

**Załącznik nr 3 do Wniosku o wszczęcie  
postępowania habilitacyjnego  
z dnia 27.09.2023 r.**

**dr n. farm. Marcin Gackowski**  
**Adiunkt**  
**Katedra Toksykologii i Bromatologii**  
**Wydział Farmaceutyczny**  
**Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszcz**  
**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**adres: ul. dr. A. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz**  
**email: marcin.gackowski@cm.umk.pl**

**Autoreferat**

**Bydgoszcz, 2023**

## Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.....	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.....	4
Wstęp.....	6
Cel.....	12
Modelowanie molekularne pochodnych antrapirazolu oraz izostewiolu.....	13
Metodologia optymalizacji geometrii przestrzennej badanych cząsteczek.....	14
Obliczanie deskryptorów molekularnych.....	15
Zastosowane algorytmy uczenia maszynowego.....	16
Dokowanie molekularne.....	18
Przewidywanie aktywności farmakologicznej pochodnych antrapirazolu i izostewiolu.....	20
Zastosowanie wybranych algorytmów uczenia maszynowego.....	27
Projektowanie nowych pochodnych estru etylowego izostewiolu.....	33
Nowe etery oksymu estru etylowego izostewiolu.....	34
Nowe N-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu.....	42
Podsumowanie.....	50
Literatura:.....	51
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	54
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	58
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.....	61

## 1. Imię i nazwisko.

**Marcin Gackowski**

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

1. Doktor nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne - Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera UMK; Bydgoszcz, 11 czerwca 2019 r. Tytuł rozprawy doktorskiej: "Zastosowanie metod spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej w analizie leków o wybranej aktywności farmakologicznej". Praca realizowana w Katedrze i Zakładzie Toksykologii CM UMK. Promotor: dr hab. inż. Marcin Koba, prof. UMK;
2. Magister farmacji - Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. L. Rydygiera UMK; Bydgoszcz, 31 marca 2011 r. Tytuł pracy magisterskiej: "Oznaczenie lormetazepamu w preparatach farmaceutycznych metodą spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej". Praca realizowana w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków CM UMK. Promotor: prof. dr hab. Michał Marszał.

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

12.2020 – obecnie	Adiunkt Katedra Toksykologii i Bromatologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
10.2019 - 11.2020	Asystent Katedra Toksykologii i Bromatologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;
11.2014 – 09.2019	Starszy technik Katedra i Zakład Toksykologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Omówienie to winno dotyczyć merytorycznego ujęcia przedmiotowych osiągnięć, jak i w sposób precyzyjny określać indywidualny wkład w ich powstanie, w przypadku, gdy dane osiągnięcie jest dziełem współautorskim, z uwzględnieniem możliwości wskazywania dorobku z okresu całej kariery zawodowej.

**Tytuł cyklu osiągnięć:**

**Wykorzystanie modelowania molekularnego do racjonalnego projektowania pochodnych izostewiolu jako inhibitorów aktywowanego czynnika krzepnięcia X oraz przewidywania aktywności przeciwnowotworowej pochodnych antrapirazolu**

Zgodnie z analizą bibliometryczną łączna punktacja MEiN prezentowanego cyklu składającego się z 5 prac wynosi 500 pkt., a sumaryczny współczynnik Impact Factor: 20,00 pkt. We wszystkich pracach jestem pierwszym oraz korespondencyjnym autorem.

**P1.** Gackowski M.\*, Szewczyk-Golec K., Pluskota R., Koba M., Mądra-Gackowska K., Woźniak A.: Application of multivariate adaptive regression splines (MARSplines) for predicting antitumor activity of anthrapyrazole derivatives, International Journal of Molecular Sciences, vol. 23, nr 9, 2022, s. 1-19, DOI:10.3390/ijms23095132,

140 pkt. MEiN, 5,6 pkt. IF

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań literatury (70%), zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentu (90%), wykonaniu 90% obliczeń, napisaniu manuskryptu (85%), korekcie manuskryptu (60%). Mój udział procentowy szacuję na 75%.

**P2.** Gackowski M.\*, Szewczyk-Golec K., Mądra-Gackowska K., Pluskota R., Koba M.: Quantitative structure-activity relationship analysis of isosteviol-related compounds as activated coagulation factor X (FXa) inhibitors, *Nutrients*, vol. 14, nr 17, 2022, s. 1-15, DOI:10.3390/nu14173521,

140 pkt. MEiN, 5,9 pkt. IF

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań literatury (80%), zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentu (90%), wykonaniu 80% obliczeń, napisaniu manuskryptu (90%), korekcie manuskryptu (70%). Mój udział procentowy szacuję na 80%.

**P3.** Gackowski M.\*, Pluskota R., Koba M.: Predicting Antitumor Activity of Anthrapyrazole Derivatives using Advanced Machine Learning Techniques, *Current Computer-Aided Drug Design*, vol. 19, 2023, DOI:10.2174/1573409919666230612144407,

40 pkt. MEiN, 1,7 pkt. IF

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań literatury (90%), zaplanowaniu (100%) i przeprowadzeniu eksperymentu (90%), wykonaniu 95% obliczeń, napisaniu manuskryptu (90%), korekcie manuskryptu (85%). Mój udział procentowy szacuję na 90%.

**P4.** Gackowski M.\*, Madriwala B., Studzińska R., Koba M.: Novel isosteviol-based FXa inhibitors: molecular modeling, in silico design and docking simulation, *Molecules*, s.n., vol. 28, nr 13, 2023, s. 1-22, DOI:10.3390/molecules28134977,

140 pkt. MEiN, IF 4,6 pkt. IF

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań literaturowych (90%), zaplanowaniu (100%) i przeprowadzeniu eksperymentu (90%), wykonaniu 90% obliczeń, napisaniu manuskryptu (80%), korekcie manuskryptu (90%). Mój udział procentowy szacuję na 85%.

**P5.** Gackowski M.\*, Madriwala B., Koba M.: In silico design, docking simulation, and ANN-QSAR model for predicting the anticoagulant activity of thiourea isosteviol compounds as FXa inhibitors, Chemical Papers, Slovenska Akademia Vied - Chemicky Ustav, 2023, s. , DOI:10.1007/s11696-023-02994-y

40 pkt. MEiN, 2,2 pkt. IF

Czasopismo przypisane do dyscypliny nauki farmaceutyczne.

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na wykonaniu badań literaturowych (90%), zaplanowaniu (100%) i przeprowadzeniu eksperymentu (90%), wykonaniu 80% obliczeń, napisaniu manuskryptu (85%), korekcie manuskryptu (80%). Mój udział procentowy szacuję na 85%.

## Wstęp

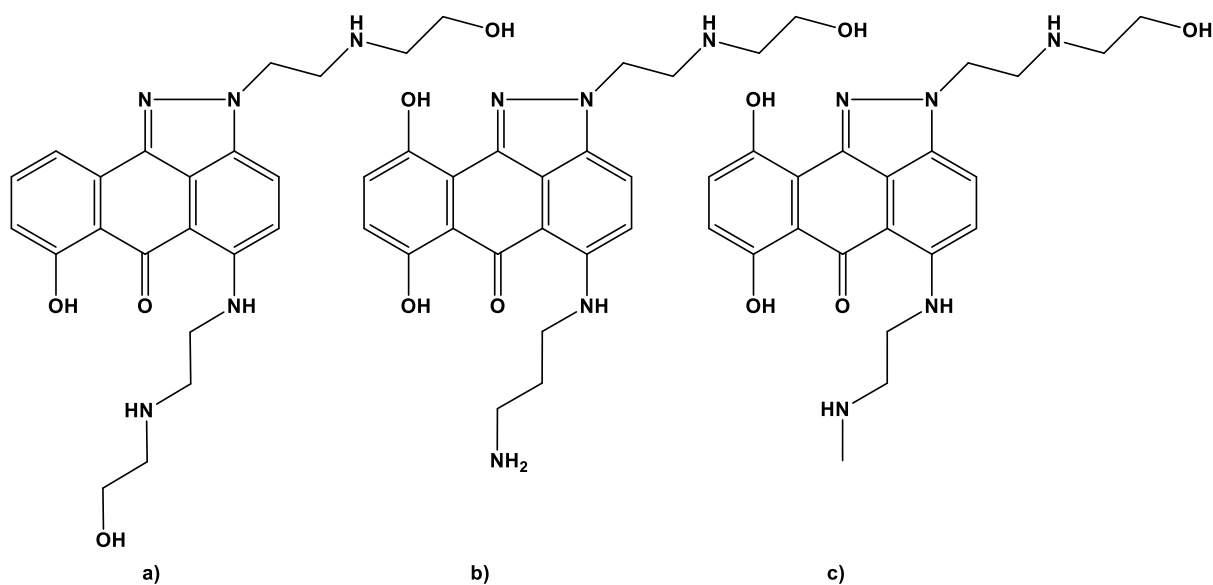
Opracowywanie i wprowadzanie na rynek nowych leków jest jednym z najbardziej złożonych i trudnych procesów w branży farmaceutycznej. Ogromne nakłady finansowe oraz lata badań poświęca się, aby osiągnąć wysoką jakość oraz zrównoważyć skuteczność terapeutyczną z zachowaniem jak największego bezpieczeństwa stosowania u pacjentów – zarówno ludzi jak i zwierząt. Ingerencja ksenobiotyków w skomplikowane układy biologiczne pociąga za sobą konieczność przeprowadzenia kosztownych badań klinicznych zgodnie z coraz surowszymi protokołami. Do fazy badań klinicznych dociera tylko niewielki odsetek badanych bioaktywnych związków, a jeszcze mniej zostaje wprowadzonych na rynek. Potrzeba sprostania rosnącym wymaganiom pacjentów, firm ubezpieczeniowych, czy systemów opieki zdrowotnej dotyczących skuteczniejszych, bezpieczniejszych oraz efektywnych kosztowo farmakoterapii wymaga poszukiwania coraz bardziej wyrafinowanych technik i metod badawczych. W ostatnich latach, aby przyspieszyć proces opracowywania nowych aktywnych związków, zredukować koszty i czas badań oraz ograniczyć doświadczenia przeprowadzane na zwierzętach wykorzystuje się komputerowe metody projektowania oparte są na różnych technikach modelowania molekularnego. Modelowanie molekularne wykorzystuje wszystkie metody teoretyczne oraz techniki obliczeniowe do modelowania, przewidywania właściwości oraz symulacji zachowania się cząsteczek w określonych warunkach. Modele molekularne mogą bazować na analizie struktury badanych związków. Umożliwiają przewidywanie, w jaki sposób wprowadzenie zmiany strukturalnej w danym związku chemicznym wpłynie na jego

aktywność, a w konsekwencji zaprojektowanie takich struktur, które będą bardziej aktywne niż dotychczas stosowany lek. Często obejmują one koncepcję ilościowej zależności struktura-aktywność (QSAR, ang. *quantitative structure–activity relationship*). Badania QSAR są użytecznym narzędziem chemii obliczeniowej do przewidywania wymagań strukturalnych dla aktywności biologicznej. Paradygmat QSAR szybko ewoluował do tego stopnia, że właściwości molekularne i/lub aktywność biologiczną nowych związków można szybko przewidzieć *in silico* bez lub przy minimalnych badaniach eksperymentalnych (w tym na zwierzętach), optymalizując w ten sposób pracę, oszczędzając czas, zasoby i koszt produkcji leków. Analiza QSAR generuje dobrą korelację obliczeniową między deskryptorami molekularnymi a obserwowaną aktywnością (wyrażoną na przykład jako połowa maksymalnego stężenia hamującego - IC<sub>50</sub>). Techniki modelowania molekularnego, takie jak dokowanie molekularne pozwalają przewidywać powinowactwo i sposób wiązania między dwiema cząsteczkami, co umożliwia zrozumienie mechanizmu interakcji między ligandem a receptorem, gdy łączą się ze sobą w celu uzyskania stabilnej konformacji. Dokowanie jest szeroko stosowane w multidyscyplinarnych dziedzinach, takich jak biologia, fizyka, chemia oraz przede wszystkim w przemyśle farmaceutycznym. Dokowanie molekularne jest jedną z najczęściej stosowanych metod w opartym na wiedzy strukturalnej projektowaniu leków ze względu na zdolność do przewidywania konformacji wiązania ligandów z odpowiednim docelowym miejscem wiązania. Charakterystyka zachowania wiązania odgrywa ważną rolę w racjonalnym projektowaniu leków i wyjaśnianiu podstawowych procesów biochemicznych. Techniki modelowania molekularnego wymienione powyżej wspomagają projektowanie i optymalizację ligandów o pożądanych właściwościach, takich jak wysokie powinowactwo do celu molekularnego i selektywność.

Nowotwory złośliwe zajmują niechlubne pierwsze miejsce wśród przyczyn zgonów na całym świecie, ponadto stanowią barierę dla wzrostu średniej długości życia. W 2019 roku nowotwór był pierwszą lub drugą przyczyną zgonów przed 70. rokiem życia w 112 ze 183 krajów i zajął trzecie lub czwarte miejsce w kolejnych 23 krajach według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*). Niewątpliwie liczba nowych przypadków oraz zgonów z powodu nowotworów nieustannie rosną w skali globu, dlatego nowe strategie terapeutyczne, które zwiększają szanse na powrót do zdrowia, łagodzą przebieg choroby w leczeniu paliatywnym oraz czynią leczenie bezpieczniejszym, są bezwzględnie potrzebne. Antracykliny już od ponad pół wieku należą do najbardziej

aktywnych cytostatyków stosowanych w walce z wieloma różnymi nowotworami i są podstawą wielu schematów terapeutycznych. Substancje te znalazły szerokie zastosowanie u pacjentów chorych m.in. na nowotwór piersi. Jednym z najlepiej przebadanych i szeroko stosowanych chemioterapeutyków jest doksorubicyna, antybiotyk antracyklinowy znany z wysokiej częstości występowania działań niepożądanych, w tym przede wszystkim kardiotoksyczności i mielosupresji. Zaobserwowano, że doksorubicyno-zależna przewlekła niewydolność serca rozwija się u 26% pacjentów po przekroczeniu dawki kumulacyjnej 550 mg/m<sup>2</sup> powierzchni ciała. W poprzednich dekadach podejmowano liczne próby zdefiniowania mechanizmu kardiotoksyczności indukowanej antracyklinami. Jest on wieloczynnikowy, jednakże nie został do końca poznany. Przeprowadzone badania w tym temacie doprowadziły do udoskonalenia używanych protokołów chemioterapii poprzez obniżenie dawek w sytuacjach, gdzie jest to możliwe. Natomiast nowe leki z grupy antracyklin nie spełniły stawianych im oczekiwań ani w kwestii większej siły działania przeciwnowotworowego ani bezpieczeństwa w stosunku do miokardium. W drugiej połowie XX wieku zsyntetyzowano pochodne antrapirazolu, posiadające szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej wykazane w różnych modelach guza jako nową klasę leków przeciwnowotworowych i potencjalnych następców antracyklin. Dzięki płaskiej strukturze związku te są interkalatorami. Indukują uszkodzenia DNA poprzez hamowanie topoizomerazy II, co prowadzi do trwałych pęknięć w jednej lub obu niciach DNA, oraz hamowanie syntezy DNA. W przypadku trzech pochodnych antrapirazolu, tj. losoksantronu, piroksantronu oraz teloksantronu (Rysunek 1.), wykonano ocenę kliniczną. Zarówno badania przedkliniczne, jak i badania kliniczne I fazy wskazywały na brak występowania kardiotoksyczności. Jednakże mielosupresja z leukopenią głównie w przypadku losoksantronu i piroksantronu oraz neutropenia w przypadku teloksantronu były głównymi, ograniczającymi wielkość dawki, objawami toksyczności badanych molekuł. W badaniach fazy II wszystkie trzy cząsteczki wykazały godne uwagi wskaźniki odpowiedzi terapeutycznej u kobiet z nowotworem piersi z przerzutami.



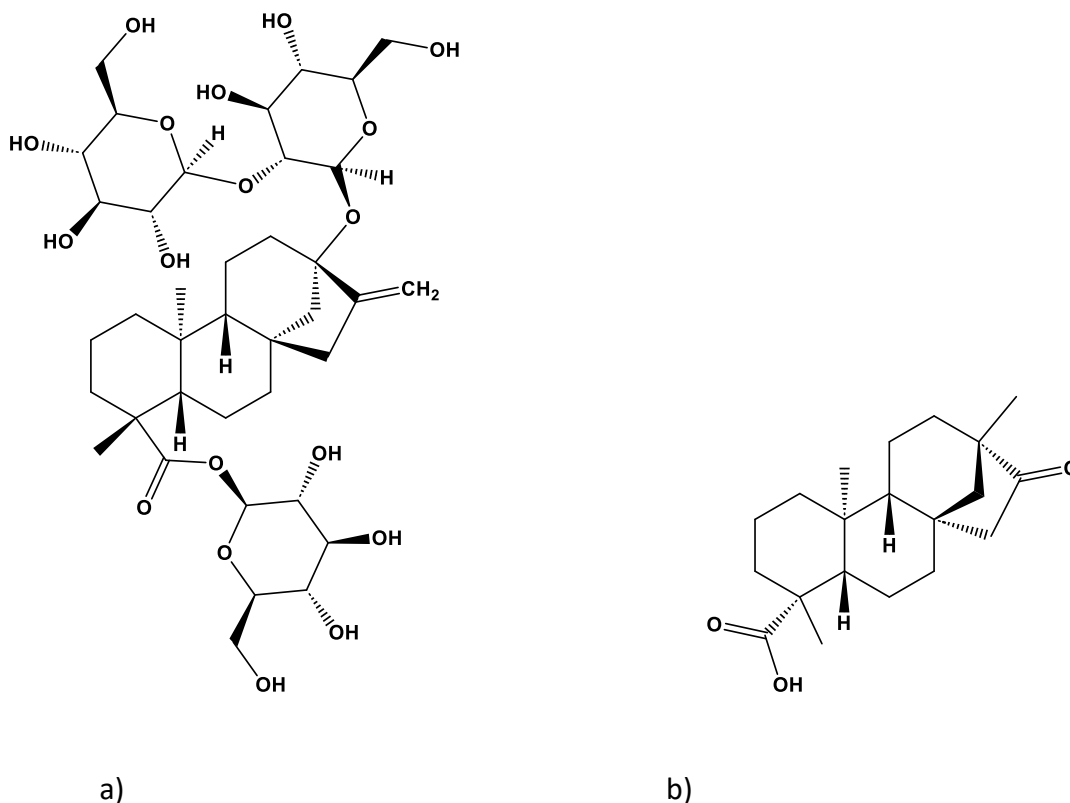


Rysunek 1. Struktura chemiczna pochodnych antrapirazolu: a) losoksantron, b) piroksantron, c) teloksantron.

Pomimo upływu czasu pochodne antrapirazolu nadal wzbudzają spore zainteresowanie, ponieważ wykazano ich silną aktywność zbadaną *in vitro* wobec różnych ludzkich linii komórek nowotworowych (rak wątrobowo-komórkowy HepG2, BEL-7402 i SMMC-7721, rak okrężnicy HCT-116 i HT-29, rak piersi MCF-7, rak gardła linii FaDu i przewlekła białaczka szpikowa K562). Liczne możliwe modyfikacje bocznych łańcuchów zawierających grupy aminowe, kluczowych dla działania cytotoksycznego analogów antrapirazolu czyni je atrakcyjnym celem komputerowo wspomaganego projektowania leków (CADD, ang. *computer-aided drug design*) jako nowych kandydatów do leczenia chorób nowotworowych.

