

DARIUSZ KIKUT-LIGAJ

## PROGNOZOWANIE SMAKU GORZKIEGO WYBRANYCH ALKALOIDÓW CHINOLIZYDYNOWYCH

### Streszczenie

Percepcja smaku gorzkiego pełni szczególnie istotną rolę w identyfikacji cech jakościowych żywności. Rozróżniając akceptowalną kompozycję smakową od zbyt gorzkiej i potencjalnie toksycznej, konsument kieruje się wyłącznie intensywnością (natężeniem) odczuwania smaku gorzkiego. Zróżnicowanie natężenia gorzkich bodźców smakowych można szacować za pomocą analizy powtarzalności cech strukturalnych w zbiorze gorzkich ligandów. Skuteczną techniką badań intensywności odczuwania smaku gorzkiego są modele 3D farmakoforowe. W analizie interakcji smakowych serii małowcząsteczkowych ligandów należących do alkaloidów chinolizydynowych wykorzystano tzw. prosty model farmakoforowy (SPM, ang. *Simple Pharmacophore Model*). Model SPM umożliwił rozpoznanie dwóch podstawowych obszarów powinowactwa badanych alkaloidów: aromatyczno-hydrofobowego (AR/H) i akceptorowego (HBA<sub>1</sub>). Ponadto rozpoznano zasadniczy dla intensywności smaku gorzkiego region atomu azotu N<sub>12</sub>, wykazujący cechy donorowe (HBD), akceptorowe (HBA) i o dodatniej jonizacji (PI). Prognozowaną intensywność smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub>) alkaloidów chinolizydynowych scharakteryzowano dwoma molekularnymi deskryptorami, takimi jak liczba obszarów pobudzających receptor (LPI, liczba punktowych interakcji) oraz liczba wpasowań liganda w hipotetyczny obszar receptorowy (LIS, liczba interaktywnych stymulacji). Wyznaczonych deskryptorów (LIS i LPI) użyto do sformułowania równania smakowego opisującego ilościowe zmiany prognozowanej intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub>) badanej grupy alkaloidów. Prognozowane wartości ISG<sub>p</sub> potwierdzono sensorycznymi wartościami intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>s</sub>).

**Słowa kluczowe:** percepcja smaku gorzkiego, prognozowanie smaku gorzkiego, alkaloidy chinolizydynowe, prosty model farmakoforowy (SPM)

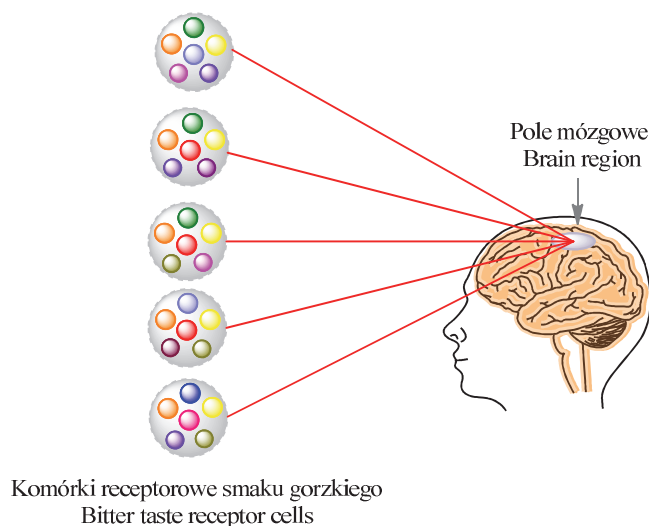
### Wprowadzenie

Zmysł smaku pełni ważną funkcję w stymulacji organizmu człowieka do spożycia m.in. substancji goryczkowych, pełniących funkcje naturalnych antybiotyków

i metabolitów, elektrolitów utrzymujących homeostazę płynów, cukrów będących źródłem kalorii oraz aminokwasów odpowiedzialnych za procesy biosyntezy [33]. Zmysł ten jest bardzo złożony, a jego czułość uzależniona od zmian w środowisku naturalnym, procesów dziedziczenia zmysłów smaku, rodzaju dostępnego pokarmu, przynależności etnicznej, akceptacji i preferencji smakowych oraz innych cech osobniczych, takich jak: stan zdrowia, wiek oraz poziom świadomości społecznej [16, 32]. W procesie rozpoznania smakowego uczestniczy pięć podstawowych wyróżników smakowych: słodki, kwaśny, umami (smak L-aminokwasów wzmocniony przez rybonukleotydy), słony i gorzki.

