

# ANALIZA CHEMOMETRYCZNA AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ POCHODNYCH IMIDAZOAKRYDONU I TRIAZOLOAKRYDONU

Adela Olejniczak

*Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk*

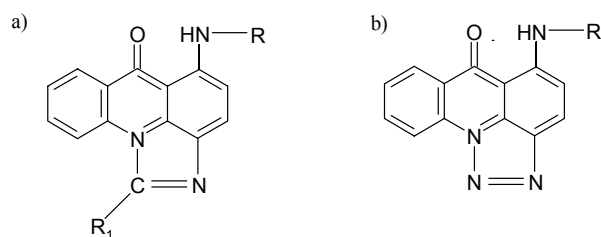
## 1 WSTĘP

Jak dotąd najbardziej rozpowszechnioną metodą leczenia nowotworów jest chirurgiczne usunięcie zmienionej tkanki. Jednakże w przypadku białaczek oraz guzów umieszczonych w miejscach niedostępnych nie jest to możliwe. Ponadto ten sposób leczenia skuteczny jest tylko po szybkiej diagnozie lekarskiej, przed powstaniem przerzutów.

W przeciwnym wypadku muszą być zastosowane inne metody leczenia takie jak radioterapia, chemoterapia czy immunoterapia. Radioterapia, czyli naświetlanie promieniowaniem jonizującym jest metodą wspomagającą. Natomiast immunoterapia znajduje się jeszcze w fazie badań. Dlatego główną formą leczenia pozostaje chemoterapia, czyli zastosowanie związków chemicznych do zniszczenia komórek nowotworowych. Ze względu na brak jakościowych różnic w biochemii komórek zmienionych i niezmienionych nowotworowo wciąż nie ma skutecznych leków przeciwnowotworowych. Poszukiwania nowych chemoterapeutyków prowadzi się różnymi metodami: metodą przesiewową, badając zależności struktura - aktywność (SAR) lub badając ilościowe zależności struktura - aktywność (QSAR). Najprostszą i najstarszą techniką jest metoda przesiewowa, która polega na badaniu możliwie szerokiego zestawu potencjalnie aktywnych substancji. Mogą to być związki syntetyzowane w laboratoriach chemicznych lub pochodzące ze źródeł naturalnych. Wszystkie potencjalne chemoterapeutyki wymagają przetestowania aktywności, co prowadzi do wyeliminowania substancji nieaktywnych lub silnie toksycznych.

Stosowanie badań przesiewowych jest bardzo mało wydajne, gdyż, jak wynika z danych statystycznych, zaledwie jedna substancja na kilka tysięcy przebadanych dociera do poziomu badań klinicznych i ma szansę zostać lekiem. Żmudne syntezy wymagają bardzo dużego nakładu pracy, środków, a przede wszystkim czasu, dlatego ważną dziedziną stało się racjonalne projektowanie leków. Poznanie i zrozumienie efektów działania związków biologicznie czynnych w zależności od ich struktury i właściwości fizykochemicznych pozwala wydatnie skrócić czas niezbędny do opracowania nowego leku.

Praca niniejsza jest próbą określenia takich zależności w serii pochodnych imidazoakrydonu i triazoloakrydonu zsyntetyzowanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej w Zespole kierowanym przez prof. dr hab. inż. Jerzego Konopę.



Rys. 1. Ogólne struktury imidazoakrydonu a) i triazoloakrydonu b).

Zainteresowanie tymi związkami bierze się stąd, że jedna z pochodnych, o symbolu C-1311, wykazuje bardzo dużą aktywność przeciwnowotworową i znajduje się obecnie na etapie badań klinicznych [1].

## 2 CEL PRACY

W trakcie testowania potencjalnych związków przeciwnowotworowych w Narodowym Instytucie Raka (NCI) w Bethesda (USA) oznaczana jest aktywność cytotoksyczna w stosunku do kilkudziesięciu linii komórkowych pochodzących z kilku typów nowotworów ludzkich. Dysponując wynikami takich oznaczeń dla serii podobnych strukturalnie związków można pokusić się o określenie ilościowych zależności pomiędzy aktywnościami tych związków a ich budową chemiczną. Klasyczne metody QSAR, takie jak metoda Free-Wilsona i metoda Hanscha, nie są jednak przystosowane do analizy zależności struktura – aktywność w przypadku, gdy ta aktywność opisana jest licznym zestawem testów biologicznych. Wydaje się, że zastosowanie zaawansowanych technik chemometrycznych, takich jak analiza podobieństwa i/lub analiza głównych składowych powinna ułatwić rozwiązanie tego problemu.

Celem mojej pracy dyplomowej było wykazanie, czy analiza chemometryczna wielowymiarowych danych biologicznych ułatwia określenie ilościowych zależności struktura – aktywność. Cel ten zamierzałam osiągnąć poddając analizie podobieństwa i analizie głównych składowych wyniki oznaczeń cytotoksyczności uzyskane w NCI dla serii pochodnych akrydonu zsyntetyzowanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej. Miałam podstawy przypuszczać, że analiza głównych składowych doprowadzi do wyodrębnienia kilku niezależnych miar aktywności biologicznych badanych pochodnych. O ile miarom takim można będzie nadać sensowną interpretację biologiczną zamierzałam dla każdej z nich określić ilościowe zależności struktura – aktywność wykorzystując klasyczne metody QSAR.

## 3 PRZEBIEG OBLICZEŃ

Dane surowe dotyczące aktywności biologicznej związków wyrażane są zwykle jako wartości stężeń wywołujących standardową odpowiedź biologiczną np. 50% zahamowanie wzrostu komórek ( $GI_{50}$ ). Takie wielkości posiadają jednak szereg wad i powinny być poddane następującej transformacji:

$$pGI_{50} = \log 1/GI_{50} = -\log GI_{50} \quad (3.1)$$

Uzyskana w ten sposób miara aktywności biologicznej jest bardziej użyteczna do analizy chemometrycznej, gdyż charakteryzuje się rozkładem oznaczeń zbliżonym do normalnego, a związki aktywne mają wysokie wartości miary aktywności.

Przedmiotem analizy jest macierz danych zawierająca wartości  $m$  zmiennych (testów aktywności) określonych dla każdego z  $n$  obiektów (związków). Przed rozpoczęciem właściwej analizy należy poddać ją wstępnej obróbce. Na etapie kompletowania danych trzeba zadbać, aby nie zawierała ona żadnych pustych miejsc. Tabelę danych poddaje się następnie odpowiednim transformacjom, mającym na celu ułatwienie dalszej analizy. Najczęściej wykonuje się standaryzację czyli tzw. autoskalowanie zgodnie ze wzorem:

$$z_{ji} = \frac{x_{ji} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (3.2)$$

gdzie:

$z_{ji}$  - standaryzowana wartość cechy  $i$  dla związku  $j$

$\bar{x}_{ji}$  - początkowa wartość cechy

$x_i$  - średnia wartość cechy  $i$

$s_i$  - odchylenie standardowe cechy  $i$

W wyniku tak przeprowadzonej transformacji zmiennych wariancje wszystkich cech są równe 1, a średnie równe 0. Dzięki temu uzyskuje się ujednoczenie wpływu wszystkich zmiennych na obraz relacji pomiędzy obiektami badań.

