

Abstract

Determination of biological activity is significant problem, particularly for drug design. Development of analytical methods and approaches that may provide accurate and reliable results is of vital importance. Moreover, collection of bioactivity data is an important analytical challenge, since biological activity is dependent on different factors in each particular case. The study of biological activity thus requires development of new approaches based on careful selection of analytical methods and precise data interpretation rather than application of standard set of techniques. Interactions between biologically active molecules and receptors play an important role for assessment of drug efficacy, side effects and selection of treatment strategy. The research in this area is focused mostly on the determination of possible molecular target as a part of so called target-centric approach that sometimes can be too simplistic and not sufficient to describe the mechanism of action. The goal of the research carried out in a framework of this study was to develop approaches for determination of biological activity of naturally occurring compounds. Literature review for the research topic was published in the form of two review papers. First review presents theoretical approach for determination of biological activity on the example of flavonoids. Critical points and examples of application of such methods as quantitative structure-activity (QSAR), quantitative structure-retention (QSRR), structure-activity (SAR) relationships as well as their combinations for determination of biological activity were presented and discussed. Second review addresses multi-instrumental approach to unravel molecular mechanisms of action of natural compounds on the example of flavonoids. Different combinations of instrumental analytical techniques for studies of interactions between flavonoids and different biologically active systems and thus, mechanisms of their action were critically reviewed and discussed. Afterwards, interactions of naturally occurring protein carboanhydrase IX (CA IX) that largely participates in tumour cancerogenesis and potential inhibitors were studied using combination of computational and instrumental analytical techniques. Potential candidates were selected by developed approach based on inversed GA-PLS quantitative structure-property relationships (QSPR) model and synthesized prior to their experimental assessment. Interactions were studied with the use of combination of such techniques as matrix-assisted laser desorption ionization with time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF-MS), sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), FTIR spectroscopy and stopped-flow spectrophotometry. Obtained data was interpreted by combination of information obtained from each of the technique and molecular dynamics and docking simulations. Furthermore, interactions of selected flavonoids with three chromatographic columns (C18, pentafluorophenyl (F5) and IAM.PC.DD2) were studied by developed approach

based on QSRR and density functional theory (DFT). Interactions of flavonoids and immobilized artificial membrane chromatographic column (IAM.PC.DD2) were studied and compared with classical C18 and pentafluorophenyl columns. In future, developed approach can be helpful to gain insights into biological activity of flavonoids with chromatographic columns simulating human body parts, for e.g. immobilized proteins to assess biological activity of analytes by analysis of the interactions. Next part of the research was focused on study of the interactions between casein and silver ions by combination of such instrumental techniques as MALDI-TOF-MS, FTIR, Raman spectroscopy, scanning electron (SEM), transmission electron (TEM) microscopy, energy dispersive X-ray detector (EDX), thermogravimetric analysis (TGA), derivative thermogravimetry (DTG). Finally, approach for analysis and identification of candidate metabolites of saccharides and cyclitols as plant bioactive compounds was developed based on electrochemical fragmentation and MALDI-TOF-MS.

Streszczenie

Oznaczanie aktywności biologicznej jest znaczącym problemem, w szczególności przy projektowaniu leków. Opracowanie metod i technik analitycznych, zapewniających precyzyjne i wiarygodne wyniki, ma w tym kluczowe znaczenie. Ponadto, gromadzenie danych dotyczących bioaktywności związków jest ważnym wyzwaniem analitycznym i to dlatego, iż aktywność biologiczna jest zależna od wielu czynników w każdym konkretnym przypadku. Zatem, badanie aktywności biologicznej wymaga opracowania nowych podejść opartych na starannym doborze metod analitycznych i precyzyjnej interpretacji danych zamiast zastosowania standardowego zestawu technik. Oddziaływania pomiędzy związkami biologicznie aktywnymi a receptorami odgrywają ważną rolę w ocenie skuteczności leków, możliwych skutków ubocznych oraz doborze strategii leczenia. Badania w tym zakresie skupiają się głównie na określeniu możliwego celu molekularnego w ramach podejścia "skoncentrowania na celu", które czasami może być zbyt uproszczonym i niewystarczającym do opisanie mechanizmów działania. Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy jest opracowanie podejść do określania aktywności biologicznej związków naturalnych. Przegląd literatury z zakresu przedmiotu badań był opublikowany w postaci dwóch artykułów przeglądowych. Pierwszy artykuł przedstawia teoretyczne zasady określania aktywności biologicznej na przykładzie flawonoidów. W artykule przedstawiono i omówiono punkty krytyczne oraz przykłady zastosowania takich metod, jak ilościowe zależności struktura-aktywność (QSAR, z ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship*), ilościowe zależności struktura-retencja (QSRR, z ang. *Quantitative Structure-Retention Relationship*), zależność struktura-aktywność (SAR, z ang. *Structure-Activity Relationship*) oraz ich połączenia do określenia aktywności biologicznej. Drugi artykuł