Doustne leki przeciwzakrzepowe nowej generacji (DOAC, ang. *direct oral anticoagulants*) są ważną i relatywnie nową klasą syntetycznych leków przeciwzakrzepowych powszechnie stosowanych w zapobieganiu powikłaniom zakrzepowo-zatorowym po zabiegach lub w migotaniu przedsionków oraz w leczeniu żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej. Dabigatran został wprowadzony na rynek w 2010 roku i jest bezpośrednim inhibitorem trombiny. Z kolei riwaroksaban, apiksaban, edoksaban i betriksaban zostały wprowadzone na rynek farmaceutyczny po 2011 r. Hamują one w sposób odwracalny aktywowany czynnik krzepnięcia X (FXa), zarówno wolny, jak i związany z protrombiną. W ten sposób skutecznie blokują powstawanie skrzepu i wytwarzanie trombiny w sposób zależny od stężenia. **Aktywowany czynnik Xa odgrywa kluczową rolę w szlaku krzepnięcia krwi i**

**aktualnie jest atrakcyjnym celem dla projektowania nowych leków przeciwzakrzepowych.** Warto jednak podkreślić, że stymuluje on również wiele wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych poprzez sprzężone z białkiem G receptory aktywowane proteazą (PARs, ang. *Protease-Activated Receptors*). Przekaznictwo FXa-PAR jest możliwym celem terapeutycznym do poprawy zaburzonego metabolizmu i wrażliwości na insulinę, czyli w przyszłości do farmakoterapii otyłości i cukrzycy. Obecnie bezpośrednio inhibitory FXa są jednym z najpowszechniej stosowanych doustnych antykoagulantów w farmakoterapii zaburzeń zakrzepowo-zatorowych. Co ciekawe, Eliquis® (apiksaban) był piątym najlepiej sprzedającym się lekiem na świecie w 2021 roku. **Warto podkreślić, że pomimo przewagi nad tradycyjnymi antykoagulantami (jak np. warfaryna), doustne leki przeciwzakrzepowe nowej generacji nadal mają ograniczenia do stosowania i poważne skutki uboczne, takie jak znaczny wzrost krwawień z przewodu pokarmowego będący głównym problemem w praktyce klinicznej, interakcje z innymi lekami, czy toksyczność skórna. Ponadto synteza tych leków jest wieloetapowa i wymaga stosowania niebezpiecznych odczynników oraz toksycznych rozpuszczalników. Dlatego w ostatnich latach podjęto wiele wysiłków w poszukiwaniu nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych inhibitorów FXa przeznaczonych do farmakoterapii chorób zakrzepowo-zatorowych.** Izostewiol (ISV, Rysunek 2 b)) jest produktem hydrolizy kwasowej stewiozydu (Rysunek 2 a)), związku pochodzącego z rośliny stewii (*Stevia rebaudiana* Bertoni), której liście stosowane były od wieków przez paragwajskich Indian do słodzenia yerba mate, naparu przyrządzanego z liści ostrokrzewu paragwajskiego. Izostewiol posiada właściwości przeciwutleniające, przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe oraz kardioprotekcyjne. Wykazuje też działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwbiegunkowe. **W ostatnich latach wykazano aktywność przeciwzakrzepową analogów izostewiolu, co zachęca do kontynuowania wysiłków w kierunku poszukiwania i projektowania nowych, bezpieczniejszych leków przeciwzakrzepowych opartych na rdzeniu ISV.**



Rysunek 2. Struktura: a) stewiozydu oraz b) produktu jego hydrolizy – izostewiolu.

W przeszłości związki pochodzenia naturalnego i ich analogi strukturalne wniosły istotny wkład w proces odkrywania leków, zwłaszcza w przypadku farmakoterapii nowotworów i chorób zakaźnych, ale także w innych obszarach terapeutycznych, jak choroby sercowo-naczyniowe (np. statyny), czy stwardnienie rozsiane (np. fingolimod). Struktura stewiozydu (i produktu jego hydrolizy – izostewiolu) może być wykorzystana w projektowaniu i syntezie nowych, bioaktywnych związków. Izostewiol posiada wiele zalet, m.in. nietoksyczność, niski koszt produkcji, a także specyficzne cechy budowy jak sztywność cząsteczki czy chiralność, co zachęca do projektowania różnorodnych analogów izostewiolu o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym. W związku z powyższym, izostewiol jest jedną z preferowanych struktur w procesie projektowania nowych leków i ma ugruntowaną pozycję w dziedzinie chemii medycznej.

## Cel

Celem badawczym przedstawionego cyklu habilitacyjnego było racjonalne zaprojektowanie nowych inhibitorów aktywowanego czynnika krzepnięcia X – pochodnych estru etylowego izostewiolu (*N*-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu oraz etery oksymu estru etylowego izostewiolu) jako alternatywy wobec doustnych bezpośrednich antykoagulantów. Ustalenie cech strukturalnych pochodnych estru etylowego izostewiolu, które w największym stopniu wpływają na aktywność hamującą wobec FXa jest kluczowe z perspektywy głębszego zrozumienia mechanizmu oddziaływań inhibitor-receptor oraz optymalizacji znanej już struktury w celu otrzymania związku o pożądanej sile działania i selektywności. **Dlatego projektowanie oparte zostało na wiedzy strukturalnej uzyskanej z przeprowadzonych badań modelowania molekularnego, tj. analizy QSAR oraz dokowania molekularnego.** Z uwagi na niewielką ilość otrzymanych do tej pory pochodnych izostewiolu, których aktywność hamująca wobec FXa została przebadana *in vitro*, w celu opracowania oraz dalszego doskonalenia metodologii badań wybrałem liczną grupę pochodnych antrapirazolu. Badania *in silico* analogów antrapirazolu miały na celu przewidywanie aktywności przeciwnowotworowej oraz ewaluację mocy predykcyjnej czterech nowoczesnych algorytmów uczenia maszynowego wykorzystanych jako algorytmy przetwarzania końcowego w prowadzonych analizach QSAR, a w konsekwencji wskazanie algorytmu o najwyższej mocy predykcyjnej do zastosowania w modelowaniu molekularnym pochodnych estru etylowego izostewiolu.

Przebieg badań:

- opracowanie metodologii badań modelowania molekularnego z wykorzystaniem 73 pochodnych antrapirazolu (wizualizacja struktury, optymalizacja geometryczna, obliczanie deskryptorów molekularnych, analiza regresji z implementacją nowoczesnego algorytmu uczenia maszynowego wielozmiennej regresji adaptacyjnej z wykorzystaniem funkcji sklepanych, walidacja modelu) oraz zastosowanie opracowanego modelu QSAR do predykcji aktywności przeciwnowotworowej pochodnych antrapirazolu (P1);

- wykorzystanie opracowanej metodologii do identyfikacji cech strukturalnych wpływających na aktywność hamującą *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu wobec FXa (P2);
- zastosowanie czterech nowoczesnych algorytmów uczenia maszynowego do rozwiązania postawionego problemu regresyjnego w analizie QSAR pochodnych antrapirazolu oraz ich ewaluacja prowadząca do wskazania najbardziej efektywnego algorytmu o najwyższej wartości prognostycznej, co spowoduje podkreślenie najistotniejszych właściwości molekularnych wpływających na aktywność farmakologiczną analizowanych związków (P3),
- łączne wykorzystanie dwóch opracowanych metod modelowania molekularnego – QSAR oraz dokowania molekularnego do racjonalnego projektowania nowych pochodnych eterów oksymu estru etylowego izostewiolu (P4) oraz nowych *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (P5) jako terapeutycznych inhibitorów aktywowanego czynnika krzepnięcia X. W ostatnim etapie wyselekcjonowanie kandydatów do dalszych badań tj. syntezy i badań *in vitro*.

### Modelowanie molekularne pochodnych antrapirazolu oraz izostewiolu

Badania modelowania molekularnego zaplanowałem i przeprowadziłem dla 73 pochodnych antrapirazolu (P1 i P3), 17 eterów oksymu estru etylowego izostewiolu (P4) oraz 20 *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (P2 i P5). Spośród wielu istniejących metod opartych na chemii teoretycznej i zastosowań modelowania molekularnego prowadzone badania oparłem o wizualizację struktury, optymalizację geometryczną, przewidywanie aktywności farmakologicznej (analiza QSAR) oraz badanie interakcji molekularnych (dokowanie). Otrzymane wyniki posłużyły do projektowania opartego na wiedzy strukturalnej nowych pochodnych estru etylowego izostewiolu jako terapeutycznych inhibitorów aktywowanego czynnika krzepnięcia X (P4 i P5).

## Metodologia optymalizacji geometrii przestrzennej badanych cząsteczek

Pierwszym etapem każdego z prowadzonych badań (P1-P5) było stworzenie i przestrzenna wizualizacja struktur analizowanych związków w programie Hyperchem 8.0 (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA), dla których dane dotyczące ich aktywności biologicznej (połowa maksymalnego stężenia hamującego -  $IC_{50}$  lub stała inhibicji -  $K_i$ ) wprowadzono na podstawie wyników badań *in vitro* opisanych w dostępnej literaturze naukowej. Poczynając od geometrii startowej, kolejnym krokiem było znalezienie takiej geometrii cząsteczki, w której osiąga ona minimum energii. Optymalizację geometryczną uzyskano stosując metodę gradientu sprzężonego Polaka-Ribiere'a. W pierwszej kolejności przeprowadzono optymalizację, stosując metodę mechaniki molekularnej (pole siłowe MM+). Określono wartość gradientu branego do obliczeń (ang. *Root mean square gradient*) – 0,01 kcal/(Å·mol) oraz maksymalną ilość cykli obliczeniowych (30 000). Następnie zastosowano półempiryczną metodę chemii kwantowej Austin Model 1 (AM1) w ramach ograniczonego formalizmu Hartree-Focka (RHF, ang. *Restricted Hartree-Fock*). Wartość gradientu oraz maksymalna ilość cykli obliczeniowych pozostały niezmiennie. Sama procedura optymalizacji przebiega w sposób iteracyjny. Oznacza to, że w każdym kroku optymalizacji wybierany jest kąt, którego zmiana spowoduje największy spadek energii cząsteczki. Dzieje się tak do momentu, w którym zmiana żadnego z kątów nie spowoduje założonego spadku energii i tym samym proces zostaje zakończony, a badana struktura zostaje zoptymalizowana (przykładowe zoptymalizowane struktury – Rysunek 3.). Zastosowanie metody semiempirycznej zapewnia nie tylko wysoki poziom zgodności z obliczeniami metodami *ab initio*, ale także czyni całą procedurę bardziej ekonomiczną i oszczędzającą czas. Niewątpliwie zaletą zastosowanej metody AM1 jest także brak wysublimowanych wymagań dotyczących sprzętu komputerowego. Metoda ta jednak ma swoje ograniczenia, dlatego niektóre przewidywania bywają nieprecyzyjne (np. zbyt niskie bariery rotacyjne, zbyt stabilne pięciocłonowe pierścienie i niedokładna standardowa entalpia tworzenia dla związków chemicznych o dużej ilości lokalizacji ładunku).



szeroko wykorzystywane do opracowywania modeli QSAR służących do przewidywania właściwości fizykochemicznych, farmakologicznych, czy toksykologicznych. Przed przystąpieniem do analizy statystycznej wykluczono deskryptory o wartościach stałych i zbliżonych do stałych, odchyleniu standardowym mniejszym niż 0,0001, wysoce skorelowanych i z co najmniej jedną brakującą wartością.

### Zastosowane algorytmy uczenia maszynowego

Istnieje szeroki wachlarz nowoczesnych, elastycznych algorytmów, dających dobre predykcje nawet w przypadku skomplikowanych zależności, jednakże wciąż w bardzo dużej ilości prac naukowych prezentowane są wyniki analiz QSAR z wykorzystaniem wielokrotnej regresji liniowej (MLR, ang. *multiple linear regression*). MLR jest jedną z pierwszych technik statystycznych wykorzystywanych do konstruowania modeli QSAR (tradycyjne metody QSAR). Ze względu na złożone zestawy danych wejściowych oraz skomplikowane zależności (zmienna zależna nie zależy od predyktorów w sposób prosty albo przynajmniej monotoniczny), w prowadzonych przeze mnie badaniach do rozwiązania postawionych problemów regresyjnych wykorzystałem nowoczesne algorytmy obliczeniowe, które oferują najbardziej efektywne dopasowanie modelu do danych empirycznych, a co z tym związane najwyższą moc predykcyjną. Do przeprowadzenia analizy statystycznej zastosowałem oprogramowanie Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, California, USA).

W badaniach zastosowałem wielozmienną regresję adaptacyjną z wykorzystaniem funkcji sklejaných (MARS, ang. *Multivariate Adaptive Regression Splines*) (P1 i P2). Jest to algorytm zaproponowany przez Friedmana w 1991 roku, predysponowany do rozwiązywania wielowymiarowych problemów regresyjnych i klasyfikacyjnych, elastyczny i dający dokładne predykcje nawet w przypadku skomplikowanych zależności. W 1993 roku Veaux i in. zasugerowali, że algorytm ten można stosować w podobnych przypadkach jak sieci neuronowe. Jest to procedura nieparametryczna, nie wymagająca założeń dotyczących funkcyjnej zależności między zmiennymi zależnymi a niezależnymi, dlatego model generowany jest jako zestaw współczynników oraz funkcji bazowych wyłącznie na podstawie analizowanych danych.

Do tworzenia modeli matematycznych wykorzystałem także sztuczne sieci neuronowe (ANNs, ang. *Artificial Neural Networks*), (P3, P4, P5), dla których inspiracją są biologiczne



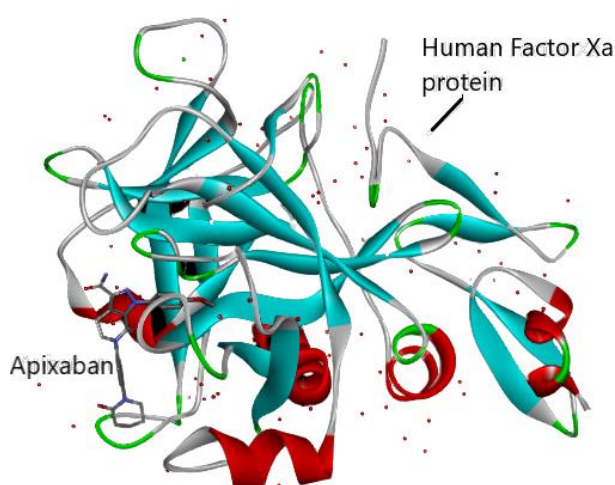
systemy nerwowe. Zastosowano je po raz pierwszy w analizach QSAR na początku lat 70-tych XX wieku. Obecnie zainteresowanie sieciami neuronowymi stale rośnie i można je wykorzystać do rozwiązania każdego rozwiązywalnego zadania w matematyce obliczeniowej, w tym tzw. zagadnień niepoprawnie postawionych, które pojawiają się w bezwzględnej większości analiz QSAR. Sieć neuronowa podczas procesu uczenia odnajduje nieliniowy model analizowanego systemu bez potrzeby podawania jakichkolwiek założeń dotyczących jego kształtu. Obliczeniowo ANN można zobrazować jako wiele połączonych neuronów ułożonych w warstwy (wejściową, ukrytą i wyjściową). Z biologicznego punktu widzenia impuls nerwowy przemieszcza się z neuronu do neuronu. Podobnie w sztucznej sieci neuronowej neurony tworzą strukturę jednokierunkową. Każdy neuron oblicza ważoną sumę swoich wejść, następnie modyfikuje ją za pomocą funkcji przejścia, tzw. funkcji aktywacji i generuje numeryczne dane wyjściowe.

W analizach regresji wykorzystałem także algorytm las losowy (ang. *Random Forest*) oraz wzmacniane drzewa regresyjne (ang. *Boosted Trees*) (P3). Algorytm las losowy został po raz pierwszy zaproponowany przez Briemana i jest oparty na zespole drzew decyzyjnych. Do stosowania w analizach ilościowej zależności struktura molekularna versus aktywność biologiczna został wprowadzony w 2003 roku przez Svetnika i wsp. Pod względem obliczeniowym każde drzewo regresji jest tworzone z wylosowanego ze zwracaniem podzbioru z dostępnego zbioru uczącego, a następnie losowana jest określona liczba zmiennych objaśniających i znajdowany jest najlepszy podział w każdym węźle drzewa. Liczba zmiennych do wypróbowania w każdym węźle jest głównym parametrem regulującym. Uczenie należy zakończyć, gdy liczba drzew osiągnie ustalone maksimum lub błąd w próbie testowej przestanie maleć. Prognoza jest osiągnana poprzez agregację (zwykłą większością głosów lub uśrednieniem) prognoz zespołu drzew. Las losowy to narzędzie przystosowane do analiz QSAR, ze względu na wbudowaną ocenę zdolności predykcyjnej oraz względnej ważności deskryptorów. Algorytm wzmacnianych drzew rozwinął się w wyniku zastosowania metod wzmacniania do drzew regresyjnych i stanowi ciekawe wyzwanie w kontekście selekcji i predykcji modeli. W porównaniu do lasu losowego, technika wzmacniania umożliwia wybór najlepszego modelu ze zbioru wiarygodnych modeli dopasowanych do danych lub średniej wszystkich modeli ważonych na podstawie pewnej miary obliczania mocy predykcyjnej. Działanie algorytmu opiera się na tworzenie ciągu bardzo prostych drzew, z których każde kolejne jest utworzone do przewidywania reszt generowanych przez poprzednie. Wzmacniane

drzewa nie tylko zachowują pozytywne własności drzew regresyjnych, ale wyróżnia je wyższa moc predykcyjna oraz łatwiejsza interpretacja uzyskanych wyników.

### Dokowanie molekularne

W prowadzonych badaniach zastosowałem również dokowanie molekularne (P4 i P5). Jest to metoda służąca do predykcji preferowanej pozycji oraz konformacji ligandu po związaniu w miejscu wiążącym receptora, a także do interpretacji występujących oddziaływań oraz oceny siły wiązania utworzonego kompleksu. Jest to najpopularniejsza metoda stosowana w projektowaniu leków opartym na strukturze. Badana cząsteczka jest określana jako ligand, ponieważ oddziałuje z miejscem aktywnym białka tworząc stabilny kompleks. Aby rozpocząć symulację należy poznać strukturę receptora, którym w prowadzonych badaniach był aktywowany czynnik krzepnięcia X (tworzący kompleks z apiksabanem; PDB ID: 2P16), a jego strukturę otrzymaną na drodze krystalografii rentgenowskiej pobrano z biblioteki białek RCSB Protein Data Bank w formacie PDB (Rysunek 4.).



Rysunek 4: Struktura białka czynnika Xa w kompleksie z apiksabanem zaczerpnięta z RCSB Protein Data Bank (P4 i P5).

Białko zostało przygotowane w celu uzdatnienia miejsca wiązania przy użyciu oprogramowania AutoDock Vina (The Center for Computational Structural Biology, La Jolla, Kalifornia, USA). W tym celu usunięto cząsteczki wody, niepożądane reszty oraz inhibitor związany z białkiem (apiksaban), a także dodano ładunki cząstkowe do poszczególnych aminokwasów metodą Kollmanna i Gasteigera. Struktura białka aktywowanego czynnika

krzepnięcia X przygotowanego do interakcji z badanymi cząsteczkami z zaznaczonym miejscem wiążącym jest przedstawiona na Rysunku 5. Przygotowanie ligandów obejmowało 43 eterowe pochodne oksymu estru etylowego izostewiolu (P4) oraz 23 *N*-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (P5), w tym nowo zaprojektowane związki o najbardziej obiecującej aktywności hamującej FXa przewidywanej przez opracowane modele QSAR, a także znane inhibitory FXa, a mianowicie apiksaban, edoksaban oraz rywaroksaban, które zapisane zostały w formacie pliku PDB przy użyciu programu BIOVIA Discovery Studio 2021 Client (Discngine S.A.S., Paryż, Francja).



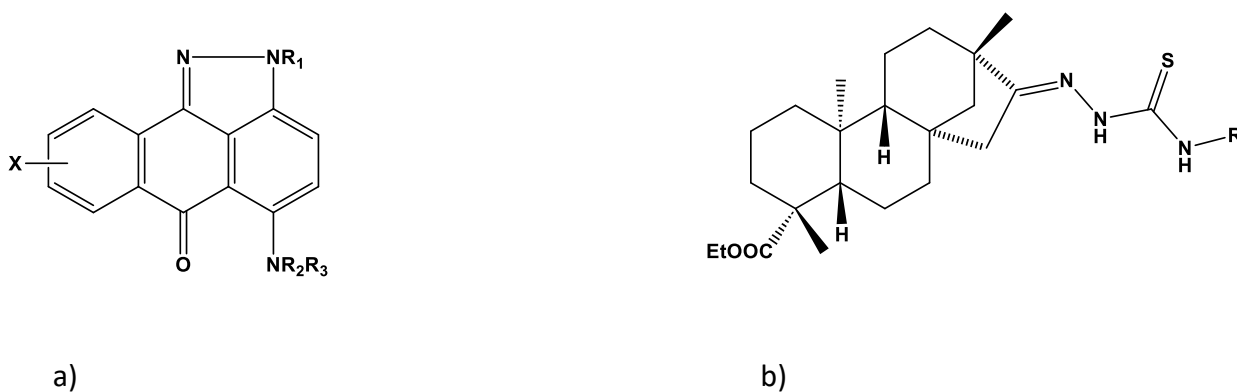
Rysunek 5: Przygotowana do symulacji dokowania struktura białka czynnika Xa (przedstawiona w kompleksie z apiksabanem, P4 i P5).

Miejsce wiążące białka zostało zidentyfikowane na podstawie pozycji inhibitora FXa - apiksabanu, a jego wymiary ustalono za pomocą Discovery Studio 2021 Client. Strukturę białka i badanych ligandów uprzednio zoptymalizowanych geometrycznie wprowadzono do oprogramowania PyRx (SourceForge, San Diego, CA, USA). Miejsce wiążące białka zaznaczono prostopadłością (ang. *grid box*) o wymiarach 25 x 25 x 25 Å i jego położenie w przestrzeni zaznaczono w układzie kartezjańskim (współrzędne: X = 9,54, Y = 43,27 i Z = 63,47). Symulację dokowania molekularnego przeprowadzono przy użyciu programu Autodock Vina, w którym zarówno algorytm jak i funkcja oceniająca są domyślne. Wybrana została dokładność funkcji oceniającej poprzez określenie parametru „exhaustiveness” (wartość 8) oraz liczbę otrzymanych sposobów wiązania (modów) przez określenie parametru „num\_modes arg” (wartość 9). Proces został uruchomiony i wszystkie ligandy zostały zadokowane, każdy dając

dziewięć modów z odpowiednimi wynikami dokowania (Docking Scores) określonymi jako wolna energia wiązania inhibitor-enzym wyrażona w jednostkach kcal/mol. Interakcje dokowania wszystkich cząsteczek z białkiem zostały zwizualizowane jako obrazy 2D i 3D przy użyciu Discovery Studio 2021 Client.