### 3.1 Analiza podobieństwa

Jej celem jest określenie relacji pomiędzy obiektami analizowanych danych oraz zmiennymi opisującymi te obiekty. Bazuje na pojęciu odległości obiektów lub zmiennych w wielowymiarowej przestrzeni zmiennych objaśniających. Przyjmuje się, że obiekty położone blisko siebie wykazują wzajemne podobieństwo. Podejście takie pozwala dokonać podziału obiektów lub cech na grupy charakteryzujące się dużym stopniem podobieństwa [2, 3].

Konieczne jest więc zdefiniowanie odległości pomiędzy obiektami badań w zależności od rodzaju analizy. Możemy bowiem badać podobieństwo obiektów ze względu na wartości cech

oraz podobieństwo cech (testów) dla danego zestawu obiektów.

W przypadku analizy przestrzeni testów miarą odległości była odległość tangensowa, a w przestrzeni związków odległość euklidesowa. Otrzymana macierz odległości została wykorzystana do analizy wiązkowej. Odpowiednie diagramy wiązkowe wykonałam z zastosowaniem metody Warda. W celu ich obiektywnego podziału posłużyłam się wykresami przebiegu aglomeracji. Jako miejsce podziału diagramu przyjął odległość, przy której nastąpił wyraźny skok wartości.

### 3.2 Analiza głównych składowych

Wykorzystując analizę głównych składowych można uzyskać prezentację graficzną zależności wielowymiarowych. Ponadto pozwala ona na zredukowanie wymiarowości problemu w przypadku, gdy zmienne są silnie skorelowane. Dzięki kombinacjom liniowym zmiennych objaśniających uzyskuje się główne składowe. Zazwyczaj kilka pierwszych z nich objaśnia większość zmienności oryginalnego zestawu danych [4].

Liczba istotnych głównych składowych została określona według dwóch kryteriów. Pierwsze z nich to kryterium zasobu zmienności, w którym brałam pod uwagę wartości własne większe od 1. Drugie kryterium to wykres ospiska. Za ostatnią istotną składową wybrałam tą, po której następował gwałtowny spadek wartości własnej.

Przeprowadziłam analizę przestrzeni cech oraz analizę przestrzeni obiektów, a następnie utworzyłam mapy nieliniowe. Początkowe rozmieszczenie punktów wyznaczyłam metodą standardową Guttmana–Lingoesa.

### 3.3 Analiza zależności struktura - aktywność

Analizę zależności pomiędzy strukturą a aktywnością badanych związków przeprowadziłam metodą Hanscha oraz metodą Free-Wilsons.

Metoda Free-Wilsons [5] oparta jest na założeniu o addytywności wpływu podstawników tzn., że dany podstawnik w danym miejscu cząsteczki ma zawsze taki sam wpływ na aktywność biologiczną niezależnie od obecności innych podstawników w innych miejscach. Przyjmując słuszność tego założenia można

zbudować matematyczny model analizowanej zależności:

$$A_i = \sum_j a_j X_{ij} + \mu_0$$

i - numer związku

j - numer podstawnikopozycji

$A_i$  - odpowiedź biologiczna dla i- tego związku

$a_j$  - wkład podstawnikopozycji do aktywności

$X_{ij}$  - obecność podstawnikopozycji j w związku i.

Ponieważ ten sam podstawnik umieszczony w różnych pozycjach może wywierać różny wpływ na aktywność, więc należy określić niezależnie wpływ danego podstawnika w każdej z pozycji, w której może występować. Takie połączenie podstawnika z pozycją w strukturze bazowej, w której występuje nazywa się podstawnikopozycją. Ponieważ model zaproponowany przez Free i Wilsona jest liniowy ze względu na nieznanne wartości  $a_j$  można więc go zidentyfikować przy pomocy metody regresyjnej. Macierzą wejściową była tabela podstawnikopozycji.

Metoda Hanscha [6, 7, 8, 9] oparta jest na założeniu, że o aktywności biologicznej decydują właściwości fizykochemiczne związków [10]. Tak więc do opisu zależności struktura – aktywność konieczne są trzy parametry: lipofilowy, elektronowy i steryczny.

Pełne równanie Hanscha ma postać:

$$\log A = a_0 + a_1 L + a_2 L^2 + a_3 E + a_4 S$$

1 Parametr lipofilowy L opisuje zdolność związku do przenikania przez błony biologiczne, charakteryzuje właściwości transportowe i resorpcyjne związku. W pracy zastosowałam logarytm ze współczynnika podziału  $\log P$  [11] obliczony zgodnie ze wzorem:

$$\log P = \sum_{i=1}^n a_i f_i \quad (3.3)$$

$f_i$  - stała hydrofobowa fragmentu i [12]

$a_i$  - ilość fragmentów i w cząsteczce

n - łączna liczba fragmentów w cząsteczce

2 Parametr elektronowy E określa zależność pomiędzy zmianami energii swobodnej wywołanej wprowadzeniem podstawnika w pochodnych kwasu benzoowego a jego powinowactwem elektronowym [13]. W pra-

cy parametrem elektronowym w zależności od rodzaju pochodnych była stała Hammeta  $\sigma$  w przypadku imidazoakrydonów oraz stała indukcyjna  $F$  i rezonansowa  $R$  w przypadku triazoloakrydonów [14].

3 Parametr steryczny  $S$  opisuje geometrię cząsteczki, a w szczególności zawadę przestrzenną w sąsiedztwie miejsc reaktywnych. W pracy zastosowałam indeksy Kiera [15, 16, 17]:

$^0\kappa$ – wskaźnik symetrii [15], jego wartość spada ze wzrostem symetrii cząsteczki

$^1\kappa$ – wskaźnik wielkości [17], obecność w cząsteczce fragmentów cyklicznych obniża wartość indeksu i to tym bardziej, im więcej jest pierścieni

$^2\kappa$ – wskaźnik linearności [16] określa stopień rozgałęzienia i sferyczność cząsteczki. Przyjmuje największe wartości dla struktur liniowych, nierozgałęzionych.

$^3\kappa$ – wskaźnik centralności rozgałęzienia [17], jego wartość zależy od obecności i lokalizacji rozgałęzienia w strukturze niecyklicznej, najmniejsza jest dla cząsteczek, w których rozgałęzienie pojawia się na atomie centralnym.

Obliczenia przeprowadziłam w oparciu o program *STATISTICA*.

## 4 WYNIKI

### 4.1 Przygotowanie danych

W mojej pracy korzystałam z wyników testowania związków przeciwnowotworowych w Narodowym Instytucie Raka w Bethesda w USA. Dysponowałam protokołami dla 21 pochodnych imidazoakrydonu i 17 pochodnych triazoloakrydonu. Każdy protokół zawierał informacje o 60 liniach komórkowych.

Tabela 1. Struktury chemiczne 31 analizowanych związków.

Nr związku	X	R <sub>1</sub>	R'	R''	n	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
C-1176	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1213	C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1246	C	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1263	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	OH	-
C-1311	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	OH	-
C-1330	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1335	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1336	C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1371	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1374	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1415	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1419	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	-	OH
C-1423	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	-	-
C-1545	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
C-1233	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1244	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	-	-
C-1287	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	NO <sub>2</sub>	-
C-1288	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	NO <sub>2</sub>	-
C-1289	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1291	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1293	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	OH	-
C-1295	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	CH <sub>3</sub>	-
C-1296	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	CH <sub>3</sub>	-	-
C-1298	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1300	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	Cl	-
C-1301	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	Cl	-
C-1303	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	OH	-
C-1304	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	OH	-
C-1305	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1380	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1428	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	3	-	OH	-

Wyniki testowania przedstawione były w postaci stężeń związków, przy których następuje 50% zahamowanie wzrostu komórek ( $GI_{50}$ ). Macierz zawierająca wyniki dla 38 związków i 70 testów stanowiła dane surowe w mojej pracy.