Zasadniczą rolę smaku gorzkiego jest ochrona przed toksycznymi składnikami żywności [4] i zapewnienie niezbędnej ilości naturalnych bioaktywnych metabolitów oraz psycho- i neurostymulantów [4]. Zazwyczaj aprobowana bądź preferowana jest mała i umiarkowana gorycz w pożywieniu, unika się natomiast silnego jej natężenia [31]. Za rozpoznawanie smaku gorzkiego odpowiedzialna jest subpopulacja komórek chemosensorycznych w pełni oddzielona od komórek receptorowych odpowiedzialnych za detekcję innych bodźców smakowych. Komórki te cechują się ekspresją genów TAS2R (rodzina trans-błonowych białek receptorowych) [5, 9, 36]. Każda komórka jest zdolna do ekspresji informacji smakowej pochodzącej od wszystkich gorzkich ligandów pobudzających różne obszary receptorowe. Liczba genów TAS2R różni się znacznie wśród kręgowców: od 3 u kureczęcia do 49 u żaby [12]. Każdy gatunek ma od kilku do kilkudziesięciu gorzkich genów receptorowych umożliwiających wykrywanie setek, a nawet tysięcy gorzkich związków znajdujących się w naturze. Ludzki genom koduje około 30 funkcjonalnych TAS2Rs, które są glikoproteinami [22, 4] mającymi zdolność tworzenia homo- i heterooligomerów [4, 19]. W przybliżeniu połowa gorzkich związków rozpoznawana jest przez trzy rodzaje białek receptorowych: TAS2R10, TAS2R14 i TAS2R46 [7]. Impulsy ze wszystkich komórek receptorowych smaku gorzkiego (BTRCs, ang. *Bitter Taste Receptor Cells*) przekazywane są do tego samego pola w mózgu (rys. 1).

Powyższy mechanizm rozpoznawania smaku gorzkiego sprawia, że ludzie nie potrafią odróżnić poszczególnych substancji gorzkich, jak ma to miejsce w przypadku zapachu, a jedynie rozróżniają intensywność goryczy. Sygnały smakowe pochodzące od odmiennych strukturalnie gorzkich ligandów są uśredniane, co ma ogromne znaczenie w badaniach ilościowych i jakościowych smaku gorzkiego. Szczególnie istotna dla konsumentów jest intensywność smaku gorzkiego, ponieważ pozwala zaakceptować bądź odrzucić określony pokarm, a tym samym rozgraniczyć akceptowalną kompozycję smakową od potencjalnie toksycznej. W wielu produktach spożywczych, takich jak: herbata, piwo, wino, soki czy czekolada, charakterystyczna domieszka smaku gorzkiego jest pożądana, ponieważ zapewnia ich optymalne walory smakowe [16].



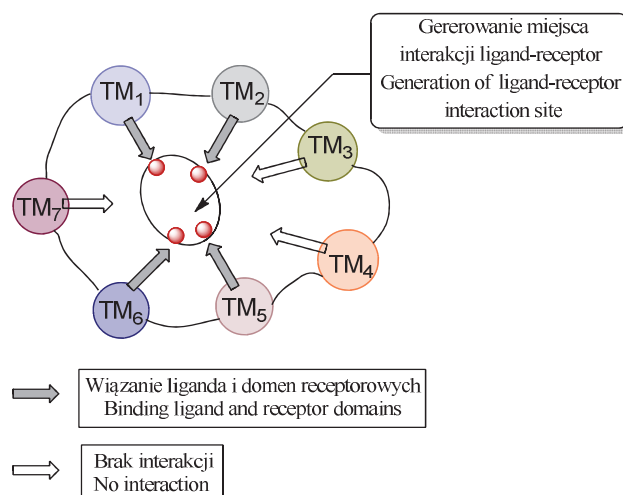
Rys. 1. Przekazywanie gorzkich sygnałów smakowych do mózgu.