### Przewidywanie aktywności farmakologicznej pochodnych antrapirazolu i izostewiolu

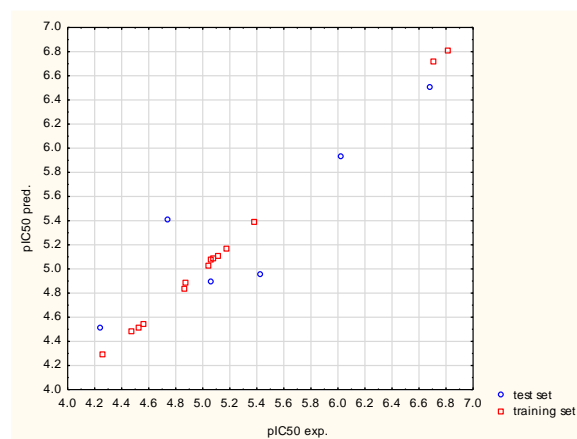
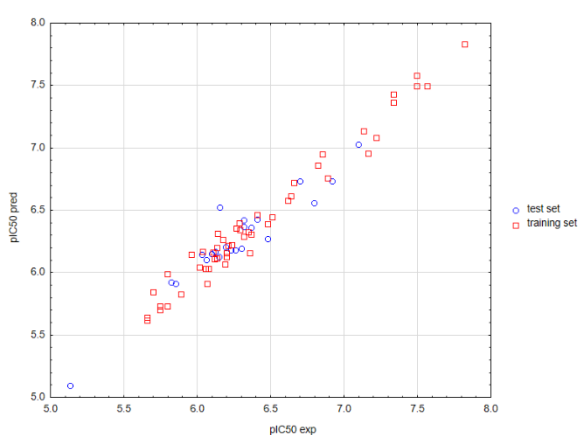
Analizie QSAR poddano 73 pochodne antrapirazolu (P1) oraz 20 *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu (P2) (Rysunek 6.).



Rysunek 6. Struktura badanych pochodnych a) antrapirazolu b) tiosemikarbazonu izostewiolu (struktury poszczególnych analogów opisane w P1 i P2).

Do opracowania procedury modelowania QSAR wybrałem wspomnianą powyżej grupę pochodnych antrapirazolu, której liczebność umożliwiła stworzenie procedury do zastosowania w kolejnych badaniach. Do rozwiązania postawionego problemu regresyjnego wykorzystałem algorytm wielozmiennej regresji adaptacyjnej z wykorzystaniem funkcji sklepanych (MARSplines). Opracowana procedura modelowania obejmuje: stworzenie i wizualizację przestrzenną badanych cząsteczek, optymalizację geometryczną, obliczanie deskryptorów molekularnych oraz analizę regresji zgodnie z metodologią opisaną powyżej. **Rezultatem prowadzonych badań jest stworzenie dwóch modeli matematycznych służących przewidywaniu aktywności przeciwnowotworowej dla pochodnych antrapirazolu (P1) oraz aktywności hamującej wobec aktywnego czynnika krzepnięcia X dla *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (P2).**

Za pomocą algorytmu MARS dla każdego zestawu związków utworzonych zostało kilka submodeli QSAR, a późniejsza analiza obliczonych podstawowych parametrów walidacyjnych ( $R^2$ ,  $Q^2$ , MAE) doprowadziła do wyboru najbardziej efektywnego, który najlepiej opisuje ilościową zależność struktura-aktywność i może być wykorzystany do przewidywania aktywności farmakologicznej. Model opracowany dla pochodnych antrapirazolu zawiera rzędną początkową oraz sumę ważoną ośmiu pojedynczych funkcji bazowych, dwunastu funkcji, które są interakcjami drugiego rzędu wartości deskryptorów molekularnych oraz dwóch funkcji, które są interakcjami trzeciego rzędu. Z kolei model uzyskany dla pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu zawiera rzędną początkową oraz sumę ważoną sześciu pojedynczych funkcji bazowych (równania modeli dostępne w P1 i P2). Wartości  $pIC_{50}$  ( $pIC_{50pred}$ ) obliczone przez opracowany model porównano z danymi eksperymentalnymi ( $pIC_{50exp}$ ) na wykresach rozrzutu, które wskazują na zależność dodatnią o mocnej sile (Rysunek 7.).



a)

b)

Rysunek 7: Wykresy rozrzutu prezentujące korelacje między aktywnością wyznaczoną za pomocą modelu obliczoną i otrzymaną eksperymentalnie dla a) pochodnych antrapirazolu, b) pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu.

Wysoką moc predykcyjną uzyskanych modeli potwierdziłem na podstawie przeprowadzonej walidacji (Tabela 1.).

Tabela 1. Wartości otrzymanych parametrów walidacyjnych dla modeli predykcyjnych MARS.

Parametr	Wartość		Kryteria akceptacji	Znaczenie
	Pochodne antrapirazolu	Pochodne ISV		
$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{cal})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y}_{training})^2}$ a)	0,9617	0,9985	$\sim 1$	miara zmienności danych obserwowanych i przewidywanych
$Q^2$ (or $Q_{Loo}^2$ ) = $1 - \frac{\sum(Y_{obs(training)} - Y_{pred(training)})^2}{\sum(Y_{obs(training)} - \bar{Y}_{(training)})^2}$ b)	0,9016	0,7922	$\geq 0,5$	$R^2$ sprawdzony pod kątem walidacji wewnętrznej
$Q_{F1}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs(test)} - Y_{pred(test)})^2}{\sum(Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{(training)})^2}$	0,9119	0,9874	$\geq 0,5$	mierzy korelację między obserwowanymi i przewidywanymi danymi zestawu testowego
$Q_{F2}^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs(test)} - Y_{pred(test)})^2}{\sum(Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{(test)})^2}$	0,90163	0,7927	$\geq 0,5$	prawie równe lub zbliżone wartości $Q_{(F2)}^2$ i $Q_{(F1)}^2$ wskazują, że średnia ze zbioru uczącego jest zbliżona do średniej ze zbioru testowego.
$Q_{F3}^2 = 1 - \frac{ \sum(Y_{obs(test)} - Y_{pred(test)})^2 /n_{test}}{ \sum(Y_{obs(train)} - \bar{Y}_{(train)})^2 /n_{train}}$	0,7959	0,9706	$\geq 0,5$	jest to miara przewidywalności modelu
$CCC = \frac{2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 + n(\bar{x} - \bar{y})^2}$ c)	0,9496	0,9635	$\sim 1$	mierzy zarówno precyzję, jak i dokładność, wykrywając odpowiednio odległość obserwacji od linii dopasowania i stopień odchylenia linii regresji od linii przechodzącej przez początek układu współrzędnych. Każde odchylenie linii regresji od linii zgodności daje wartość CCC mniejszą niż 1.
$r_m^2 = \frac{(r^2 + r_m'^2)}{2}$ oraz $\Delta r_m^2 =  r_m^2 - r_m'^2 $ , gdzie $r_m^2 = r^2 \times \left(1 - \sqrt{r^2 - r_0'^2}\right)$ $r_m'^2 = r^2 \times \left(1 - \sqrt{r^2 - r_0'^2}\right)$ Parametry $r^2$ i $r_0'^2$ są określone następująco: $r_0'^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - k \times Y_{pred})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y}_{obs})^2}$ and $r_0'^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{pred} - k' \times Y_{obs})^2}{\sum(Y_{pred} - \bar{Y}_{pred})^2}$				
	0,0173	0,0196	$\Delta r_m^2 < 0,2$	odzwierciedlają ogólną przewidywalność modelu dla całego zestawu danych
	0,9181	0,9216	warunkiem, że $r_m^2 > 0,5$	

---

Parametry  $k$  i  $k'$  są określone

następująco:

$$k = \frac{\sum(Y_{obs} \times Y_{pred})}{\sum(Y_{pred})^2} \text{ oraz } k' = \frac{\sum(Y_{obs} \times Y_{pred})}{\sum(Y_{obs})^2}$$

---

$PRESS = \sum(Y_{obs} - Y_{pred})^2$ d)	0,3446	0,8154	ocenia model przy użyciu przewidywanej resztkowej sumy kwadratów
$SDEP = \sqrt{\frac{PRESS}{n}}$ e)	0,1252	0,2020	obliczone na podstawie PRESS
$MAE = \frac{\sum Y_{obs} - Y_{pred} }{n}$ f)	0,0772	0,1017	wskaźnik błędów w kontekście badań modelowania predykcyjnego

---

- a) współczynnik determinacji
- b) współczynnik walidacji krzyżowej
- c) współczynnik korelacji zgodności (CCC, ang. *Concordance Correlation Coefficient*)
- d) przewidywana resztowa suma kwadratów (PRESS, ang. *the predicted residual sum of squares*)
- e) odchylenie standardowe błędu prognozy (SDEP, ang. *standard deviation of error of prediction*)
- f) średni błąd bezwzględny (MAE, ang. *Mean Absolute Error*)

Należy podkreślić, że wszystkie obliczone parametry spełniają kryteria akceptacji, co oznacza, że modele mogą zostać wdrożone, czyli zastosowane podczas poszukiwania nowych pochodnych antrapirazolu o potencjale przeciwnowotworowym oraz odpowiednio nowych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu o aktywności hamującej wobec FXa. Model opracowany dla pochodnych antrapirazolu wyjaśnia ponad 96% zmienności badanej aktywności przeciwnowotworowej, a model opracowany dla pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu wyjaśnia ponad 99% zmienności badanej aktywności przeciwwakrzepowej. **Model opracowany przeze mnie metodą MARS został zastosowany do przewidywania aktywności przeciwnowotworowej pochodnych antrapirazolu, dla których nie została ona dotychczas wyznaczona eksperymentalnie (P1 – supplementary materials).**

Opracowane modele wskazują, które właściwości molekularne w największym stopniu wpływają na aktywność biologiczną badanych pochodnych. Wśród zmiennych niezależnych pojawiających się w statystycznie istotnych modelach MARS można wyróżnić deskryptory należące następujących bloków: *2D Atom Pairs*, *2D autocorrelations*, *3D-MoRSE* (ang. *Molecular Representation of Structures based on Electron diffraction*), *GETAWAY* (ang. *Geometry, Topology and Atom-Weights Assembly*), *burden eigenvalues*, *RDF* (ang. *Radial Distribution Function*) oraz *WHIM* (ang. *Weighted Holistic Invariant Molecular descriptors*). Większość istotnych deskryptorów obecnych w modelach QSAR opisuje trójwymiarowe

właściwości geometryczne cząsteczki. Opis deskryptorów wchodzących w skład modeli oraz ich wkład wyrażony jako liczba pojawienia się każdego indeksu w danym modelu znajdują się w Tabeli 2.

Tabela 2. Wybrane deskryptory i liczba ich występowania w funkcjach bazowych modeli MARS (P1 i P2).

Pochodne antrapirazolu					Pochodne tiosemikarbazonu izostewiolu				
Symbol	Definicja	Blok	Wymiarowość	Liczba występowania w funkcjach bazowych	Symbol	Definicja	Blok	Wymiarowość	Liczba występowania w funkcjach bazowych
Mor05s	sygnał 05/ ważony stanem I	3D-Morse	3D	9	B01[C-Cl]	obecność/nieobecność C-Cl w odległości topologicznej 1	2D Atom Pairs	2D	1
Mor19m	sygnał 19/ ważony masowo	3D-Morse	3D	6	E2m	kierunkowy wskaźnik WHIM dostępności drugiego komponentu /ważony masą	WHIM	3D	1
MATS8e	autokorelacja Morana opóźnienia 8 ważona elektroujemnością Sandersona	2D autocorrelations	2D	4	L3v	kierunkowy wskaźnik WHIM wielkości trzeciego komponentu /ważony objętością van der Waalsa	WHIM	3D	1
H1e	H autokorelacja ważona elektroujemnością Sandersona dla opóźnienia równego 1	GETAWAY	3D	3	Mor06i	sygnał 06/ważony potencjałem jonizacji	3D-Morse descriptors	3D	1
ATSC7v	Wyśredkowana autokorelacja Broto- Moreau ważona objętością van der Waalsa dla opóźnienia równego 7	2D autocorrelations	2D	2	RDF070i	funkcja rozkładu radialnego- 070/ważona potencjałem jonizacji	RDF	3D	1
ATSC1e	wyśredkowana autokorelacja Broto- Moreau ważona elektroujemnością Sandersona dla opóźnienia równego 1	2D autocorrelations	2D	2	HATS7s	autokorelacja ważona wskaźnikiem wpływu dla opóźnienia równego 7 / wagowanego stanem I	GETAWAY	3D	1
SpMax8_	największa wartość własna n. 8 macierzy Burden ważonej stanem I	Burden eigenvalues	2D	2					
Mor21e	sygnał 21/ważony elektroujemnością Sandersona	3D-Morse descriptors	3D	2					



Mor13s	sygnał 13/ważony przez stan I	3D-MoRSE descriptors	3D	2
R5p	R autokorelacja ważona polaryzowalnością dla opóźnienia równego 5	GETAWAY descriptors	3D	2
ATSC1s	wyśrodkowana autokorelacja Broto-Moreau ważona stanem I dla opóźnienia równego 1	2D autocorrelations	2D	1
ATSC8s	wyśrodkowana autokorelacja Broto-Moreau ważona stanem I dla opóźnienia równego 8	2D autocorrelations	2D	1
RDF135e	funkcja rozkładu radialnego-135/ważona elektroujemnością Sandersona	RDF descriptors	3D	1
HATS5s	autokorelacja ważona wskaźnikiem wpływu dla opóźnienia równego 5 / wagowanego stanem I	GETAWAY descriptors	3D	1

Badania prowadzone na przestrzeni lat nad pochodnymi antrapirazolu ukazują, że zmiany strukturalne w podstawowym łańcuchu bocznym przy N-2 oraz przy C-5, C-7 mogą mieć znaczący wpływ na ich aktywność cytotoksyczną, a także na zdolność do inhibicji topoizomerazy II. W analizie ilościowych zależności struktura-aktywność pochodnych antrapirazolu deskryptory reprezentujące trójwymiarową strukturę mają największy udział w modelu QSAR (P1). Na pierwszy plan wysuwają się deskryptory 3D-MoRSE, których wartości są bardzo wrażliwe na wszelkie zmiany konformacyjne w cząsteczce oraz indeksy GETAWAY kodujące informacje o wpływie, jaki każdy z atomów ma na ostateczny kształt całej cząsteczki. **Uzyskane rezultaty wskazują, że największe znaczenie dla aktywności przeciwnowotworowej pochodnych antrapirazolu mają parametry oparte na geometrii molekularnej i właściwościach fizykochemicznych, odzwierciedlające topologię molekularną oraz rozkład odległości między atomami. W związku z tym można postulować, że różnice w aktywności przeciwnowotworowej badanych pochodnych antrapirazolu są wynikiem zmian odległości międzyatomowych lub wprowadzenia nowych atomów w łańcuchach bocznych przy N-2, C-5 oraz C-7 (P1).** Możliwych jest wiele potencjalnych kombinacji zróżnicowanych podstawników przy atomach N-2 i C-5 w pierścieniu antrapirazolu, dlatego dalsze badania tej grupy związków mają swoje uzasadnienie. **Zastosowana w modelowaniu semiempiryczna**

metoda AM1 do optymalizacji geometrii, proces generowania deskryptorów oraz uzyskanie regresji za pomocą algorytmu MARS nie wymagają zaawansowanego i kosztownego sprzętu komputerowego, jak również dużego nakładu czasu. Argumenty te przemawiają za rutynowym stosowaniem opracowanej procedury modelowania molekularnego w poszukiwaniu leków przeciwnowotworowych opartych na strukturze antrapirazolu (P1). Uniwersalność opracowanej procedury pozwala na jej zastosowanie do poszukiwania leków również o innej strukturze oraz aktywności farmakologicznej.

Opracowana przeze mnie procedura modelowania molekularnego została zastosowana także do wyprowadzenia ilościowych zależności struktura-aktywność dla *N*-podstawionych pochodnych estru etylowego tiosemikarbazonu izostewiolu (P2). **Model QSAR dla pochodnych ISV wskazuje, że z punktu widzenia struktury chemicznej największe znaczenie dla badanej aktywności mają: obecność atomów chloru (B01[C-Cl]), równomierny rozkład masy atomowej (E2m), objętość molekularna (L3v), trójwymiarowy rozkład molekularnego potencjału jonizacji (Mor06i i RDF070i) oraz wewnętrzne właściwości cząsteczki (HATS7s). Pięć z sześciu deskryptorów to deskryptory geometryczne ujmujące ilościowo trójwymiarowe aspekty struktury molekularnej.** Pomimo niewielkiego zbioru badanych związków, została uzyskana wysoka wartość aplikacyjna otrzymanego modelu, potwierdzona przez obszerny protokół walidacyjny (P2). Ponieważ sygnalizacja FXa-PAR jest potencjalnym celem terapeutycznym w celu poprawy upośledzonego metabolizmu i insulinooporności w otyłości, model predykcyjny może stanowić cenne narzędzie w poszukiwaniu nowych aktywnych analogów izostewiolu.

**Najważniejsze wyniki opisane w P1 oraz P2 zostały również przedstawione w formie streszczenia pod tytułem "MARSplines approach for quantitative relationships between structure and pharmacological activity of potential drug candidates" (DOI:10.3390/ECMC2022-13170) zaprezentowanego na konferencji międzynarodowej The 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry "Small molecules as drug candidates" (ECMC 2022), 2022, 01-11-2022 - 30-11-2022, Online, Szwajcaria). Udowodniłem, że opracowana procedura modelowania molekularnego wykorzystująca do rozwiązania problemu regresyjnego nowoczesny algorytm uczenia maszynowego MARSplines może stanowić integralną część procesu projektowania leków opartego na wiedzy strukturalnej.**

## Zastosowanie wybranych algorytmów uczenia maszynowego

Do rozwiązania złożonych problemów regresyjnych dla badanych zależności struktura-aktywność pochodnych antrapirazolu przeprowadziłem analizę statystyczną uwzględniającą cztery nowoczesne algorytmy uczenia maszynowego, takie jak wspomniana technika MARS a także ANNs, losowy las oraz wzmacniane drzewa regresyjne (P3). Następnie dokonałem ewaluacji mocy predykcyjnej modeli ze wskazaniem najbardziej efektywnego algorytmu, najlepiej przystosowanego do postawionego problemu. W analizach wykorzystana została ta sama grupa 73 pochodnych antrapirazolu oraz opisana powyżej metodologia modelowania molekularnego. Jednakże w etapie poprzedzającym analizę regresji zastosowałem proces preselekcji najbardziej istotnych 15 deskryptorów (zmiennych niezależnych), aby podnieść wartość prognostyczną modelu i wskazać najistotniejsze właściwości molekularne wpływające na aktywność farmakologiczną analizowanych związków. Wyselekcjonowane deskryptory należały do następujących bloków: *2D autocorrelations*, *3D atom pairs*, *2D atom pairs*, *2D matrix-based descriptors*, *ETA indices*, *GETAWAY descriptors*, *Atom type E-state indices* oraz *Walk and path counts*. 87% z nich zawiera informacje topologiczne, a pozostałe deskryptory opisują geometryczną, trójwymiarową strukturę cząsteczki. Dla porównania w pracy P1 deskryptory geometryczne miały udział w modelu MARS rzędu 68%. Dla każdego z algorytmów po przeprowadzeniu treningu dokonywałem ewaluacji otrzymanego modelu. Jeżeli wynik nie był zadowalający, przed przystąpieniem do uczenia z wykorzystaniem kolejnego algorytmu, dokonywałem zmian w obrębie ustawionych pierwotnie wartości hiperparametrów i powtórnie trenowałem model. Podejście zaowocowało powstaniem portfolio submodeli dla każdego z algorytmów, z którego wybrałem model pozwalający uzyskać najbardziej zadowalające efekty. Wartości zoptymalizowanych hiperparametrów, czyli zmiennych przekazywanych do funkcji inicjalizującej model zostały przedstawione w Tabeli 3. Mocne oraz słabe strony zastosowanych algorytmów oraz pierwotnie ustawione hiperparametry są opisane w P3.