Tabela 2. Lista 23. uwzględnionych testów aktywności cytotoksycznej oraz ich przynależność do poszczególnych typów nowotworów.

LINIA KOMÓRKOWA	PANEL TYPU NOWOTWORU
OVCAR-3	Nowotwory jajnika
OVCAR-4	
OVCAR-5	
IGROV1	
SK-OV-3	
UACC-257	Czerniaki
SK-MEL28	
KM12	Nowotwory okrężnicy
HCT-15	
RPMI-822	Białaczki
MOLT-4	
HL-60-TB	
NCI-H23	Nowotwory płuc
NCI-H226	
NCI-H460	
NCI-H522	
HOP-62	
A549-ATC	
A786-0	
ACHN	
SN12C	
CAKI-1	
A498	
A498	

Dane surowe poddałam transformacji zgodnie ze wzorem 3.1. Uzyskana macierz zawierała jednak wiele pustych miejsc, gdyż nie wszystkie związki były badane na tych samych liniach. Usunęłam więc linie komórkowe, na których badana była mała liczba związków oraz związki badane na nietypowych liniach. Uzyskana w ten sposób macierz danych zawierała 46 testów i 31 związków.

Dla niektórych związków dysponowałam powtórzeniami wartości aktywności cytotoksycznej. Mogłam więc obliczyć odchylenia standardowe pojedynczego pomiaru dla poszczególnych testów. Testy, dla których błąd oznaczeń był większy lub porównywalny ze zmiennością, nie wnoszą żadnej użytecznej informacji do zależności struktura - aktywność. Dlatego zostały usunięte z analizy. Ostatecznie więc pracowałam na 23 testach i 31 związkach, wśród których było 14 pochodnych imidazo-

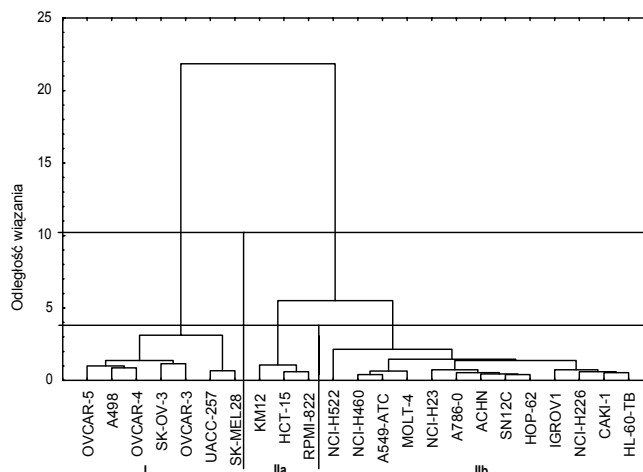
akrydonu i 17 pochodnych triazoloakrydonu. (tabela 1, 2).

Uzyskaną macierz danych poddałam standaryzacji zgodnie ze wzorem 3.2. Tak przygotowane dane stanowiły przedmiot dalszej analizy chemometrycznej.

## 4.2 Analiza podobieństwa

### 4.2.1 Analiza przestrzeni testów

Uzyskany diagram podobieństwa testów przedstawiony jest na rys. 2. Widać na nim wyraźnie, że zbiór analizowanych testów ma charakterystyczną wewnętrzną strukturę, wskazującą na możliwość podzielenia go na bardziej jednorodne grupy.



Rys. 2. Diagram wiązkowy podobieństwa testów otrzymany metodą Warda (odległości tangensowe).

W grupie I znajduje się 7 linii: OVCAR-5, A498, OVCAR-4, SK-OV-3, OVCAR-3, UACC-257, SK-MEL-28. Obejmuje ona prawie wszystkie linie nowotworu jajnika, wszystkie linie czerniaka i jedną (A498) z pięciu linii nowotworu nerki.

Najmniej liczna grupa IIa obejmuje wszystkie analizowane linie nowotworu okrężnicy (KM12 i HCT-15) oraz RPMI822 z panelu białaczek obejmującego 3 linie.

W grupie IIb znajdują się linie: NCI-H522, NCI-H460, A549/ATCC, MOLT-4, NCI-H23, A786-0, ACHN, SN12C, HOP-62, IGROV-1, NCI-H226, CAKI-1, HL-60-TB. Pochodzą one z czterech różnych typów nowotworów: nerki, jajnika, płuc i białaczek. Są to wszystkie linie nowotworu płuc, dwie z trzech linii białaczek,



Tabela 5. Struktury chemiczne związków z grupy B1.

Nr związku	X	R <sub>1</sub>	R'	R''	n	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
C-1428	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	3	-	OH	-
C-1304	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	OH	-
C-1287	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	NO <sub>2</sub>	-
C-1295	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	CH <sub>3</sub>	-
C-1291	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1545	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Tabela 6. Struktury chemiczne związków z grupy B2.

Nr związku	X	R <sub>1</sub>	R'	R''	n	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
C-1300	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	Cl	-
C-1233	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1289	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1296	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	CH <sub>3</sub>	-	-
C-1419	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	-	OH
C-1415	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1244	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	-	-
C-1423	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	2	-	-	-
C-1176	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-
C-1298	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1213	C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	-	-

Tabela 7. Struktury chemiczne związków z grupy B3.

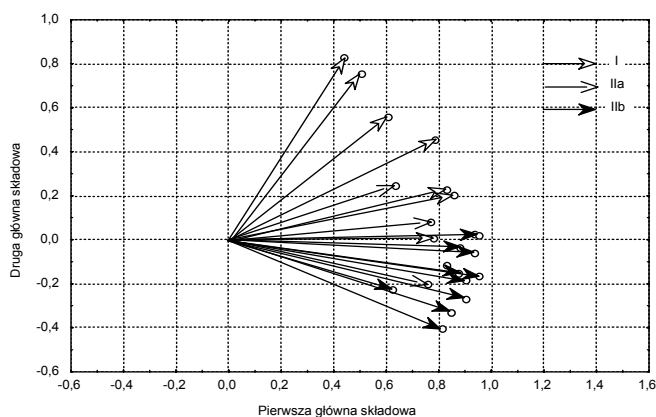
Nr związku	X	R <sub>1</sub>	R'	R''	n	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>
C-1293	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	-	OH	-
C-1303	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	2	-	OH	-
C-1305	N	-	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1330	C	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1374	C	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OCH <sub>3</sub>	-
C-1380	N	-	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-
C-1336	C	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3	-	OH	-

### 4.3 Analiza głównych składowych

#### 4.3.1 Analiza przestrzeni testów

Na podstawie utworzonej macierzy korelacji można stwierdzić, że występuje znaczna redundancja informacji w zestawie danych.

Do zobrazowania relacji występujących pomiędzy analizowanymi testami wykorzystano trzy pierwsze główne składowe. Pierwsza główna składowa zawiera ponad 64% zmienności zawartej w danych, druga 11%, a więc razem wyjaśniają 76% informacji. Trzecia główna składowa zawiera prawie 7% zmienności. Tak więc trzy pierwsze główne składowe wyjaśniają razem prawie 83% informacji zawartej w danych. Uzyskane wyniki zostały przedstawione na wykresach 6. i 7., obrazujących rozmieszczenie wektorów kierunkowych testów w płaszczyźnie głównych składowych.



