków.

*Supernatant z inhibitorem (związek N1)*

Związek N1 6,25 µmol/l: dodać po 50 µl roztworu do odpowiednich 24 dołków.

Związek N1 12,5 µmol/l: dodać po 50 µl roztworu do odpowiednich 24 dołków.

*Znacznik – prostaglandyna E<sub>2</sub> związana z acetylocholinoesterazą*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

*Antyserum specyficzne dla prostaglandyny E<sub>2</sub>*

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

TABELA 11.1-suplement

Uproszczony schemat dodawania reagentów do poszczególnych dołków [7].

<b>Supernatant, odczynniki, kontrola</b>	<b>Bufor cEIA</b>	<b>S1-S8, kontrola, supernatant</b>	<b>Znacznik</b>	<b>Antyserum</b>
<b>Dolek</b>				
<b>Blk</b>	-	-	-	-
<b>TA</b>	-	-	5 µl (etap rozwijania płytki)	-
<b>NSB</b>	100 µl	-	50 µl	-
<b>B<sub>0</sub></b>	50 µl	-	50 µl	50 µl
<b>S1-S8, kontrola, supernatant</b>	-	50 µl	50 µl	50 µl

Przykładowe oznakowanie dołków dla oceny aktywności COX-2 zaprezentowano na RYCINIE 11.1-suplement.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B <sub>0</sub>	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B <sub>0</sub>	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B <sub>0</sub>	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Dołki 1-8: kontrola (supernatant bez związku **N1**)

Dołki 9-16: supernatant (związek **N1** 6,25 μmol/l)

Dołki 17-24: supernatant (związek **N1** 12,5 μmol/l)

#### RYCINA 11.1-suplement

Wzór 96-dołkowej płytki do oznaczania stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym [7].

### 3. Inkubacja płytki i pomiar absorbancji

#### Etap inkubacji I (z reagentami)

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

Czas inkubacji: 60 minut.

#### Etap inkubacji II (z odczynnikiem Ellman'a):

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

### 4. Obliczenia

#### Obliczenia podstawowe:

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

#### Obliczenia danych do krzywej wzorcowej:

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

#### Wyznaczenie krzywej wzorcowej:

Patrz ROZDZIAŁ 7.4.1.4 – SUPLEMENT.

#### Obliczenia wyników dla kontroli oraz supernatantu z inhibitorem:

##### *Wartość B/B<sub>0</sub>*

1. W tym celu od uzyskanych wartości absorbancji (skorygowanych wartością próby ślepej *Blk*) odejmowano średnią wartość NSB i następnie uzyskany wynik podzielono przez skorygowane B<sub>0</sub>.
2. Odczytano stężenie prostaglandyny E<sub>2</sub> w kontroli oraz supernatancie z inhibitorem, wykorzystując wykres i wzór krzywej liniowej  $\text{logit}(B/B_0) = f[\text{log}(\text{stężenie PGE}_2)]$ .
4. Wyznaczono średnie stężenie prostaglandyny E<sub>2</sub> w kontroli (PGE<sub>2</sub> kontrola) oraz supernatancie z określonym stężeniem inhibitora (PGE<sub>2</sub> supernatant).

5. Wyznaczono stopień zahamowania aktywności COX-2 w komórkach MCF-7 przez określone stężenie badanego inhibitora (związek nr **N1**) względem kontroli – na podstawie poniższego wzoru:

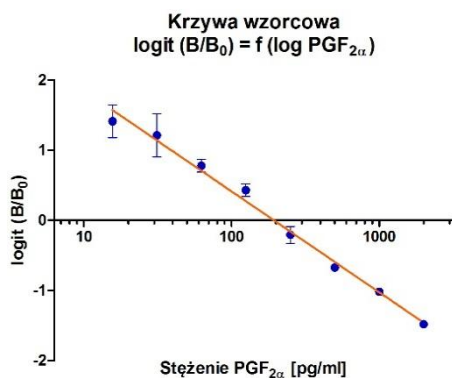
$$\text{zahamowanie aktywności COX-2 [\%]} = \frac{\text{PGE}_2 \text{ kontrola} - \text{PGE}_2 \text{ supernatant}}{\text{PGE}_2 \text{ kontrola}} * 100 \%$$

## 12. Wyniki

### 12.1. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej pochodnych *trans*-stilbenu i *trans*-stilbazolu wobec COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro* (ETAP I)

#### 12.1.1. Badanie przesiewowe

#### Wykresy i parametry krzywych wzorcowych



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,44 (\pm 0,15) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,29 (\pm 0,35)$$

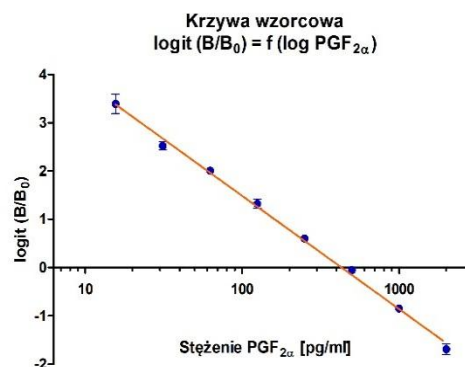
$$R^2 = 0,9692 \quad R = 0,9845$$

$$B/B_{0(20)} = 1778,28 \text{ pg/ml} (1467,23; 2249,52)$$

$$B/B_{0(50)} = 193,20 \text{ pg/ml} (153,63; 243,89)$$

$$B/B_{0(80)} = 21,04 \text{ pg/ml} (16,07; 26,21)$$

A



$$\text{logit}(B/B_0) = -2,35 (\pm 0,11) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 6,18 (\pm 0,26)$$

$$R^2 = 0,9931 \quad R = 0,9965$$

$$B/B_{0(20)} = 1678,80 \text{ pg/ml} (1530,85; 1855,35)$$

$$B/B_{0(50)} = 430,53 \text{ pg/ml} (384,23; 484,06)$$

$$B/B_{0(80)} = 110,41 \text{ pg/ml} (106,56; 114,05)$$

B

#### WYKRES 12.1-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ :

badanie przesiewowe związków nr Z1 – Z16 w reakcji z COX-1 → wykres A

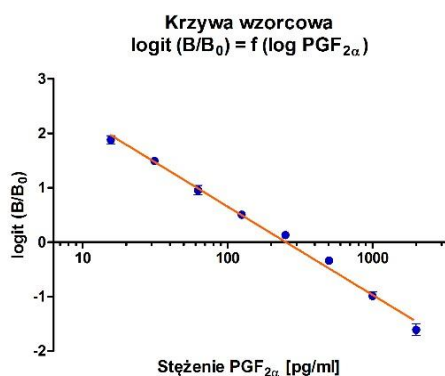
badanie przesiewowe związków nr Z17 – Z25 w reakcji z COX-1 → wykres B

$B/B_{0(20)}$  – stężenie  $\text{PGF}_{2\alpha}$  przy 20% wartości  $B/B_0$

$B/B_{0(50)}$  – stężenie  $\text{PGF}_{2\alpha}$  przy 50% wartości  $B/B_0$

$B/B_{0(80)}$  – stężenie  $\text{PGF}_{2\alpha}$  przy 80% wartości  $B/B_0$





$$\text{logit}(B/B_0) = -1,63 (\pm 0,09) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,91 (\pm 0,23)$$

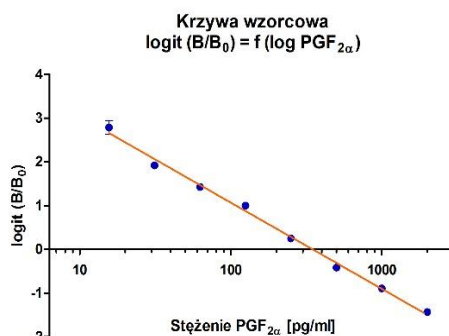
$$R^2 = 0,9895 \quad R = 0,9947$$

$$B/B_0(20) = 1807,17 \text{ pg/ml} (1607,07; 2058,65)$$

$$B/B_0(50) = 253,51 \text{ pg/ml} (221,67; 290,13)$$

$$B/B_0(80) = 35,56 \text{ pg/ml} (31,65; 39,37)$$

A



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,98 (\pm 0,10) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 5,01 (\pm 0,22)$$

$$R^2 = 0,9930 \quad R = 0,9965$$

$$B/B_0(20) = 1761,98 \text{ pg/ml} (1602,01; 1954,05)$$

$$B/B_0(50) = 349,14 \text{ pg/ml} (312,03; 391,11)$$

$$B/B_0(80) = 69,02 \text{ pg/ml} (65,09; 72,92)$$

B

## WYKRES 12.2-suplement

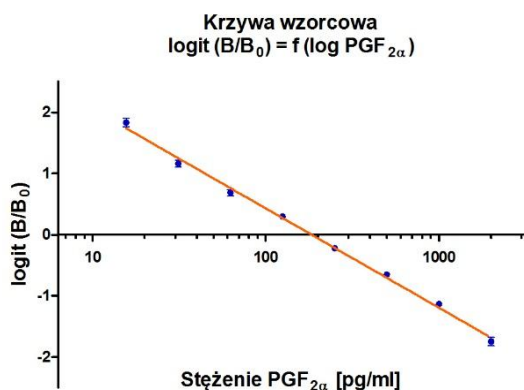
Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ :

badanie przesiewowe związków nr Z1 – Z16 w reakcji z COX-2 → wykres A

badanie przesiewowe związków nr Z17 – Z25 w reakcji z COX-2 → wykres B

## 12.1.2. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków Z5, Z9 i Z11

## Wykresy i parametry krzywych wzorcowych



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,62 (\pm 0,08) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,68 (\pm 0,16)$$

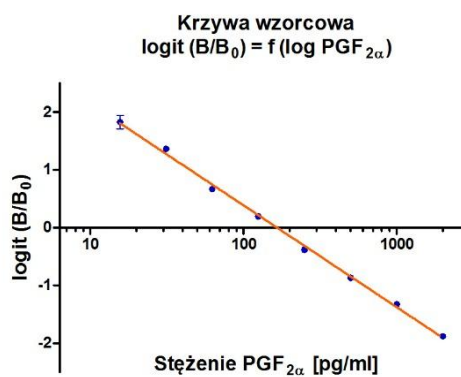
$$R^2 = 0,9947 \quad R = 0,9973$$

$$B/B_0(20) = 1312,20 \text{ pg/ml} (1176,49; 1447,91)$$

$$B/B_0(50) = 183,65 \text{ pg/ml} (175,47; 191,83)$$

$$B/B_0(80) = 25,76 \text{ pg/ml} (23,73; 27,79)$$

A



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,76 (\pm 0,06) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,91 (\pm 0,15)$$

$$R^2 = 0,9963 \quad R = 0,9981$$

$$B/B_0(20) = 1011,58 \text{ pg/ml} (972,44; 1050,72)$$

$$B/B_0(50) = 165,58 \text{ pg/ml} (158,04; 173,12)$$

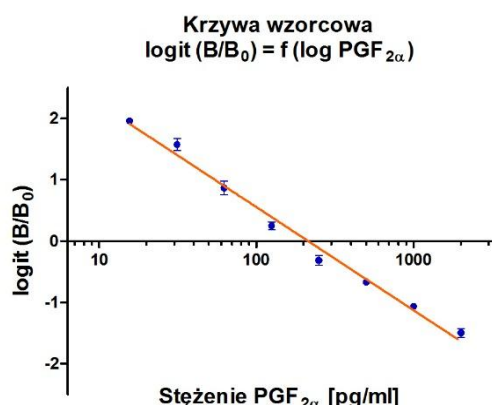
$$B/B_0(80) = 27,04 \text{ pg/ml} (24,62; 29,46)$$

B

## WYKRES 12.3-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku Z5 z COX-1.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2



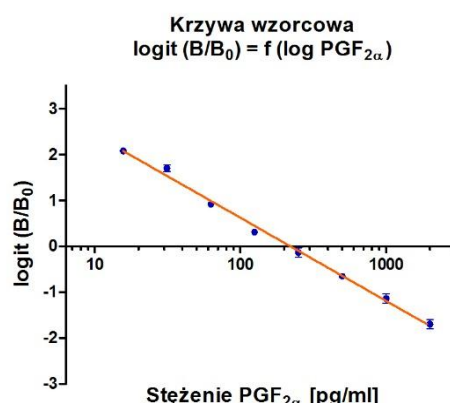
$$\text{logit}(B/B_0) = -1,68 (\pm 0,11) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,92 (\pm 0,26)$$

$$R^2 = 0,9873 \quad R = 0,9936$$

$$B/B_{0(20)} = 1419,05 \text{ pg/ml} (1286,76; 1551,34)$$

$$B/B_{0(50)} = 213,30 \text{ pg/ml} (200,24; 226,36)$$

A  $B/B_{0(80)} = 32,06 \text{ pg/ml} (27,74; 36,38)$



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,81 (\pm 0,07) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 4,24 (\pm 0,20)$$

$$R^2 = 0,9937 \quad R = 0,9968$$

$$B/B_{0(20)} = 1276,46 \text{ pg/ml} (1209,31; 1343,61)$$

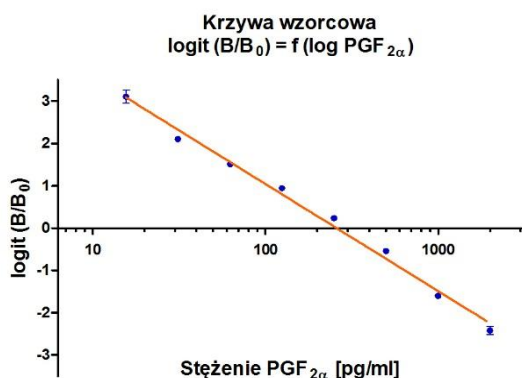
$$B/B_{0(50)} = 219,79 \text{ pg/ml} (211,12; 228,46)$$

B  $B/B_{0(80)} = 37,67 \text{ pg/ml} (34,05; 41,29)$

#### WYKRES 12.4-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku **Z5** z **COX-2**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2



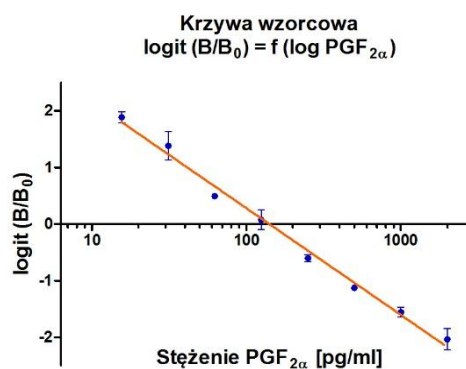
$$\text{logit}(B/B_0) = -2,53 (\pm 0,14) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 6,11 (\pm 0,34)$$

$$R^2 = 0,9904 \quad R = 0,9952$$

$$B/B_{0(20)} = 909,91 \text{ pg/ml} (860,66; 959,16)$$

$$B/B_{0(50)} = 258,27 \text{ pg/ml} (250,09; 266,45)$$

A  $B/B_{0(80)} = 73,28 \text{ pg/ml} (68,66; 77,90)$



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,88 (\pm 0,15) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 4,05 (\pm 0,35)$$

$$R^2 = 0,9816 \quad R = 0,9908$$

$$B/B_{0(20)} = 763,84 \text{ pg/ml} (708,34; 819,34)$$

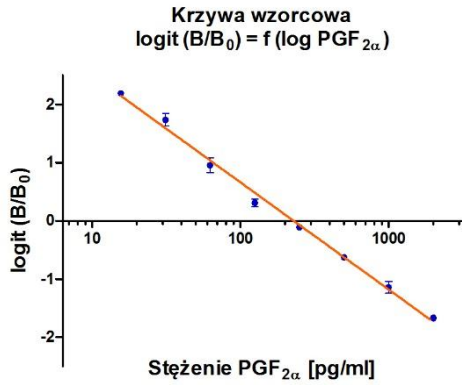
$$B/B_{0(50)} = 140,60 \text{ pg/ml} (134,14; 147,06)$$

B  $B/B_{0(80)} = 25,88 \text{ pg/ml} (21,86; 29,90)$

#### WYKRES 12.5-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związków **Z9** i **Z11** z **COX-1**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2



$$\text{logit (B/B}_0\text{)} = -1,84 (\pm 0,09) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 4,35 (\pm 0,20)$$

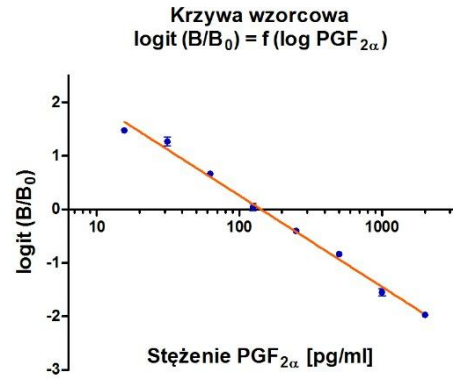
$$R^2 = 0,9931 \quad R = 0,9965$$

$$B/B_{0(20)} = 1291,22 \text{ pg/ml (1219,26; 1363,18)}$$

$$B/B_{0(50)} = 228,60 \text{ pg/ml (224,78; 232,42)}$$

$$B/B_{0(80)} = 40,36 \text{ pg/ml (37,13; 43,59)}$$

A



$$\text{logit (B/B}_0\text{)} = -1,71 (\pm 0,08) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,67 (\pm 0,18)$$

$$R^2 = 0,9924 \quad R = 0,9962$$

$$B/B_{0(20)} = 920,45 \text{ pg/ml (841,67; 999,23)}$$

$$B/B_{0(50)} = 141,91 \text{ pg/ml (137,39; 146,43)}$$

$$B/B_{0(80)} = 21,83 \text{ pg/ml (19,86; 23,80)}$$

B

### WYKRES 12.6-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit (B/B}_0\text{)} = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związków **Z9** i **Z11** z **COX-2**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2

**12.2. Analiza 2D QSAR (ETAP II)****12.2.1. Prosta regresja liniowa (SLR)****12.2.2. Wieloraka regresja liniowa (MLR)****Test istotności statystycznej współczynnika korelacji liniowej**

1. Należy sformułować hipotezę zerową ( $H_0$ ) oraz alternatywną ( $H_1$ ), która powinna sugerować, że w populacji korelacja między obu cechami jest większa od zera.

$$H_0: r = 0; H_1: r > 0$$

2. Obliczyć statystykę testową dla postawionej hipotezy zerowej.
3. Przyjmując poziom istotności  $\alpha < 0,05$  i ustalając ilość stopni swobody – należy odnaleźć wartość krytyczną ( $t_{kr}$ ) dla obliczonej statystyki testowej.
4. Obliczyć wartość parametru  $t$  korzystając z poniższego wzoru i porównać z wartością  $t_{kr}$

$$t = R \sqrt{\frac{n-2}{1-R^2}}$$

gdzie:

$n$  – ilość pomiarów

$R$  – współczynnik korelacji

5. W przypadku, gdy  $t > t_{kr} \rightarrow$  należy odrzucić hipotezę zerową, co oznacza że współczynnik korelacji różni się od zera w sposób istotny statystycznie.