Tabela 3. Zoptymalizowane hiperparametry zastosowanych algorytmów

ANN	MARSplines	Las losowy	Wzmacniane drzewa
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sposób tworzenia modeli: Automatyczne poszukiwanie sieci;</li> <li>• Typ sieci: MLP;</li> <li>• Liczba neuronów ukrytych: 7;</li> <li>• Funkcja aktywacji – Neuronów ukryte: Tanh;</li> <li>• Funkcja aktywacji – Neuronów wyjściowe: Logistyczna;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liczba funkcji bazowych: 13;</li> <li>• Rząd interakcji: 3;</li> <li>• Kara: 2;</li> <li>• Próg: 0,0005;</li> <li>• Usuwanie nieistotnych funkcji bazowych: tak.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liczba predyktorów: 4;</li> <li>• Liczba drzew: 100;</li> <li>• Minimalna liczebność: 5;</li> <li>• Maksymalna liczba poziomów: 10;</li> <li>• Minimalna liczebność potomka: 5;</li> <li>• Maksymalna liczba węzłów: 100;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Współczynnik uczenia: 0,1;</li> <li>• Liczba drzew: 44;</li> <li>• Wartość początkowa generatora liczb los.: 1;</li> <li>• Minimalna liczebność: 5;</li> <li>• Maksymalna liczba poziomów: 10;</li> <li>• Minimalna liczba potomka: 1;</li> <li>• Maksymalna liczba węzłów: 3;</li> </ul>

Obliczone metryki walidacyjne dla modeli otrzymanych za pomocą każdego z zastosowanych algorytmów pozwoliły na ocenę ich przydatności w rozwiązaniu założonego problemu regresyjnego. Kluczowe do dokonania oceny parametry walidacyjne zostały przedstawione w Tabeli 4.

Tabela 4. Wartości wskaźników walidacji obliczonych dla każdego algorytmu.

Algorytm	ANN	MARS	Losowy las	Wzmacniane drzewa
Parametr	Wartość			
$R^2 = 1 - \frac{\sum(Y_{obs} - Y_{cal})^2}{\sum(Y_{obs} - \bar{Y}_{training})^2}$ a)	0,8836	0,1429	0,1877	0,8296
$Q^2 (or Q_{LOO}^2) = 1 - \frac{\sum(Y_{obs(training)} - Y_{pred(training)})^2}{\sum(Y_{obs(training)} - \bar{Y}_{(training)})^2}$ b)	0,9258	0,5986	0,1975	0,9769
$PRESS = \sum(Y_{obs} - Y_{pred})^2$ c)	1,3270	9,7732	9,2623	1,9429
$MAE = \frac{\sum Y_{obs} - Y_{pred} }{n}$ d)	0,0911	0,2779	0,2844	0,1060

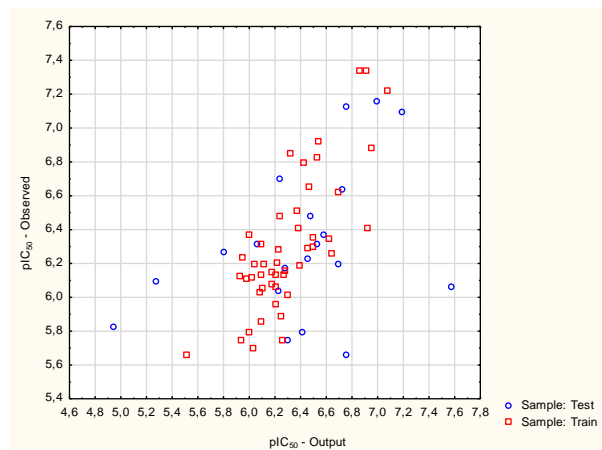
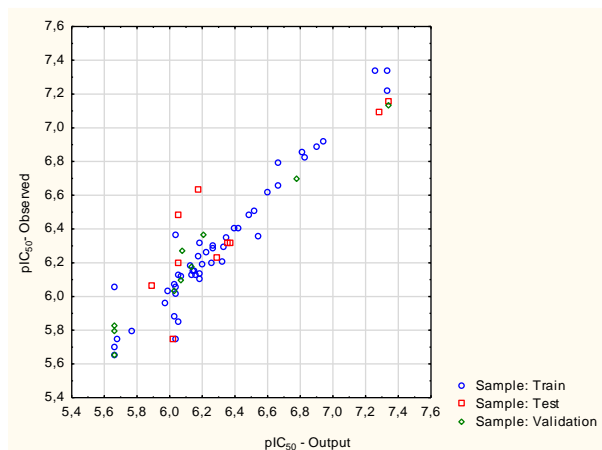
a) współczynnik determinacji

b) współczynnik walidacji krzyżowej

c) przewidywana resztowa suma kwadratów (PRESS, ang. *the predicted residual sum of squares*)

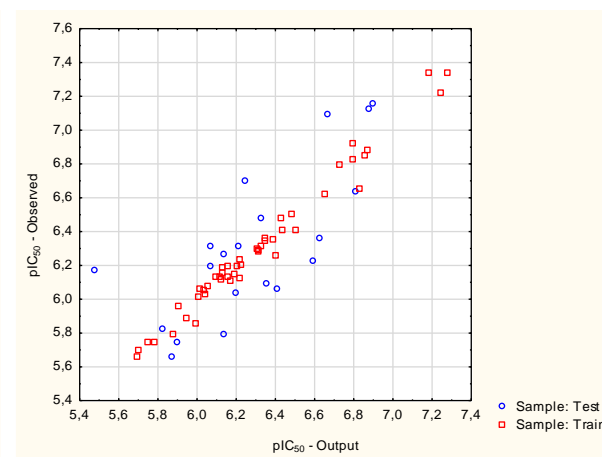
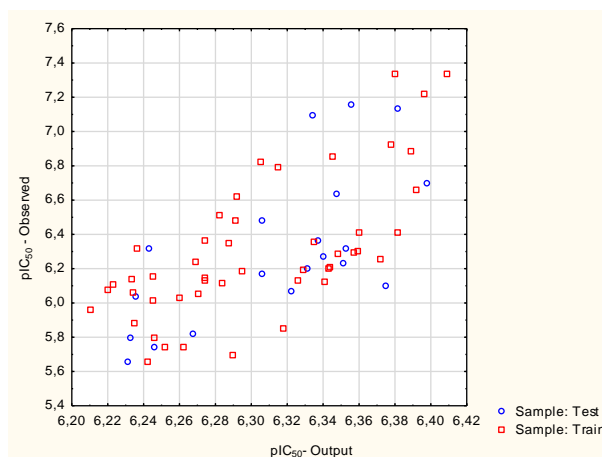
d) średni błąd bezwzględny (MAE, ang. *Mean Absolute Error*)

**Analiza parametrów walidacyjnych oraz wykresów rozrzutu (Rysunek 8.) jednoznacznie wskazuje, że wiarygodność i trafność przewidywania opracowanych modeli z wykorzystaniem algorytmów ANN i wzmocnianych drzew regresyjnych zostały potwierdzone.** Dla modelu uzyskanego z użyciem algorytmu sztuczne sieci neuronowe otrzymano najwyższy współczynnik determinacji. Jako „miarę sukcesu” wytrenowanych modeli regresyjnych przyjęto średni błąd bezwzględny (Mean Absolute Error, MAE), którego wartość jest najniższa również dla modelu ANN. **Model ANN najdokładniej odzwierciedla zależność pomiędzy przewidywaną aktywnością przeciwnowotworową na podstawie deskryptorów molekularnych a aktywnością wyznaczoną *in vitro*, dlatego został wybrany do ustalenia i wyjaśnienia związku między strukturą molekularną a aktywnością przeciwnowotworową pochodnych antrapirazolu w ramach rozważań teoretycznych (P3).** W przypadku ograniczenia ilości zmiennych niezależnych w wyniku przeprowadzonej preselekcji algorytm MARS oraz las losowy okazały się nieodpowiednie do rozwiązania tak postawionego problemu. Algorytmy te sprawdzają się lepiej w przypadku większego zestawu zmiennych, tak jak w przypadkach opisanych w P1 i P2.



a)

b)



c)

d)

Rysunek 8. Wykresy wartości obserwowanych względem przewidywanych przed model: a) ANN, b) MARS, c) losowy las i d) wzmacniane drzewa regresyjne.

Sieć neuronowa MLP 15-7-1, wybrana do celów predykcyjnych, ma postać perceptronu wielowarstwowego (Multilayer Perceptron, MLP) i składa się z jednej warstwy wejściowej (15 neuronów), jednej warstwy ukrytej (7 neuronów) oraz jednej warstwy wyjściowej (1 neuron). Do aktywacji neuronów w warstwie ukrytej została użyta funkcji Tanh (tangens hiperboliczny), a w warstwie wyjściowej funkcji sigmoidalnej, zwanej też logistyczną. Zastosowany algorytm uczenia to BFGS (ang. *Broyden-FletcherGoldfarb-Shanno*) 102 (ang. *Quasi-Newton*). Błąd średniokwadratowy (RMS, ang. *Root Mean Square error*) osiągnął najniższą wartość w

odniesieniu do zestawu danych walidacyjnych w 17 cyklu uczenia. Przeprowadzona analiza wrażliwości wskazała, które zmienne mają największe znaczenie dla aktywności przeciwnowotworowej badanych pochodnych antrapirazolu (Tabela 5.). Wrażliwość sieci jest obliczana jako iloraz błędu stwierdzonego przy uruchomieniu sieci dla zbioru danych bez jednej zmiennej i błędu występującego z kompletem zmiennych (błąd pierwotny). Im większy błąd występuje po odrzuceniu danej zmiennej w stosunku do błędu pierwotnego, tym bardziej sieć jest wrażliwa na brak tej zmiennej. Wśród najwyżej ocenionych deskryptorów według modelu ANN (iloraz błędu > 10) znalazły się cztery indeksy należące do *2D Autocorrelations*, dwa wskaźniki reprezentujące *2D Matrix-based descriptors* oraz po jednym deskrytorze dla każdej z następujących klas: *3D Atom pairs*, *2D Atom pairs*, oraz *ETA indices*.

Tabela 5. Wyniki analizy wrażliwości dla sieci neuronowej (MLP) 15-7-1 (P3).

Nazwa	Definicja	Blok	Iloraz błędu MLP 15-7-1	Pozycja
ATSC8s	wyśrodkowana autokorelacja Broto-Moreau ważona stanem I dla opóźnienia równego 8	2D autocorrelations	36,31362	1
G(N..N)	suma odległości geometrycznych pomiędzy N..N	3D Atom Pairs	24,14980	2
T(N..N)	suma odległości topologicznych pomiędzy N..N	2D Atom Pairs	17,73548	3
ATS1s	autokorelacja Broto-Moreau (funkcja logarytmiczna) ważona stanem I dla opóźnienia równego 1	2D autocorrelations	16,71192	4
SM1_Dz(Z)	moment spektralny rzędu 1 z macierzy Barysza ważony liczbą atomową	2D matrix-based descriptors	13,66256	5
SM1_Dz(e)	moment spektralny rzędu 1 z macierzy Barysza ważony elektroujemnością Sandersona	2D matrix-based descriptors	13,50655	6
ATSC4e	Wyśrodkowana autokorelacja Broto-Moreau ważona elektroujemnością Sandersona dla opóźnienia równego 4	2D autocorrelations	10,90670	7
Eta_F	indeks funkcjonalności eta	ETA indices	10,56049	8
GATS3i	autokorelacja Geary'ego ważona potencjałem jonizacji dla opóźnienia równego 3	2D autocorrelations	10,37957	9
SpAbs_B(s)	energia wykresu z macierzy Burden ważona stanem I	2D matrix-based descriptors	8,413823	10
R4m	autokorelacja R / ważona masa dla opóźnienia równego 4	GETAWAY	8,403155	11
SaasN	suma stanów aasN E	Atom-type E-state indices	3,339686	12
SM5_X	moment spektralny rzędu 5 z macierzy chi	2D matrix-based descriptors	3,217437	13
SRW09	samopowracający licznik kroków rzędu 9	Walk and path counts	1,479807	14
SRW07	samopowracający licznik kroków rzędu 7	Walk and path counts	1,280776	15



Powyższa strategia modelowania QSAR oparta na sztucznych sieciach neuronowych łączy informacje o topologii i topografii cząsteczek pochodnych antrapirazolu i może być wykorzystana do projektowania nowych analogów o aktywności przeciwnowotworowej (P3). Model ten pomaga w lepszym zrozumieniu interakcji między antrapirazolami i ich celem molekularnym. Może on być rozszerzony o badania uwzględniające interakcje białko-ligand. **Uczenie maszynowe jest nauką empiryczną i sprawność czy efektywność danego algorytmu zależy od danych wejściowych.** Dlatego zaprezentowane przeze mnie podejście wykorzystujące cztery różne algorytmy pozwala na dostosowanie analizy statystycznej do wybranego zbioru cząsteczek o określonej aktywności biologicznej. Gdy jeden z algorytmów zawiedzie, badacz może wybrać jeden z trzech pozostałych w ostatnim etapie modelowania, co czyni opracowaną przeze mnie procedurę uniwersalną.

### Projektowanie nowych pochodnych estru etylowego izostewiolu

Projektowanie molekularne nowych pochodnych estru etylowego izostewiolu zostało oparte na połączonej strategii analizy QSAR oraz dokowania molekularnego (P4 i P5). W analizach wykorzystałem 17 eterowych pochodnych oksymu estru etylowego izostewiolu (P4) oraz 20 *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (P5). Analizy QSAR przebiegały zgodnie z metodologią opisaną powyżej, obejmując etap preselekcji zmiennych niezależnych oraz zastosowanie sztucznych sieci neuronowych jako algorytmu przetwarzania końcowego, zgodnie z opublikowanymi wynikami (P3), wskazującymi najbardziej efektywny algorytm uczenia maszynowego dla postawionego problemu regresyjnego. Model QSAR umożliwił ustalenie zależności między deskryptorami molekularnymi reprezentującymi właściwości cząsteczek a aktywnością hamującą FXa. Symulację dokowania, przeprowadzoną zgodnie z metodologią opisaną powyżej, zastosowałem w celu lepszego zrozumienia mechanizmu oddziaływań z receptorem oraz zidentyfikowania kluczowych cech zwiększających powinowactwo wiązania ligand-receptor. **Informacje uzyskane dzięki zastosowaniu połączonej strategii QSAR-dokowanie molekularne posłużyły do racjonalnego zaprojektowania 26 nowych eterowych pochodnych oksymu estru etylowego izostewiolu oraz 11 *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu, dla których wyznaczyłem przewidywaną aktywność hamującą wobec aktywnego czynnika krzepnięcia X.**

## Nowe etery oksymu estru etylowego izostewiolu

Wdrożony przeze mnie model matematyczny ilustrujący ilościowe relacje struktura-aktywność dla eterów oksymu estru etylowego izostewiolu ma postać sieci neuronowej (MLP 5-8-1) i do jego wytrenowania wykorzystałem pięć indeksów molekularnych (P4). Trzy z pięciu obecnych w nim deskryptorów należą do deskryptorów geometrycznych 3D, a pozostałe dwa są deskryptorami topologicznymi 2D. Wskazuje to, że opis dwu- i trójwymiarowej struktury molekularnej jest najważniejszy dla aktywności przeciwwakrzepowej badanych związków ISV wyrażonej jako stała inhibicji ( $K_i$ ). Ponadto podnosi on wartość aplikacyjną modelu, ponieważ modelowana aktywność nie zależy tylko od trójwymiarowych właściwości cząsteczki. Analiza regresji ANN i będąca jej integralną częścią analiza wrażliwości sieci wskazały znaczenie poszczególnych deskryptorów dla aktywności hamującej FXa na podstawie najwyższego ilorazu błędów (Tabela 6.).

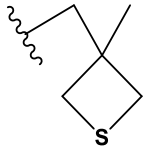
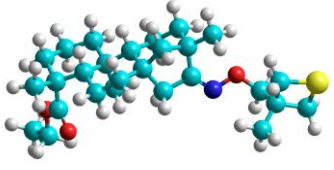
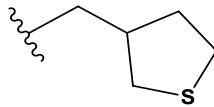
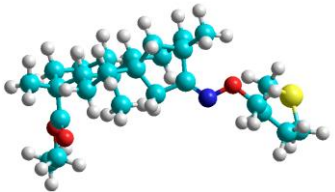
Tabela 6. Wyniki analizy wrażliwości dla modelu MLP 5-8-1.

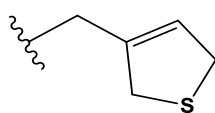
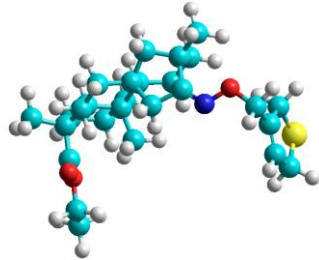
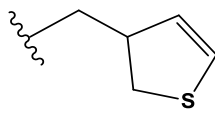
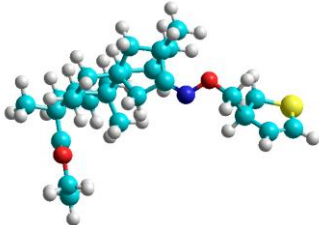
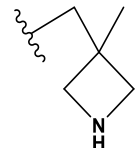
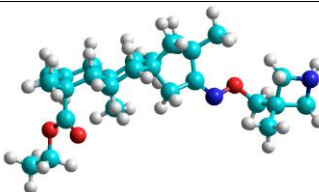
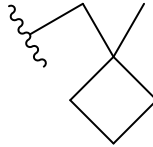
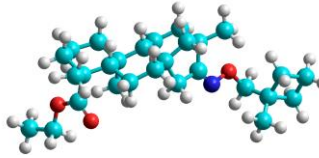
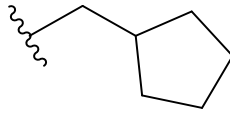
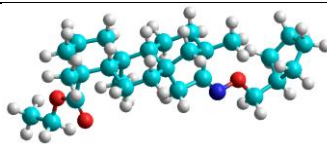
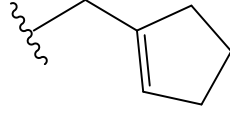
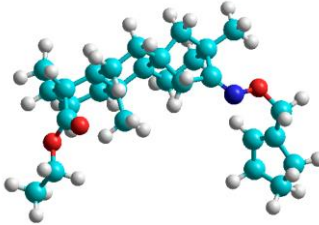
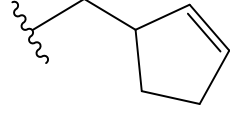
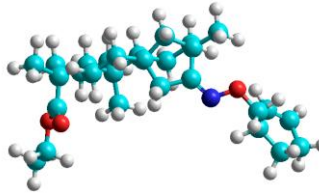
Nazwa	Definicja	Blok	Wymiarowość	Iloraz błędu MLP 5-8-1	Pozycja
GATS8p	autokorelacja Geary'ego opóźnienia 8 ważona polaryzowalnością	2D autocorrelations	2D	16,75531	1
HATS2i	autokorelacja ważona wskaźnikiem wpływu dla opóźnienia równego 2 / wagowanego potencjałem jonizacji	GETAWAY descriptors	3D	14,49011	2
R5e	autokorelacja R opóźnienia 5/ważona elektroujemnością Sandersona	GETAWAY descriptors	3D	13,33332	3
HATS2e	autokorelacja ważona wskaźnikiem wpływu dla opóźnienia równego 2 / wagowanego elektroujemnością Sandersona	GETAWAY descriptors	3D	8,866242	4
SpMAD_B(v)	spektralne średnie bezwzględne odchylenie od macierzy Burdena wagowane objętością van der Waalsa	2D-matrix-based descriptors	2D	8,699860	5