Rys. 6. Rozmieszczenie wektorów kierunkowych testów aktywności cytotoksycznej w płaszczyźnie dwóch pierwszych głównych składowych. Grupy wydodrębnione przy pomocy analizy podobieństwa zaznaczono różnymi strzałkami.



ne w systemie zero-jedynkowym. Cyfra 1 oznacza obecność danej podstawnikopozycji, a 0 jej brak w danym związku. Łączna liczba podstawnikopozycji w analizowanej serii pochodnych wynosi 15. Tak skonstruowana macierz danych nie mogła być jednak użyta do obliczeń regresyjnych, ponieważ niektóre podstawnikopozycje pojawiają się tylko raz. Dlatego usunęłam z zestawu związki o nietypowej strukturze (tabela 1). tj.: C-1296, C-1246, C-1545, C-1423, C-1419, C-1213, C-1336 i C-1287. Ponadto pogrupowałam różne podstawniki znajdujące się w tej samej pozycji w jedną zbiorczą podstawnikopozycję. Tak powstała np. podstawnikopozycja „R<sub>8</sub>inne”.

W przypadku gdy dany element struktury występuje tylko w dwóch wersjach, (np. X z nagłówka tabeli 1) odpowiadające mu podstawnikopozycje są liniowo zależne ( $r=1$ ) i tylko jedna z nich może być użyta w modelu regresyjnym. Ostatecznie do opisu 23 związków

zastosowałam 7 następujących podsta-wnikopozycji (tabela 8):

XC=1 - imidazoakrydon,

XC=0 - triazoloakrydon

R'Me - obecność grupy dimetyloaminowej w łańcuchu bocznym

R'Et - obecność grupy dietyloaminowej w łańcuchu

R'EtOH - obecność grupy hydroksyetyloaminowej w łańcuchu

n2=1 - dwie grupy metylenowe pomiędzy atomami azotu w łańcuchu, n2=0 - trzy grupy metylenowe pomiędzy atomami azotu w łańcuchu

R<sub>8</sub>OH - grupa hydroksylowa w pozycji 8.

R<sub>8</sub>inne – grupametylowa, metoksylova, nitrova lub atom chloru w pozycji 8

Ponadto włączyłam do analizy dodatkowy parametr opisujący lipofilowość związków (L). Jest on równy ilości atomów węgla w łańcuchu bocznym.

Tabela 8. Macierz podstawnikopozycji dla badanych pochodnych imidazoakrydonu i triazoloakrydonu oraz trzy miary ich aktywności.

Symbol związku	X	R'			n	R <sub>8</sub>		L	GS1	GS2	GS3
	C	Me	Et	EtOH	2	OH	Inne				
C-1176	1	1	0	0	1	0	0	4	0,075	-1,090	-0,107
C-1233	0	1	0	0	1	0	0	4	-0,332	-1,034	-0,068
C-1244	0	0	0	1	1	0	0	4	0,313	-1,224	-0,205
C-1263	1	1	0	0	1	1	0	4	1,672	0,459	-0,280
C-1288	0	1	0	0	0	0	1	5	1,060	-1,020	0,556
C-1289	0	0	1	0	1	0	0	6	-0,574	-0,949	0,074
C-1291	0	0	1	0	1	0	1	6	-1,154	0,316	0,658
C-1293	0	0	1	0	1	1	0	6	0,134	1,191	1,443
C-1295	0	0	1	0	1	0	1	6	-1,425	0,202	0,389
C-1298	0	1	0	0	1	0	1	4	-0,014	-0,624	0,531
C-1300	0	1	0	0	1	0	1	4	-0,382	-0,611	0,066
C-1301	0	0	0	1	1	0	1	4	0,808	-1,646	0,464
C-1303	0	1	0	0	1	1	0	4	-0,188	0,554	0,562
C-1304	0	0	0	1	1	1	0	4	-0,656	-0,352	-2,447
C-1305	0	1	0	0	0	1	0	5	-0,288	1,045	0,699
C-1311	1	0	1	0	1	1	0	6	2,608	1,419	0,256
C-1330	1	0	1	0	0	0	1	7	-0,045	0,707	1,164
C-1335	1	0	1	0	0	1	0	7	1,349	1,990	-1,597
C-1371	1	1	0	0	0	1	0	5	1,880	0,674	-1,595
C-1374	1	1	0	0	0	0	1	5	-0,095	0,807	1,607
C-1380	0	0	1	0	0	1	0	7	-0,923	1,200	-0,248
C-1415	1	0	1	0	1	0	0	6	-0,505	-0,717	-0,689
C-1428	0	0	0	1	0	1	0	5	-1,589	0,536	-2,814

GS1 – uogólniona aktywność cytotoksyczna

GS2 – aktywność przeciwczierniakowa

GS3 – aktywność w stosunku do nowotworu okrężnicy

Analizy przeprowadziłam dla całej serii związków oraz oddzielnie dla pochodnych imidazoakrydonu i triazoloakrydonu, aby lepiej wyodrębnić relacje w obu grupach związków. Badałam zależności pomiędzy strukturą a aktywnością uogólnioną, a także aktywnością przeciwczeraniakową i aktywnością przeciw nowotworom okrężnicy.

1 Uogólniona aktywność cytotoksyczna (GS1).

W przypadku imidazoakrydonów uzyskałam dość dobre równanie:

Imidazoakrydony	N=8	F=46,82	s=0,42	R <sup>2</sup> =0,87	p<0,00048
GS1=-0,14(±0,21)+2,02(±0,30)R <sub>8</sub> OH					

Wysoką aktywność tego rodzaju związków determinuje obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8. Najlepsza pochodna w tej serii powinna posiadać aktywność 1,88 (±0,37) (średnia wartości doświadczalnych 1,88(±0,46)). Nie stwierdziłam w tej grupie pochodnych wpływu łańcucha bocznego na GS1.

Natomiast dla całego zestawu triazoloakrydonów nie udało się uzyskać wyraźnych zależności. Dlatego też zbadałam oddzielnie wpływ podstawnika w pozycji 8. W grupie pochodnych zawierających grupy inne niż hydroksylową lub nie podstawionych wcale uzyskałam następującą zależność:

Triazoloakrydony bez 8-OH	N=9	F=14,14	s=0,34	R <sup>2</sup> =0,83	p<0,00708
GS1=1,06(±0,34)-0,81(±0,28)R <sup>'</sup> Et-1,30(±0,39)n <sub>2</sub> +0,80(±0,31)R <sup>'</sup> EtOH					

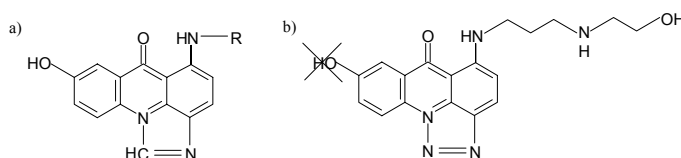
Równanie jest statystycznie istotne, posiada dość wysoką wartość współczynnika determinacji oraz małe odchylenie standardowe. Wynika z niego, że najmniej aktywne są związki zawierające w łańcuchu grupę dietyloaminową bądź też dwa atomy węgla w łańcuchu bocznym. Natomiast grupa hydroksyetyloaminowa i trójwęglowy łącznik pomiędzy atomami azotu zwiększa aktywność związków. Pochodna o optymalnej strukturze, zawierająca łańcuch hydroksyetyloaminopropylowy, powinna posiadać aktywność równą 1,86 (±0,46). W zestawie analizowanych związków nie ma związku o takiej strukturze.