### 12.3. Synteza pochodnych *trans*-stilbenu (ETAP III)

#### 12.3.1. Wyniki badań tożsamości i struktury

##### 12.3.1.1. Produkt pośredni dla związku nr Z5: 4-chloro-4'-hydrokso-*trans*-stilben

Elementarna analiza pierwiastków:

C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>OCl – masa molowa: 230,58 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 72,91 %

H = 4,80 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 72,62 %

H = 4,61 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

183 – 185°C

TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelem krzemionkowym

Faza ruchoma – CHCl<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH 50:1 (v/v)

Współczynnik opóźnienia R<sub>f</sub> = 0,51

MS:

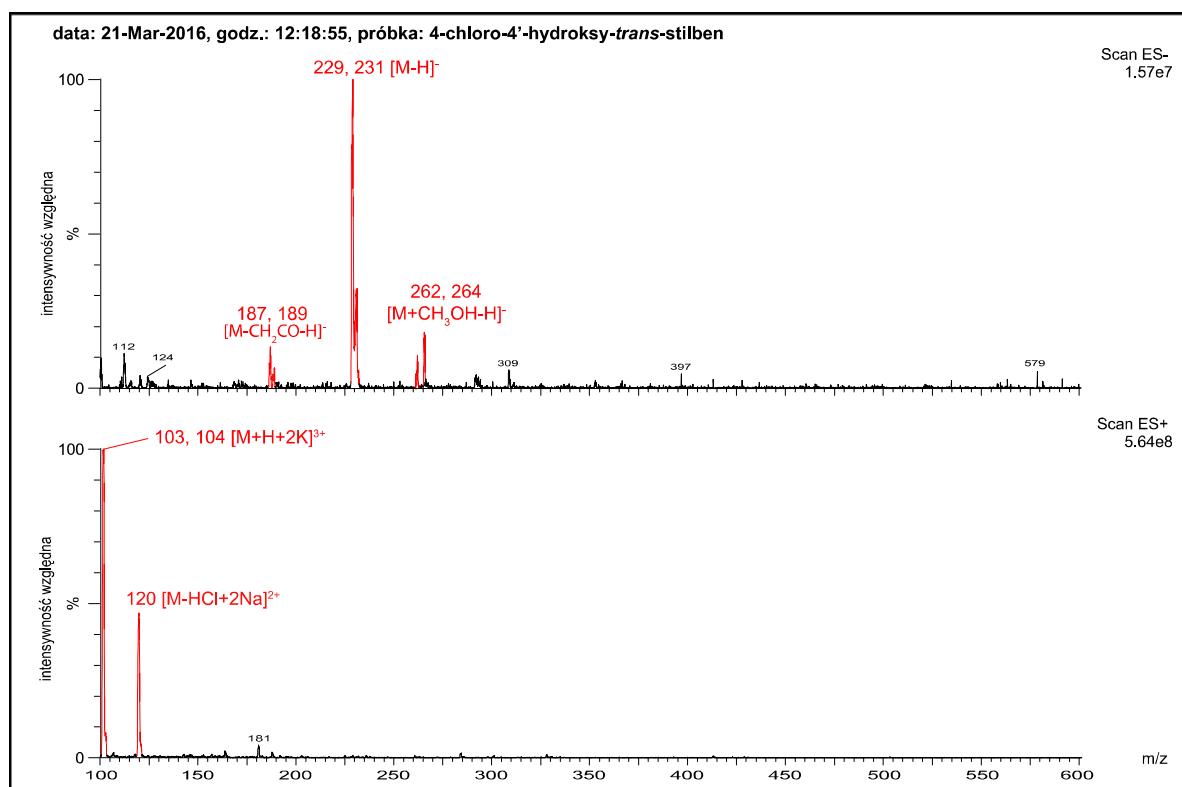
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.1-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 103 i 104 m/z [M+H+2K]<sup>3+</sup> – pik główny
- 120 m/z [M-HCl+2Na]<sup>2+</sup>

b) jonizacja ujemna:

- 187 i 189 m/z [M-CH<sub>2</sub>CO-H]<sup>-</sup>
- 229 i 231 m/z [M-H]<sup>-</sup> – pik główny
- 262 i 264 m/z [M+CH<sub>3</sub>OH-H]<sup>-</sup>



RYCINA 12.1-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-chloro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu. $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR:

Badanie  $^1\text{H}$  NMR przeprowadzono z zastosowaniem częstotliwości rezonansowej 400 MHz, natomiast  $^{13}\text{C}$  NMR przy częstotliwości 101 MHz.

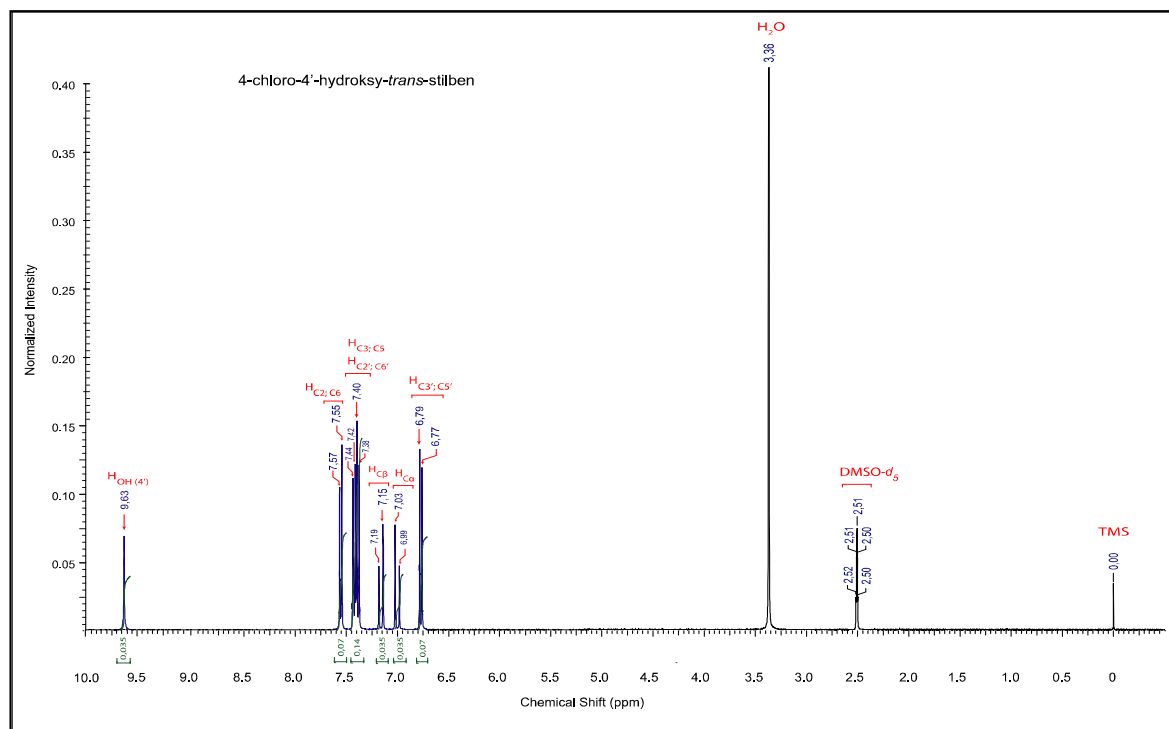
Wyniki analizy wraz z przyporządkowaniem atomów wodoru i węgla do poszczególnych sygnałów zaprezentowano w TABELI 12.1-suplement oraz na RYCINACH 12.2-3-suplement.

TABELA 12.1-suplement

Charakterystyka widm  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-chloro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu.

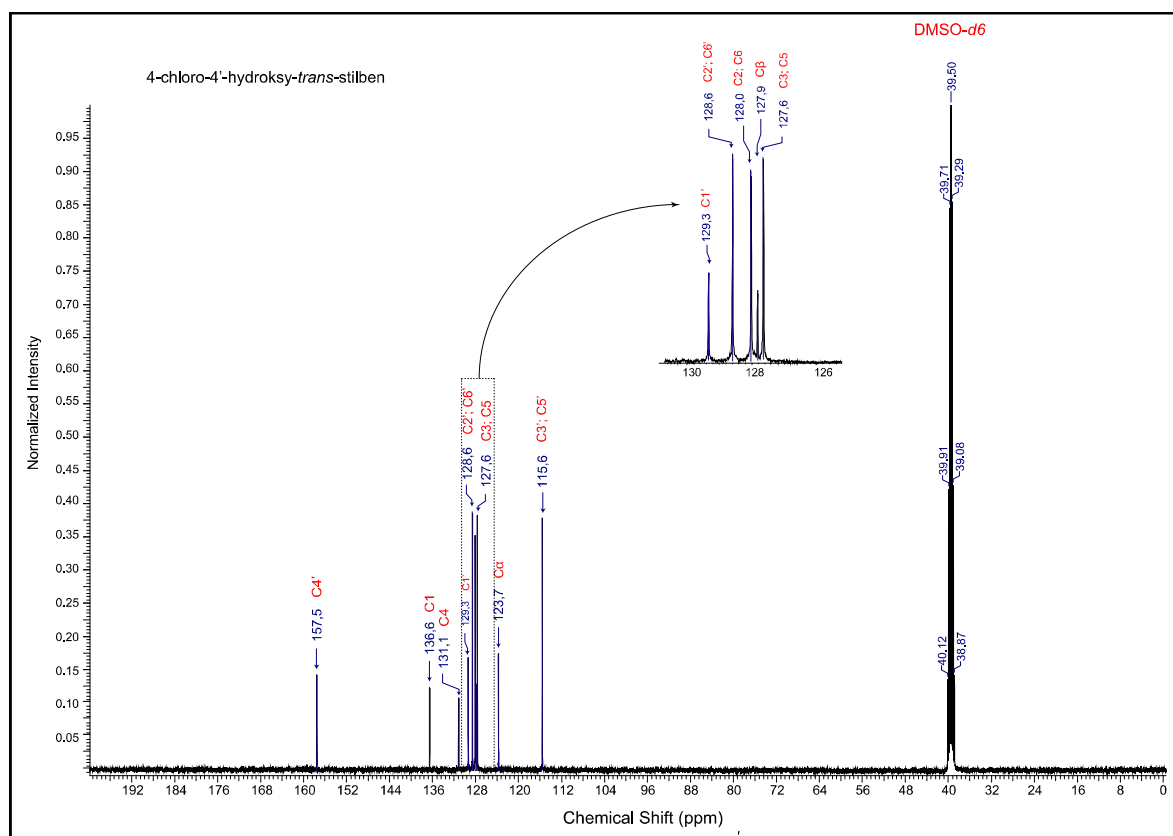
Nr atomu	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
$\alpha$	6,99; 7,03 (doublet, $J = 16,4$ Hz, 2H)	123,7
$\beta$	7,15; 7,19 (doublet, $J = 16,6$ Hz, 2H)	127,9
1	-	136,6
2	7,55; 7,57 (doublet, $J = 8,7$ Hz, 2H)	128,0
3	7,42 - 7,44 (2 x doublet, $J = 8,5$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 4H)	127,6
4	-	131,1
5	7,42 - 7,44 (2 x doublet, $J = 8,5$ Hz, $J = 8,6$ Hz, 4H)	127,6
6	7,55; 7,57 (doublet, $J = 8,7$ Hz, 2H)	128,0

1'	-	129,3
2'	7,42 - 7,44 (2 x dublet, J = 8,5Hz, J = 8,6 Hz, 4H)	128,6
3'	6,77; 6,79 (dublet, J = 8,4 Hz, 2H)	115,6
4'	-	157,5
5'	6,77; 6,79 (dublet, J = 8,4 Hz, 2H)	115,6
6'	7,42 - 7,44 (2 x dublet, J = 8,5Hz, J = 8,6 Hz, 4H)	128,6
OH (4')	9,63 (singlet, 1H)	-



RYCINA 12.2-suplement

Widmo <sup>1</sup>H NMR dla 4-chloro-4'-hydroksy-*trans*-stilbenu.



RYCINA 12.3-suplement

Widmo <sup>13</sup>C NMR dla 4-chloro-4'-hydroxy-*trans*-stilbenu.

### 12.3.1.2. Produkt pośredni dla związków nr Z9 i Z11: 4-nitro-4'-hydroxy-*trans*-stilben

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C, H i N; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS, <sup>1</sup>H NMR oraz <sup>13</sup>C NMR.

Elementarna analiza pierwiastków:

C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> – masa molowa: 241,24 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 69,70 %

H = 4,60 %

N = 5,81 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 69,77 %

H = 4,84 %

N = 5,57 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

211 – 215°C



TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelem krzemionkowym

Faza ruchoma –  $\text{CHCl}_3$ Współczynnik opóźnienia  $R_f = 0,11$ MS:

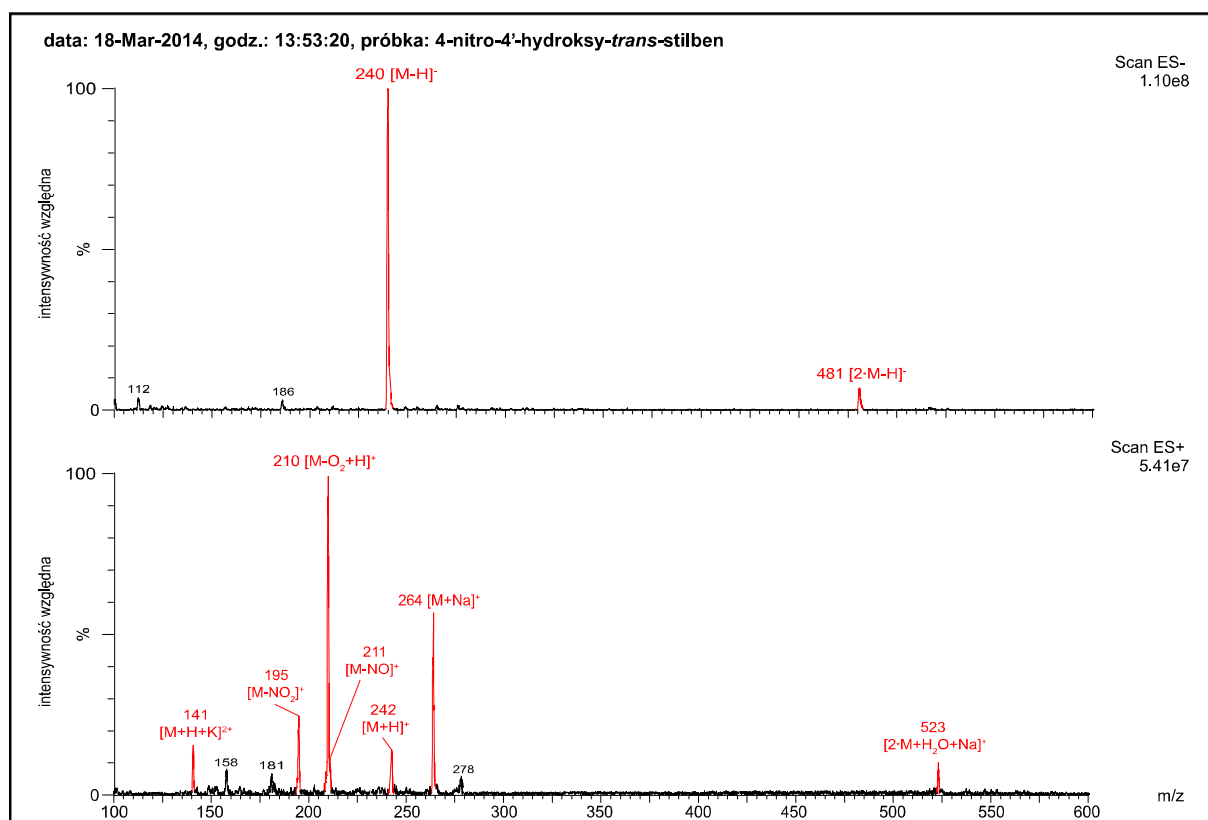
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.4-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 141 m/z  $[\text{M}+\text{H}+\text{K}]^{2+}$
- 195 m/z  $[\text{M}-\text{NO}_2]^+$
- 210 m/z  $[\text{M}-\text{O}_2+\text{H}]^+$  – pik główny
- 211 m/z  $[\text{M}-\text{NO}]^+$
- 242 m/z  $[\text{M}+\text{H}]^+$
- 264 m/z  $[\text{M}+\text{Na}]^+$
- 523 m/z  $[2*\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$

b) jonizacja ujemna:

- 240 m/z  $[\text{M}-\text{H}]^-$  – pik główny
- 481 m/z  $[2*\text{M}-\text{H}]^-$



RYCINA 12.4-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-nitro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu.

$^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR:

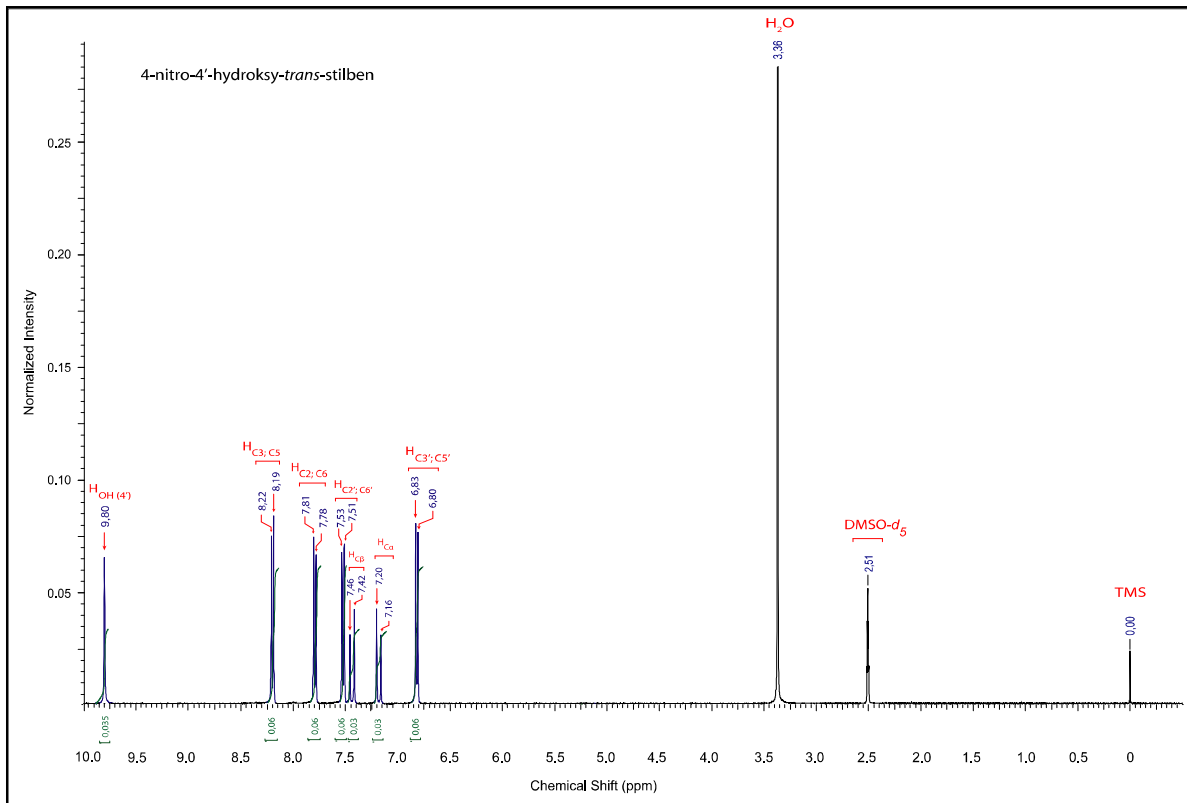
Badanie  $^1\text{H}$  NMR przeprowadzono z zastosowaniem częstotliwości rezonansowej 400 MHz, natomiast  $^{13}\text{C}$  NMR przy częstotliwości 101 MHz.