Fig.1. Transmission of bitter taste signals to brain.

Prognozowanie procesów rozpoznawania smaku gorzkiego oraz przewidywanie gorzkiej aktywności smakowej wymaga użycia odpowiednich technik modelowania komputerowego. Poszukiwania nowych czynnych biologicznie molekuł prowadzone są za pomocą wirtualnego skringu (VS, ang. *Virtual Screening*) [23]. Wśród metod VS można wyróżnić dwie rodziny metod skringowych: bazującą na znanej strukturze receptora (SBVS i TBVS, ang. *Strukture-Based* i *Target-Based Virtual Screening*) oraz bazującą wyłącznie na strukturach ligandów danego receptora (LBVS, ang. *Ligand-Based Virtual Screening*) [23]. Podstawą technik stosowanych w wirtualnym skringu jest analiza cech fizykochemicznych (sterycznych i elektronowych) ewentualnych ligandów. Informacja, jaką zawiera cząsteczka liganda, jest odczytywana przez odpowiedni białkowy receptor. W przypadku smaku gorzkiego receptor zawiera 7 miejsc interakcji (tzw. 7 transbłonowych domen 7TM, ang. *seven-transmembrane domain*) [24]. Struktura tego receptora jest dynamiczna, co oznacza, że w momencie interakcji (skurczu receptora) część domen wiązana jest z ligandem, a odległości pomiędzy nimi maleją, natomiast inne domeny, niebiorące udziału, oddalają się od miejsca wiązania (rys. 2). Jest to podstawowa koncepcja aktywacji konformacyjnej receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR, ang. *G Protein Coupled Receptors*).

Interakcje liganda z białkiem receptorowym można analizować za pomocą tzw. 3D modeli farmakoforowych. Trójwymiarowe (3D) modele farmakoforowe należą do technik opisujących relacje małowielkościowych ligandów z białkowym receptorem (tzw. celem molekularnym) [35]. Wygenerowany farmakofor pozwala wyszczególnić i

przypisać przestrzenną dyslokację grupom funkcyjnym (tzw. funkcjom farmakoforowym) niezbędnym do wytworzenia lub zablokowania aktywności biologicznej [17, 26]. Modelowanie farmakoforowe wspomagane jest techniką 3D farmakoforową (ang. *3D pharmacophore-based techniques*) [35, 20], dokowaniem molekularnym (ang. *Molecular Docking*) [21], techniką QSAR (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationships*) [17, 21] oraz technikami mapowania receptora tj. analizą hipotetycznej powierzchni receptora RSA (ang. *Receptor Surface Analysis*) [34] lub analizą porównawczą pól molekularnych CoMFA (ang. *Comparative Molecular Field Analysis*) [8].



Rys. 2. Tworzenie się miejsca wiązania ligand-receptor.

Fig. 2. Binding ligand and receptor domains.

Technika 3D farmakoforowa umożliwia szczegółowy wgląd w interakcje ligandów z celami molekularnymi i w efekcie pozwala na wyznaczenie matematycznych deskryptorów kodujących gorzką aktywność smakową.

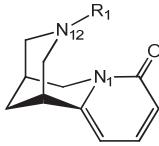
Celem pracy była identyfikacja wyróżników strukturalnych kształtujących gorzką aktywność smakową serii alkaloidów chinolizydynowych oraz określenie natężenia tej cechy smakowej przy użyciu technik modelowania komputerowego. Sprecyzowanie cech powinowactwa badanej grupy związków do receptora smaku gorzkiego posłużyło do wyrażenia ilościowych zależności różnicujących aktywność smakową serii alkaloidów chinolizydynowych.