Dla związków zawierających w pozycji 8 podstawniki inne niż hydroksyl otrzymałam następującą zależność:

Triazoloakrydony 8-inne	N=6	F=10,34	s=0,60	R <sup>2</sup> =0,65	p<0,03244
GS1=0,37(±0,30)-1,66(±0,52)R <sup>'</sup> Et					

Równanie jest co prawda statystycznie istotne, jednakże ze względu na małą ilość związków posiada słabe zdolności prognostyczne. Do analizy zostały włączone tylko trzy podstawnikopozycje R<sup>'</sup>Me, R<sup>'</sup>Et i R<sup>'</sup>EtOH, dlatego otrzymane równanie oszacowuje ich wpływ na aktywność związków. Okazuje się, że grupa dietyloaminowa znacznie obniża aktywność. Jednak wśród związków pozbawionych tej grupy nie należy spodziewać się pochodnych o aktywności większej niż 0,37(±0,30). Średnia z wartości doświadczalnych wynosi 0,37(±0,70).

Dla triazoloakrydonów podstawionych w pozycji 8 grupą hydroksylową nie udało mi się uzyskać wyraźnych zależności. Średnia aktywność tej grupy związków wynosi -0,59(±0,61).



Rys. 10. Struktury pochodnych imidazoakrydonu a) i triazoloakrydonu b) o przypuszczalnie najwyższej uogólnionej aktywności cytotosycznej.

2 Aktywność przeciwczeraniakowa (GS2).

Dla wszystkich badanych związków uzyskałam całkiem dobre równanie:

Wszystkie związki	N=23	F=26,93	s=0,42	R <sup>2</sup> =0,83	p<0,00000
GS2=-4,06(±0,59)+1,58(±0,24)R <sub>8</sub> OH+0,59(±0,10)L+0,52(±0,2)R <sup>'</sup> Me+0,52(±0,24)R <sub>8</sub> inne					

Okazuje się, że na ten rodzaj aktywności największy wpływ ma obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8. Najkorzystniejszy wydaje się łańcuch dietyloaminopropylowy. Prognozowana aktywność 8-hydroksy pochodnej z takim łańcuchem wynosi 1,65(±0,64). W badanym zestawie znajdują się dwa związki o takiej strukturze. Ich średnia aktywność przeciwczeraniakowa wynosi 1,60(±0,56). Można ponadto przypuszczać, że 8-hydroksy pochodne z łańcuchem dietyloaminobutylovym powinny wykazywać jeszcze wyższą aktywność przeciwczeraniakową (wartość ekstrapolowana wynosi 2,24). Jednakże w przypadku modelu Free-Wilsona

taka ekstrapolacja obarczona jest znaczną dozą niepewności.

W analizie dla poszczególnych typów pochodnych okazuje się, że wpływ podstawnika w pozycji 8 najważniejszy był dla imidazoakrydonów, natomiast znacznie mniejszy dla triazoloakrydonów.

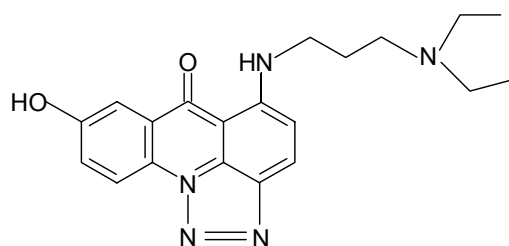
Imidazoakrydony	N=8	F=9,13	s=0,56	R <sup>2</sup> =0,70	p<0,02143
GS2=-0,90(±0,39)+2,04(±0,48)R <sub>8</sub> OH+1,66(±0,56)R <sub>8</sub> inne					

W tej grupie związków ważna jest obecność podstawnika w pozycji 8, który najprawdopodobniej bierze udział w procesie metabolizmu związku w komórce. Korzystniejsza jest przy tym obecność grupy hydroksylowej. Związek o optymalnej strukturze posiada aktywność równą 1,14(±0,62). W analizowanym zestawie związków są cztery pochodne zawierające grupę hydroksylową w pozycji 8. Oszacowana na ich podstawie wartość doświadczalna wynosi 1,14(±0,70).

Dla serii triazoloakrydonów otrzymałam dużo bardziej istotne statystycznie równanie:

Triazoloakrydony	N=15	F=22,52	s=0,40	R <sup>2</sup> =0,82	p<0,00005
GS2=-1,98(±0,60)+1,38(±0,22)R <sub>8</sub> OH+0,29(±0,12)L-1,62(±0,26)R'EtOH					

Na aktywność wpływa obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8. Ponadto korzystny jest łańcuch boczny o dużej liczbie atomów węgla, ale pozbawiony grupy hydroksyetylowej na azocie omega. Obecność grupy hydroksyetylowej na azocie omega drastycznie obniża aktywność. Związek o optymalnej strukturze (rys. 11) powinien posiadać aktywność równą 1,43(±0,70). W badanej grupie związków znajduje się tylko jedna pochodna o takiej strukturze. Jej aktywność wynosi 1,20.



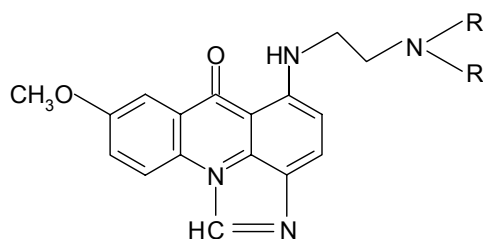
Rys. 11. Struktura pochodnej triazoloakrydonu o przypuszczalnie najwyższej aktywności przeciwczerwieniakowej.

3 Aktywność wobec nowotworów okrężnicy (GS3).

Dobre równanie uzyskałam dla pochodnych imidazoakrydonu. Charakteryzuje się ono wysoką wartością testu F oraz współczynnika determinacji:

Imidazoakrydony	N=8	F=39,76	s=0,33	R <sup>2</sup> =0,92	p<0,00085
GS3=-1,60(±0,24)+2,98(±0,33)R <sub>8</sub> inne+1,39(±0,29)n2					

Grupa metoksylova w pozycji 8 zwiększa aktywność imidazoakrydonów o około trzy jednostki, a obecność dwóch atomów węgla w łańcuchu bocznym o ponad jedną jednostkę. Szacunkowa aktywność pochodnej imidazoakrydonu o optymalnej strukturze (rys. 12) wynosi 2,77(±0,50). W analizowanej grupie związków nie ma pochodnej o podobnej strukturze.



Rys. 12. Struktura pochodnych imidazoakrydonu o przypuszczalnie najwyższej aktywności wobec nowotworów okrężnicy.