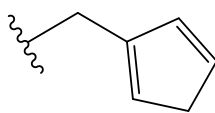
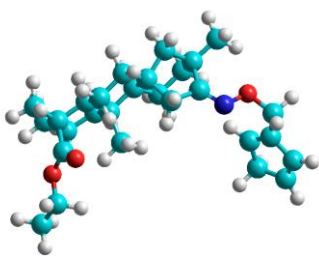
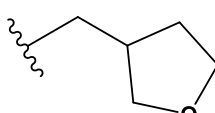
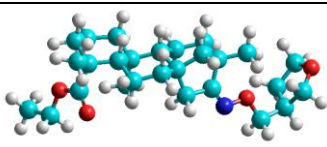
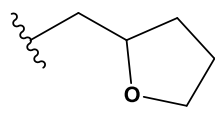
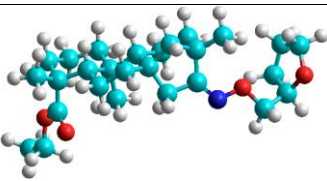
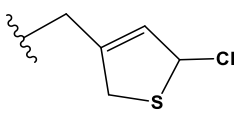
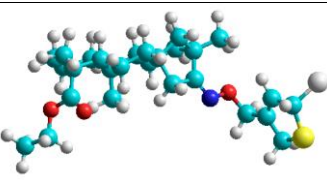
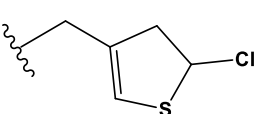
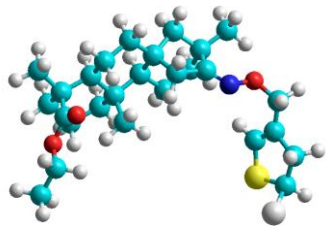
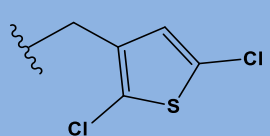
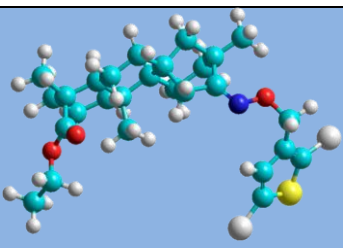
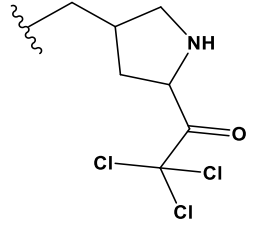
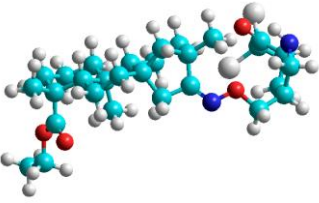
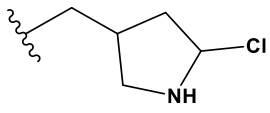
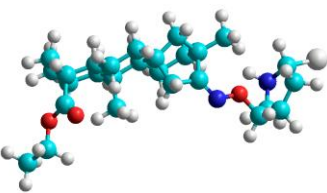
Rozważania teoretyczne przedstawione w P4 dotyczące ilościowych relacji struktura-aktywność odnoszą się głównie do właściwości elektronowych, obecności rozgałęzień i pierścieni, obecności polaryzowalnych par atomów, energii jonizacji i elektroujemności. Wcześniejsze badania odnoszące się do zsyntetyzowanych pochodnych ISV wskazują, że

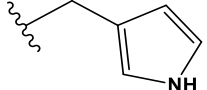
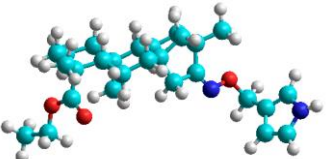
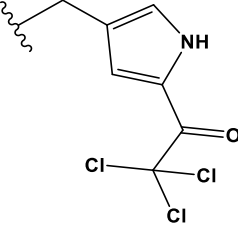
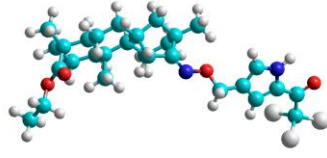
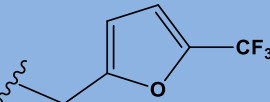
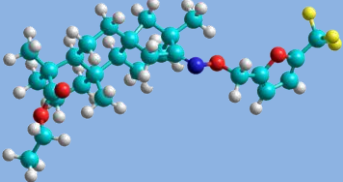
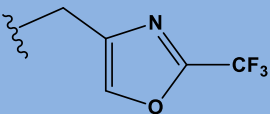
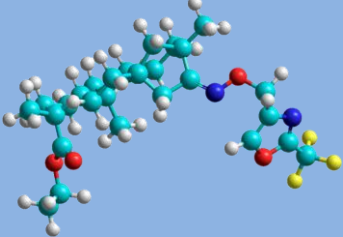
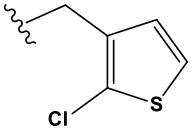
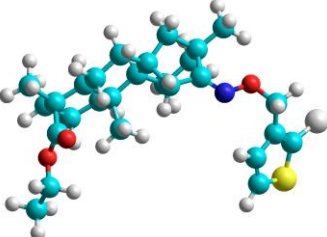
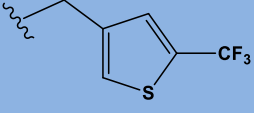
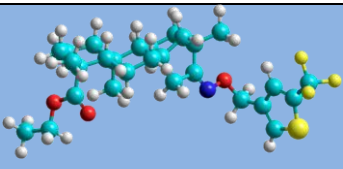
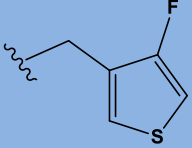
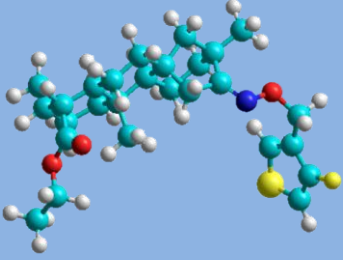
zestryfikowanie grupy karboksylowej i wprowadzenie ugrupowania eterooksymowego przy grupie karbonylowej w cząsteczce izostewiolu wzmacniają aktywność przeciwzakrzepową. Ponadto podstawniki takie jak: tiofen, 3-metylooksetan lub pentafluorobenzen mogą również wpływać na wzrost aktywności. **Zaprojektowany przeze mnie model ANN dał wgląd w aktywność hamującą FXa związków ISV, podkreślając rolę rozgałęzień cząsteczki, a także atomów elektroujemnych i polaryzowalnych oraz wskazując możliwe do zaprojektowania podstawniki, co może przyczynić się do powstania związków o wysokiej aktywności antykoagulacyjnej. Ponadto zgodnie z symulacją dokowania przeprowadzoną dla związków ISV z aktywnością hamującą FXa zbadaną eksperymentalnie można przypuszczać, że obecność atomu halogenu, zwłaszcza fluoru, może zwiększać powinowactwo wiązania ligand-receptor. Przewidywana aktywność farmakologiczna zaprojektowanych w P4 nowych pochodnych oraz wartości energii swobodnej wiązania ligand-receptor przedstawione są w Tabeli 7.**

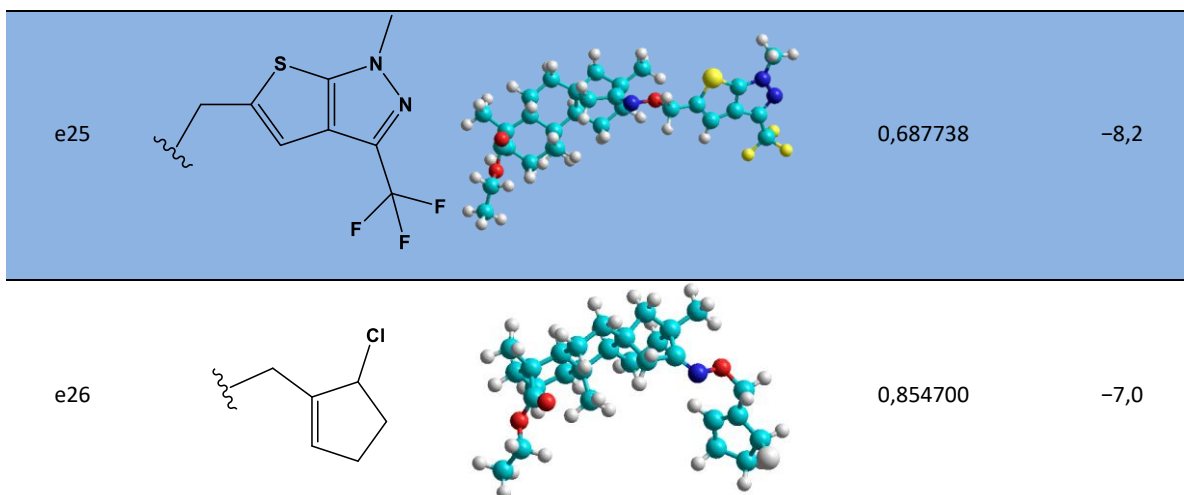
Tabela 7. Wartości przewidywanej aktywności hamującej FXa oraz energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-FXa dla nowo zaprojektowanych eterów oksymu estru etylowego izostewiolu (najbardziej aktywne związki według modelu QSAR potwierdzone dokowaniem wyróżniono kolorem niebieskim) (P4)

Kod	R *	Zoptymalizowana geometrycznie struktura przestrzenna**	Przewidywana aktywność hamująca wobec FXa: stała inhibicji ( $K_i$ ), [ $\mu\text{M}$ ] ***	Energia swobodna wiązania (kcal/mol)
e1			9,785990	-6,9
e2			1,118201	-7,7

e3			0,645249	-8,0
e4			9,282278	-7,4
e5			3,984843	-7,2
e6			6,454281	-7,1
e7			2,640193	-7,4
e8			1,421969	-7,4
e9			4,412301	-7,5

e10			1,569841	-7,6
e11			1,133094	-7,3
e12			0,936761	-7,7
e13			0,372101	-7,7
e14			0,544725	-7,2
e15			0,906731	-8,3
e16			0,947983	-6,9
e17			0,936441	-7,7

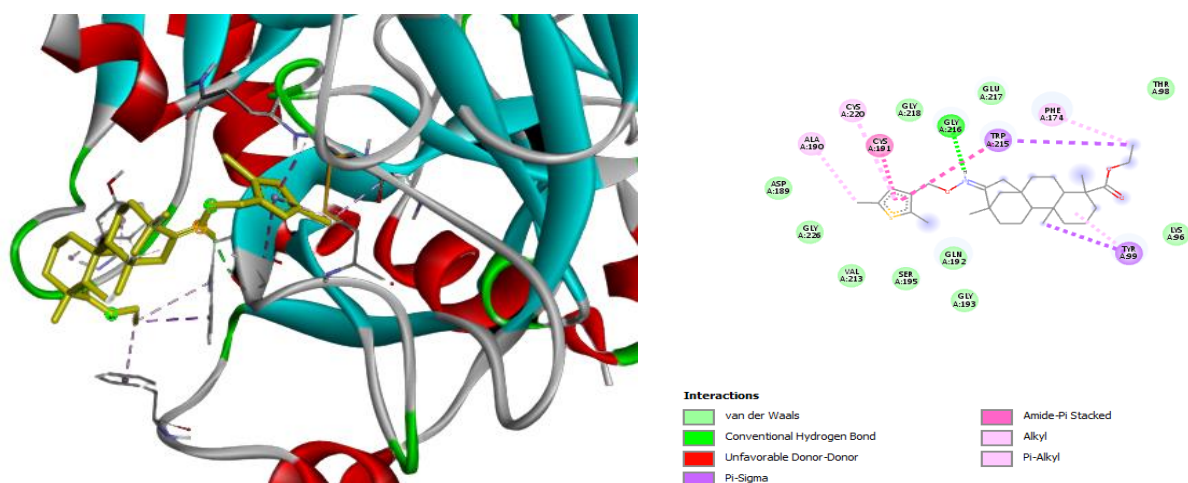
e18			0,650819	-7,4
e19			0,493827	-6,9
e20			0,673789	-8,1
e21			0,656182	-8,3
e22			0,749590	-7,0
e23			0,554588	-8,1
e24			0,642575	-8,2



\*podstawnik, \*\* kolorem niebieskim oznaczone są atomy węgla, czerwonym – tlenu, granatowym – azotu, żółtym – siarki (kule większe) i fluoru (kule mniejsze), białym – wodoru (kule mniejsze) oraz chloru (kule większe), \*\*\*stężenie molowe

**Dokowanie molekularne wykorzystałem do zbadania interakcji molekularnych i powinowactwa badanych pochodnych izostewiolu oraz zarejestrowanych na rynku inhibitorów FXa (rywaroksaban, edoksaban, apiksaban) do białka aktywowanego czynnika krzepnięcia X oraz do nadania priorytetów dla zaprojektowanych związków do dalszych ich badań. Badany zbiór zaprojektowanych pochodnych wykazał wyniki zbliżone do zarejestrowanych na rynku farmaceutycznym doustnych bezpośrednich antykoagulantów (P4). Wyniki symulacji dokowania pokazały, że wśród zaprojektowanych pochodnych strukturami o najlepszych zdolnościach do wiązania wewnątrz miejsca aktywnego FXa są związki oznaczone kodem e15 i e21 charakteryzujące się najniższą wartością energii swobodnej wiązania kompleksu inhibitor-enzym ( $\Delta G$ ), -8,3 kcal/mol, co jest zbliżone do edoksabanu (Tabela 7). Jednak powinowactwo tych związków do receptora okazało się nieco słabsze niż apiksabanu i rywaroksabanu. Podobnie, dla pochodnych oznaczonych kodem e20, e23, e24 i e25 uzyskałem wyniki zbliżone do związków e15 i e21. Dla utworzonych kompleksów ligand-receptor oddziaływania energetyczne uwzględniaty m.in. siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne oraz międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. Zaprojektowane pochodne ISV o przewidywanej najwyższej aktywności hamującej wobec FXa wskazane w Tabeli 6. wykazują podobne oddziaływanie z badanym białkiem, w którym połączony region policykliczny cząsteczki jest zaangażowany w interakcję molekularną z aromatyczną kieszenią S4 receptora wyłożoną resztami Tyr99, Phe174 i Trp215, a podstawnik R (Tabela 7.) zajmuje anionową kieszeń S1 wyłożoną resztami Asp189, Ser195**

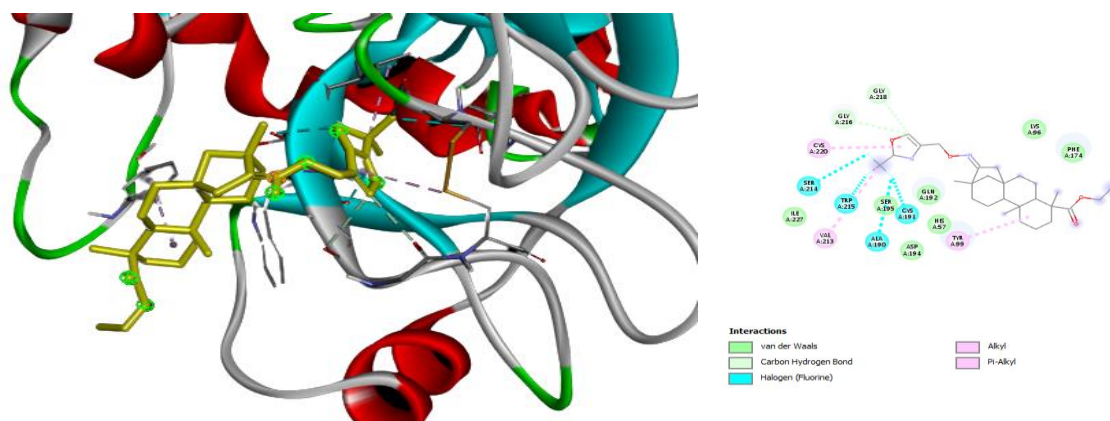
i Tyr228 oraz kieszeń S2. Uzyskane wartości energii swobodnej wiązania kompleksu ligand-receptor zbliżone do zarejestrowanych inhibitorów aktywowanego czynnika krzepnięcia X wskazują na wysokie prawdopodobieństwo powstania stabilnych oddziaływań między zaprojektowanymi ligandami a białkiem docelowym. Co więcej, wykazałem również dodatkowe interakcje w porównaniu do kompleksu FXa-edoksaban (P4), które również przemawiają za stabilnością powstałych kompleksów zaprojektowanych związków z FXa. Interakcje 3D i 2D najbardziej aktywnych zaprojektowanych pochodnych ISV oznaczonych kodem e15 oraz e21 z FXa zaprezentowane są na Rysunku 9. i Rysunku 10. Model wiązania związku e15 wskazuje unikalne oddziaływanie  $\pi$ - $\sigma$  między resztą tryptofanu 215 i pierścieniem tiofenu, a także grupą estrową w kieszeni S1. Uwagę zwraca również interakcja tiofenu z Asp 191 w kieszeni S1, która jest typowym oddziaływaniem dla znanych inhibitorów FXa i sugeruje, że obecność pierścienia tiofenu może poprawić aktywność liganda. Z kolei Tyrozyna 99 również wykazywała wiązanie  $\pi$ - $\sigma$  z grupą alkilową pierścienia policyklicznego (Rysunek 9.).



Rysunek 9. Interakcje 3D i 2D związku e15 z aktywowanym czynnikiem krzepnięcia X (P4).

W przypadku cząsteczki e21 zaobserwowałem interakcje grupy trifluorometylowej z aminokwasami Ser214, Trp215, Cys191 i Ala190 w regionie S1 i S2 białka (Rysunek 10.).





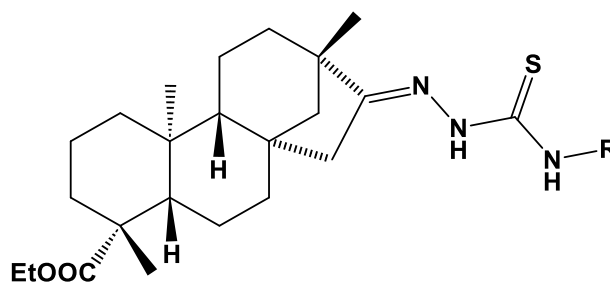
Rysunek 10. Interakcje 3D i 2D związku e21 z aktywowanym czynnikiem krzepnięcia X (P4).

Łączne zastosowanie obu metod modelowania ułatwiło projektowanie *in silico* nowych pochodnych eterów oksymu estru etylowego izostewiolu. **Przeprowadzone analizy wskazują, że najbardziej obiecującymi inhibitorami FXa są pochodne izostewiolu, zawierające pierścienie tiofenu, furanu i oksazolu lub układ skondensowanych pierścieni tiofenu i pirazolu z podstawnikiem elektronoakceptorowym, np. chlor, fluor lub podstawnik trifluorometylowy (P4).** Informacje te mogą okazać się być pomocne we wczesnym opracowywaniu leków przeciwzakrzepowych. Opracowana metoda może być szeroko stosowana przy projektowaniu nowych inhibitorów aktywowanego czynnika krzepnięcia X. Zaprojektowane analogi mogą być zsyntetyzowane oraz przebadane *in vitro*, co zweryfikuje ich rzeczywistą aktywność i będzie stanowić podstawę do dalszych badań dążących do uzyskania nowych inhibitorów FXa. **Na podstawie aktywności przewidywanej przez model QSAR, potwierdzonej symulacją dokowania zdecydowałem się na wskazanie sześciu zaprojektowanych eterowych pochodnych oksymu estru etylowego izostewiolu jako potencjalnych cząsteczek wiodących (P4), dla których w kolejnym etapie badań w ramach planowanej współpracy naukowej z inną jednostką planuję przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej w celu potwierdzenia stabilności otrzymanych kompleksów ligand-receptor, następnie syntezę związków o potwierdzonej stabilności oraz ocenę aktywności przeciwzakrzepowej *in vitro*.**

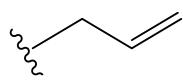
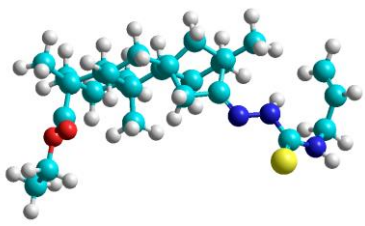
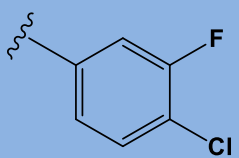
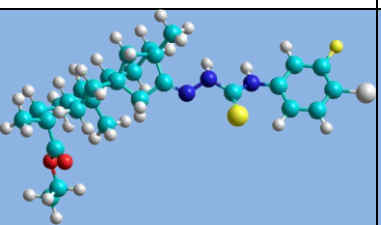
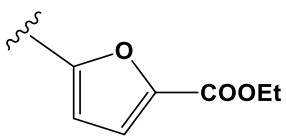
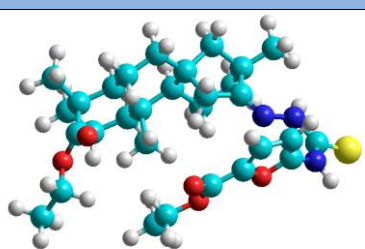
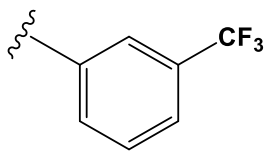
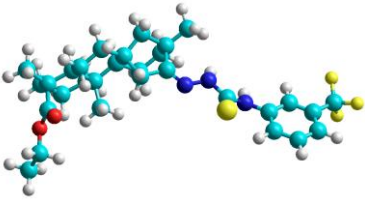
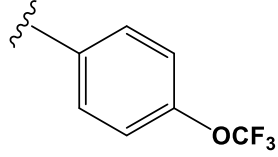
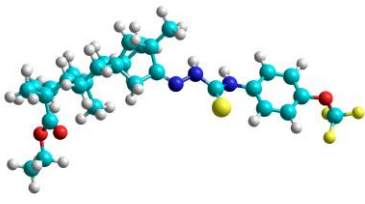
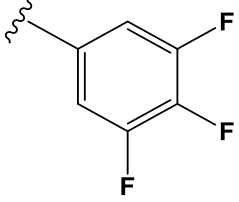
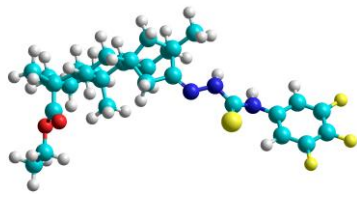
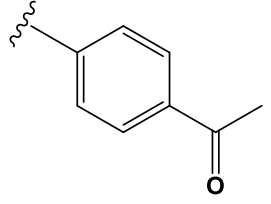
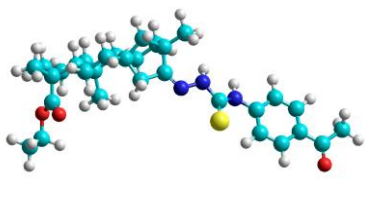
## Nowe N-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu

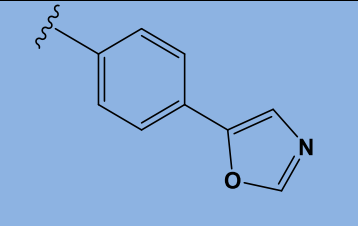
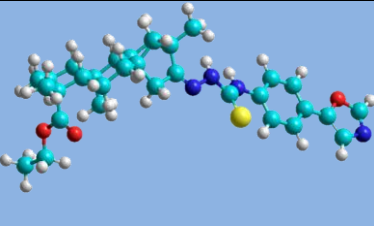
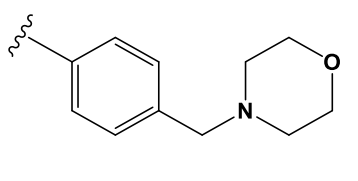
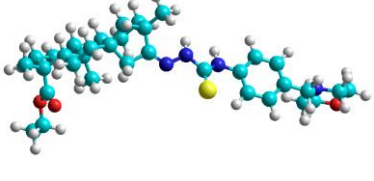
W modelowaniu molekularnym *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu, w pełni opisanym w opublikowanej pracy P5, opracowany model regresji nie tylko dobrze odzwierciedla zależności pomiędzy wyznaczoną eksperymentalnie aktywnością hamującą FXa a deskryptorami molekularnymi, ale został także wykorzystany do przewidywania tej aktywności dla nowych, zaprojektowanych *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (Tabela 8.).