przeglądowy dotyczy multiinstrumentalnego podejścia do oznaczania molekularnych mechanizmów działania związków naturalnych na przykładzie flawonoidów. Między innymi krytycznie przeanalizowano i omówiono możliwości różnych połączeń instrumentalnych technik analitycznych do badania oddziaływań pomiędzy flawonoidami a różnymi układami biologicznymi, a zatem mechanizmy ich działania. Następnie za pomocą połączenia obliczeniowych oraz instrumentalnych technik analitycznych przeprowadzono badania oddziaływania naturalnie występującego białka anhydrazy węglanowej IX (CA IX), która w znaczącym stopniu uczestniczy w kancerogenezie, z jej potencjalnymi inhibitorami. Potencjalnych kandydatów wybrano i zsyntezowano przed ich oceną eksperymentalną za pomocą opracowanego podejścia GA-PLS opartego na odwróconym modelu ilościowych zależności struktura-właściwości (QRPS, z ang. *Quantitative Relationship Property-Structure*). Oddziaływania badano z wykorzystaniem połączenia takich technik, jak spectrometria mas z laserową ionizacją/desorpcją próbki wspomaganą matrycą z analizatorem czasu przelotu (MALDI-TOF-MS, z ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), elektroforeza żelowa w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu (SDS-PAGE, z ang. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), spektroskopii FTIR oraz spectrophometrii z zatrzymanym przepływem (z ang. *stopped-flow spectrophotometry*). Uzyskane dane zinterpretowano poprzez połączenie wyników uzyskanych eksperymentalnie z metodami dynamiki molekularnej oraz dokującego modelowania. Ponadto, zbadano oddziaływania wybranych flawonoidów z trzema rodzajami kolumn chromatograficznych (C18, pentafluorophenolowa i IAM.PC.DD2) z użyciem opracowanej metody opartej na QSRR i teorii funkcjonału gęstości (DFT, z ang. *Density Functional Theory*). Zbadano oddziaływania flawonoidów oraz immobilizowanej sztucznej membranowej kolumny chromatograficznej (IAM.PC.DD2), wyniki były porównywane z wynikami uzyskanymi dla klasycznych kolumn chromatograficznych C18 oraz pentafluorofenolowej. Opracowane podejście w przyszłości może być pomocne przy oznaczaniu aktywności biologicznej flawonoidów za pomocą kolumn chromatograficznych symulujących części ludzkiego ciała, na przykład z użyciem immobilizowanych białek w celu oceny aktywności biologicznej analitów poprzez analizę ich oddziaływań. Kolejne części badań były skupione na oddziaływaniach kazeiny z jonami srebra poprzez połączenie takich technik jak MALDI-TOF-MS, FTIR, spektroskopia Ramana, skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM, z ang. *Scanning Electron Microscopy*), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM, z ang. *Transmission Electron Microscopy*) połączona z detektorem spektroskopii rentgenowskiej z dyspersją energetyczną (EDX, z ang. *Energy Dispersive X-ray detector*), analiza termograviometryczna (TGA, z ang. *Thermogravimetric Analysis*), termiczna analiza różnicowa (DTG, z ang. *Derivative*

Thermogravimetry). Na koniec, opracowano metode analizy i identyfikacji potencjalnych metabolitów opartej na fragmentacji elektrochemicznej oraz MALDI-TOF-MS cukrów oraz cyklitoli jako bioaktywnych związków pochodzenia roślinnego.

01.10.2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Jarosław'.