Z kolei równanie dla triazoloakrydonów ma niskie wartości testu F i współczynnika determinacji a także zły rozkład reszt, dlatego też przeprowadziłam analizę oddzielnie dla związków posiadających grupę hydroksylową w pozycji 8:

Triazoloakrydony 8-OH	N=6	F=37,24	s=0,61	R <sup>2</sup> =0,88	p<0,00365
GS3=0,61(±0,31)-3,24(±0,53)R'EtOH					

Widać wyraźnie, że aktywność obniża w znacznym stopniu grupa hydroksyetylowa na azocie omega. Związki o optymalnej strukturze, pozbawione tej grupy, powinny posiadać aktywność równą 0,61(±0,31). Średnia wartość doświadczalna wynosi 0,61(±0,69).

Dla pozostałych triazoloakrydonów otrzymałam następujące równanie:

Triazoloakrydony bez 8-OH	N=9	F=14,53	s=0,19	R <sup>2</sup> =0,63	p<0,00662
GS3=-0,07(±0,11)+0,51(±0,13)R <sub>8</sub> inne					

Charakteryzuje się ono małym odchyleniem standardowym i dobrym współczynnikiem determinacji. Najbardziej optymalna struktura

zawiera podstawnik w pozycji 8, a jej aktywność wynosi 0,44(±0,17). Wartość ta pokrywa się z wynikiem doświadczalnym 0,44(±0,21).

Tabela 9. Tablica parametrów fizykochemicznych wszystkich związków.

Symbol związku	logP	(logP) <sup>2</sup>	F	R	σ	<sup>0</sup> κ	<sup>1</sup> κ	<sup>2</sup> κ	<sup>3</sup> κ
<b>C-1176</b>	1,25	1,562	0	0	0	4,068	4,167	2,222	3
C-1233	-0,31	0,096	0	0	-	4,068	4,167	2,222	3
C-1244	-2,38	5,664	0	0	-	3,507	5,143	4,167	3,840
<b>C-1263</b>	0,58	0,336	0,487	-0,643	-0,37	4,068	4,167	2,222	3
C-1288	0,09	0,008	1,109	0,155	-	4,711	5,143	3,061	3,840
C-1289	1,01	1,020	0	0	-	6,016	6,125	3,938	2,813
C-1291	1,06	1,123	0,413	-0,5	-	6,016	6,125	3,938	2,813
C-1293	0,34	0,115	0,487	-0,643	-	6,016	6,125	3,938	2,813
C-1295	1,67	2,788	-0,052	-0,141	-	6,016	6,125	3,938	2,813
C-1298	-0,26	0,067	0,413	-0,5	-	4,068	4,167	2,222	3
C-1300	0,4	0,160	0,69	-0,161	-	4,068	4,167	2,222	3
C-1301	-1,67	2,788	0,690	-0,161	-	3,507	5,143	4,167	3,840
C-1303	-0,98	0,960	0,487	-0,643	-	4,068	4,167	2,222	3
C-1304	-3,05	9,302	0,487	-0,643	-	3,507	5,143	4,167	3,840
C-1305	-0,32	0,102	0,487	-0,643	-	4,711	5,143	3,061	3,840
<b>C-1311</b>	1,01	1,020	0,487	-0,643	-0,37	6,016	6,125	3,938	2,813
<b>C-1330</b>	3,28	10,758	0,413	-0,5	-0,27	6,777	7,111	4,840	3,556
<b>C-1335</b>	1,32	1,742	0,487	-0,643	-0,37	6,777	7,111	4,84	3,556
<b>C-1371</b>	1,24	1,537	0,487	-0,643	-0,37	4,711	5,143	3,061	3,840
<b>C-1374</b>	2,13	4,536	0,413	-0,5	-0,27	4,711	5,143	3,061	3,840
C-1380	1	1	0,487	-0,643	-	6,777	7,111	4,840	3,556
<b>C-1415</b>	2,57	6,604	0	0	0	6,016	6,125	3,938	2,813
C-1428	-2,39	5,712	0,487	-0,643	-	3,736	6,125	5,143	5

Pogrubioną czcionką wyróżniono pochodne imidazoakrydonu.

#### 4.4.2 Metoda Hanscha

Danymi wejściowymi były macierze odpowiednich parametrów fizykochemicznych (tabela 9).

1 Uogólniona aktywność cytotoksyczna (GS1).

W wyniku analizy łącznej dla wszystkich związków nie uzyskałam istotnych zależności. Dlatego włączyłam do analizy zmienną XC, która różnicuje typ pochodnej. Dzięki temu uzyskałam następujące równanie:

Wszystkie związki	N=23	F=10,18	s=0,65	R <sup>2</sup> =0,63	p<0,00017
GS1=-0,60(±0,30)+2,11(±0,39)XC+1,09(±0,51)F-0,15(±0,05)(logP) <sup>2</sup> -0,29(±0,12)logP					

Dla wszystkich związków korzystne jest podstawienie grupą oddającą elektrony do pierścienia aromatycznego. Okazało się jednak, że o aktywności cytotoksycznej decyduje głównie

przynależność do grupy imidazoakrydonów. Dla nich otrzymałam zależność:

Imidazoakrydony	N=8	F=12,33	s=0,56	R <sup>2</sup> =0,76	p<0,01167
GS1=1,02(±0,67)-3,96(±1,40)σ-0,69(±0,25)logP					

Dla tej grupy związków korzystna jest niska, możliwie ujemna wartość stałej Hammetta, a więc podstawniki będące donorami elektronów oraz możliwie ujemna wartość logP, a więc jak najmniejsza lipofilowość związku.

W grupie triazoloakrydonów istotną zależność uzyskałam dopiero po oddzieleniu związków podstawionych w pozycji 8 grupą hydroksylową:

Triazoloakrydony 8-OH	N=6	F=16,20	s=0,31	R <sup>2</sup> =0,75	p<0,01581
GS1=2,02(±0,66)-0,71(±0,18) <sup>3</sup> κ					

W tej grupie pochodnych korzystne są możliwe najmniejsze wartości indeksu  $^3\kappa$ . Oznacza to, że łańcuch boczny powinien raczej zawierać dwa atomy węgla pomiędzy azotami oraz dwie grupy etylowe na azocie omega. Dla pozostałych pochodnych uzyskałam następujące równanie:

Triazoloakrydony bez 8-OH	N=9	F=41,64	s=0,25	R <sup>2</sup> =0,91	p<0,00030
GS1=-5,97(±0,64)+1,88(±0,21) <sup>3</sup> κ-0,18(±0,05)(logP) <sup>2</sup>					

Równanie charakteryzuje się dużą wartością testu F oraz współczynnika determinacji R<sup>2</sup>. W tej grupie związków korzystny jest wzrost parametru  $^3\kappa$ , co oznacza, że łańcuch boczny nie powinien zawierać rozgałęzienia na atomie centralnym. Najbardziej aktywne są więc pochodne zawierające grupę hydroksyetylową lub dwie grupy metylowe na azocie omega.

Jeszcze lepsze statystycznie równanie uzyskałam wyłącznie dla pochodnych podstawionych w pozycji 8 podstawnikami: metylowym, metoksyowym, nitrowym i atomem chloru.

Triazoloakrydony 8-inne	N=6	F=440	s=0,06	R <sup>2</sup> =0,996	p<0,00227
GS1=-6,47(±0,27)+2,30(±0,08) <sup>3</sup> κ-0,39(±0,03) <sup>2</sup> κ-0,81(±0,15)R					

Stąd wynika, że oprócz wzrostu parametru  $^3\kappa$  korzystne są również ujemne wartości stałej rezonansowej, a więc podstawniki oddające elektrony do pierścienia aromatycznego na skutek efektu rezonansowego takie jak hydroksyloxy lub metoksyloxy. Niewielki wkład wnosi indeks  $^2\kappa$ , który powinien być możliwie najmniejszy. Zgodnie z nim korzystny jest rozgałęzienie łańcuch boczny.