## Material i metody badań

### Badane związki i ich aktywność biologiczna

Cytyzyna jest jednym z ważniejszych przedstawicieli trójpierścieniowych alkaloidów chinolizydynowych. Występuje głównie w roślinach motylkowych, a najczęściej ekstrahowana jest z nasion złotokapu (*Laburnum anagyroides*) należącego do rodziny *Fabaceae* [14, 15]. Związek ten i jego analogi wykazują interakcje z receptorami nikotynowymi nAChR (podjednostkami typu  $\alpha 4\beta 2$  i  $\alpha 7$ ) [2, 6, 25]. Interakcje z receptorami nikotynowymi umożliwiają stosowanie tych związków chemicznych w terapii farmakologicznej depresji, stanów lękowych, uzależnienia od nikotyny, jaskry oraz choroby Alzheimera, Parkinsona, czy Huntingtona [2, 6, 25]. Pochodne cytyzyny użyte w badaniach zamieszczono w tab. 1.

Tabela 1. Struktury związków (1-5) użytych w badaniach.  
Table 1. Structures of (1 – 5) compounds used in research study.

| Nr<br>No | Alkaloidy chinolizydynowe / Quinolizidine alkaloids |   |
|----------|---|---|
|          | Nazwa związku<br>Name of compound                   | <br>R <sub>1</sub> |
| 1        | Cytozyna / Cytisine                                 | -H  |
| 2        | N-metylocytyzyna / N-methylcytisine                 | -CH <sub>3</sub>  |
| 3        | N-etylocytyzyna / N-ethylcytisine                   | -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>  |
| 4        | N- acetylocytyzyna / N-acetylcytisine               | -COCH <sub>3</sub>  |
| 5        | N-propionylocytyzyna / N-propionylcytisine          | -COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>  |

Badana grupa związków różni się między sobą podstawnikami w regionie atomu azotu N<sub>12</sub>. Modyfikacje w obrębie atomu azotu N<sub>12</sub> badanych alkaloidów prowadzą do zmian właściwości elektofilowo-nukleofilowych tego obszaru.

### Metody komputerowe użyte w badaniach struktur związków 1 - 5

Modelowanie molekularne prowadzono za pomocą pakietu programowego Gaussian 09W. Optymalizację geometrii badanych ligandów 1 - 5 prowadzono, stosując teorię funkcjonałów gęstości (DFT, ang. *Density Functional Theory*) z B3LYP funk-

cyjonałem i 6-31G (2d,p) bazą [1]. Obecność rozpuszczalnika (wody) stymulowano modelem CPCM (ang. *Conducting Polarized Continuum Model*) [3, 10, 27]. Funkcje farmakoforowe oraz powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika (SAS, ang. *Solvent Accessible Surface Area*) wyznaczono za pomocą programu LigandScout. Programem tym rozpoznano "klasyczne" funkcje farmakoforowe, takie jak: ugrupowania będące akceptorami i donorami wiązania wodorowego (HBA i HBD, ang. *Hydrogen Bond Acceptors (Donors)*), obszary o cechach obszarów aromatyczno-hydrofobowych (AR/H) oraz regiony zdolne do dodatniej jonizacji (PI, ang. *Positive Ionizable*). Wizualizację prostego modelu farmakoforowego (SPM) prowadzono w programie ChemBioOffice. Analizę powierzchni receptora RSA (ang. *Receptor Surface Analysis*) badanych związków 1-5 prowadzono przy użyciu programu Scigress Explorer, LigandScout i Chem-X. Gęstość ładunków potencjału elektrostatycznego (ESP, ang. *Electrostatic Potential*) wyznaczano w programie Gaussian.