Tabela 8. Przewidywana aktywność hamująca FXa zaprojektowanych *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (trzy najbardziej aktywne związki według modelu QSAR wyróżnione kolorem niebieskim) (P5).



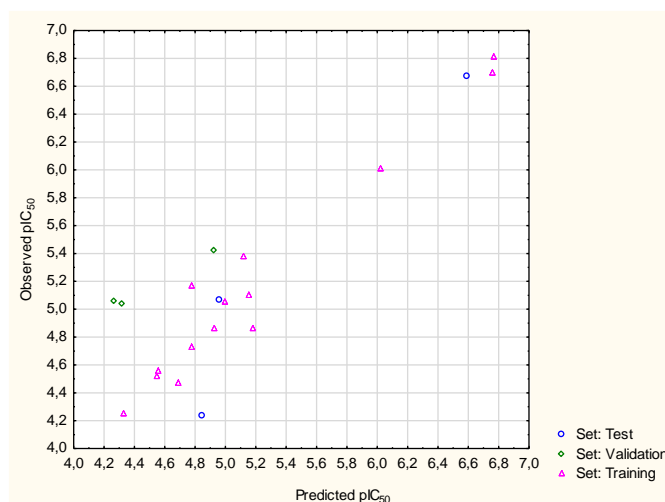
Kod	R*	Zoptymalizowana geometrycznie struktura przestrzenna**	Przewidywana aktywność hamująca wobec FXa: pIC <sub>50</sub> , [M] <sup>***</sup>	Przewidywana aktywność hamująca wobec FXa: IC <sub>50</sub> , [mM] <sup>***</sup>
e1			6,746	0,180
e2			4,288	51,577

e3			4,333	46,471
e4			6,747	0,179
e5			5,787	1,635
e6			4,269	53,889
e7			4,280	52,486
e8			4,261	54,889
e9			4,395	40,306

e10			6,383	0,415
e11			4,268	53,996

\* podstawnik, \*\* kolorem niebieskim oznaczone są atomy węgla, czerwonym – tlenu, granatowym – azotu, żółtym – siarki (kule większe) i fluoru (kule mniejsze), białym – wodoru (kule mniejsze) oraz chloru (kule większe), \*\*\*stężenie molowe

Predykcyjny model QSAR wyselekcjonowałem spośród około dwustu wytrenowanych sieci neuronowych. Wybrana sieć to system połączonych ze sobą neuronów ułożonych w trzech warstwach. Warstwa wejściowa składa się z 20 neuronów, z których każdy przyjmuje jeden z deskryptorów do dalszego przetwarzania. Warstwa pośrednia (ukryta) jest kluczowym elementem zaprojektowanej sieci, składającym się z jedenastu neuronów i przetwarzającym dane poprzez zastosowanie funkcji sigmoidalnej. Przechwytuje ona i odtwarza niezwykle złożone relacje wejścia-wyjścia. Ostatnią warstwą sieci jest warstwa wyjściowa, która składa się z jednego neuronu i generuje końcowy wynik, wyrażony jako wartość  $pIC_{50}$ . Jak przedstawiono na Rysunku 11. przewidywane wartości  $pIC_{50}$  są w dobrej zgodności z wartościami eksperymentalnymi, co wskazuje na istotną korelację między wybranymi deskryptorami a aktywnością hamującą FXa.

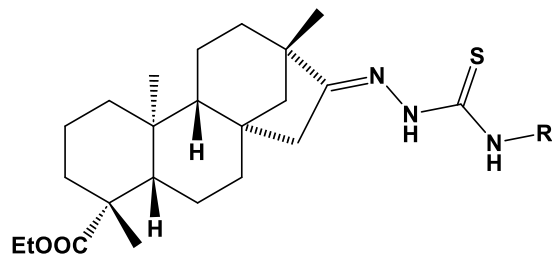


Rysunek 11. Graficzna prezentacja analizy regresji: zestaw treningowy  $R=0,976$ ; zestaw testowy  $R=0,959$  i zestaw walidacyjny  $R=0,994$  (P5).

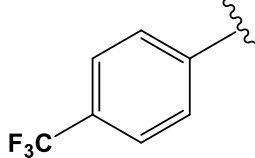
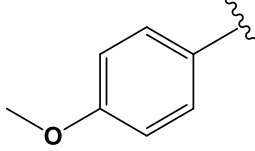
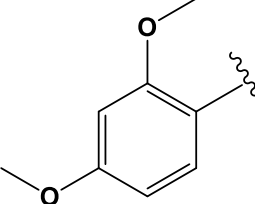
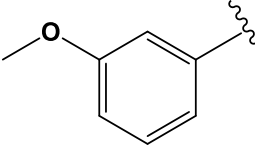
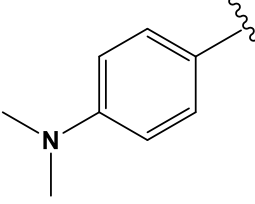
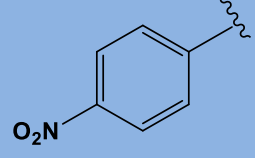
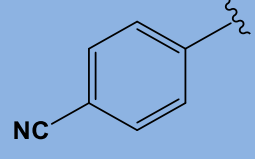
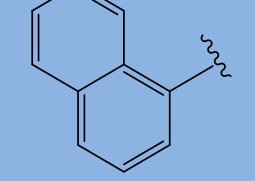
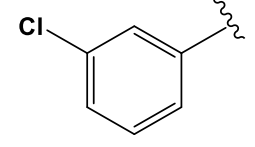
Opracowany model QSAR zawiera deskryptory molekularne 0D, 2D i 3D, dlatego kompleksowo odzwierciedla właściwości molekularne badanych pochodnych ISV. Warto podkreślić, że wykorzystanie różnych deskryptorów zawierających informacje o całej strukturze molekularnej zapewnia modele o lepszej predykcji w porównaniu do zawierających tylko indeksy związane z określonymi cechami cząsteczki (P5). Spośród 20 deskryptorów włączonych do modelu ANN (MLP 20-11-1), 60% to deskryptory topologiczne 2D, 25% opisuje trójwymiarową strukturę molekularną, a pozostałe 15% należy do deskryptorów konstytucyjnych. W ustalaniu ważności predyktorów w analizie wrażliwości posłużyłem się wielkością ilorazu błędów większego niż 2 i w ten sposób wyróżnionych zostało sześć najbardziej znaczących deskryptorów należących do następujących bloków: *2D Atom Pairs*, *GETAWAY descriptors*, *Burden eigenvalues*, *Constitutional indices* and *P\_VSA-like descriptors*. Analiza QSAR wskazuje, że dla aktywności hamującej wobec FXa pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu największe znaczenie ma obecność atomu chloru w różnych pozycjach pierścienia benzenowego, położenie każdego z atomów w trójwymiarowej przestrzeni molekularnej, polaryzowalności cząsteczki oraz obecność atomów o wysokiej hydrofobowości (P5).

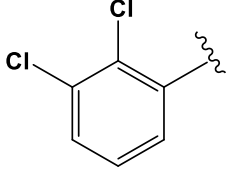
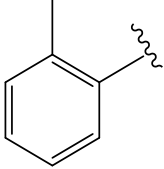
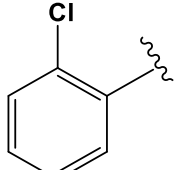
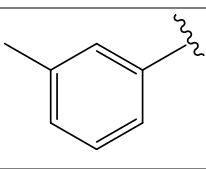
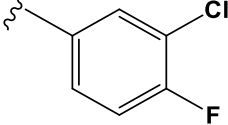
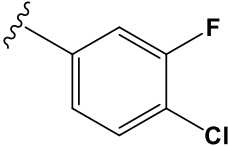
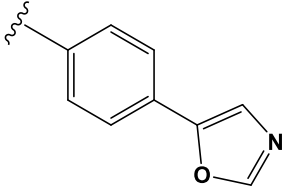
Symulacja dokowania została przeprowadzona dla 23 pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu (20 z eksperymentalnie zbadaną aktywnością oraz 3 zaprojektowane *in silico* pochodne z najwyższą przewidywaną aktywnością na podstawie modelu QSAR). Miarą stabilności powstałych kompleksów receptora białkowego i ligandu jest energia swobodna wiązania inhibitor-enzym, której najniższą wartość, tj. -9,3 kcal/mol uzyskano dla kompleksu receptor-związek o kodzie i23 (Tabela 9.), co jest wynikiem korzystniejszym od edoksabanu (-8,7 kcal/mol) i bardzo zbliżonym do rywaroksabanu (-9,4 kcal/mol) oraz apiksabanu (-10,3 kcal/mol). Wysokie powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu oraz niską wartość energii swobodnej kompleksu inhibitor-enzym (-9,2 kcal/mol) potwierdziłem także dla pochodnej oznaczonej kodem i20. Natomiast dla pochodnych oznaczonych kodem i32, i33 i i34 otrzymałem ten sam wynik dokowania wynoszący -9,0 kcal/mol, co jest wartością zbliżoną do znanych inhibitorów jak rywaroksaban oraz edoksaban. Wykazałem, że nowo zaprojektowane pochodne tiosemikarbazonu izostewiolu, o potencjalnej aktywności wobec FXa przewidywanej przez model QSAR, mogą tworzyć z aktywowanym czynnikiem krzepnięcia X kompleksy, których wartość energii swobodnej wiązania jest zbliżona do znanego inhibitora edoksabanu (P5).

Tabela 9. Wartości energii swobodnych wiązania kompleksów inhibitor-FXa dla *N*-podstawionych pochodnych tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu oraz zarejestrowanych na rynku inhibitorów (związki o największym powinowactwie do receptora wyróżniono kolorem niebieskim) (P5).



Kod	R*	Energia swobodna wiązania (kcal/mol)
i20		-9,2
i21		-8,8
i22		-8,9
i23		-9,3
i24		-8,8
i25		-7,1
i26		-7,0

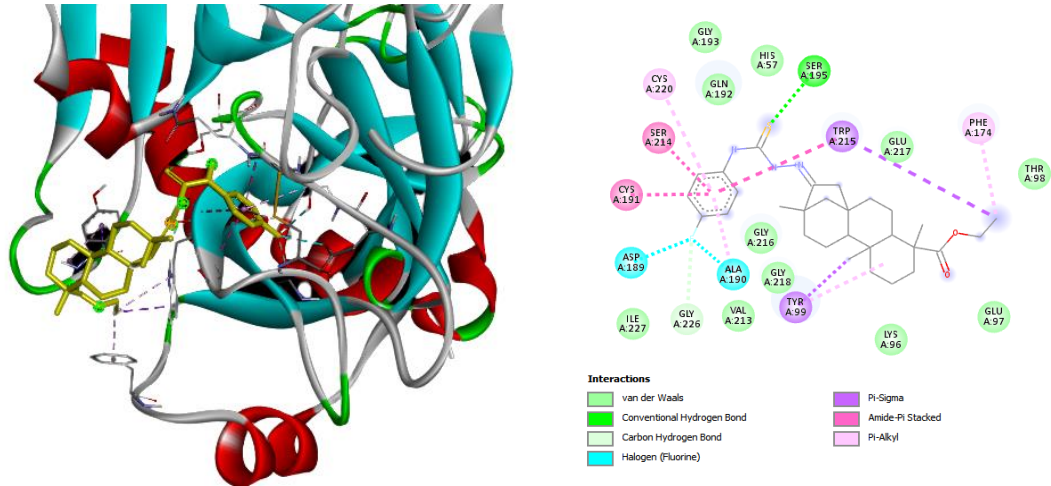
i27		-8,7
i28		-8,6
i29		-8,4
i30		-8,7
i31		-8,3
i32		-9,0
i33		-9,0
i34		-9,0
i35		-8,8

i36		-8,8
i37		-8,3
i38		-8,5
i39		-8,6
e1		-8,8
e4		-8,5
e10		-8,8
apixaban		-10,3
edoxaban		-8,7
rivaroxaban		-9,4

Interakcje inhibitor-enzym dla wszystkich utworzonych najkorzystniejszych energetycznie kompleksów obejmują oddziaływania van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne, a także międzycząsteczkowe wiązania wodorowe. Połączony region policykliczny zadokowanych pochodnych ISV zajmuje kieszeń S4 z resztami Tyr99, Phe174, Lys96 i Glu97. Z kolei pierścień aromatyczny tworzy wiązania van der Waalsa, konwencjonalne wiązania wodorowe oraz wiązania  $\pi$ -alkil i  $\pi$ -amid z aminokwasami w kieszeni S1. Interakcje 2D oraz 3D dla pochodnej

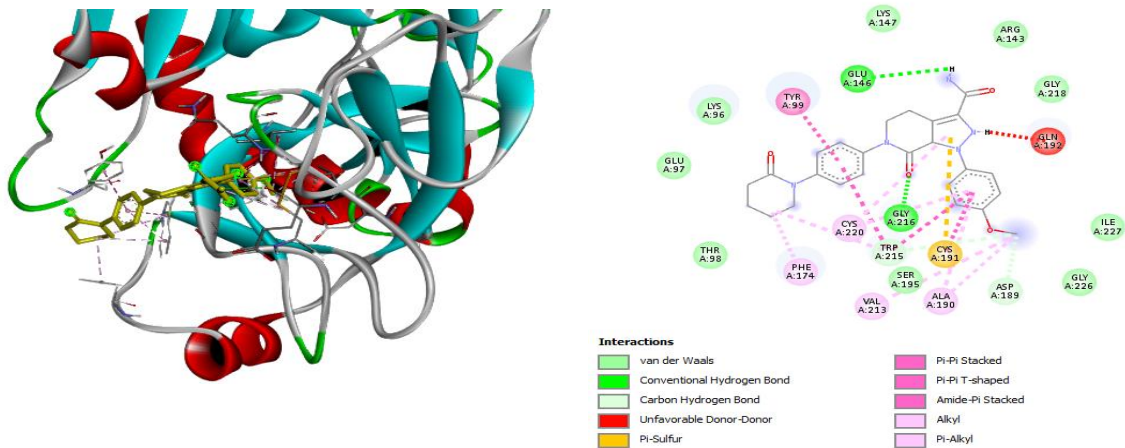


oznaczonej kodem i23 (najniższa wartość energii swobodnej) oraz apiksabanu przedstawione są na Rysunkach 12 i 13.



Rysunek 12. Interakcje 3D i 2D związku i23 z aktywowanym czynnikiem krzepnięcia X (P5).

W przypadku apiksabanu widoczna jest unikalna interakcja donor-donor grupy -NH pierścienia benzopirazolowego z Glu192 w dolnej części wnęki S1.



Rysunek 13. Interakcje 3D i 2D apiksabanu z aktywowanym czynnikiem krzepnięcia X (P5)

W przytoczonym powyżej badaniu szczegółowo opisanym w P5 opracowany model regresji ustala zależności między eksperymentalnie określoną aktywnością biologiczną a deskryptorami molekularnymi, ponadto symulacja dokowania wskazuje możliwe sposoby wiązania oraz powinowactwo do aktywowanego czynnika krzepnięcia X. Informacje uzyskane z modelowania molekularnego wykorzystałem do zaprojektowania nowych pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu o działaniu antykoagulacyjnym. **Otrzymane wyniki wskazują, że nowe zaprojektowane N-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu z podstawnikami 3-chloro-4-fluorofenylowym, 3-fluoro-4-chlorofenylowym lub 4-(oksazol-5-ilo)fenylowym mogą być obiecującymi inhibitorami aktywowanego czynnika krzepnięcia X.** Dla wskazanych na podstawie badania opisanego w P5 pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu (e1, e4, e10) również, w kolejnym etapie badań, planuję przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej, syntezę oraz ocenę aktywności przeciwwązkowej *in vitro*.

## Podsumowanie

Przytoczone wyniki z pięciu prac dostarczają ważnych informacji wspomagających poszukiwanie nowych substancji o potencjalnym znaczeniu terapeutycznym, tj. związków o działaniu przeciwnowotworowym – pochodne antrapirazolu (P1 i P3) oraz związków o działaniu przeciwwązkowym - etery oksymu estru etylowego izostewiolu (P4) oraz N-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu (P2 i P5). Zaprezentowane metody modelowania molekularnego mogą zostać zastosowane w poszukiwaniu potencjalnie aktywnych związków bazujących na innej strukturze chemicznej oraz innym miejscu docelowym. Nie tylko uniwersalność zaprezentowanych procedur, ale także ich ekonomiczność oraz relatywnie krótki czas operacyjny przemawiają za ich rutynowym zastosowaniem w procesie projektowania leków opartym na wiedzy strukturalnej. Prowadzone badania przyczyniły się do lepszego poznania mechanizmu działania pochodnych antrapirazolu (P1) oraz izostewiolu (P2). Wskazały także korzyści ze stosowania nowoczesnych algorytmów uczenia maszynowego o wysokiej, potwierdzonej w analizach mocy predykcyjnej, takich jak wielozmienna regresja adaptacyjna z wykorzystaniem funkcji sklepanych (P1 i P2), drzewa wzmacniane i losowy las (P3), a także sztuczne sieci neuronowe (P3, P4 i P5) w badaniach QSAR określających cechy ligandów wywierające najistotniejszy wpływ na ich

aktywność. Kwintesencją prowadzonych badań było wykorzystanie analiz QSAR oraz dokowania molekularnego w racjonalnym projektowaniu nowych eterowych pochodnych oksymu izostewiolu (P4) oraz nowych pochodnych tiosemikarbazonu izostewiolu (P5) o potencjalnej aktywności przeciwzakrzepowej. Z zaprojektowanych prawie czterdziestu nowych pochodnych izostewiolu, na podstawie przewidywanej aktywności przeciwzakrzepowej oraz energii swobodnej wiązania kompleksu ligand-receptor, wyłoniłem dziewięć potencjalnych związków wiodących (P4 i P5), dla których w przyszłości planuję przeprowadzenie symulacji dynamiki molekularnej, syntezę oraz ocenę aktywności przeciwzakrzepowej *in vitro*. Wśród eterowych pochodnych oksymu izostewiolu najbardziej obiecującymi inhibitorami FXa są te zawierające pierścienie tiofenowe, furanowe i oksazolowe lub układ skondensowanych pierścieni tiofenu i pirazolu z podstawnikiem elektronoakceptorowym (np. chlor, fluor, podstawnik trifluorometylowy) (P4). Natomiast *N*-podstawione pochodne tiosemikarbazonu estru etylowego izostewiolu z podstawnikiem 3-chloro-4-fluorofenylowym, 3-fluoro-4-chlorofenylowym lub 4-(oksazol-5-ilo)fenylowym mogą być potencjalnymi inhibitorami tego enzymu (P5).