Wyniki analizy wraz z przyporządkowaniem atomów wodoru i węgla do poszczególnych sygnałów zaprezentowano w TABELI 12.2-suplement oraz na RYCINACH 12.5-6-suplement.

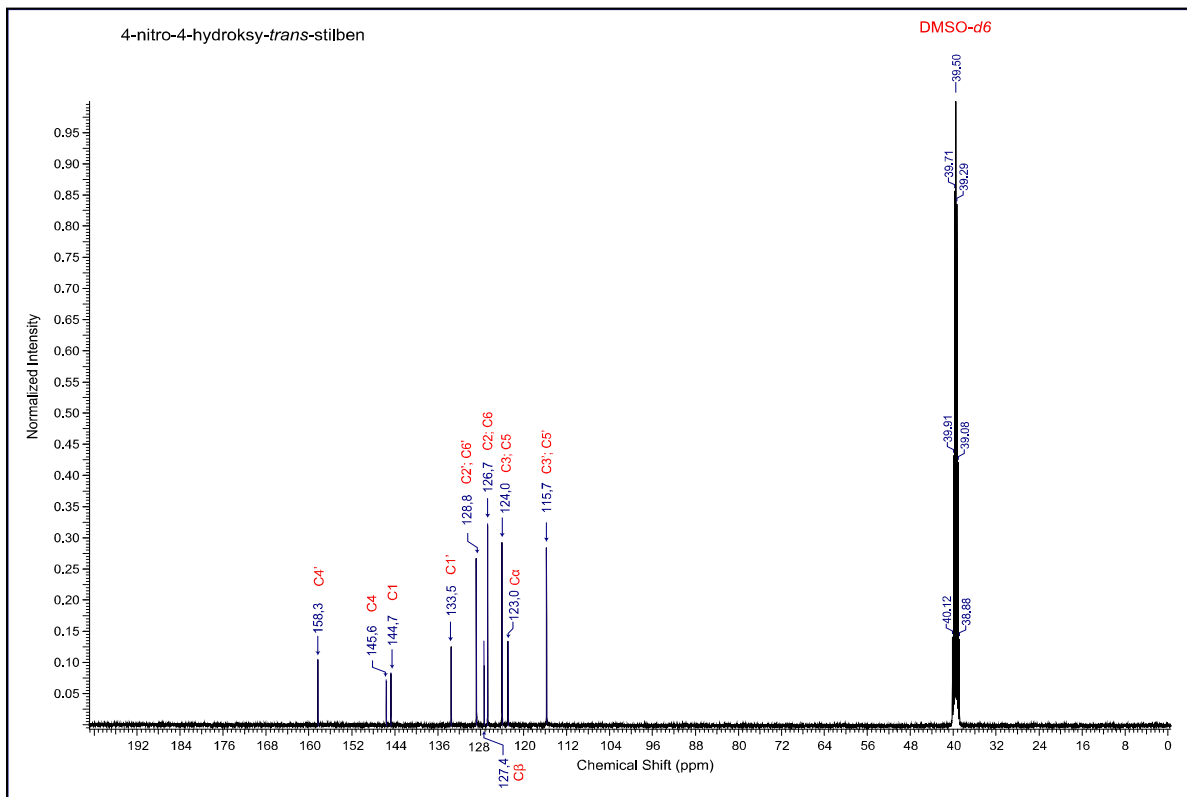
## TABELA 12.2-suplement

Charakterystyka widm  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-4'-hydrokso-*trans*-stilbenu.

Nr atomu	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
$\alpha$	7,16; 7,20 (doublet, $J = 16,4$ Hz, 2H)	123,0
$\beta$	7,42; 7,46 (doublet, $J = 16,4$ Hz, 2H)	127,4
1	-	144,7
2	7,78; 7,81 (doublet, $J = 8,9$ Hz, 2H)	126,7
3	8,19; 8,22 (doublet, $J = 8,8$ Hz, 2H)	124,0
4	-	145,6
5	8,19; 8,22 (doublet, $J = 8,8$ Hz, 2H)	124,0
6	7,78; 7,81 (doublet, $J = 8,9$ Hz, 2H)	126,7
1'	-	133,5
2'	7,51; 7,53 (doublet, $J = 8,6$ Hz, 2H)	128,8
3'	6,80; 6,83 (doublet, $J = 8,6$ Hz, 2H)	115,7
4'	-	158,3
5'	6,80; 6,83 (doublet, $J = 8,6$ Hz, 2H)	115,7
6'	7,51; 7,53 (doublet, $J = 8,6$ Hz, 2H)	128,8
OH (4')	9,80 (singlet, 1H)	-



RYCINA 12.5-suplement

Widmo <sup>1</sup>H NMR dla 4-nitro-4'-hydrokxy-*trans*-stilbenu.

RYCINA 12.6-suplement

Widmo <sup>13</sup>C NMR dla 4-nitro-4'-hydrokxy-*trans*-stilbenu.

**12.3.1.3. Związek nr Z5: 4-chloro-4'-karboksymetyloktoksy-*trans*-stilben**

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C i H; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS oraz IR.

Elementarna analiza pierwiastków

C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>Cl – masa molowa: 302,75 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 67,44 %

H = 4,99 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 67,35 %

H = 4,70 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

158 – 159°C

TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelalem krzemionkowym

Faza ruchoma – CHCl<sub>3</sub>

Współczynnik opóźnienia R<sub>f</sub> = 0,80

MS:

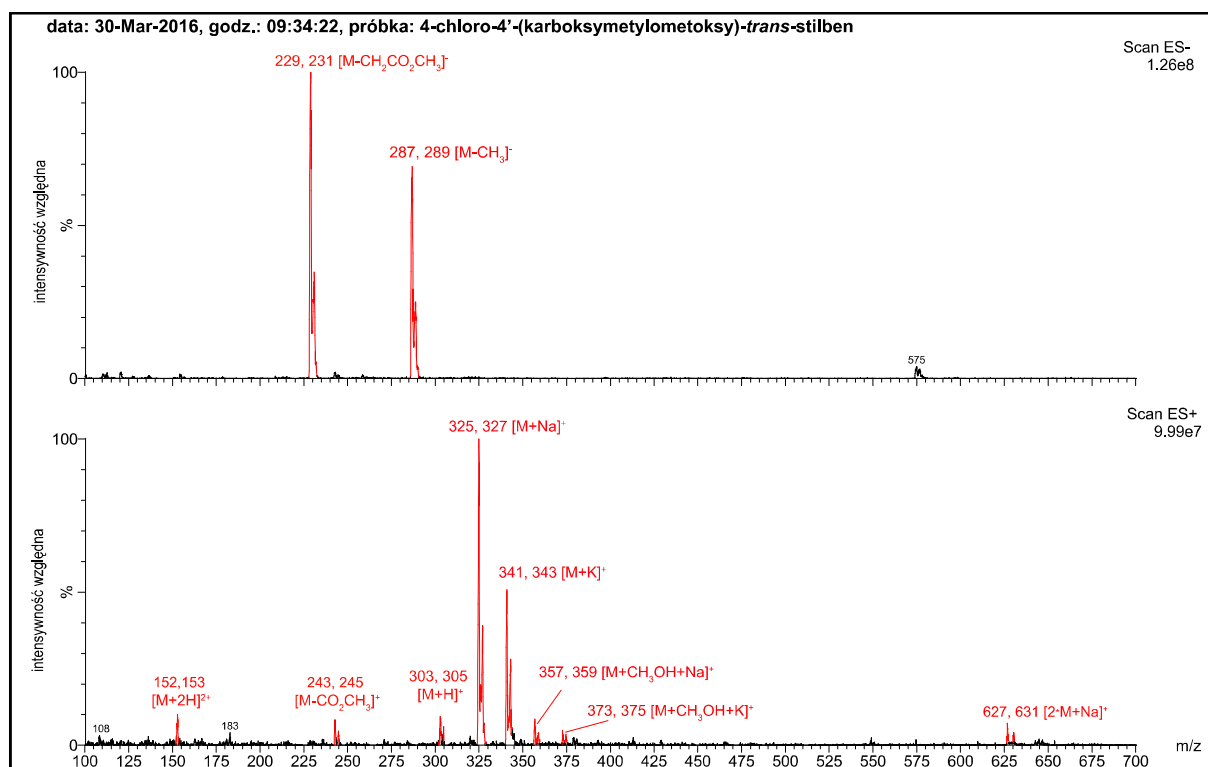
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.7-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 152, 153 m/z [M+2H]<sup>2+</sup>
- 243, 245 m/z [M-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>
- 303, 305 m/z [M+H]<sup>+</sup>
- 325, 327 m/z [M+Na]<sup>+</sup> – pik główny
- 341, 343 m/z [M+K]<sup>+</sup>
- 357, 359 m/z [M+CH<sub>3</sub>OH+Na]<sup>+</sup>
- 373, 375 m/z [M+CH<sub>3</sub>OH+K]<sup>+</sup>
- 627, 631 m/z [2\*M+Na]<sup>+</sup>

b) jonizacja ujemna:

- 229, 231 m/z [M-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> – pik główny
- 287, 289 m/z [M-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>



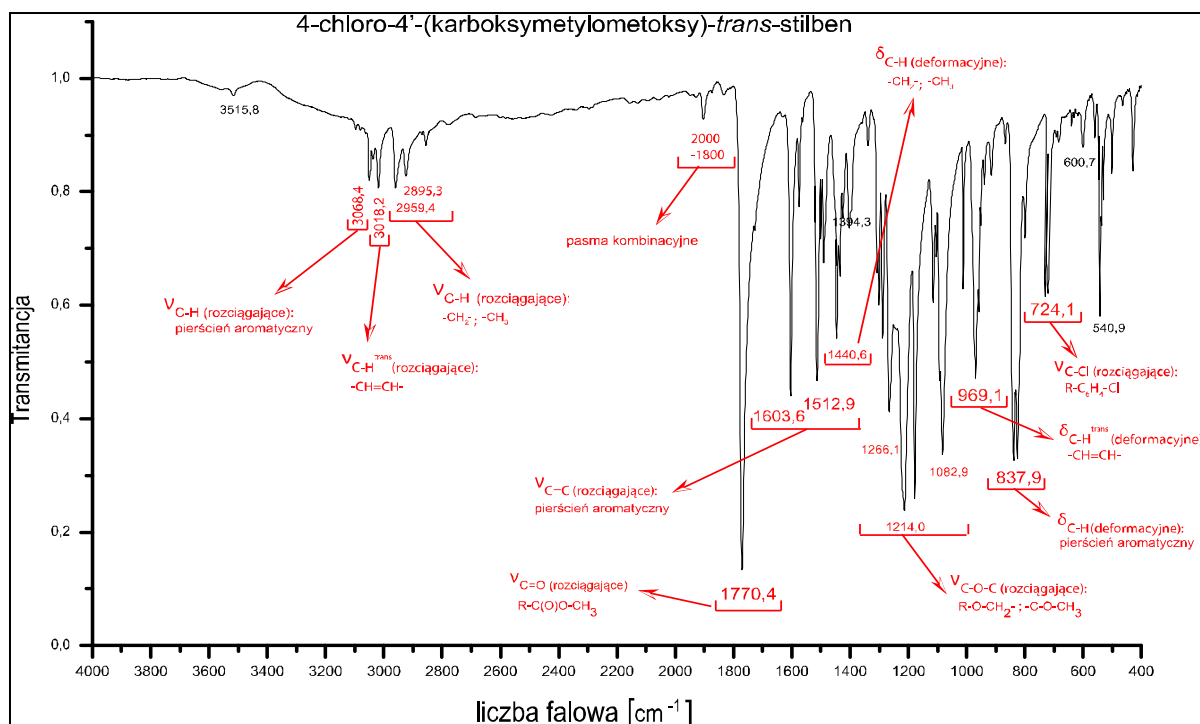
## RYCINA 12.7-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-chloro-4'-karboksymetyloktoksy-*trans*-stilbenu.

IR

Podczas analizy widma IR stwierdzono występowanie kilku charakterystycznych oddziaływań (RYCINA 12.8-suplement i TABELA 12.3-suplement):

- drgania rozciągające wiązania C-H w mostku etylenowym, pierścieniu aromatycznym oraz podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=O w podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 1770  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym – ok. 1600 – 1500  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C-O-C w podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 1300 – 1000  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w mostku etylenowym – ok. 950  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym – ok. 840  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-Cl – ok. 720  $\text{cm}^{-1}$ .



RYCINA 12.8-suplement

Widmo IR dla 4-chloro-4'-karboksymetyloetoksy-*trans*-stilbenu.

TABELA 12.3-suplement

Charakterystyka widma IR dla 4-chloro-4'-karboksymetyloetoksy-*trans*-stilbenu.

Liczba falowa [cm <sup>-1</sup> ]	Rodzaj drgań
3068,4	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
3018,2	$\nu_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): -CH=CH-
2959,4; 2895,3	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): -CH <sub>2</sub> -; -CH <sub>3</sub>
2000 – 1800	pasma kombinacyjne
1770,4	$\nu_{\text{C=O}}$ (rozciągające): -R-C(O)O-CH <sub>3</sub>
1603,6; 1512,9	$\nu_{\text{C=C}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
1440,6	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): -CH <sub>2</sub> -; -CH <sub>3</sub>
1266,1 – 1082,9	$\nu_{\text{C-O-C}}$ (rozciągające): R-O-CH <sub>2</sub> -; -C-O-CH <sub>3</sub>
969,1	$\delta_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (deformacyjne): -CH=CH-
837,9	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): pierścień aromatyczny
724,1	$\nu_{\text{C-Cl}}$ (rozciągające): R-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -Cl

#### 12.3.1.4. Związek nr Z9: 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilben

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C, H i N; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS oraz IR.

Elementarna analiza pierwiastków:

C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub> – masa molowa: 269,29 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 71,29 %

H = 5,57 %

N = 5,20 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 71,18 %

H = 5,84 %

N = 5,06 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

145 – 147°C

TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelem krzemionkowym

Faza ruchoma – CHCl<sub>3</sub>

Współczynnik opóźnienia R<sub>f</sub> = 0,74

MS:

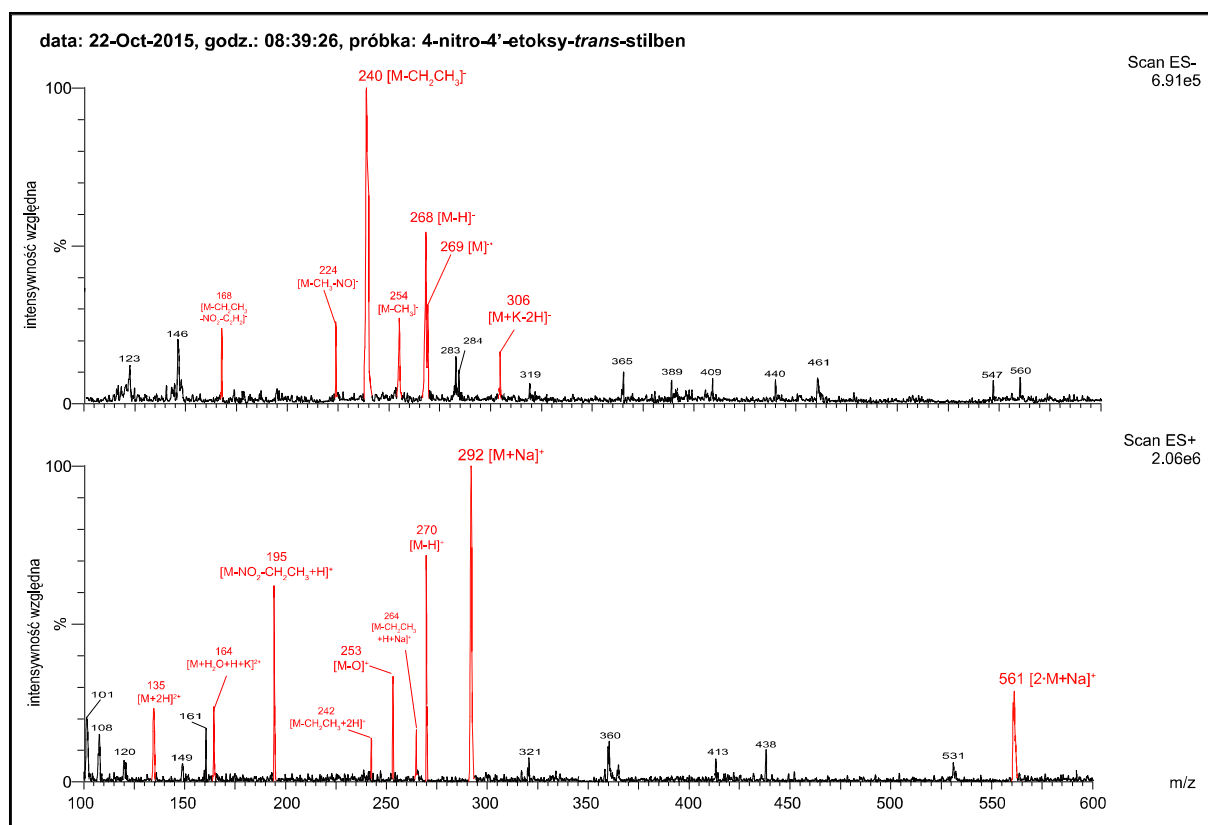
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.9-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 135 m/z [M+2H]<sup>2+</sup>
- 164 m/z [M+H<sub>2</sub>O+H+K]<sup>2+</sup>
- 195 m/z [M-NO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>
- 242 m/z [M-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+2H]<sup>+</sup>
- 253 m/z [M-O]<sup>+</sup>
- 264 m/z [M-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>+H+Na]<sup>+</sup>
- 270 m/z [M+H]<sup>+</sup>
- 292 m/z [M+Na]<sup>+</sup> – pik główny
- 561 m/z [2\*M+Na]<sup>+</sup>

b) jonizacja ujemna:

- 168 m/z [M-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>]<sup>-</sup>
- 224 m/z [M-CH<sub>3</sub>-NO]<sup>-</sup>
- 240 m/z [M-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup> – pik główny
- 254 m/z [M-CH<sub>3</sub>]<sup>-</sup>
- 268 m/z [M-H]<sup>-</sup>
- 269 m/z [M]<sup>-•</sup>
- 306 m/z [M+K-2H]<sup>-</sup>



## RYCINA 12.9-suplement

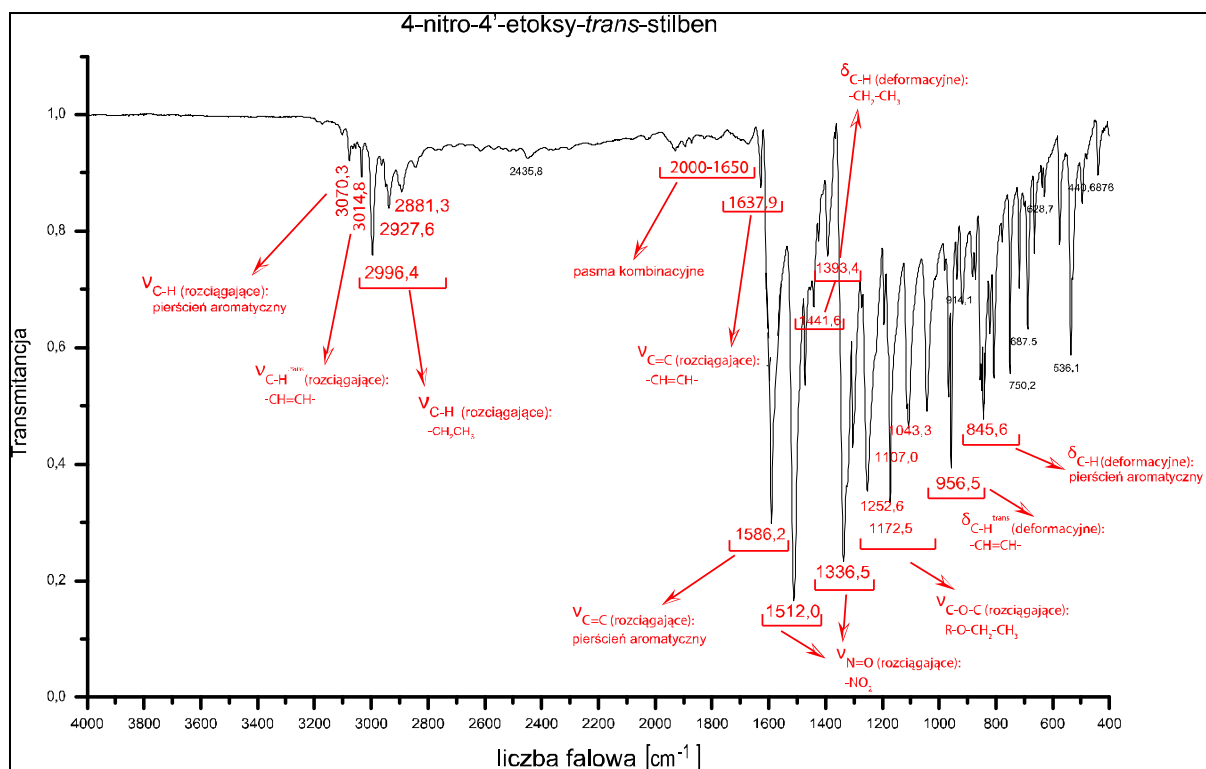
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilbenu.

IR

Podczas analizy widma IR stwierdzono występowanie kilku charakterystycznych oddziaływań (RYCINA 12.10-suplement i TABELA 12.4-suplement):

- drgania rozciągające wiązania C-H w mostku etylenowym, pierścieniu aromatycznym oraz podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 3100 – 2800 cm<sup>-1</sup>,
- drgania rozciągające wiązania C=O w podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 1770 cm<sup>-1</sup>,
- drgania rozciągające wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym – ok. 1600 cm<sup>-1</sup>,
- drgania rozciągające wiązania N=O grupy nitrowej w pozycji 4 – ok. 1500 i 1330 cm<sup>-1</sup>,
- drgania rozciągające wiązania C-O-C w podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 1300 – 1000 cm<sup>-1</sup>,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w mostku etylenowym – ok. 950 cm<sup>-1</sup>,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym – ok. 840 cm<sup>-1</sup>.





RYCINA 12.10-suplement

Widmo IR dla 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilbenu.

TABELA 12.4-suplement

Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-4'-etoksy-*trans*-stilbenu.

Liczba falowa [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Rodzaj drgań
3070,3	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
3014,8	$\nu_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): $-\text{CH}=\text{CH}-$
2996,4 – 2881,3	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): $-\text{CH}_2\text{CH}_3$
2000 – 1650	pasma kombinacyjne
1637,9	$\nu_{\text{C=C}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): $-\text{CH}=\text{CH}-$
1586,2	$\nu_{\text{C=C}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
1512,0; 1336,5	$\nu_{\text{N=O}}$ (rozciągające): $-\text{NO}_2$
1441,6; 1393,4	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): $-\text{CH}_2\text{CH}_3$
1252,6 – 1043,3	$\nu_{\text{C-O-C}}$ (rozciągające): $\text{R-O-CH}_2\text{CH}_3$
956,6	$\delta_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (deformacyjne): $-\text{CH}=\text{CH}-$
845,6	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): pierścień aromatyczny

**12.3.1.5. Związek nr Z11: 4-nitro-4'-karboksymetyloetoksy-*trans*-stilben**

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C, H i N; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS oraz IR.

Elementarna analiza pierwiastków:

$C_{17}H_{15}NO_5$  – masa molowa: 313,30 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 65,17 %

H = 4,83 %

N = 4,47 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 65,08 %

H = 4,84 %

N = 4,26 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

169 – 172°C

TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelem krzemionkowym

Faza ruchoma –  $CHCl_3$

Współczynnik opóźnienia  $R_f = 0,46$

MS:

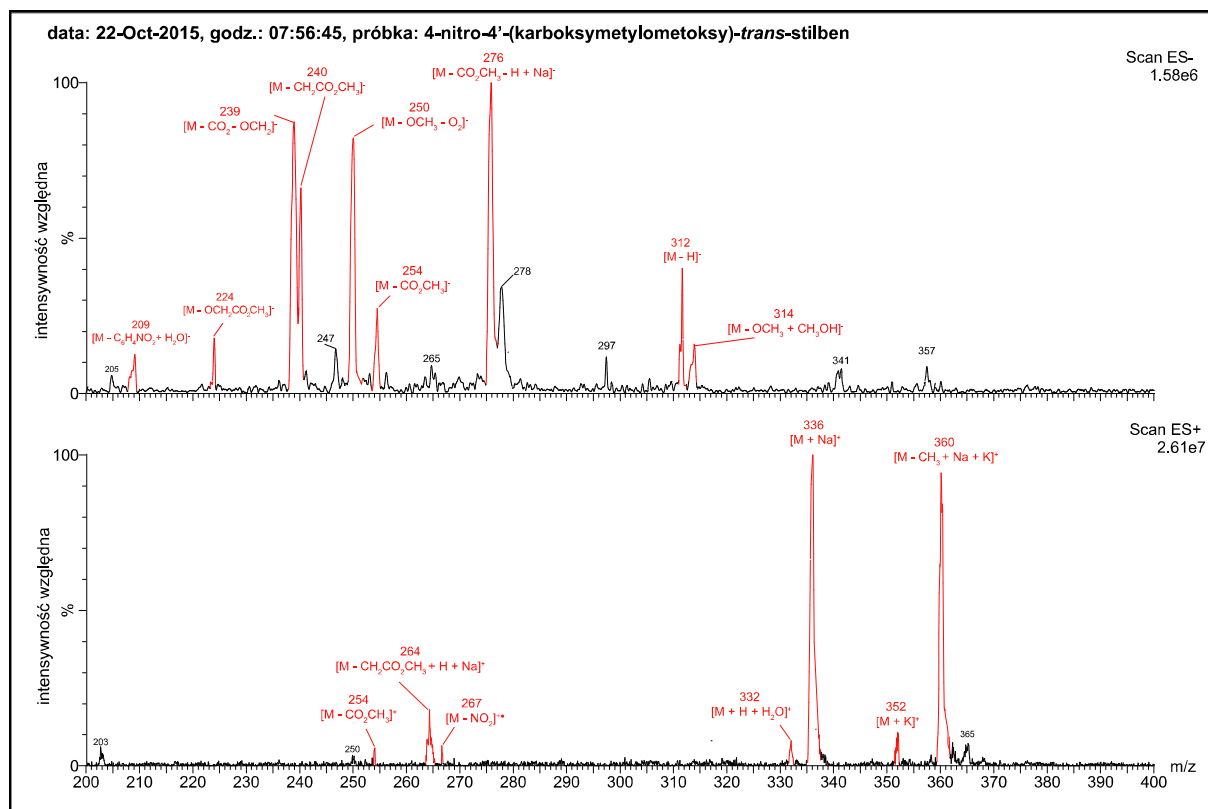
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.11-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 254 m/z  $[M-CO_2CH_3]^+$
- 264 m/z  $[M-CH_2CO_2CH_3+H+Na]^+$
- 267 m/z  $[M-NO_2]^+$
- 332 m/z  $[M+H+H_2O]^+$
- 336 m/z  $[M+Na]^+$  – pik główny
- 352 m/z  $[M+K]^+$
- 360 m/z  $[M-CH_3+Na+K]^+$

b) jonizacja ujemna:

- 209 m/z  $[M-C_6H_4NO_2+H_2O]^-$
- 224 m/z  $[M-OCH_2CO_2CH_3]^-$
- 239 m/z  $[M-CO_2-OCH_2]^-$
- 240 m/z  $[M-CH_2CO_2CH_3]^-$
- 250 m/z  $[M-OCH_3-O_2]^-$
- 254 m/z  $[M-CO_2CH_3]^-$
- 276 m/z  $[M-CO_2CH_3-H+Na]^-$  – pik główny
- 312 m/z  $[M-H]^-$
- 314 m/z  $[M-OCH_3+CH_3OH]^-$



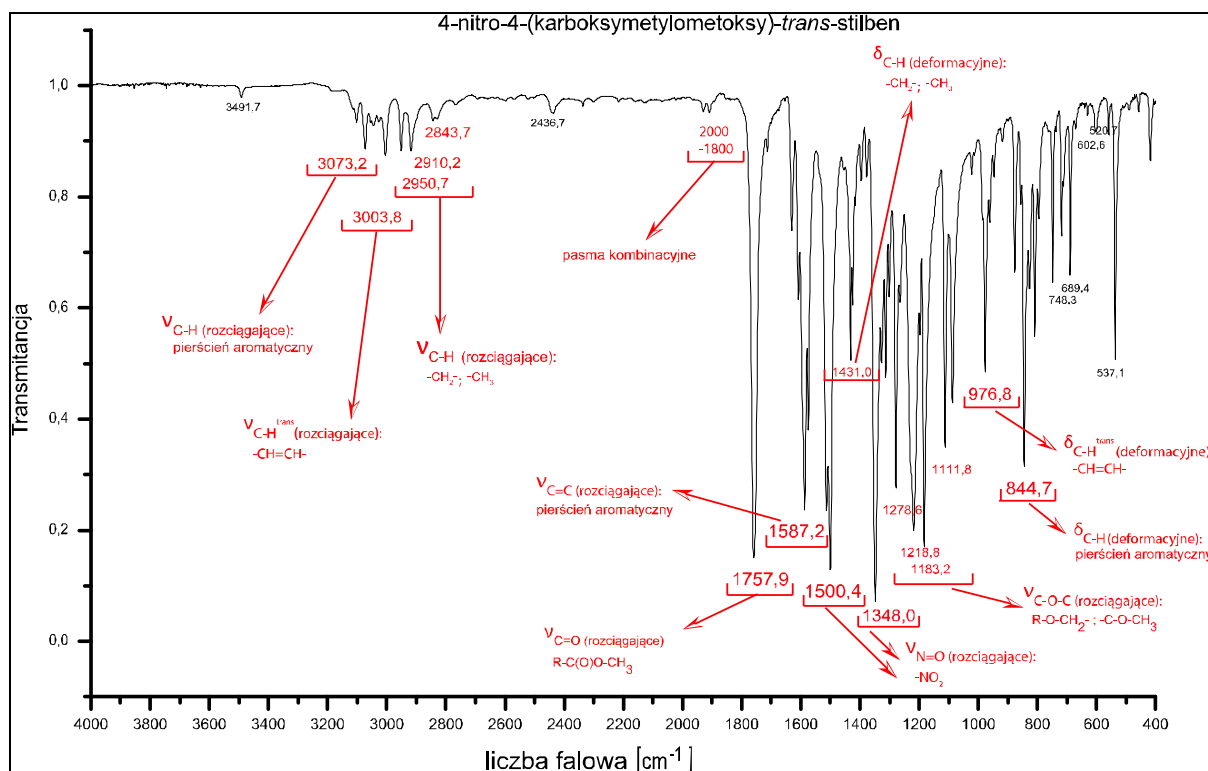
## RYCINA 12.11-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-nitro-4'-karboksymetyloktoksy-*trans*-stilbenu.

IR

Podczas analizy widma IR stwierdzono występowanie kilku charakterystycznych oddziaływań (RYCINA 12.12-suplement i TABELA 12.5-suplement):

- drgania rozciągające wiązania C-H w mostku etylenowym, pierścieniu aromatycznym oraz podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=O w podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 1760  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym – ok. 1600  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania N=O grupy nitrowej w pozycji 4 – ok. 1500 i 1350  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C-O-C w podstawniku alifatycznym w pozycji 4' – ok. 1300 – 1100  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w mostku etylenowym – ok. 980  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym – ok. 840  $\text{cm}^{-1}$ .



RYCINA 12.12-suplement

Widmo IR dla 4-nitro-4'-karboksymetyloktoksi-*trans*-stilbenu

TABELA 12.5-suplement

Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-4'-karboksymetyloktoksi-*trans*-stilbenu

Liczba falowa [cm <sup>-1</sup> ]	Rodzaj drgań
3073,2	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
3003,8	$\nu_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): -CH=CH-
2950,7; 2910,2; 2843,7	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): -CH <sub>2</sub> -; -CH <sub>3</sub>
2000 – 1800	pasma kombinacyjne
1757,9	$\nu_{\text{C=O}}$ (rozciągające): -R-C(O)O-CH <sub>3</sub>
1587,2	$\nu_{\text{C=C}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
1500,4; 1348,0	$\nu_{\text{N=O}}$ (rozciągające): -NO <sub>2</sub>
1431,0	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): -CH <sub>2</sub> -; -CH <sub>3</sub>
1278,6 – 1111,8	$\nu_{\text{C-O-C}}$ (rozciągające): R-O-CH <sub>2</sub> -; -C-O-CH <sub>3</sub>
978,6	$\delta_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (deformacyjne): -CH=CH-
844,7	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): pierścień aromatyczny

**12.3.1.6. Związek nr N1: 4-nitro-3',4',5'-trihydroksi-*trans*-stilben**

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C, H i N; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS; <sup>1</sup>H NMR; <sup>13</sup>C NMR oraz IR.