### **Badania sensoryczne**

Analizę sensoryczną prowadzono techniką przepłukiwania jamy ustnej (ang. *sip-and-spit*) wodnymi roztworami badanych związków (1 - 5) [11, 13, 18]. Stosowano wodne roztwory tych związków o stężeniu nadprogowym (0,002 g/100 ml wody dejonizowanej). Zgodnie z zasadami przyjętymi dla tego typu testów [28] zespół testerów (ekspertów o sprawdzonej wrażliwości sensorycznej) był wyselekcjonowany i przeszkolony. Zadaniem 15-osobowej grupy eksperckiej było uporządkowanie badanych związków pod względem intensywności wrażenia smaku gorzkiego [28, 29, 30].

Serie badawcze powtórzono trzykrotnie, a wyniki pomiarów opracowano statystycznie. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono wykorzystując program Origin 8.0. Zróżnicowanie ocen sensorycznych analizowano statystycznie za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) na poziomie istotności  $p = 0,05$ .

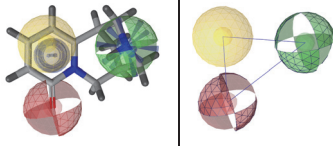
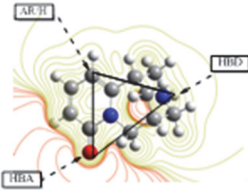
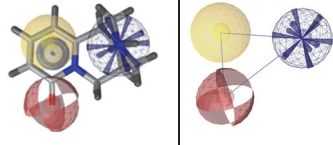
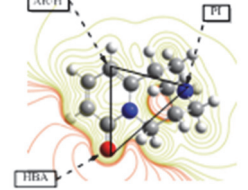
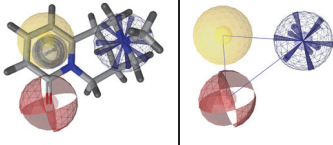
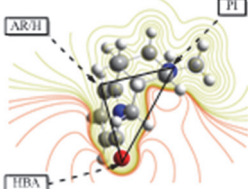
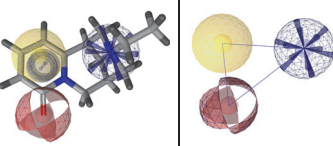
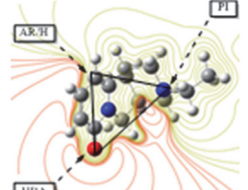
### **Wyniki i dyskusja**

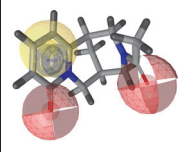
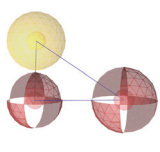
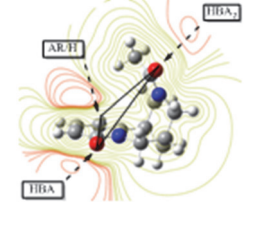
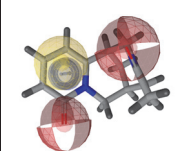
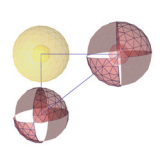
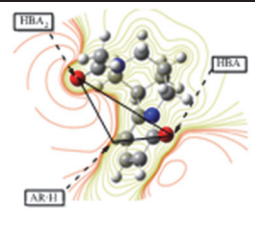
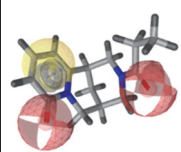
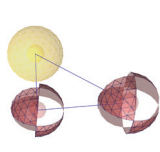
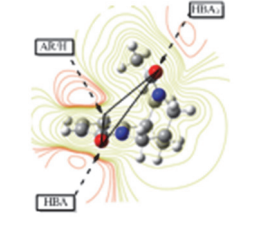
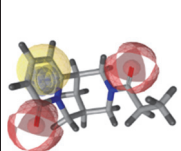
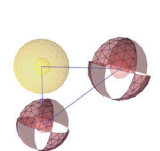
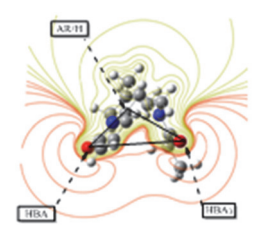
#### **Otrzymywanie prostego modelu farmakoforowego (SPM) badanej grupy alkaloidów chinolizydynowych**