### Literatura:

- Atanasov, Atanas G., et al. "Natural Products in Drug Discovery: Advances and Opportunities." *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 20, no. 3, 2021, pp. 200–16, <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00114-z>.
- Aydın, Sinem Gürkan. "Review on Molecular Modeling and Docking." *SAR Journal - Science and Research*, vol. 5, no. 4, 2022, pp. 206–10, <https://doi.org/10.18421/sar54-06>.
- Baskin, Igor I., et al. "Neural Networks in Building QSAR Models." *Methods in Molecular Biology*, vol. 458, no. May 2014, 2008, pp. 137–58, [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-101-1\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-101-1_8).
- Begleiter, Asher, et al. "Structure-Activity Studies with Cytotoxic Anthrapyrazoles." *Oncology Reports*, vol. 15, no. 6, 2006, pp. 1575–80, <https://doi.org/10.3892/or.15.6.1575>.
- Breiman, Leo. "Random Forests." *Machine Learning*, vol. 45, no. 1, Jan. 2001, pp. 5–32, <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>.
- Chen, Peng, et al. "Discovery of Novel, Potent, Isosteviol-Based Antithrombotic Agents." *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 183, 2019, p. 111722, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111722>.
- De Veaux, R. D., et al. "A Comparison of Two Nonparametric Estimation Schemes: MARS and Neural Networks." *Computers and Chemical Engineering*, vol. 17, no. 8, 1993, pp. 819–37, [https://doi.org/10.1016/0098-1354\(93\)80066-V](https://doi.org/10.1016/0098-1354(93)80066-V).
- Dewar, Michael J. S., et al. "AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model1." *Journal of the American Chemical Society*, vol. 107, no. 13, 1985, pp. 3902–09, <https://doi.org/10.1021/ja00299a024>.
- Dibia, Kevin Tochukwu, et al. "Exploration of the Quantitative Structure-Activity Relationships for Predicting Cyclooxygenase-2 Inhibition Bioactivity by Machine Learning Approaches." *Results in Chemistry*, vol. 4, 2022, p. 100272, <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100272>.

- Dobchev, Dimitar, and Mati Karelson. "Have Artificial Neural Networks Met Expectations in Drug Discovery as Implemented in QSAR Framework?" *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 11, no. 7, 2016, pp. 627–39, <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1186876>.
- Duchnowska, Renata, et al. "The Role of Anthracyclines and Dose Dense Therapy in an Adjuvant Setting, in HER2-Positive Early Breast Cancer, in Clinical Practice." *Oncology in Clinical Practice*, vol. 12, no. 1, 2016, pp. 8–11.
- Dudley, D. A., et al. "Rational Design, Synthesis, and Biological Activity of Benzoxazinones as Novel Factor Xa Inhibitors." *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 43, no. 22, 2000, pp. 4063–70, <https://doi.org/10.1021/jm000074l>.
- Ford, George P., and Bingze Wang. "New Approach to the Rapid Semiempirical Calculation of Molecular Electrostatic Potentials Based on the Am1 Wave Function: Comparison with Ab Initio Hf/6-31g\* Results." *Journal of Computational Chemistry*, vol. 14, no. 9, 1993, pp. 1101–11, <https://doi.org/10.1002/jcc.540140911>.
- Friedman, Jerome H. "MULTIVARIATE ADAPTIVE REGRESSION SPLINES." *The Annals of Statistics*, vol. 19, no. 1, 1991, pp. 1–141, <http://links.jstor.org/sici?sici=0090-5364%28199103%2919%3A1%3C1%3AMARS%3E2.0.CO%3B2-D>.
- Glenn, De'ath. "Boosted Trees for Ecological Modeling and Prediction." *Ecology*, vol. 88, no. 1, 2007, pp. 243–51.
- Hartley, J. A., et al. "Characteristics of the Interaction of Anthrapyrazole Anticancer Agents with Deoxyribonucleic Acids: Structural Requirements for DNA Binding, Intercalation, and Photosensitization." *Molecular Pharmacology*, vol. 33, no. 3, Mar. 1988, pp. 265–71.
- Helguera, Aliuska, et al. "Applications of 2D Descriptors in Drug Design: A DRAGON Tale." *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 18, 2008, pp. 1628–55, <https://doi.org/10.2174/156802608786786598>.
- Hollis Showalter, H. D., et al. "Anthrapyrazole Anticancer Agents. Synthesis and Structure-Activity Relationships against Murine Leukemias." *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 30, no. 1, 1987, pp. 121–31, <https://doi.org/10.1021/jm00384a021>.
- Ichikawa, Hiroaki, et al. "Rivaroxaban, a Direct Factor Xa Inhibitor, Ameliorates Hypertensive Renal Damage Through Inhibition of the Inflammatory Response Mediated by Protease-Activated Receptor Pathway." *Journal of the American Heart Association*, vol. 8, no. 8, 2019, pp. 1–14, <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.012195>.
- Kushnir, Margarita, et al. "Efficacy and Safety of Direct Oral Factor Xa Inhibitors Compared with Warfarin in Patients with Morbid Obesity: A Single-Centre, Retrospective Analysis of Chart Data." *The Lancet Haematology*, vol. 6, no. 7, 2019, pp. e359–65, [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(19\)30086-9](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30086-9).
- Leteurtre, François, et al. "Topoisomerase II Inhibition and Cytotoxicity of the Anthrapyrazoles Dup 937 and Dup 941 (Losoxantrone) in the National Cancer Institute Preclinical Antitumor Drug Discovery Screen." *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 86, no. 16, 1994, pp. 1239–44, <https://doi.org/10.1093/jnci/86.16.1239>.
- Liang, Hong, et al. "A Structure-Based 3D-QSAR Study of Anthrapyrazole Analogues of the Anticancer Agents Losoxantrone and Piroxantrone." *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 46, no. 4, 2006, pp. 1827–35, <https://doi.org/10.1021/ci060056y>.
- Mariño-Ocampo, Nory, et al. "Direct Oral FXa Inhibitors Binding to Human Serum Albumin: Spectroscopic, Calorimetric, and Computational Studies." *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 24, no. 5, 2023, <https://doi.org/10.3390/ijms24054900>.
- Morsy, Mohamed A., et al. "Screening and Molecular Docking of Novel Benzothiazole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents." *Antibiotics*, vol. 9, no. 5, 2020, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050221>.
- Mross, Klaus, et al. "Phase I Clinical and Pharmacokinetic Study of BBR 3576, a Novel Aza-Anthrapyrazole, Administered i.v. Every 4 Weeks in Patients with Advanced Solid Tumors: A Phase I Study Group Trial of the Central European Society of Anticancer-Drug Research (CESAR)." *Anti-Cancer Drugs*, vol. 15, no. 1, 2004, pp. 15–22,

- <https://doi.org/10.1097/00001813-200401000-00003>.
- Nadendla, Rama Rao. *Molecular Modeling : A Powerful Tool for Drug Design and Molecular Docking*. no. May, 2004.
- Nelson, James M., et al. "Anthrapyrazoles, a New Class of Intercalating Agents with High-Level, Broad Spectrum Activity against Murine Tumors." *Cancer Research*, vol. 45, no. November, 1985, pp. 5532–39.
- Ooms, F. "Molecular Modeling and Computer Aided Drug Design. Examples of Their Applications in Medicinal Chemistry." *Current Medicinal Chemistry*, vol. 7, no. 2, 2012, pp. 141–58, <https://doi.org/10.2174/0929867003375317>.
- Pappachen, Leena K., et al. "In Silico Design, Synthesis and Characterization of Some Novel Benzothiazole Derivatives as Anticancer Agents." *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 10, no. 4, 2017, pp. 150–55, <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i4.16407>.
- Quan, Mimi L., et al. "Design and Synthesis of Isoxazoline Derivatives as Factor Xa Inhibitors. 2." *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 42, no. 15, 1999, pp. 2760–73, <https://doi.org/10.1021/jm980406a>.
- RCSB Protein Data Bank. *2P16: Factor Xa in Complex with the Inhibitor APIXABAN (BMS-562247) AKA 1-(4-METHOXYPHENYL)-7-OXO-6-(4-(2-OXO-1-PIPERIDINYL)PHENYL)-4,5,6,7-TETRAHYDRO-1H-PYRAZOLO[3, 4-C]PYRIDINE-3-CARBOXAMIDE*. <https://doi.org/10.2210/pdb2P16/pdb>. Accessed 14 Mar. 2023.
- Rodríguez, Diego F., et al. "Green by Design: Convergent Synthesis, Computational Analyses, and Activity Evaluation of New Fxa Inhibitors Bearing Peptide Triazole Linking Units." *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 1, 2022, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010033>.
- Roy, Kunal, et al. "Is It Possible to Improve the Quality of Predictions from an 'Intelligent' Use of Multiple QSAR/QSPR/QSTR Models?" *Journal of Chemometrics*, vol. 32, no. 4, 2018, pp. 1–18, <https://doi.org/10.1002/cem.2992>.
- Schirone, Leonardo, et al. "The Role of Anthracyclines in Cardio-Oncology: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2022, 2022, <https://doi.org/10.1155/2022/9862524>.
- Schreuder, Mark, et al. "Reversal Agents for the Direct Factor Xa Inhibitors: Biochemical Mechanisms of Current and Newly Emerging Therapies." *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, vol. 46, no. 8, 2020, pp. 986–98, <https://doi.org/10.1055/s-0040-1709134>.
- Shi, Yang, et al. "Synthesis and Biological Evaluation of Isosteviol Derivatives as FXa Inhibitors." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 30, no. 2, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.07.044>.
- Sung, Hyuna, et al. "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 71, no. 3, May 2021, pp. 209–49, <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- Svetnik, Vladimir, et al. "Random Forest: A Classification and Regression Tool for Compound Classification and QSAR Modeling." *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, vol. 43, no. 6, 2003, pp. 1947–58, <https://doi.org/10.1021/ci034160g>.
- Talete SRL. *List of Molecular Descriptors Calculated by Dragon*. pp. 1–51, [http://www.talete.mi.it/products/dragon\\_molecular\\_descriptor\\_list.pdf](http://www.talete.mi.it/products/dragon_molecular_descriptor_list.pdf). Accessed 18 Apr. 2023.
- Ullah, Asad, et al. "Bioactivity Profile of the Diterpene Isosteviol and Its Derivatives." *Molecules*, vol. 24, no. 4, 2019, pp. 1–24, <https://doi.org/10.3390/molecules24040678>.
- Urquhart, Lisa. "Top Companies and Drugs by Sales in 2021." *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 21, no. 4, 2022, p. 251, <https://doi.org/10.1038/d41573-022-00047-9>.
- Wang, Mingying, et al. "Diterpenoid Lead Stevioside and Its Hydrolysis Products Steviol and Isosteviol: Biological Activity and Structural Modification." *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 156, 2018, pp. 885–906, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.052>.
- Wang, Wenzhi, et al. "Novel Anthranilamide-Based Fxa Inhibitors: Drug Design, Synthesis and Biological Evaluation." *Molecules*, vol. 21, no. 4, 2016, pp. 12–14,

<https://doi.org/10.3390/molecules21040491>.

Zacconi, Flavia C. "FXa Direct Synthetic Inhibitors." *Anticoagulant Drugs*, 2018,

<https://doi.org/10.5772/intechopen.76518>.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

#### **Modelowanie molekularne pochodnych izostewiolu**

W latach 2022-2023 współpracowałem z **Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Nitte College of Pharmaceutical Sciences, Yelahanka, Bengaluru, Karnataka, Indie**, w zakresie dokowania molekularnego pochodnych izostewiolu do aktywowanego czynnika krzepnięcia X. Przeprowadzone w ramach współpracy analizy dokowania umożliwiły wybranie, spośród grupy prawie czterdziestu zaprojektowanych nowych pochodnych izostewiolu, dziewięciu kandydatów do testów *in vitro*. Współpraca jest potwierdzona dwoma opublikowanymi artykułami oryginalnymi wchodzącymi w skład prezentowanych powyżej osiągnięć naukowych (P4 i P5).

Poza prezentowanymi powyżej osiągnięciami naukowymi, moja aktywność naukowa obejmuje również następujące obszary:

**Pacjenci geriatryczni: farmakoterapia, hospitalizacja, opieka geriatryczna, stres oksydacyjny, niedożywienie.**

W latach 2015 – 2017 współpracowałem z **Regionalną Siecią Uniwersytetu Trzeciego Wieku Wyższej Szkoły Gospodarki w Bydgoszczy** udzielając wykładów popularnonaukowych dla seniorów z województwa kujawsko – pomorskiego – słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego wieku (UTW). Wykłady pt. „Interakcje, suplementy diety i tańsze odpowiedniki, czyli jak odnaleźć się w aptece” oraz „Jak działają leki? Kontynuować czy przerwać farmakoterapię?” wygłosiłem w dwóch cyklach spotkań w takich miejscowościach jak: Golub Dobrzyń, Dobrcz, Więcbork, Złotniki Kujawskie, Kowalewo Pomorskie, Czernikowo, Karolewo, Brzoza, Kcynia, Lubiewo, Koronowo, Sicienko, Gniewkowo, Osielsko, Pakość, Chełmża czy Solec Kujawski. Wykłady miały na celu przybliżenie seniorom specyfiki farmakoterapii osób starszych, ryzyka występowania interakcji przyjmowanych leków i suplementów diety, konieczności przestrzegania zaleceń medycznych ze szczególnym uwzględnieniem systematycznego przyjmowania leków (ang. *compliance*), różnic między lekiem oryginalnym a generycznym oraz praw pacjenta w aptece.

Od 2017 roku współpracuję z **Katedrą Geriatrii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK**. W latach 2017-2019 owocami współpracy był cykl artykułów przeglądowych opublikowanych w czasopismach *Gerontologia Polska* oraz *Geriatrics* obejmujących praktyczne zagadnienia profilaktyki przeciwpyłkowej, farmakoterapii nadciśnienia tętniczego, farmakoterapii bezsenności oraz antybiotykoterapii (w tym leczenia infekcji *Helicobacter pylori*) u pacjentów w wieku 65 lat i powyżej (7 artykułów). **Jestem także współautorem dwóch rozdziałów będących częścią "Encyclopedia of Biomedical Gerontology", 2020, Cambridge, Massachusetts, Elsevier, 1640 s., ISBN 978-0-12-816075-6 powstałych również we współpracy z Katedrą Geriatrii.** Pierwszy z nich opisuje starzenie się szpiku kostnego, nieuchronność starzenia nawet hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych – „Aging of bone marrow” [Kędzióra-Kornatowska Kornelia, Mądra-Gackowska Katarzyna, **Gackowski Marcin** : Aging of bone marrow, W: Encyclopedia of Biomedical Gerontology / Rattan S. (red.), 2020, Cambridge, Massachusetts, Elsevier, s.132-137, ISBN 978-0-12-816075-6], z kolei drugi opisuje niedokrwistość u osób starszych, która stanowi istotną i jedną z

najczęstszych chorób układu krwiotwórczego – „Anemia” [Kędziora-Kornatowska Kornelia, Mądra-Gackowska Katarzyna, **Gackowski Marcin** : Anemia, W: Encyclopedia of Biomedical Gerontology / Rattan S. (red.), 2020, Cambridge, Massachusetts, Elsevier, s.22-28, ISBN 978-0-12-816075-6].

Ponadto brałem udział w badaniu pt. „Zastosowanie wybranych parametrów biochemicznych w ocenie stanu odżywienia pacjentów geriatrycznych oraz zapadalności na wybrane jednostki chorobowe”, w którym uczestniczyli również pracownicy **Katedry Biologii i Biochemii Medycznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK (współpraca międzywydziałowa w ramach UMK)**. Owocem współpracy jest opublikowany w tym roku artykuł oryginalny pt. *“Evaluation of selected parameters of oxidative stress and adipokine levels in hospitalized older patients with diverse nutritional status”* [Mądra-Gackowska K., Szewczyk-Golec K., **Gackowski M.**, Woźniak A., Kędziora-Kornatowska K., Antioxidants, 2023: Vol. 12, nr 3, s. 1-17, 140 punktów MEiN, IF(7,0)]. Celem przeprowadzonego badania przekrojowego była identyfikacja parametrów stresu oksydacyjnego i adipokin, które mogą być potencjalnymi biomarkerami niedożywienia u hospitalizowanych starszych pacjentów. Wybrane parametry zostały oznaczone u 137 pacjentów w podeszłym wieku, biorąc pod uwagę ich stan odżywienia. W badaniu zaobserwowaliśmy, że oznaczanie poziomu leptyny, rezystyny, oksydowanych lipoprotein małej gęstości oraz aktywności peroksydazy glutationowej może stanowić wartościowe uzupełnienie prowadzonej na oddziałach geriatrycznych rutynowej oceny stanu odżywienia u seniorów, w celu wczesnej identyfikacji ryzyka niedożywienia oraz wdrożenia spersonalizowanej terapii żywieniowej.

**W terminie 01 – 31.07.2022 r. odbyłem staż naukowy w Zakładzie Podstaw Pielęgniarstwa, będący częścią Katedry Rozwoju Pielęgniarstwa, Wydział Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.** Opiekunem stażu był dr hab. n. o zdr. Mariusz Wysokiński, prof. Uczelni. **Tematyka realizowanych badań dotyczyła wielowymiarowej, interprofesjonalnej opieki geriatrycznej z uwzględnieniem wielochorobowości i polifarmakoterapii geriatrycznej.** Farmakoterapia pacjentów geriatrycznych wymaga szczególnej uwagi ze względu na zdrowie fizyczne starszych pacjentów (powszechna wielochorobowość) oraz specyfikę wieku podeszłego z charakterystycznymi tzw. wielkimi zespołami geriatrycznymi (np. upadki i zaburzenia równowagi, zaburzenia otępienne, zespół słabości). **Jako farmaceuta nieprzerwanie od 2011 r. wykonujący swój zawód w aptece ogólnodostępnej** jestem świadomy, że zaburzenia funkcji poznawczych i choroby psychiczne mogą utrudniać lub uniemożliwiać właściwe przyjmowanie leków, a trudna sytuacja socjoekonomiczna pacjenta może stanowić przeszkodę w ich wykupowaniu. W przypadku seniorów ważna jest rola farmaceuty z uwagi potrzebę zestawienia wszystkich preparatów, które z różnych powodów stosuje pacjent, czyli wykonanie tzw. przeglądu lekowego, w celu identyfikacji oraz rozwiązaniu problemów lekowych, w tym potencjalnych interakcji. Przegląd lekowy przeprowadzany przez farmaceutę uwzględnia leki zaordynowane w opiece specjalistycznej, przepisywane przez lekarza podstawowej opieki zdrowotnej oraz preparaty stosowane w samoleczeniu (leki bez recepty, preparaty ziołowe, suplementy diety). Obecność farmaceuty jest również istotna w aspekcie opieki lekarskiej i pielęgniarstwa, ponieważ w przypadku wielu stosowanych w praktyce klinicznej leków należy dostosować dawkę do czynności nerek pacjenta, czy przeanalizować potencjalne interakcje z lekami dotychczas stosowanymi przez chorego.

### **Analiza chemometryczna**

W latach 2020-2021 współpracowałem z **Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** w zakresie analizy statystycznej związanej z klasyfikacją leków przeciwnowotworowych z zastosowaniem analizy chemometrycznej na podstawie chromatograficznych danych retencji. Współpraca jest potwierdzona opublikowanym artykułem oryginalnym pt. *„Pharmacological classification of anticancer drugs applying chromatographic retention data and chemometric analysis”* [**Gackowski M.\***, Koba M., Pluskota R., Dagher-Wojtkowiak E., Szatkowska-Wandas P., Kruszewski S., Chemical Papers, Slovenska Akademia Vied - Chemicky Ustav, vol. 70, 2021, s. 265-278, 40 punktów MEiN, IF(2,146)]. Opublikowane wyniki wskazują, że lipofilowość jest jednym z kluczowych parametrów charakteryzujących użyteczność potencjalnych aktywnych

związków chemicznych, co potwierdza aktualny stan wiedzy w dziedzinie projektowania leków. Co więcej, zastosowanie analizy głównych składowych może skutecznie umożliwić klasyfikację związków chemicznych na podstawie danych obliczeniowych, nie tylko ze względu na strukturę przestrzenną, ale także ze względu na mechanizm działania i potencjalne zastosowanie terapeutyczne. Metoda ta jest porównywana z analizą QSAR, która daje korzystne wyniki w projektowaniu nowych leków i jest pomocna w badaniu strategii przewidywania ich aktywności.

W latach 2017-2018 współpracowałem z **Katedrą i Zakładem Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** w zakresie analizy chemometrycznej związków o zróżnicowanej aktywności farmakologicznej. Współpraca jest potwierdzona opublikowanym artykułem oryginalnym: Stasiak J., Koba M.\*, **Gackowski M.**, Bączek T.: Chemometric analysis for the classification of some groups of drugs with divergent pharmacological activity on the basis of some chromatographic and molecular modeling parameters, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 21, nr 2, 2018, s. 125-137, 25 punktów MEiN, IF(1,503). W badaniu tym zastosowaliśmy metody chemometryczne, takie jak analiza korelacji, analiza skupień, analiza głównych składowych i analiza czynnikowa w celu zmniejszenia liczby parametrów chromatograficznych ( $\log k/\log k_w$ ) i różnych (np. 0D, 1D, 2D, 3D) deskryptorów molekularnych dla leków reprezentujących trzy różne grupy terapeutyczne: 12 leków przeciwbólowych, 11 leków sercowo-naczyniowych i 36 "innych" związków, oraz w celu wybrania najważniejszych z nich. Zaproponowana strategia QSAR wykorzystująca zredukowaną liczbę parametrów może być użytecznym punktem wyjścia do dalszych analiz statystycznych, a także wsparciem przy projektowaniu nowych leków i przewidywaniu ich możliwej aktywności.