Elementarna analiza pierwiastków:

$C_{14}H_{11}NO_5$  – masa molowa: 273,24 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 61,54 %

H = 4,06 %

N = 5,13 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 61,26 %

H = 4,32 %

N = 5,17 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

do temperatury 360°C związek nie ulega stopieniu

TLC:

Faza stacjonarna – bibuła chromatograficzna

Faza ruchoma – n-butanol : kwas octowy : woda (4:1:1)

Współczynnik opóźnienia  $R_f = 0,00$

MS:

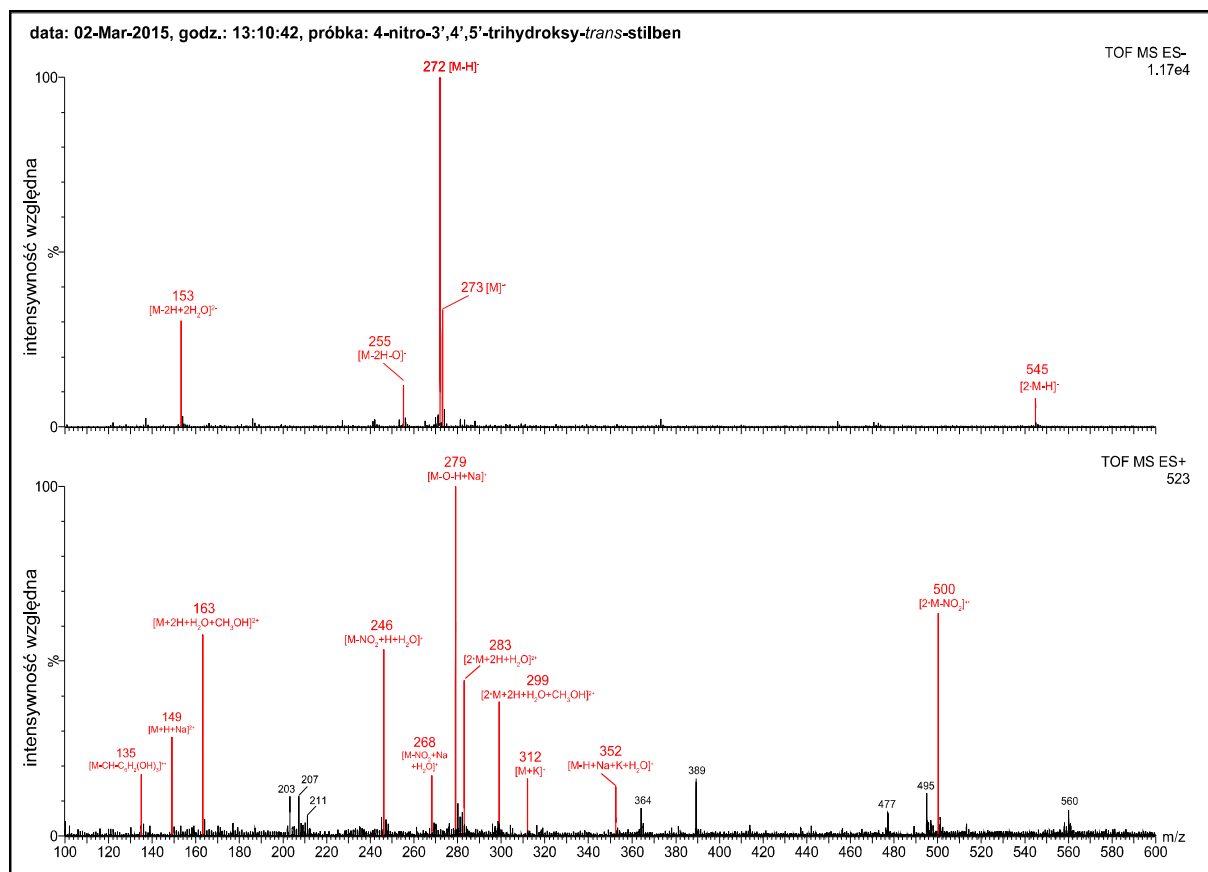
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.13-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 135 m/z  $[M-CH-C_6H_2(OH)_3]^+\bullet$
- 149 m/z  $[M+H+Na]^{2+}$
- 163 m/z  $[M+2H+H_2O+CH_3OH]^{2+}$
- 246 m/z  $[M-NO_2+H+H_2O]^+$
- 268 m/z  $[M-NO_2+Na+H_2O]^+$
- 279 m/z  $[M-O-H+Na]^+$  – pik główny
- 283 m/z  $[2*M+2H+H_2O]^{2+}$
- 299 m/z  $[2*M+2H+H_2O+CH_3OH]^{2+}$
- 312 m/z  $[M+K]^+$
- 352 m/z  $[M-H+Na+K+H_2O]^+$
- 500 m/z  $[2*M-NO_2]^+\bullet$

b) jonizacja ujemna:

- 209 m/z  $[M-C_6H_4NO_2+H_2O]^-$
- 224 m/z  $[M-OCH_2CO_2CH_3]^-$
- 153 m/z  $[M-2H+2H_2O]^{2-}$
- 255 m/z  $[M-2H-O]^-$
- 272 m/z  $[M-H]^-$  – pik główny
- 273 m/z  $[M]^- \bullet$
- 545 m/z  $[2*M-H]^-$



## RYCINA 12.13-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbenu.

 $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR:

Badanie  $^1\text{H}$  NMR przeprowadzono z zastosowaniem częstotliwości rezonansowej 300 MHz, natomiast  $^{13}\text{C}$  NMR przy częstotliwości 101 MHz.

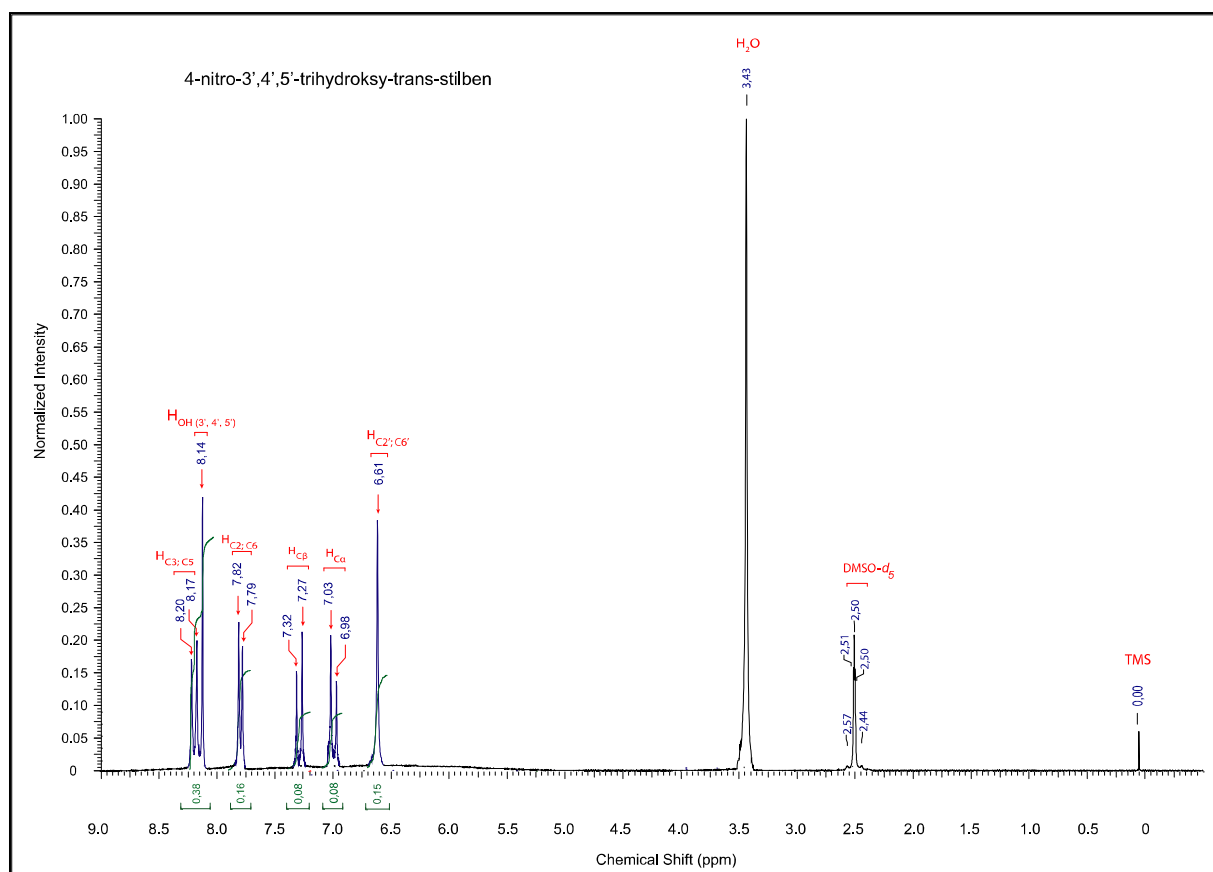
Wyniki analizy wraz z przyporządkowaniem atomów wodoru i węgla do poszczególnych sygnałów zaprezentowano w TABELI 12.6-suplement oraz na RYCINACH 12.14-15-suplement.

## TABELA 12.6-suplement

Charakterystyka widm  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbenu.

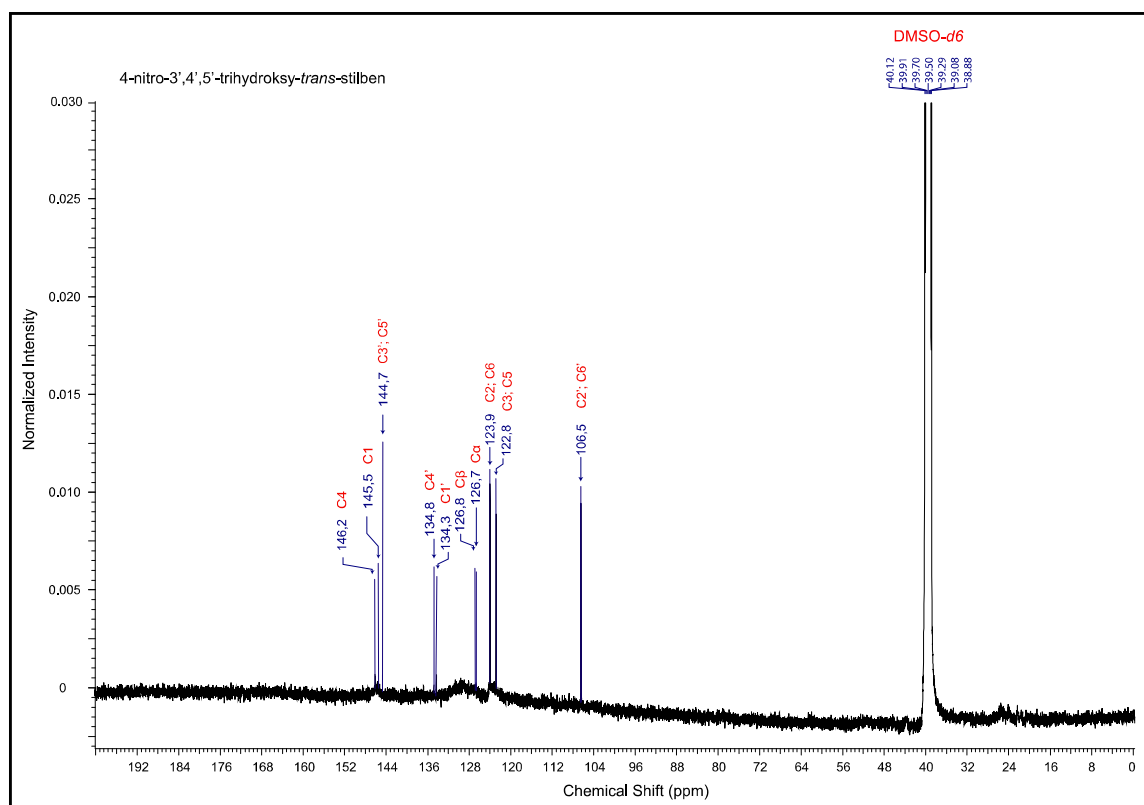
Nr atomu	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
$\alpha$	6,98; 7,03 (doublet, $J = 15,9$ Hz, 1H)	126,7
$\beta$	7,27; 7,32 (doublet, $J = 16,2$ Hz, 1H)	126,8

1	-	145,5
2	7,79; 7,82 (doublet, J = 8,9 Hz, 2H)	123,9
3	8,17; 8,20 (doublet, J = 8,6 Hz, 2H)	122,8
4	-	146,2
5	8,17; 8,20 (doublet, J = 8,6 Hz, 2H)	122,8
6	7,79; 7,82 (doublet, J = 8,9 Hz, 2H)	123,9
1'	-	134,3
2'	6,61 (singlet, 2H)	106,5
3'	-	144,7
4'	-	134,8
5'	-	144,7
6'	6,61 (singlet, 2H)	106,5
OH (3')	8,14 (singlet, 3H)	-
OH (4')	8,14 (singlet, 3H)	-
OH (5')	8,14 (singlet, 3H)	-



RYCINA 12.14-suplement

Widmo <sup>1</sup>H NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbenu.



## RYCINA 12.15-suplement

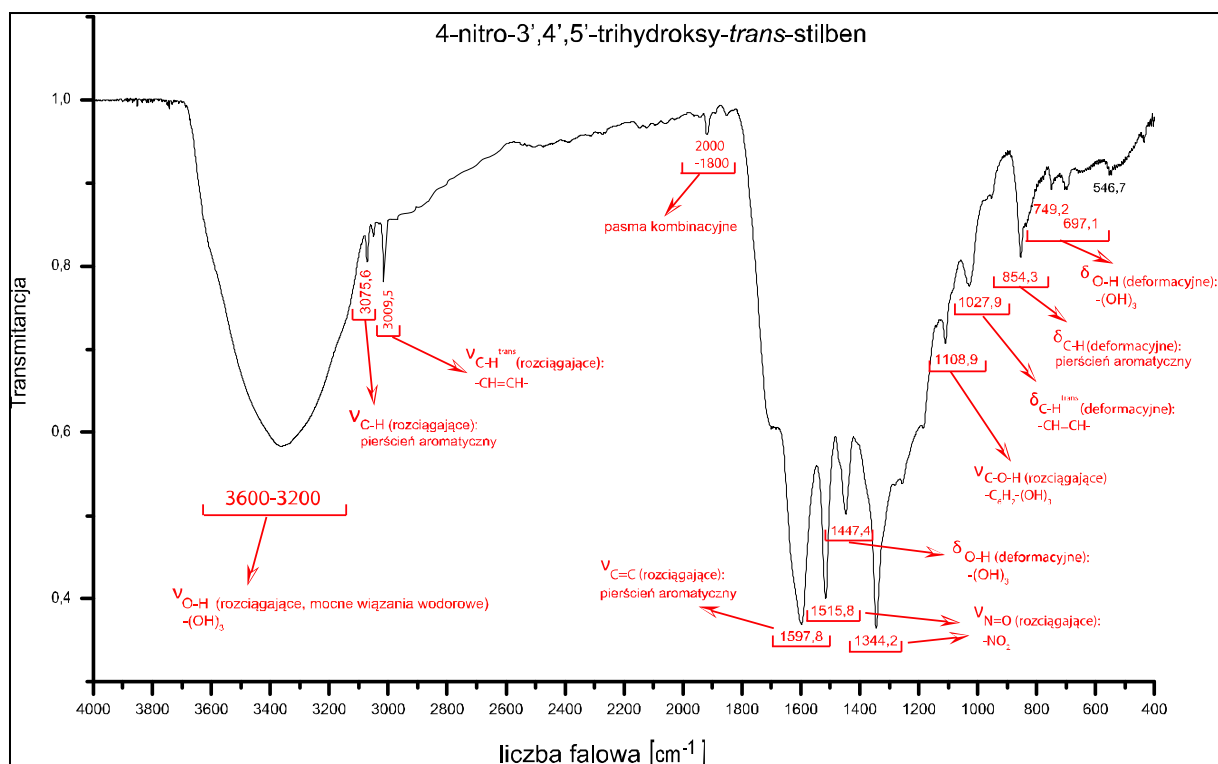
Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso-*trans*-stilbenu.

IR

Podczas analizy widma IR stwierdzono występowanie kilku charakterystycznych oddziaływań (RYCINA 12.16-suplement i TABELA 12.7-suplement):

- drgania rozciągające wiązania O-H w grupach hydroksylowych w pozycjach 3', 4' i 5', charakteryzujące się mocnymi wiązaniami wodorowymi między cząsteczkami – szerokie pasmo ok.  $3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C-H w mostku etylenowym i pierścieniu aromatycznym – ok.  $3100 - 3000\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym – ok.  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania N=O grupy nitrowej w pozycji 4 – ok.  $1515$  i  $1350\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania O-H w grupach hydroksylowych w pozycjach 3', 4' i 5' – ok.  $1450\text{ cm}^{-1}$  i  $750 - 700\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C-O-H pomiędzy węglami 3', 4' i 5' pierścienia aromatycznego a grupami hydroksylowymi w pozycjach 3', 4' i 5' – ok.  $1100\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w mostku etylenowym – ok.  $1030\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym – ok.  $850\text{ cm}^{-1}$ .





RYCINA 12.16-suplement  
Widmo IR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbenu.

TABELA 12.7-suplement  
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroxy-*trans*-stilbenu.

Liczba falowa [cm <sup>-1</sup> ]	Rodzaj drgań
3600 – 3200	$\nu_{\text{O-H}}$ (rozciągające, mocne wiązania wodorowe): $-(\text{OH})_3$
3075,6	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
3009,5	$\nu_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): $-\text{CH}=\text{CH}-$
2000 – 1800	pasma kombinacyjne
1597,8	$\nu_{\text{C=C}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
1515,8; 1344,2	$\nu_{\text{N=O}}$ (rozciągające): $-\text{NO}_2$
1447,4; 749,2; 697,1	$\delta_{\text{O-H}}$ (deformacyjne): $-(\text{OH})_3$
1108,9	$\nu_{\text{C-O-H}}$ (rozciągające): $-\text{C}_6\text{H}_2-(\text{OH})_3$
1027,9	$\delta_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (deformacyjne): $-\text{CH}=\text{CH}-$
854,3	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): pierścień aromatyczny

### 12.3.1.7. Związek nr N2: 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilben

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C, H i N; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS; <sup>1</sup>H NMR; <sup>13</sup>C NMR oraz IR.

Elementarna analiza pierwiastków:

C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> – masa molowa: 315,32 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 64,75 %

H = 5,43 %

N = 4,44 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 64,53 %

H = 5,30 %

N = 4,47 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

191 – 194°C

TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelem krzemionkowym

Faza ruchoma – CHCl<sub>3</sub>

Współczynnik opóźnienia R<sub>f</sub> = 0,28

MS:

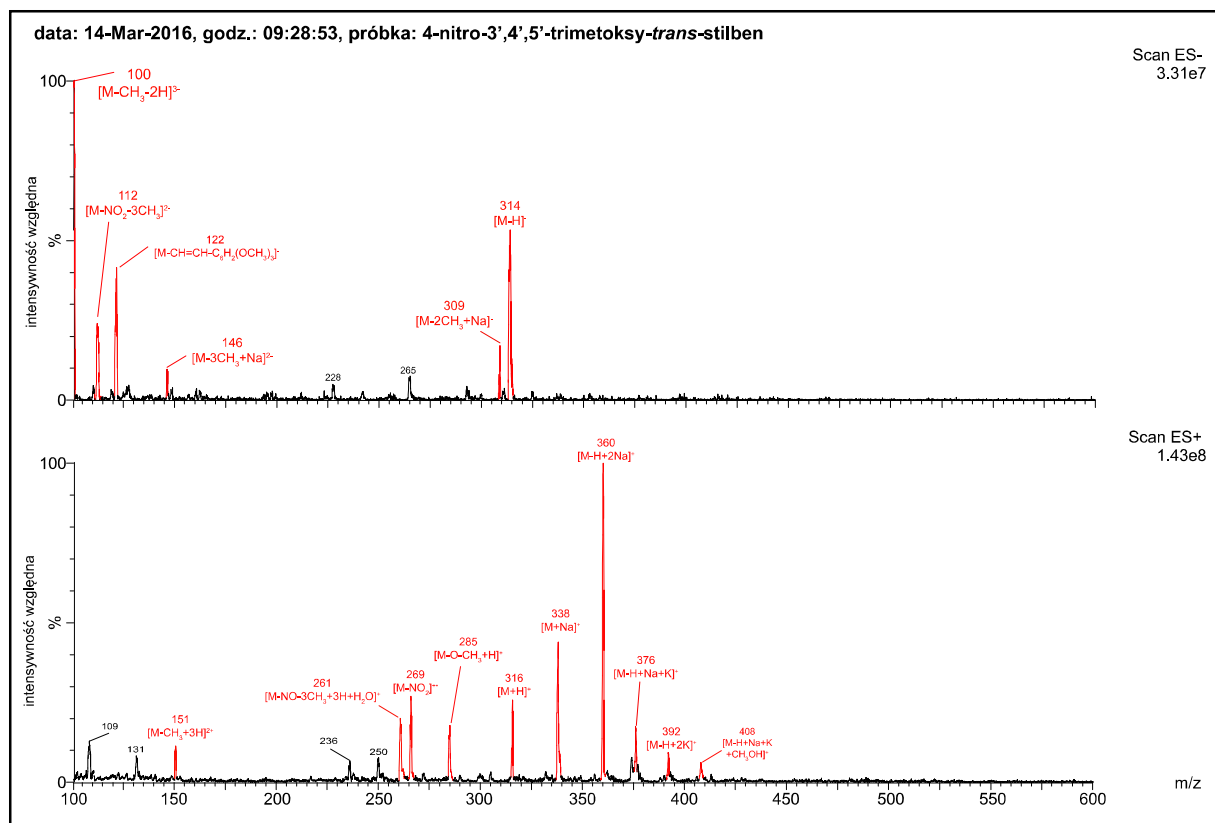
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.17-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 140 m/z [M-2CH<sub>3</sub>+3H+Na]<sup>2+</sup>
- 151 m/z [M-CH<sub>3</sub>+3H]<sup>2+</sup>
- 261 m/z [M-NO-3CH<sub>3</sub>+3H+H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>
- 269 m/z [M-NO<sub>2</sub>]<sup>+•</sup>
- 285 m/z [M-O-CH<sub>3</sub>+H]<sup>+</sup>
- 316 m/z [M+H]<sup>+</sup>
- 338 m/z [M+Na]<sup>+</sup>
- 360 m/z [M-H+2Na]<sup>+</sup> – pik główny
- 376 m/z [M-H+Na+K]<sup>+</sup>
- 392 m/z [M-H+2K]<sup>+</sup>
- 408 m/z [M-H+Na+K+CH<sub>3</sub>OH]<sup>+</sup>

b) jonizacja ujemna:

- 100 m/z [M-CH<sub>3</sub>-2H]<sup>3-</sup> – pik główny
- 112 m/z [M-NO<sub>2</sub>-3CH<sub>3</sub>]<sup>2-</sup>
- 122 m/z [M-CH=CH-C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]<sup>-</sup>
- 146 m/z [M-3CH<sub>3</sub>+Na]<sup>2-</sup>
- 309 m/z [M-2CH<sub>3</sub>+Na]<sup>-</sup>
- 314 m/z [M-H]<sup>-</sup>



## RYCINA 12.17-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

 $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR:

Badanie  $^1\text{H}$  NMR przeprowadzono z zastosowaniem częstotliwości rezonansowej 300 MHz, natomiast  $^{13}\text{C}$  NMR przy częstotliwości 75 MHz.