## 2 Aktywność przeciwczeriakowa (GS2).

W analizie łącznej uzyskałam dobre równanie, posiadające wysoką wartość testu F:

Wszystkie związki	N=23	F=61,98	s=0,39	R <sup>2</sup> =0,85	p<0,00000
GS2=-2,78(±0,37)-2,55(±0,29)R+0,38(±0,07) <sup>0</sup> κ					

Najbardziej aktywne związki posiadają w pozycji 8 podstawniki o ujemnej wartości stałej rezonansowej R. Ponadto korzystny jest wzrost indeksu  $^0\kappa$ , co oznacza spadek symetrii łańcucha, a więc rozgałęzione łańcuchy boczne.

Dla pochodnych imidazoakrydonu otrzymałam następujące równanie:

Imidazoakrydony	N=8	F=27,78	s=0,35	R <sup>2</sup> =0,88	p<0,00196
GS2=-2,05(±0,47)-5,07(±0,82)σ+0,37(±0,13) <sup>2</sup> κ					

Decydujący wpływ na aktywność wywiera stała σ. Najbardziej aktywne związki posiadają w pozycji 8 podstawniki o ujemnych wartościach σ, a więc oddające elektrony do pierścienia aromatycznego (hydroksyloxy, metoksyloxy). Znacznie mniejszy wpływ na aktywność wywiera wskaźnik linearności  $^2\kappa$ . Przyjmuje on największe wartości dla cząsteczek liniowych nierozgałęzionych.

Następnie przeprowadziłam analizę dla pochodnych triazoloakrydonu:

Triazoloakrydony	N=15	F=29,55	s=0,42	R <sup>2</sup> =0,80	p<0,00002
GS2=-2,72(±0,48)-2,30(±0,37)R+0,37(±0,10) <sup>0</sup> κ					

Równanie jest statystycznie istotne, charakteryzuje się dużą wartością testu F oraz współczynnika determinacji. Decydujący wpływ na aktywność ma stała rezonansowa, która powinna przyjmować wartości możliwie ujemne. Takie wartości odpowiadają podstawnikom oddającym elektrony do pierścienia aromatycznego (hydroksyloxy, metoksyloxy). Mniejsze znaczenie ma indeks  $^0\kappa$ . Zgodnie z nim najbardziej aktywne pochodne powinny mieć niesymetryczny łańcuch boczny.

Następnie przeprowadziłam analizę tylko dla pochodnych triazoloakrydonu zawierających grupę hydroksyloxy w pozycji 8. Uzyskałam następującą zależność:

Triazoloakrydony 8-OH	N=6	F=21,05	s=0,27	R <sup>2</sup> =0,80	p<0,01012
GS2=1,01(±0,13)+0,35(±0,08)logP					

Dla pozostałych związków otrzymałam mniej istotne statystycznie równanie:

Triazoloakrydony bez 8-OH	N=9	F=10,83	s=0,43	R <sup>2</sup> =0,55	p<0,01329
GS2=-0,42(±0,14)+0,38(±0,12)logP					

Z obu równań wynika wpływ parametru lipofilowego na aktywność przeciwczeriakową w tych grupach związków.

W przypadku pochodnych zawierających inne podstawniki w pozycji 8 najważniejszy okazał się wpływ stałej rezonansowej R, która powinna być możliwie ujemna. Mniejsze znaczenie ma parametr lipofilowy, który powinien być jak największy.

Triazoloakrydony 8-inne	N=6	F=900,8	s=0,03	R <sup>2</sup> =0,998	p<0,00111
$GS2=-1,42(\pm 0,10)+0,54(\pm 0,01)\log P-1,08(\pm 0,06)R+0,10(\pm 0,02)^0\kappa$					

Należy dodać, że jest to bardzo dobre statystycznie równanie. Wyróżnia się dużą wartością testu F=900 i współczynnika determinacji R<sup>2</sup>=0,998.

Podsumowując, wśród triazoloakrydonów najkorzystniejszy jest wzrost lipofilowości. Pochodne podstawione grupami innymi niż hydroksylowa powinny zawierać niesymetryczny łańcuch boczny.

### 3 Aktywność w stosunku do nowotworów okrężnicy (GS3).

O aktywności w stosunku do nowotworów okrężnicy można wnioskować jedynie dla pochodnych triazoloakrydonu, ponieważ tylko dla tej grupy związków otrzymałam dobre statystycznie równanie.

Triazoloakrydony	N=15	F=23,36	s=0,71	R <sup>2</sup> =0,61	p<0,00033
$GS3=0,66(\pm 0,23)-0,33(\pm 0,07)(\log P)^2$					

O aktywności decydują tutaj własności lipofilowe (optimum logP znajduje się wokół logP=0). Ponieważ równanie nie jest zbyt dobre statystycznie przeprowadziłam analizy dla różnych grup triazoloakrydonów. W przypadku pochodnych zawierających podstawnik hydroksylowy w pozycji 8 otrzymałam następujące równanie:

Triazoloakrydony 8-OH	N=6	F=37,52	s=0,45	R <sup>2</sup> =0,93	p<0,00754
$GS3=4,18(\pm 1,06)-0,30(\pm 0,06)(\log P)^2-1,03(\pm 0,31)^3\kappa$					

Z uzyskanej zależności widać wyraźnie, że w tej grupie pochodnych najważniejszy wpływ wywierają efekty steryczne. Wartości indeksu <sup>3</sup>κ powinny być jak najmniejsze, co oznacza rozgałęzienie na atomie centralnym łańcucha bocznego (obecność dwóch atomów węgla między

atomami azotu oraz dwóch grup etylowych na azocie omega).

## 5 Dyskusja wyników

Analiza podobieństwa testów wykazała istnienie wśród analizowanych testów trzech grup linii komórkowych. Uzyskany podział linii nie jest specyficzny ze względu na typ nowotworu (rys. 2). Jedynie linie wywodzące się z czerniaków i nowotworów okrężnicy koncentrują się w odrębnych grupach. Linie pozostałych typów nowotworów rozproszone są mniej lub bardziej we wszystkich grupach.

Analiza przestrzeni związków doprowadziła do wyodrębnienia pięciu grup związków (rys. 4) różniących się aktywnością cytotoksyczną w stosunku do poszczególnych linii komórkowych. Charakterystyczne jest przy tym, że podział ten nie pokrywa się z podziałem badanych związków na pochodne imidazoakrydonu i triazoloakrydonu (tabela 3-7). Jedynie grupa A1 jest jednorodna pod względem budowy chemicznej: znalazły się w niej cztery spośród pięciu badanych 8-hydroksylimidazoakrydonów.

Analiza głównych składowych ujawniła z kolei, że około 83% zmienności aktywności cytotoksycznej da się opisać przy pomocy trzech wzajemnie ortogonalnych składowych. Składowym tym można zarazem przypisać interpretację biologiczną.

Pierwsza główna składowa wyjaśniająca około 65% ogólnej zmienności może być potraktowana jako miara uogólnionej aktywności cytotoksycznej.