#### **Poszukiwanie biomarkerów biochemicznych o możliwym znaczeniu diagnostycznym chorób neurodegeneracyjnych, autoimmunologicznych oraz nowotworów**

W latach 2019 – 2021 współpraca z Katedrą Geriatrii Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK została rozszerzona o współpracę z **Katedrą Biofarmacji i Farmakodynamiki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego** w zakresie analizy statystycznej prowadzonej w celu przedstawienia wyników badania profilowania aminokwasów u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi oraz demencją. Wyniku podjętej współpracy opublikowany został artykuł oryginalny pt.: „Amino acid levels as potential biomarker of elderly patients with dementia” [Socha E., Kośliński P., Koba M.\*, Mądra-Gackowska K., Kędziora-Kornatowska K., **Gackowski M.**, Dagher-Wojtkowiak E., *Brain Sciences, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, vol. 10, nr 12, 2020, 914, 1-16, 100 punktów MEiN, IF(3,394)]. Zespół badawczy miał za zadanie ocenę profili aminokwasów u pacjentów będących w początkowych stadiach demencji w celu lepszego zrozumienia złożonej i wieloczynnikowej patogenezы zaburzeń neurodegeneracyjnych. 123 uczestników badania podzielono na dwie grupy: zdrowe osoby starsze i pacjentów z łagodną lub umiarkowaną demencją. Wyniki wskazują, że poziomy trzech aminokwasów w surowicy były znacząco zmienione u pacjentów z demencją w stosunku do osób pozbawionych zaburzeń poznawczych. Zaobserwowane różnice u pacjentów z demencją w porównaniu z grupą kontrolną dotyczyły seryny, argininy i izoleucyny (wszystkie były istotnie statystycznie). Uzyskane wyniki sugerują, że metabolizm niektórych aminokwasów może się być zmieniony u pacjentów z demencją.

Wynikiem współpracy jest także opublikowany artykuł oryginalny pt.: „Serum amino acid profiles in patients with mild cognitive impairment and in patients with mild dementia or moderate dementia: [Socha E., Kośliński P., Koba M.\*, Mądra-Gackowska K., **Gackowski M.**, Kędziora-Kornatowska K., Dagher-Wojtkowiak E., *Amino Acids*, vol. 53, nr 1, 2021, s. 97-109, 100 punktów MEiN, IF(3,789)]. Badanie miało na celu ustalenie czy poziomy aminokwasów w surowicy zmieniają się wraz z upośledzeniem funkcji poznawczych oraz zidentyfikowanie domniemyanych biomarkerów służących wczesnemu diagnozowaniu chorób neurodegeneracyjnych. Poziomy 16 aminokwasów w surowicy zostały określone w 3 grupach pacjentów - 22 z łagodnymi zaburzeniami poznawczymi, 45 z łagodną demencją i 28 z umiarkowaną demencją - za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną. Wyniki badania wskazują, że poziom argininy może mieć potencjalną



wartość diagnostyczną, dlatego profilowanie aminokwasów może być pomocne w poszukiwaniu biomarkerów chorób neurodegeneracyjnych, w tym demencji.

Współpraca nawiązana ze wspomnianymi wyżej jednostkami naukowymi zaowocowała również artykułem oryginalnym pt.: „Comparison of pteridine normalization methods in urine for detection of bladder cancer” [Kośliński P.\*, Pluskota R., Mądra-Gackowska K., **Gackowski M.**, Markuszewski M., Kędziora-Kornatowska K., Koba M., *Diagnostics*, vol. 10, nr 9, 2020, 612, 1-15, , 70 punktów MEiN, IF(3,706)]. W badaniu tym oceniliśmy przydatność związków pterynowych w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego, ze szczególnym uwzględnieniem roli kreatyniny i ciężaru właściwego moczu jako czynników normalizujących stężenie związków pterynowych w moczu. Spośród związków wchodzących w skład profilu pterynowego, izoksantopteryna może być potencjalnie wykorzystana jako biomarker nowotworów układu moczowego, jednak wykorzystanie zagregowanych danych (standaryzowanych na ciężar właściwy moczu i kreatyninę) pozwala na lepszą klasyfikację pacjentów jako zdrowych lub cierpiących na nowotwór pęcherza moczowego. Wartość diagnostyczna uzyskanych wyników wymaga dalszego potwierdzenia, dlatego zespół badawczy planuje przeprowadzenie dalszych badań na większych próbach zarówno pacjentów z nowotworem pęcherza moczowego, jak i grup kontrolnych, aby ocenić potencjalną wartość diagnostyczną pteryn w kontekście nowotworu pęcherza moczowego.

W latach 2020–2022 współpracowałem z **Kliniką Neurologiczną 10. Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką w Bydgoszczy** oraz **Niepublicznym Zakładem Opieki Zdrowotnej "SANITAS" LEKARZE SPECJALIŚCI w Bydgoszczy**, w ramach prowadzonych dwóch badań dotyczących profilowania aminokwasów u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym oraz miastenią w celu potraktowania poziomu aminokwasów jako potencjalnych biomarkerów wspomnianych jednostek chorobowych. Współpraca jest potwierdzona dwoma opublikowanymi artykułami oryginalnymi, w których byłem autorem korespondencyjnym: Kośliński P., Rzepiński Ł., Koba M., **Gackowski M.\***, Maciejek Z.: Amino acids levels as a potential biomarker in myasthenia gravis, *Folia Neuropathologica*, vol. 60, nr 1, 2022, s. 122-127, 70 punktów MEiN, IF(2) oraz Rzepiński Ł., Kośliński P., **Gackowski M.\***, Koba M., Maciejek Z.: Amino acid levels as potential biomarkers of multiple sclerosis in elderly patients: preliminary report, *Journal of Clinical Neurology*, vol. 18, nr 5, 2022, s. 529-534, 70 punktów MEiN, IF(3,1). Przeprowadzone badania pilotażowe wskazują, że metabolizm niektórych aminokwasów jest zmieniony u pacjentów chorobami neurodegeneracyjnymi, jak miastenia, czy wtórnie postępująca postać stwardnienia rozsianego. W związku z tym, profilowanie aminokwasów może być pomocne w poszukiwaniu biomarkerów chorób ośrodkowego układu nerwowego. Planowane jest przeprowadzenie dodatkowych badań na większej grupie ochotników.

### **Stres oksydacyjny w chorobach metabolicznych**

W latach 2016-2017 brałem udział w opracowaniu i przeprowadzeniu randomizowanego, z podwójnie ślepą próbą i kontrolowanego placebo badania prowadzonego w grupach równoległych, współpracując z Katedrą Biologii i Biochemii Medycznej Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK oraz z **Wojewódzkim Szpitalem Obserwacyjno-Zakaźnym im. Tadeusza Browicza w Bydgoszczy**. Współpraca jest potwierdzona opublikowanym artykułem oryginalnym pt.: „Melatonin supplementation lowers oxidative stress and regulates adipokines in obese patients on a calorie-restricted diet” [Szewczyk-Golec K.\*, Rajewski P., **Gackowski M.**, Miła-Kierzenkowska C., Wesołowski R., Sutkowy P., Pawłowska M., Woźniak A., *Oxidat. Med. Cell. Long.* 2017: Vol. 2017, s. 1-10. 30 punktów MEiN, IF(4,936)]. Celem badania było oszacowanie wpływu suplementacji melatoniną na stres oksydacyjny i poziom adipokin u otyłych pacjentów na diecie o obniżonej kaloryczności. Trzydziestu otyłych pacjentów otrzymywało dzienną dawkę 10 mg melatoniny (n = 15) lub placebo (n = 15) przez 30 dni wraz z dietą o obniżonej kaloryczności. Poziom melatoniny, 4-hydroksynonenalu (HNE), adiponektyny, omentyny-1, leptyny i rezystyny w surowicy, jak również krwinkowe stężenie dialdehydu malonowego (MDA) oraz aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydaza glutationowej (GPx) mierzyliśmy na początku badania i po suplementacji. Znaczące zmniejszenie masy ciała zaobserwowaliśmy tylko w grupie przyjmującej melatoninę. Po przebytej suplementacji

melatoniną poziomy adiponektyny i omentyny-1 oraz aktywność GPx istotnie wzrosły, podczas gdy stężenia MDA odnotowały spadek. W grupie placebo stwierdziliśmy znaczący wzrost stężenia HNE i spadek stężenia melatoniny. Wyniki wskazują na zwiększony stres oksydacyjny towarzyszący ograniczeniu kalorii. Suplementacja melatoniną ułatwiała redukcję masy ciała, poprawiała obronę antyoksydacyjną i regulowała wydzielanie adipokin. Wyniki te zdecydowanie sugerują, że melatonina powinna być brana pod uwagę w leczeniu otyłości.

### **Profilaktyka uzależnień**

W latach 2022-2023 współpracowałem z **Apteką Szpitalną Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Słupcy** w zakresie oceny szybkich testów immunochemicznych przeznaczonych do wykrywania amfetaminy w moczu. Współpraca jest potwierdzona artykułem oryginalnym, w którym jestem autorem korespondencyjnym: Miłoś A., **Gackowski M.\***, Przybylska A., Kośliński P., Koba M.: Comparison of Sensitivity and Specificity of Commercial Amphetamine Tests, AppliedChem, MDPI AG, vol. 3, nr 1, 2023, s. 141-152, 5 punktów MEiN. W przeprowadzonym badaniu oceniliśmy czułość i swoistość testów na obecność narkotyków w moczu dostępnych na rynku farmaceutycznym. Oceniane testy zostały zanurzone w syntetycznym moczu z dodatkiem amfetaminy w różnych stężeniach, zawierającym również substancje potencjalnie zakłócające, takie jak kofeinę, paracetamol i kwas acetylosalicylowy, następnie po upływie określonego przez producenta czasu obserwowano, czy wynik jest zgodny z oczekiwaniami. Metodą referencyjną zastosowaną w tym badaniu była wysokosprawna chromatografia cieczowa. Uzyskane wyniki potwierdziły deklarowane przez producentów testów poziomy odcięcia, a także swoistość szybkich testów diagnostycznych. Obecnie wraz z zespołem badawczym Katedry Toksykologii i Bromatologii CM UMK planuję poszerzenie badań o testy służące wykrywaniu innych substancji psychoaktywnych obecne na rynku farmaceutycznym. Tematyka ta jest powiązana z planowanym przeze mnie w roku akademickim 2023/2024 cyklem wykładów w liceach ogólnokształcących w Bydgoszczy w ramach promowania szeroko rozumianych zachowań prozdrowotnych i profilaktyki uzależnień.

## **6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.**

### Prace dyplomowe

1. Opieka nad 9 Studentami realizującymi prace magisterskie na kierunku Farmacja;
2. Recenzent 4 prac dyplomowych Studentów kierunku Farmacja.

### Zajęcia dydaktyczne:

1. Od 2019 r. do chwili obecnej: prowadzę laboratoria z przedmiotu "Toksykologia" realizowanego dla studentów kierunków Farmacja;
2. W roku 2021 stworzyłem program zajęć oraz sylabus do przedmiotu „Older patients in the eye of pharmacist and geriatrician. Malnutrition, hospitalization, pharmacotherapy, interactions and drug toxicity” prowadzonego w języku angielskim w ramach zajęć ogólnouniwersyteckich;
3. W roku 2023 współtworzyłem program studiów podyplomowych pt. "Zasady organizacji i realizacja zadań zespołów interdyscyplinarnych w opiece medycznej” zgłoszony na konkurs ogłoszony przez Agencję Badań Medycznych nr ABM/2023/6 pt. "Opracowanie i realizacja autorskiego programu studiów podyplomowych z zakresu nauk biomedycznych". Projekt z nr 2023/ABM/06/00005 tytułem: "EDUKACJA MEDYCZNA pracowników ochrony zdrowia - INNOWACYJNE STUDIA PODYPLOMOWE realizowane przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w

Toruniu Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy" został zgłoszony przez CM UMK i przyjęty do oceny merytorycznej.

#### Udział w programie ERASMUS+

1. Przeprowadzenie zajęć dydaktycznych dla Studentów kierunku Farmacja pochodzących z Hiszpanii oraz Turcji (semestr zimowy roku akademickiego 2021/2022);
2. Opiekun stażu dr. Jona Keri, pracownika naukowego University Aldent (Tirana, Albania) (20.02-24.02.2023r.).

#### Wygłaszanie wykładów popularnonaukowych:

1. Dwa cykle wykładów popularnonaukowych skierowanych do słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego Wieku z województwa kujawsko-pomorskiego we współpracy z Regionalną Siecią Uniwersytetu Trzeciego Wieku Wyższej Szkoły Gospodarki w Bydgoszczy. Wykłady pt. „Interakcje, suplementy diety i tańsze odpowiedniki, czyli jak odnaleźć się w aptece” oraz „Jak działają leki? Kontynuować czy przerwać farmakoterapię?” wygłosiłem w dwóch turach w takich miejscowościach jak: Golub Dobrzyń, Dobrcz, Więcbork, Złotniki Kujawskie, Kowalewo Pomorskie, Czernikowo, Karolewo, Brzoza, Kcynia, Lubiewo, Koronowo, Sicienko, Gniewkowo, Osielsko, Pakość, Chełmża czy Solec Kujawski;
2. Wykład w ramach XXXIII cyklu „Medyczna Środa” kierowany m.in. do mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego organizowany przez Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK pt.: "Jak rozsądnie stosować leki przeciwbólowe dostępne bez recepty?" (18.01.2023r., dostępny na platformie Youtube);
3. Planuję udział w kolejnych edycjach cyklu „Medyczna Środa”.

#### Wygłaszanie wykładów na zaproszenie:

1. Wykład wygłoszony na Międzynarodowej Konferencji Naukowo-Szkoleniowej SZTUKA ROZMOWY PODSTAWĄ DIAGNOZY organizowanej przez Polskie Towarzystwo Komunikacji Medycznej oraz Collegium Medicum UMK w Bydgoszczy w dniu 10.04.2015r. pt.: „Czego pacjent oczekuje od farmaceuty?”;
2. Wykład wygłoszony na spotkaniu naukowo-szkoleniowym Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej o/Bydgoszcz w dniu 14.09.2023 r. pt.: „Ocena czułości szybkich testów do wykrywania amfetaminy w moczu”.

#### Wykłady prowadzone w celu promowania szeroko rozumianych zachowań prozdrowotnych i profilaktyki uzależnień dla uczniów szkół licealnych w ramach współpracy Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK:

1. "Substancje psychoaktywne" przeprowadzony dla Uczniów III Liceum Ogólnokształcącego w Bydgoszczy (19.04.2023 r.);
2. Planowany cykl wykładów do przeprowadzenia w liceach ogólnokształcących w Bydgoszczy w roku akademickim 2023/2024.

#### Członkostwo w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji:

1. Udział w Komitecie Naukowym iMEDIC - 6th International Medical Interdisciplinary Congress Medical, Pharmaceutical and Health Sciences Bydgoszcz, Poland organizowanym przez Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy UMK (27.05.2023 r.)

#### Udział w konferencjach naukowych:

1. **Gackowski M.**, Szewczyk-Golec K., Koba M., s., 2022, The 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry "Small molecules as drug candidates". Sciforum, 2022, poster;
2. Kośliński P., Pawlak J., Pluskota R., **Gackowski M.**, Mądra-Gackowska K., Koba M. Comparison of the concentrations of metabolic profiles of pterine compounds in urine samples from patients with bladder, renal and prostate cancer. W: 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, September 24-26th, Gdańsk, Poland. S. 53, 2019, poster;
3. Socha E., Kośliński P., Mądra-Gackowska K., Ziółkowska S., **Gackowski M.** Non-commercial clinical trials in Poland : legal aspects, potential benefits and risks. W: iMEDIC 2018 Bydgoszcz : 3rd International Medical Interdisciplinary Congress. Medical, Pharmaceutical and Health Sciences. 9th June 2018, Bydgoszcz, Poland. Abstract Book. W. Stemplowski, P. Wojtczak, A. Ziółkowska, N. Sokołowska, R. Sokołowski. Bydgoszcz : UMK CM, 2018, s. 90., streszczenie;
4. Ziółkowska S., Mądra-Gackowska K., Socha E., **Gackowski M.**, Kujawska A., Kujawski S., Ziółkowski W., Kędziora-Kornatowska Kornelia. A massive gross haematuria in an 85-year-old patient with acquired haemophilia A. W: iMEDIC 2018 Bydgoszcz : 3rd International Medical Interdisciplinary Congress. Medical, Pharmaceutical and Health Sciences. 9th June 2018, Bydgoszcz, Poland. Abstract Book. W. Stemplowski, P. Wojtczak, A. Ziółkowska, N. Sokołowska, R. Sokołowski. Bydgoszcz : UMK CM, 2018, s. 47, streszczenie;
5. **Gackowski M.**, Koba M., Stasiak J., Proszowska A., Marszał M.P. Oznaczanie lormetazepamu metodą chromatograficzną oraz spektrofotometryczną w preparatach farmaceutycznych. W: XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja Polska na tle Unii Europejskiej". Gdańsk, 12-15 IX 2010. Streszczenia. [Gdańsk, 2010], s. 615, poster.

#### Kierowanie projektami badawczymi i udział w projektach:

1. Kierownik projektu „Inicjatywa Doskonałości – Debiuty” w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza” (Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, 2020-2022). Tytuł wniosku: “ Application of new in silico tools in the structure-activity relationship of anticancer drugs”. Katedra Toksykologii i Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zakupione dzięki środkom pozyskanym z niniejszego grantu sprzęt komputerowy oraz oprogramowanie umożliwiły przeprowadzenie badań naukowych, których owocem są opublikowane artykuły oryginalne wchodzące w skład przedstawionego powyżej cyklu osiągnięć (P1-P5).

#### Pełnienie funkcji redaktora gościnnego (Guest Editor):

1. Redaktor gościnnie (Guest editor) w specjalnym wydaniu czasopisma „Pharmaceuticals” wydania specjalnego pt. “Recent Advances in the Discovery and Development of Drugs for Civilization Diseases”; (nauki farmaceutyczne, IF 4,6, 140 pkt. MEiN); (28.06- 30.11.2023r.).

#### Członkostwo w towarzystwach naukowych:

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Gerontologicznego (PTG).

### Udzielone recenzje w czasopismach międzynarodowych:

W latach 2019-2023 wykonałem 11 recenzji artykułów dla czasopism z listy filadelfijskiej:

- BMC Chemistry (IF 4,6) – 2 artykuły;
- Chemical papers (IF 2,2) – 2 artykuły;
- Foods (IF 5,2) – 1 artykuł;
- International Journal of Environmental Research and Public Health (IF 4,614) – 1 artykuł;
- International Journal of Molecular Sciences (IF 5,6) – 1 artykuł;
- Molecules (IF 4,6) – 1 artykuł;
- Nutrients (IF 5,9) – 1 artykuł;
- Sensors (IF 3,9) – 1 artykuł;
- Journal of Clinical Neurology (IF 3,1) – 1 artykuł.

### Działalność organizacyjna w ramach Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu:

1. maj 2022r.- obecnie: członek Zespołu ds. Promocji Wydziału Farmaceutycznego przy Collegium Medicum UMK w Toruniu.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej

### Dane naukometryczne:

Łączna wartość punktacji KBN/MEiN: **1870,000**

Wartość wskaźnika IF: **72,148**

Cytowania (Web of Science Core Collection): **114**

Cytowania bez autocytowań (Web of Science Core Collection): **106**

Index H=**6** (Web of Science Core Collection)

Cytowania (Scopus): **132**

Cytowania bez autocytowań (Scopus): **125**

Index H=**6** (Scopus)

Moja dotychczasowa aktywność publikacyjna obejmuje **2** rozdziały z monografii, **2** wystąpienia ustne, **3** prezentacje plakatowe, **33** artykuły w czasopismach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym (w **16** jako pierwszy autor, w **19** jako autor korespondencyjny).

### Nagrody i wyróżnienia

1. Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2022r.;
2. Jednorazowe stypendium JM Rektora UMK z dn. 4.11.2022r. za wysoko punktowaną publikację naukową pt. "Quantitative structure-activity relationship analysis of isosteviol-related compounds as activated coagulation factor X (FXa) inhibitors", opublikowaną w prestiżowym czasopiśmie naukowym Nutrients, Vol. 14, nr 17, 2022, s. 1-15 (P2);
3. Zespołowe Wyróżnienie Rektora Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowej w 2021r.;
4. Jednorazowe stypendium JM Rektora UMK z dn. 7.03.2022r. za wysoko punktowaną publikację naukową pt. "Cardiovascular effects of chocolate and wine – narrative review", opublikowaną w prestiżowym czasopiśmie naukowym Nutrients, Vol. 13, nr 12, 2021, s. 1-30.

.....

(podpis wnioskodawcy)