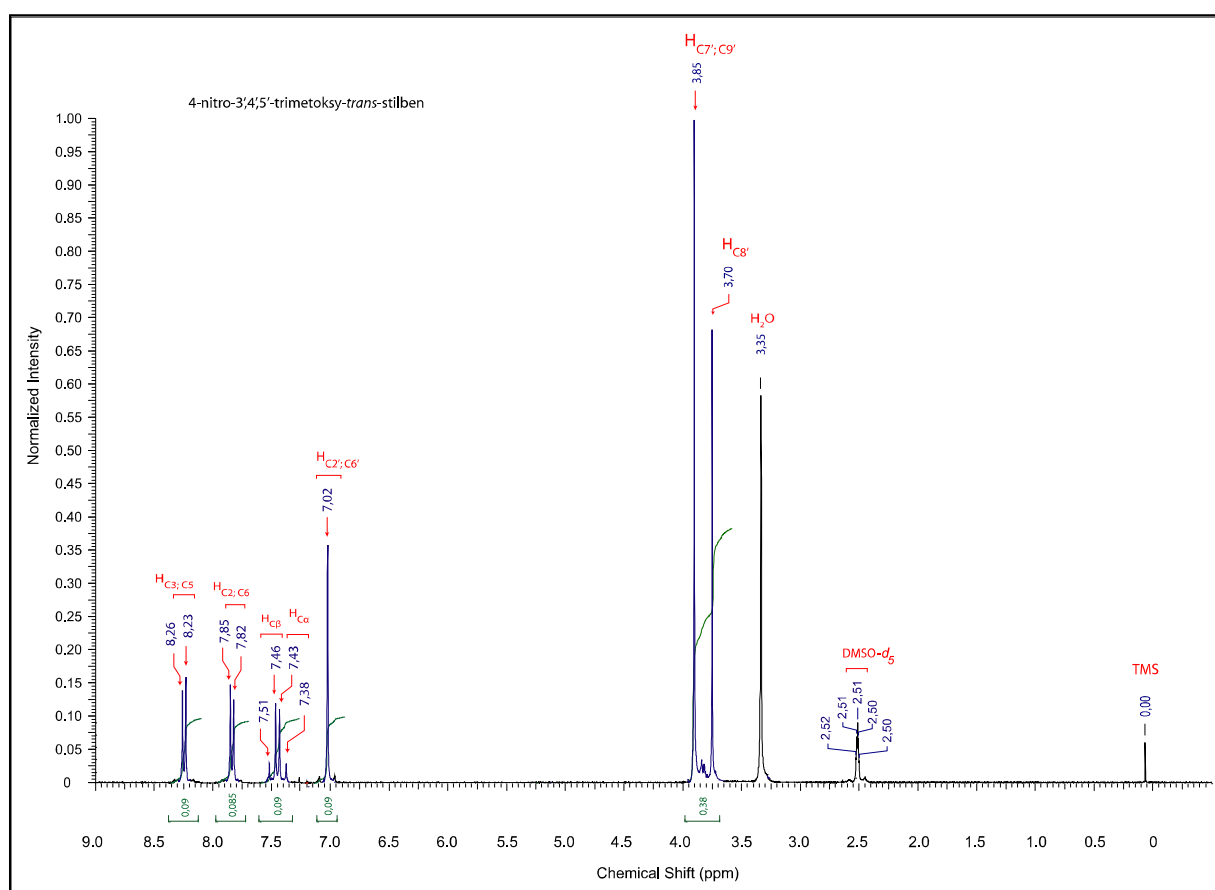
Wyniki analizy wraz z przyporządkowaniem atomów wodoru i węgla do poszczególnych sygnałów zaprezentowano w TABELI 12.8-suplement oraz na RYCINACH 12.18-19-suplement.

## TABELA 12.8-suplement

Charakterystyka widm  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

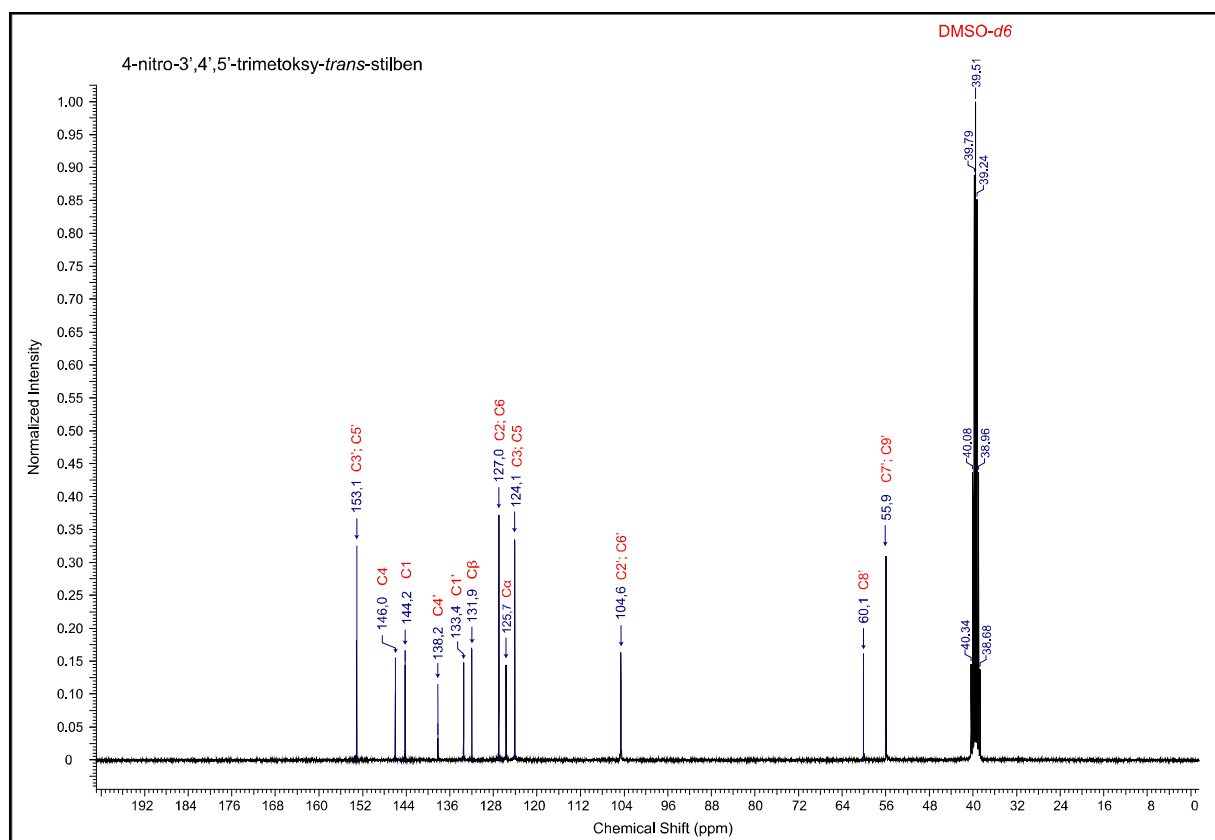
Nr atomu	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
$\alpha$	7,38; 7,43 (dublet, J = 16,4 Hz, 1H)	125,7
$\beta$	7,46; 7,51 (dublet, J = 16,5 Hz, 1H)	131,9

1	-	144,2
2	7,82; 7,85 (doublet, J = 9,0 Hz, 2H)	127,0
3	8,23; 8,26 (doublet, J = 8,9 Hz, 2H)	124,1
4	-	146,0
5	8,23; 8,26 (doublet, J = 8,9 Hz, 2H)	124,1
6	7,82; 7,85 (doublet, J = 9,0 Hz, 2H)	127,0
1'	-	133,4
2'	7,02 (singlet, 2H)	104,6
3'	-	153,1
4'	-	138,2
5'	-	153,1
6'	7,02 (singlet, 2H)	104,6
7'	3,85 (singlet, 6H)	55,9
8'	3,70 (singlet, 3H)	60,1
9'	3,85 (singlet, 6H)	55,9



RYCINA 12.18-suplement

Widmo  $^1H$  NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.



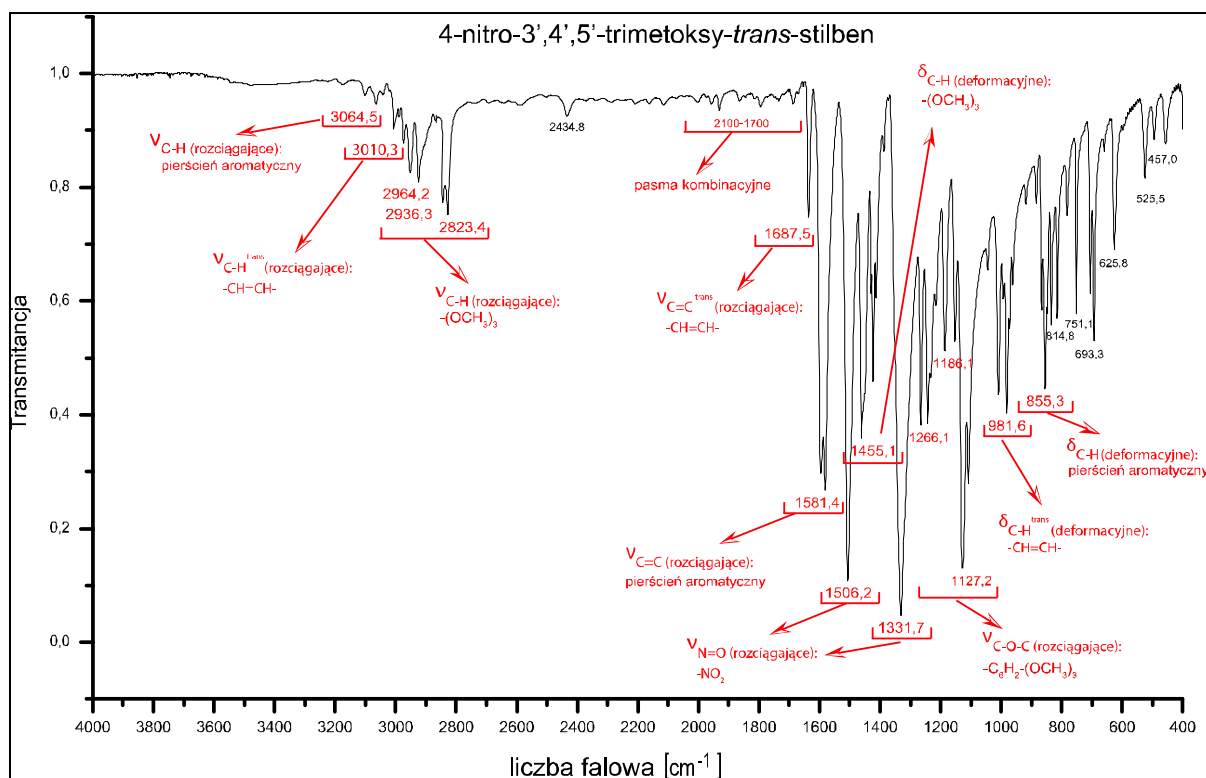
## RYCINA 12.19-suplement

Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

IR

Podczas analizy widma IR stwierdzono występowanie kilku charakterystycznych oddziaływań (RYCINA 12.20-suplement i TABELA 12.9-suplement):

- drgania rozciągające wiązania C-H w mostku etylenowym, pierścieniu aromatycznym i w podstawnikach metoksyłowych – ok. 3100 – 2800  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym – ok. 1580  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania N=O grupy nitrowej w pozycji 4 – ok. 1500 i 1330  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w podstawnikach metoksyłowych – ok. 1450  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C-O-C pomiędzy węglami 3', 4' i 5' pierścienia aromatycznego a grupami metoksyłowymi w pozycjach 3', 4' i 5' – ok. 1300 – 1100  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w mostku etylenowym – ok. 980  $\text{cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym – ok. 860  $\text{cm}^{-1}$ .



RYCINA 12.20-suplement  
Widmo IR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

TABELA 12.9-suplement  
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy-*trans*-stilbenu.

Liczba falowa [cm <sup>-1</sup> ]	Rodzaj drgań
3064,5	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
3010,3	$\nu_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): -CH=CH-
2964,2 – 2823,4	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
2100 – 1700	pasma kombinacyjne
1687,5	$\nu_{\text{C=C}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): -CH=CH-
1581,4	$\nu_{\text{C=C}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
1506,2; 1331,7	$\nu_{\text{N=O}}$ (rozciągające): -NO <sub>2</sub>
1455,1	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
1266,1 – 1127,2	$\nu_{\text{C-O-C}}$ (rozciągające): -C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
981,6	$\delta_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (deformacyjne): -CH=CH-
855,3	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): pierścień aromatyczny

### 12.3.1.8 Związek nr N6: 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilben

Związek poddano następującym badaniom: elementarna analiza pierwiastków C, H i N; oznaczenie temperatury topnienia; TLC; MS; <sup>1</sup>H NMR; <sup>13</sup>C NMR oraz IR.

Elementarna analiza pierwiastków:

$C_{16}H_{15}NO_4$  – masa molowa: 285,29 g/mol

Obliczona zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 67,36 %

H = 5,30 %

N = 4,91 %

Otrzymana zawartość podstawowych pierwiastków:

C = 67,27 %

H = 5,34 %

N = 4,67 %

Oznaczenie temperatury topnienia:

131 – 133°C

TLC:

Faza stacjonarna – płytka szklana pokryta żelem krzemionkowym

Faza ruchoma –  $CHCl_3$

Współczynnik opóźnienia  $R_f = 0,52$

MS:

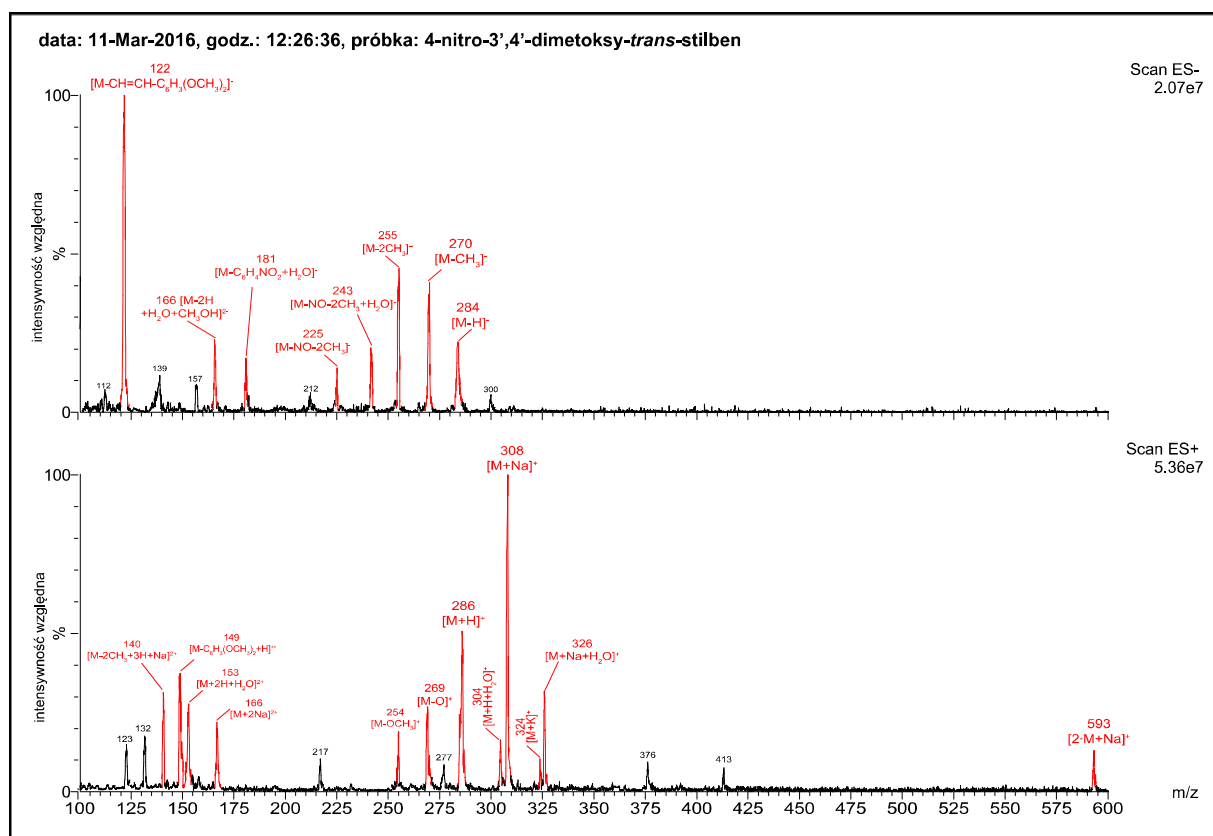
W analizie ESI-MS zidentyfikowano następujące piki (RYCINA 12.21-suplement):

a) jonizacja dodatnia:

- 140 m/z  $[M-2CH_3+3H+Na]^{2+}$
- 149 m/z  $[M-C_6H_3(OCH_3)_2+H]^{+•}$
- 153 m/z  $[M+2H+H_2O]^{2+}$
- 166 m/z  $[M+2Na]^{2+}$
- 254 m/z  $[M-OCH_3]^+$
- 269 m/z  $[M-O]^+$
- 286 m/z  $[M+H]^+$
- 304 m/z  $[M+H+H_2O]^+$
- 308 m/z  $[M+Na]^+$  – pik główny
- 324 m/z  $[M+K]^+$
- 326 m/z  $[M+Na+H_2O]^+$
- 593 m/z  $[2•M+Na]^+$

b) jonizacja ujemna:

- 122 m/z  $[M-CH=CH-C_6H_3(OCH_3)_2]^-$  – pik główny
- 166 m/z  $[M-2H+H_2O+CH_3OH]^{2-}$
- 181 m/z  $[M-C_6H_4NO_2+H_2O]^-$
- 225 m/z  $[M-NO-2CH_3]^-$
- 243 m/z  $[M-NO-2CH_3+H_2O]^-$
- 255 m/z  $[M-2CH_3]^{•-}$
- 270 m/z  $[M-CH_3]^-$
- 284 m/z  $[M-H]^-$



## RYCINA 12.21-suplement

Widmo ESI-MS dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu. $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR:

Badanie  $^1\text{H}$  NMR przeprowadzono z zastosowaniem częstotliwości rezonansowej 400 MHz, natomiast  $^{13}\text{C}$  NMR przy częstotliwości 101 MHz.