Druga główna składowa wyjaśniająca około 11% zmienności zależna jest przede wszystkim od aktywności w stosunku do linii komórkowych wywodzących się z czerniaków (rys. 6). Można więc ją potraktować jako aktywność przeciwczerńkową. Z analogicznego powodu trzecią główną składową wyjaśniającą około 7% zmienności można interpretować jako aktywność w stosunku do nowotworów okrężnicy (rys. 7).

Na uwagę zasługuje fakt, że udział testów w drugiej i trzeciej głównej składowej związany jest z ich przynależnością do określonych grup podobieństwa. I tak, na drugą główną składową decydujący wpływ mają linie komórkowe z grupy I (rys. 6), a na trzecią składową linie z grupy IIa (rys. 7).

Charakterystyczne jest przy tym rozmieszczenie grup badanych związków w przestrzeni tak zdefiniowanych rodzajów aktywności (rys. 8 i 9). Najwyższą uogólnioną aktywnością cytotoksyczną charakteryzują się związki należące do grupy A1, czyli pochodne 8-hydroksyimidazoakrydonu. Z kolei związki należące do grupy B1 wykazują wyjątkowo niską uogólnioną aktywność cytotoksyczną.

Związki z grup A2 i B2 wykazują średnią uogólnioną aktywność cytotoksyczną, lecz charakteryzują się wysoką aktywnością przeciwczerśniakową. Wysoka aktywność w stosunku do nowotworów okrężnicy (trzecia główna składowa) nie jest jednoznacznie związana z żadną z grup związków. Pewne preferencje w tym kierunku wykazują związki z grupy B3 i część związków z grupy B1.

Zredukowanie 23 testów aktywności do trzech zbiorczych miar aktywności (głównych składowych) i przypisanie im określonej interpretacji biologicznej otworzyło możliwość określenia w badanej grupie związków ilościowych zależności struktura - aktywność (QSAR).

Analizę QSAR przeprowadziłam korzystając zarówno z metody Free-Wilsona jak i metody Hanscha. Jest przy tym charakterystyczne, że obie metody doprowadziły do podobnych zależności struktura – aktywność.

Przede wszystkim wykazałam, że w przypadku uogólnionej aktywności cytotoksycznej oraz aktywności w stosunku do nowotworów okrężnicy w grupie pochodnych imidazoakrydonu istnieją odmienne zależności struktura – aktywność niż w grupie pochodnych triazoloakrydonu. Jest to wyraźna przesłanka, że te dwie klasy pochodnych akrydonu wykazują istotne różnice w mechanizmie działania biologicznego na poziomie molekularnym. Przeprowadzona analiza QSAR nie wystarcza wszakże dla określenia etapu lub etapów, na których te różnice występują. Wymaga to szczegółowych badań biochemicznych, które nie były przedmiotem mojej pracy.

Jedynie w przypadku aktywności przeciwczerśniakowej możliwe jest określenie wspólnych zależności struktura – aktywność dla obu klas pochodnych. Może to sugerować, że w przypadku tego typu aktywności różnice w mechanizmie działania obu klas związków są mało istotne.

Dla każdego rodzaju aktywności zaproponowałam struktury pochodnych akrydonu, które powinny charakteryzować się szczególnie wysoką aktywnością. Na tym etapie bardzo

przydatne okazały się wyniki uzyskane z metody Free-Wilsona.

W przypadku uogólnionej aktywności cytotoksycznej wydaje się możliwe uzyskanie podobnego stopnia aktywności w obu klasach pochodnych (rys. 10). Przy czym w przypadku pochodnych imidazoakrydonu kluczową rolę odgrywa obecność grupy hydroksylowej w pozycji 8. Struktura łańcucha bocznego nie ma w tej klasie pochodnych istotnego wpływu na uogólnioną aktywność cytotoksyczną. Wśród pochodnych triazoloakrydonu maksymalną aktywność tego typu wykazują związki podstawione w pozycji 8 grupą metylową, metoksyową lub nitrową oraz atomem chloru. Brak podstawnika w tej pozycji lub obecność grupy hydroksylowej istotnie obniżają uogólnioną aktywność cytotoksyczną. Istotną rolę w tej klasie pochodnych odgrywa struktura łańcucha bocznego. Z uzyskanego równania Free-Wilsona wynika, że szczególnie korzystna dla uogólnionej aktywności cytotoksycznej jest obecność łańcucha hydroksyetyloaminopropylowego.

Dla aktywności przeciwczerśniakowej otrzymałam dla obu klas pochodnych podobne zależności struktura – aktywność. Optymalna pochodna powinna zawierać w pozycji 8 grupę hydroksylową i możliwie długi łańcuch boczny (rys. 11).

W przypadku aktywności w stosunku do nowotworów okrężnicy wykazałam, że podobnie jak dla uogólnionej aktywności cytotoksycznej, dla obu klas związków występują odmienne zależności struktura – aktywność. W przypadku pochodnych imidazoakrydonu szczególnie wysoką aktywność tego typu wykazują związki z grupą metoksyową w pozycji 8 oraz łańcuchem bocznym zawierającym fragment etylenowy pomiędzy atomami azotu (rys. 12). Zależności uzyskane dla pochodnych triazoloakrydonu wskazują, że w tej klasie pochodnych nie należy spodziewać się związków o wysokiej aktywności w stosunku do nowotworów okrężnicy.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Z. Mazerska, E. Augustin, A. Składanowski, M.C. Bibby, J.A. Double, J. Konopa, C-1311, *Drugs of the Future*, 23(7), 702-706 (1998).
- 2) W. Pluta, *Wielowymiarowa analiza porównawcza w badaniach ekonomicznych*, PWE, Warszawa (1977).
- 3) *STATISTICA PL dla Windows*, tom III, StatSoft Polska, Kraków (1997).

- 4) M.A. Sharaf, D.L. Illman, B.R. Kowalski, *Chemometrics*, John Wiley & Sons, New York (1986).
- 5) S.H. Free, Jr., J.W. Wilson, *J. Med. Chem.*, 7:395 (1964).
- 6) C.Hansch, E.W. Deutsch, *Biochem. Biophys. Acta*, 112:381 (1966).
- 7) C.Hansch, E.W. Deutsch, *Biochem. Biophys. Acta*, 126:117 (1966).
- 8) C.Hansch, in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 1966. C. Cain (Ed.). Academic Press (New York) 1967.
- 9) C.Hansch, et al. *Journal of the American Chemical Society*, 85:2817 (1963).
- 10) C. Hansch, P.P. Maloney, T. Fujita, *Nature*, 194:178 (1962).
- 11) G.C. Nys, R.F. Rekker, *Chim. Therap.*, 8, 521 (1973).
- 12) C. Hansch, A.J. Leo, *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*, John Wiley & Sons, Nowy Jork, 1979.
- 13) L.P. Hammett, *Chem. Rev.*, 17, 125 (1935).
- 14) C.G. Swain, E.C. Lupton, Jr., Field and Resonance Components of Substituent Effects; *Journal of the American Chemical Society*, 90,4328 (1968).
- 15) L.B. Kier, Inclusion of Symmetry as a Shape Attribute in Kappa Index Analysis; *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 6, 8- 12 (1987).
- 16) L.B. Kier, A Shape Index from Molecular Graphs, *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 4,109-116 (1985).
- 17) L.B. Kier, Shape Indexes of Orders One and Three from Molecular Graphs; *Quant. Struct.-Act. Relat.*, 5, 1-7 (1986).