Wyniki analizy wraz z przyporządkowaniem atomów wodoru i węgla do poszczególnych sygnałów zaprezentowano w TABELI 12.10-suplement oraz na RYCINACH 12.22-23-suplement.

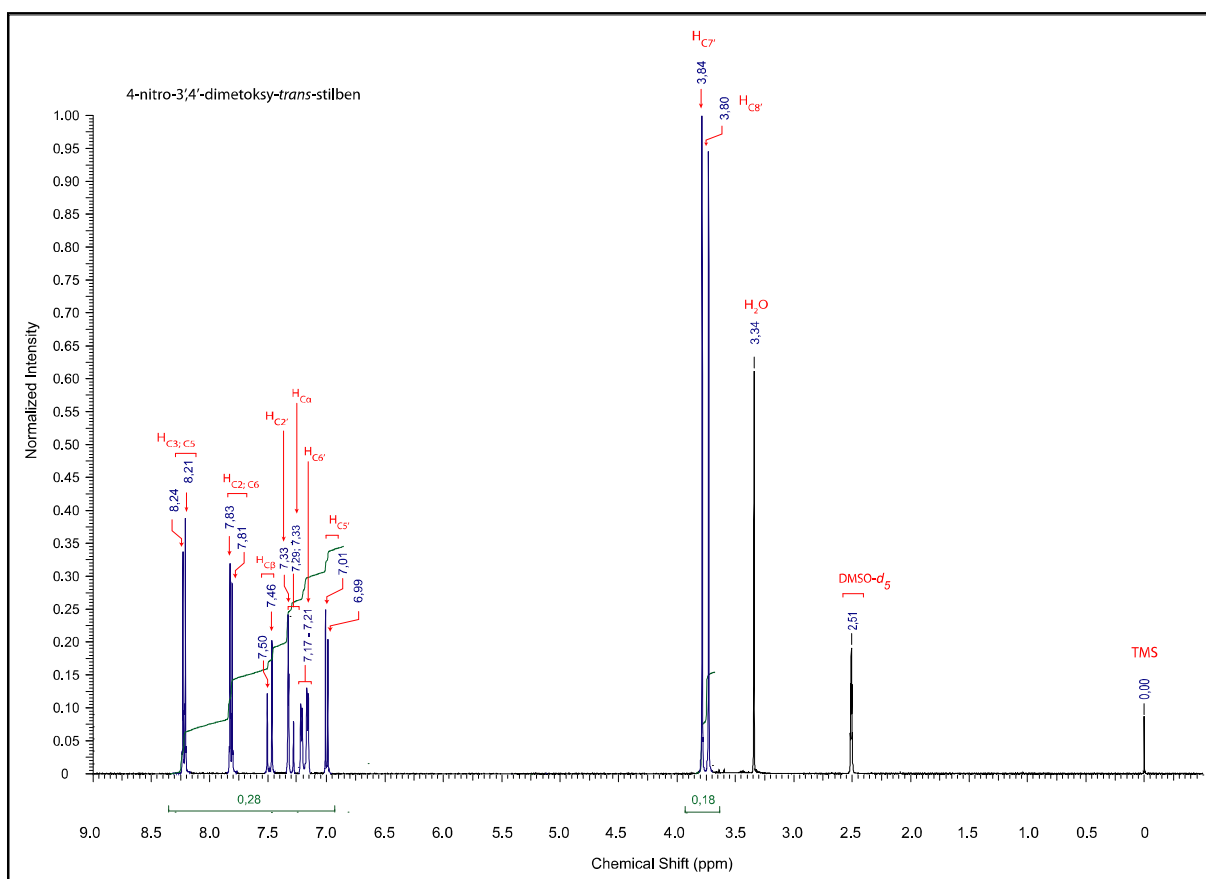
## TABELA 12.10-suplement

Charakterystyka widm  $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu.

Nr atomu	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
	$\delta$ [ppm]	$\delta$ [ppm]
$\alpha$	7,29; 7,33 (dublet, J=16,2 Hz, 1H)	126,8
$\beta$	7,46; 7,50 (dublet, J=16,4 Hz, 1H)	131,9

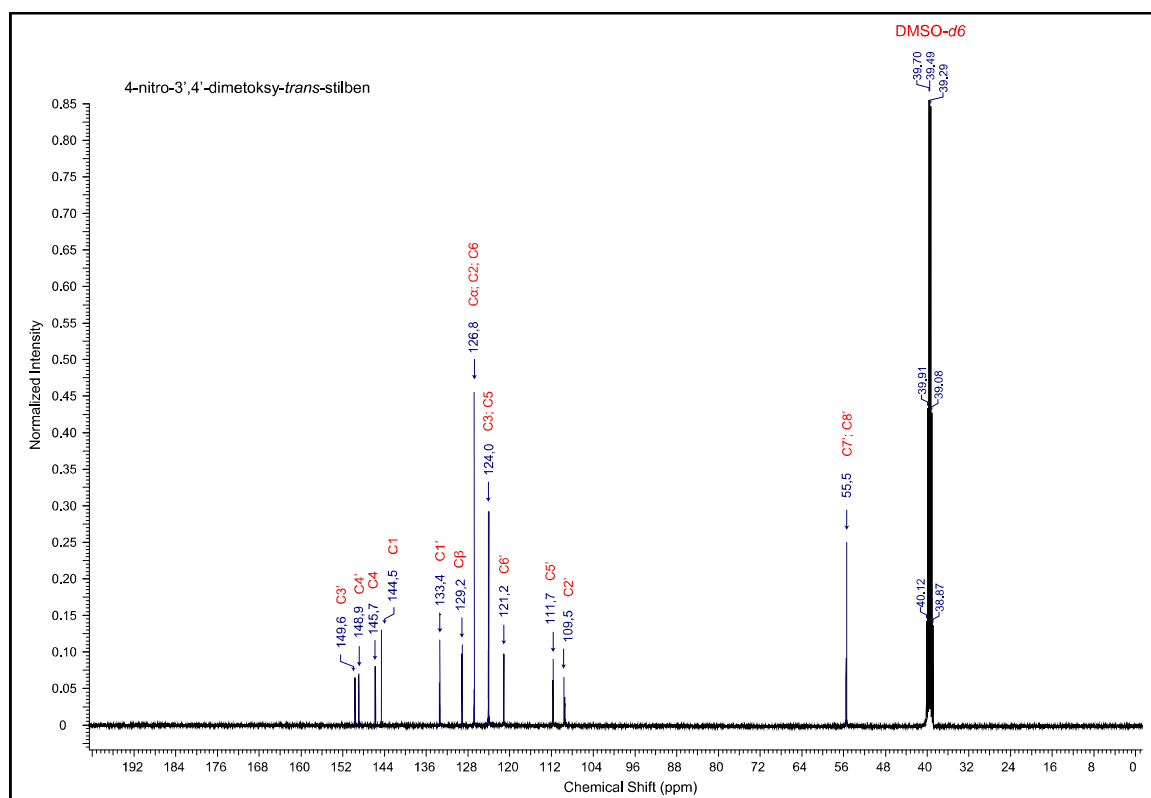


1	-	144,5
2	7,81; 7,83 (doublet, J=8,8 Hz, 2H)	126,8
3	8,21; 8,24 (doublet, J=8,9 Hz, 2H)	124,0
4	-	145,7
5	8,21; 8,24 (doublet, J=8,9 Hz, 2H)	124,0
6	7,81; 7,83 (doublet, J=8,8 Hz, 2H)	126,8
1'	-	133,4
2'	7,33 (singlet, 1H)	109,5
3'	-	149,6
4'	-	148,9
5'	6,99; 7,01 (doublet, J=8,4 Hz, 1H)	111,7
6'	7,17 – 7,21 (doublet doubletów, J=8,4 Hz, 1H)	121,2
7'	3,84 (singlet, 3H)	55,5
8'	3,80 (singlet, 3H)	55,5



RYCINA 12.22-suplement

Widmo <sup>1</sup>H NMR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu.



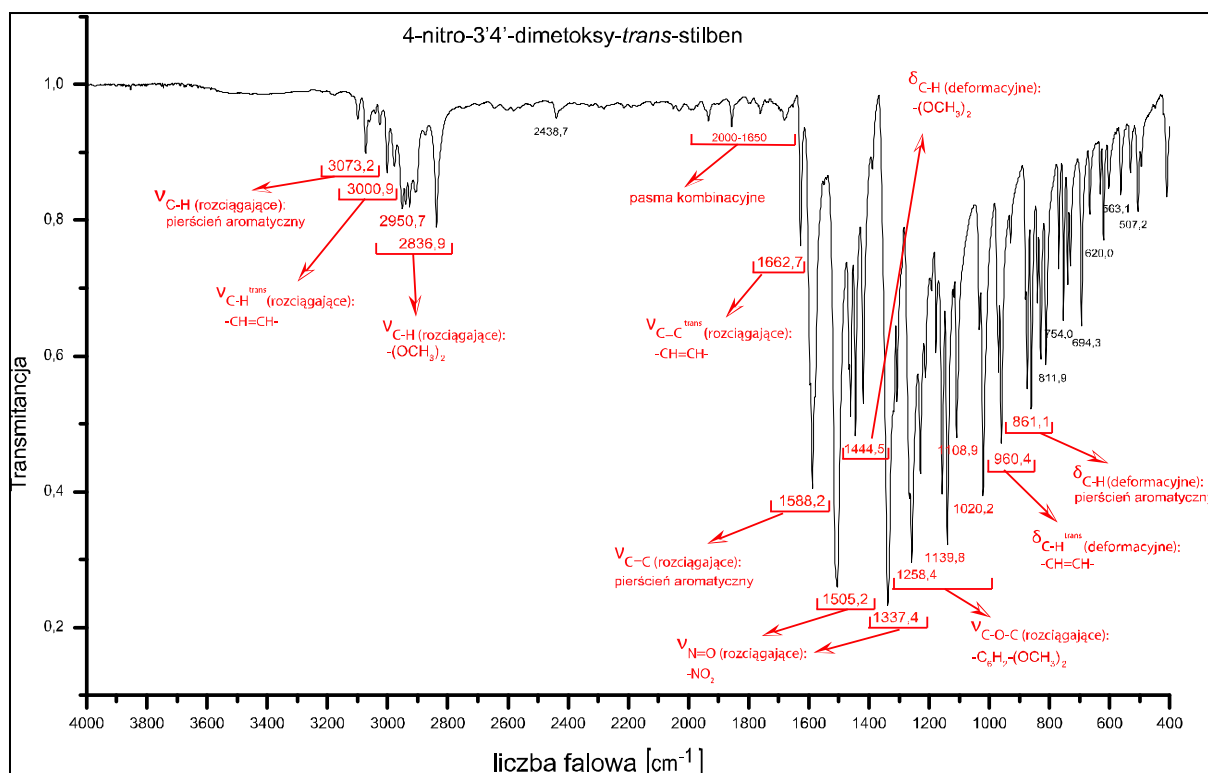
## RYCINA 12.23-suplement

Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu.

IR

Podczas analizy widma IR stwierdzono występowanie kilku charakterystycznych oddziaływań (RYCINA 12.24-suplement i TABELA 12.11-suplement):

- drgania rozciągające wiązania C-H w mostku etylenowym, pierścieniu aromatycznym i w podstawnikach metoksyowych – ok.  $3100 - 2800\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym – ok.  $1590\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania N=O grupy nitrowej w pozycji 4 – ok.  $1500$  i  $1340\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w podstawnikach metoksyowych – ok.  $1450\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania rozciągające wiązania C-O-C pomiędzy węglami 3' i 4' pierścienia aromatycznego a grupami metoksyowymi w pozycjach 3' i 4' – ok.  $1300 - 1000\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w mostku etylenowym – ok.  $960\text{ cm}^{-1}$ ,
- drgania deformacyjne wiązania C-H w pierścieniu aromatycznym – ok.  $860\text{ cm}^{-1}$ .



RYCINA 12.24-suplement

Widmo IR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu.

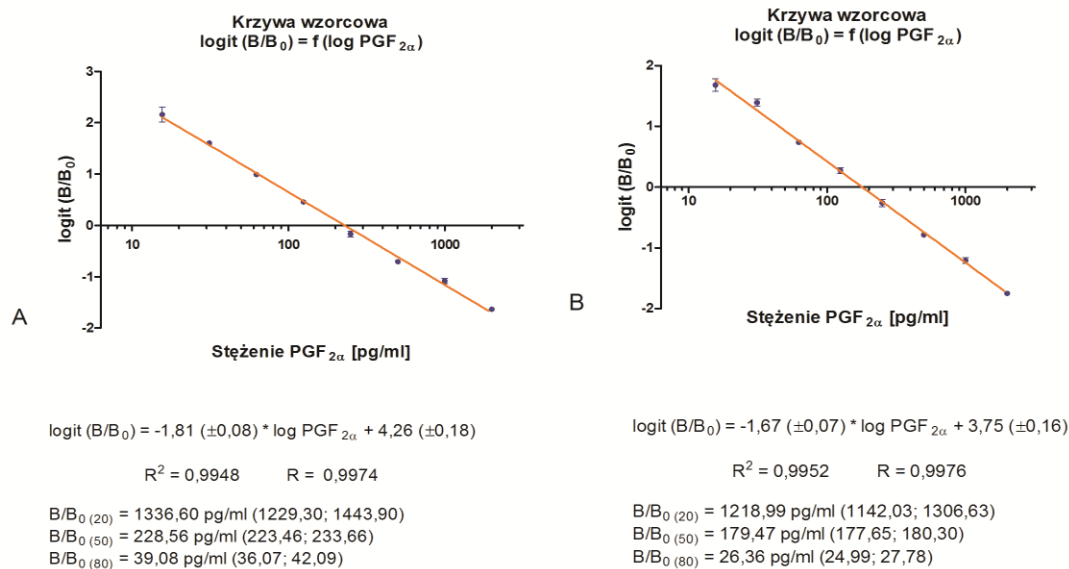
TABELA 12.11-suplement

Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy-*trans*-stilbenu.

Liczba falowa [cm <sup>-1</sup> ]	Rodzaj drgań
3073,2	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
3000,9	$\nu_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): -CH=CH-
2950,7; 2836,9	$\nu_{\text{C-H}}$ (rozciągające): -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
2000 – 1650	pasma kombinacyjne
1662,7	$\nu_{\text{C-C}}^{\text{trans}}$ (rozciągające): -CH=CH-
1588,2	$\nu_{\text{C=C}}$ (rozciągające): pierścień aromatyczny
1505,2; 1337,4	$\nu_{\text{N=O}}$ (rozciągające): -NO <sub>2</sub>
1444,5	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
1258,4 – 1020,2	$\nu_{\text{C-O-C}}$ (rozciągające): -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -(OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
960,4	$\delta_{\text{C-H}}^{\text{trans}}$ (deformacyjne): -CH=CH-
861,1	$\delta_{\text{C-H}}$ (deformacyjne): pierścień aromatyczny

## 12.4. Oznaczenie aktywności inhibicyjnej związków nr N1, N2 i N6 wobec COX-1 i COX-2 w warunkach *in vitro* (ETAP IV)

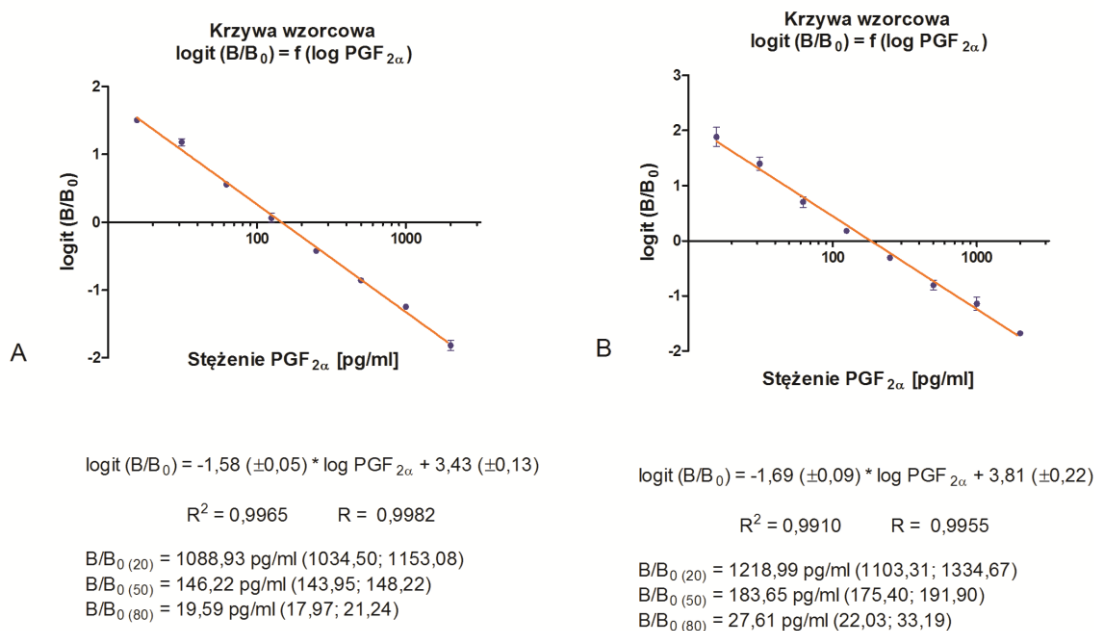
### Wykresy i parametry krzywych wzorcowych



### WYKRES 12.7-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N1 z COX-1.

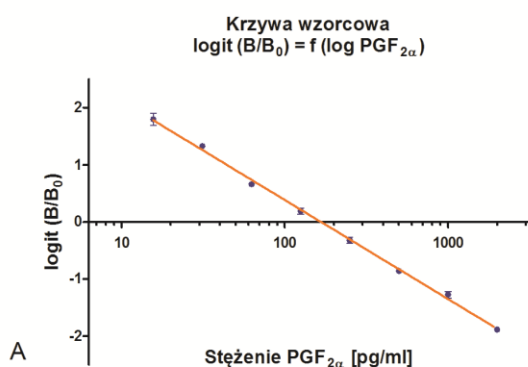
krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2.



### WYKRES 12.8-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N1 z COX-2.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2.



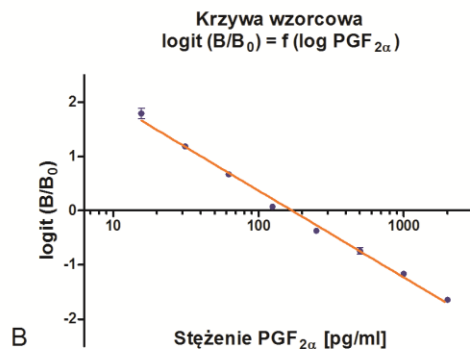
$$\text{logit}(B/B_0) = -1,73 (\pm 0,06) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,85 (\pm 0,15)$$

$$R^2 = 0,9964 \quad R = 0,9982$$

$$B/B_{0(20)} = 1049,54 \text{ pg/ml (986,61; 1110,47)}$$

$$B/B_{0(50)} = 166,34 \text{ pg/ml (126,69; 205,99)}$$

$$B/B_{0(80)} = 26,36 \text{ pg/ml (24,30; 28,42)}$$



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,60 (\pm 0,08) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,57 (\pm 0,19)$$

$$R^2 = 0,9924 \quad R = 0,9962$$

$$B/B_{0(20)} = 1250,26 \text{ pg/ml (1156,36; 1344,16)}$$

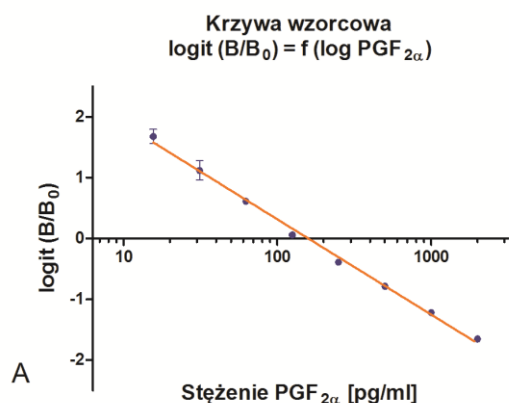
$$B/B_{0(50)} = 170,22 \text{ pg/ml (162,37; 178,07)}$$

$$B/B_{0(80)} = 23,17 \text{ pg/ml (20,45; 25,89)}$$

## WYKRES 12.9-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku **N2** z **COX-1**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2.



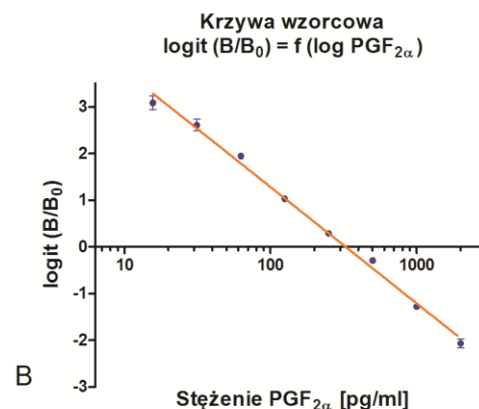
$$\text{logit}(B/B_0) = -1,57 (\pm 0,07) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,45 (\pm 0,17)$$

$$R^2 = 0,9939 \quad R = 0,9969$$

$$B/B_{0(20)} = 1213,39 \text{ pg/ml (1128,50; 1335,28)}$$

$$B/B_{0(50)} = 158,49 \text{ pg/ml (140,14; 176,84)}$$

$$B/B_{0(80)} = 20,70 \text{ pg/ml (18,48; 22,92)}$$



$$\text{logit}(B/B_0) = -2,49 (\pm 0,12) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 6,26 (\pm 0,28)$$

$$R^2 = 0,9940 \quad R = 0,9970$$

$$B/B_{0(20)} = 1177,61 \text{ pg/ml (1088,18; 1267,04)}$$

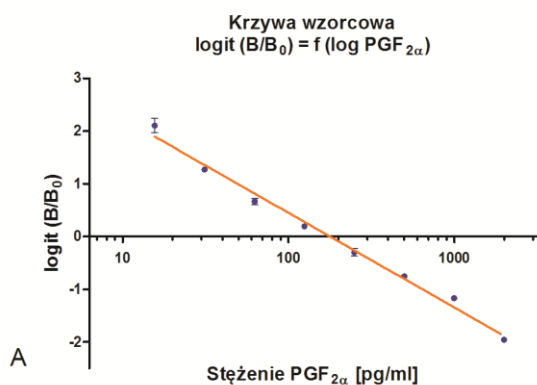
$$B/B_{0(50)} = 326,59 \text{ pg/ml (310,41; 342,77)}$$

$$B/B_{0(80)} = 90,57 \text{ pg/ml (85,77; 95,37)}$$

## WYKRES 12.10-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku **N2** z **COX-2**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2.



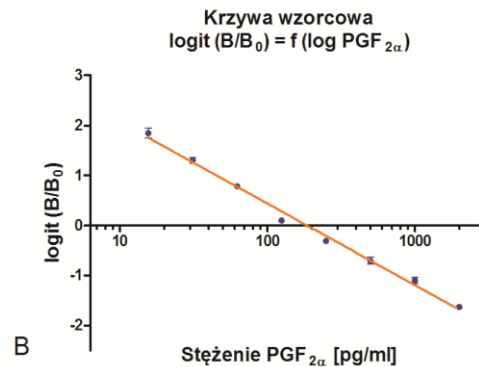
$$\text{logit}(B/B_0) = -1,79 (\pm 0,11) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 4,04 (\pm 0,27)$$

$$R^2 = 0,9878 \quad R = 0,9939$$

$$B/B_{0(20)} = 1056,82 \text{ pg/ml} (963,96; 1175,36)$$

$$B/B_{0(50)} = 178,24 \text{ pg/ml} (154,49; 205,83)$$

$$B/B_{0(80)} = 30,06 \text{ pg/ml} (26,22; 33,91)$$



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,63 (\pm 0,09) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,70 (\pm 0,21)$$

$$R^2 = 0,9912 \quad R = 0,9956$$

$$B/B_{0(20)} = 1312,20 \text{ pg/ml} (1198,98; 1452,57)$$

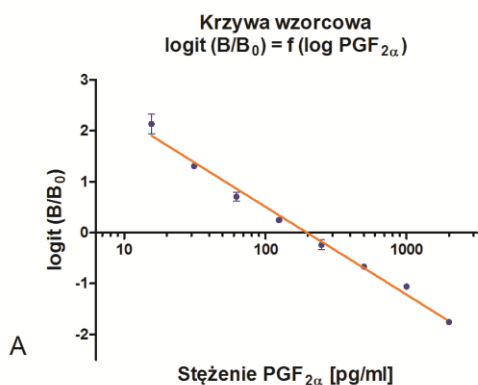
$$B/B_{0(50)} = 185,35 \text{ pg/ml} (164,25; 209,51)$$

$$B/B_{0(80)} = 26,36 \text{ pg/ml} (23,17 - 29,25)$$

## WYKRES 12.11-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku **N6** i **CELEKOKSYBU** z **COX-1**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2.



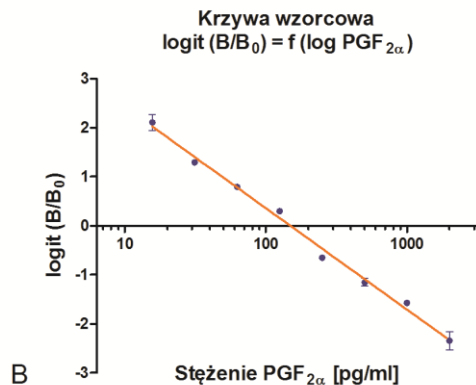
$$\text{logit}(B/B_0) = -1,73 (\pm 0,12) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 3,96 (\pm 0,29)$$

$$R^2 = 0,9866 \quad R = 0,9933$$

$$B/B_{0(20)} = 1250,26 \text{ pg/ml} (1123,67; 1415,32)$$

$$B/B_{0(50)} = 197,24 \text{ pg/ml} (169,93; 229,46)$$

$$B/B_{0(80)} = 31,05 \text{ pg/ml} (26,94; 35,14)$$



$$\text{logit}(B/B_0) = -2,07 (\pm 0,11) * \log \text{PGF}_{2\alpha} + 4,49 (\pm 0,26)$$

$$R^2 = 0,9918 \quad R = 0,9959$$

$$B/B_{0(20)} = 698,23 \text{ pg/ml} (659,54; 743,04)$$

$$B/B_{0(50)} = 149,28 \text{ pg/ml} (132,37; 167,57)$$

$$B/B_{0(80)} = 31,84 \text{ pg/ml} (28,56; 35,08)$$

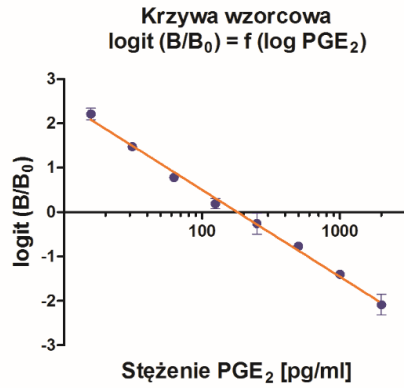
## WYKRES 12.12-suplement

Krzywe wzorcowe  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku **N6** i **CELEKOKSYBU** z **COX-2**.

krzywa A – pomiar nr 1, krzywa B – pomiar nr 2.

**12.7. Oznaczenie aktywności biologicznej związku nr N1 – badanie *in vitro***  
 – ocena stopnia hamowania syntezy PGE<sub>2</sub> w linii komórkowej MCF-7 (ETAP VII)

Wykres i parametry krzywej wzorcowej



$$\text{logit}(B/B_0) = -1,96 (\pm 0,13) * \log \text{PGE}_2 + 4,43 (\pm 0,32)$$

$$R^2 = 0,9861 \quad R = 0,9930$$

$$B/B_0_{(20)} = 920,45 \text{ pg/ml} (833,38; 1007,52)$$

$$B/B_0_{(50)} = 180,72 \text{ pg/ml} (174,06; 187,38)$$

$$B/B_0_{(80)} = 35,48 \text{ pg/ml} (30,80; 40,16)$$

WYKRES 12.13-suplement

Krzywa wzorcowa  $\text{logit}(B/B_0) = f(\log \text{PGE}_2)$  do obliczenia stężenia PGE<sub>2</sub> w supernatancie komórkowym – po inkubacji komórek MCF-7 ze związkiem nr N1.

**WYKAZ RYCIN**

RYCINA 7.1-suplement	
Procedura przygotowania stężeń prostaglandyn do krzywej wzorcowej. ....	10
RYCINA 7.2-suplement	
Wzór oznakowania 96-dołkowej płytki do oznaczania aktywności inhibitorów COX oraz zdjęcie płytki po inkubacji z odczynnikiem Ellman'a. ....	13
RYCINA 11.1-suplement	
Wzór 96-dołkowej płytki do oznaczania stężenia PGE <sub>2</sub> w supernatancie komórkowym. ....	27
RYCINA 12.1-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-chloro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	35
RYCINA 12.2-suplement	
Widmo <sup>1</sup> H NMR dla 4-chloro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	36
RYCINA 12.3-suplement	
Widmo <sup>13</sup> C NMR dla 4-chloro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	37
RYCINA 12.4-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	38
RYCINA 12.5-suplement	
Widmo <sup>1</sup> H NMR dla 4-nitro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	40
RYCINA 12.6-suplement	
Widmo <sup>13</sup> C NMR dla 4-nitro-4'-hydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	40
RYCINA 12.7-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-chloro-4'-karboksymetylometokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	42
RYCINA 12.8-suplement	
Widmo IR dla 4-chloro-4'-karboksymetylometokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	43
RYCINA 12.9-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-4'-etokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	45
RYCINA 12.10-suplement	
Widmo IR dla 4-nitro-4'-etokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	46
RYCINA 12.11-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-4'-karboksymetylometokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	48
RYCINA 12.12-suplement	
Widmo IR dla 4-nitro-4'-karboksymetylometokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	49
RYCINA 12.13-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-3',4',5'-trihydrokso- <i>trans</i> -stilbenu. ....	51



---

RYCINA 12.14-suplement	
Widmo $^1\text{H}$ NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	52
RYCINA 12.15-suplement	
Widmo $^{13}\text{C}$ NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	53
RYCINA 12.16-suplement	
Widmo IR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	54
RYCINA 12.17-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	56
RYCINA 12.18-suplement	
Widmo $^1\text{H}$ NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	57
RYCINA 12.19-suplement	
Widmo $^{13}\text{C}$ NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	58
RYCINA 12.20-suplement	
Widmo IR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	59
RYCINA 12.21-suplement	
Widmo ESI-MS dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	61
RYCINA 12.22-suplement	
Widmo $^1\text{H}$ NMR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	62
RYCINA 12.23-suplement	
Widmo $^{13}\text{C}$ NMR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	63
RYCINA 12.24-suplement	
Widmo IR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	64

**WYKAZ TABEL**

TABELA 7.1-suplement	
Uproszczony schemat dodawania reagentów do poszczególnych dołków.....	13
TABELA 11.1-suplement	
Uproszczony schemat dodawania reagentów do poszczególnych dołków.....	26
TABELA 12.1-suplement	
Charakterystyka widm <sup>1</sup> H NMR oraz <sup>13</sup> C NMR dla 4-chloro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	35
TABELA 12.2-suplement	
Charakterystyka widm <sup>1</sup> H NMR oraz <sup>13</sup> C NMR dla 4-nitro-4'-hydroksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	39
TABELA 12.3-suplement	
Charakterystyka widma IR dla 4-chloro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	43
TABELA 12.4-suplement	
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-4'-etoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	46
TABELA 12.5-suplement	
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-4'-karboksymetylometoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	49
TABELA 12.6-suplement	
Charakterystyka widm <sup>1</sup> H NMR oraz <sup>13</sup> C NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	51
TABELA 12.7-suplement	
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-3',4',5'-trihydroksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	54
TABELA 12.8-suplement	
Charakterystyka widm <sup>1</sup> H NMR oraz <sup>13</sup> C NMR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	56
TABELA 12.9-suplement	
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-3',4',5'-trimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	59
TABELA 12.10-suplement	
Charakterystyka widm <sup>1</sup> H NMR oraz <sup>13</sup> C NMR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu. ....	61
TABELA 12.11-suplement	
Charakterystyka widma IR dla 4-nitro-3',4'-dimetoksy- <i>trans</i> -stilbenu.....	64

## WYKAZ WYKRESÓW

WYKRES 7.1-suplement	
Krzywa liniowa $\text{logit}(B/B_0) = f[\log(\text{stężenie PG})]$ .	13
WYKRES 12.1-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ – badanie przesiewowe z COX-1	29
WYKRES 12.2-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ – badanie przesiewowe z COX-2	30
WYKRES 12.3-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku Z5 z COX-1.	30
WYKRES 12.4-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku Z5 z COX-2.	31
WYKRES 12.5-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związków Z9 i Z11 z COX-1.	31
WYKRES 12.6-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związków Z9 i Z11 z COX-2.	32
WYKRES 12.7-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N1 z COX-1.	65
WYKRES 12.8-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N1 z COX-2.	65
WYKRES 12.9-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N2 z COX-1.	66
WYKRES 12.10-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N2 z COX-2.	66
WYKRES 12.11-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N6 i CELEKOKSYBU z COX-1.	67
WYKRES 12.12-suplement	
Krzywe wzorcowe $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGF}_{2\alpha})$ : reakcje związku N6 i CELEKOKSYBU z COX-2.	67
WYKRES 12.13-suplement	
Krzywa wzorcowa $\text{logit}(B/B_0) = f(\log\text{PGE}_2)$ do obliczenia stężenia $\text{PGE}_2$ w supernatancie komórkowym – po inkubacji komórek MCF-7 ze związkiem nr N1.	68

**PIŚMIENNICTWO**

1. Cayman Chemical Company (USA): COX (ovine/human) Inhibitor Screening Assay Kit (nr katalogowy 560131).  
<https://www.caymanchem.com/pdfs/560131.pdf>  
(data wejścia: 25.09.2014)
2. Analytical Methods Committee: Evaluation of analytical instrumentation. Part XIX: CHNS elemental analysers. *Accred Qual Assur.* 2006; 11(11): 569-576
3. Stanford Research Systems, Labo Plus: Digi-Melt – manualny aparat do pomiaru temperatury topnienia. <http://www.laboplus.pl/images/stories/SRS/MPA161.pdf> (data wejścia: 14.10.2015)
4. Young Han S, Suck Lee H, Hye Choi D i wsp.: Efficient total synthesis of piceatannol via (E)-selective Wittig-Horner reaction. *Synthetic Communications* 2009; 39(8): 1425-1432
5. Xu JH, Wei JP, Hao Z i wsp.: Highly double selective nitration of nitrostilbenes over zeolite. *Chem Commun (Camb)*. 2014; 50(73): 10710-10713
6. Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ: Spectrometric identification of organic compounds. 7<sup>th</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc. USA, Nowy Jork. 2005; 1-502
7. Cayman Chemical Company (USA): Prostaglandin E<sub>2</sub> Express EIA Kit (nr katalogowy 500141).  
<https://www.caymanchem.com/pdfs/500141.pdf>  
(data wejścia: 16.02.2015)