W metodach wirtualnego skriningu wykorzystuje się kryterium podobieństwa, co oznacza, że pokrewne strukturalnie związki powinny stymulować podobną aktywność biologiczną. W celu wyznaczenia wspólnych cech przestrzennych i strukturalnych badanej grupy związków (1 - 5) rozpoznano funkcje farmakoforowe za pomocą programu LigandScout (tab. 2). Struktury pochodnych cytyzyny zawierają trzy kluczowe obszary: nukleofilowy zlokalizowany na grupie karbonylowej (C=O) (HBA, określane również jako HBA<sub>1</sub>) aromatyczno/hydrofobowy (AR/H) oraz obszar atomu azotu N<sub>12</sub>, który był poddawany modyfikacji chemicznej.

Tabela 2. Identyfikacja funkcji farmakoforowych badanych alkaloidów chinolizydynowych (1 - 5).

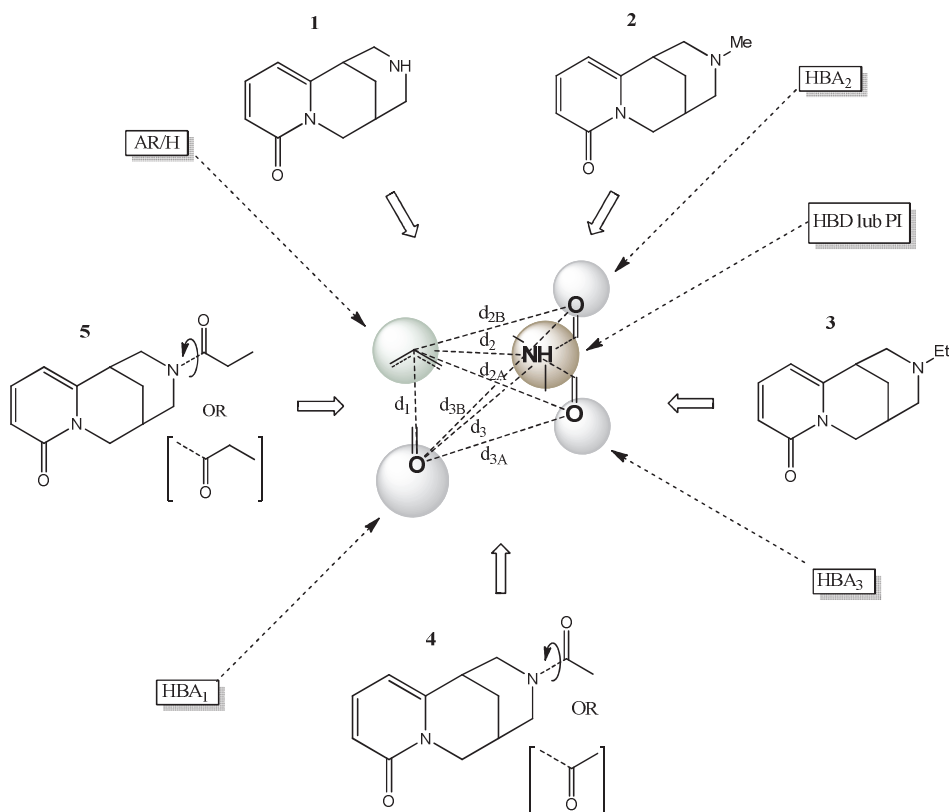
Table 2. Identification of pharmacophoric features of quinolizidine alkaloids (1 - 5) studied.

| Nr związku<br>Compound<br>number | Funkcje farmakoforowe<br>(kolor żółty - AR/H, zielony - HBD;<br>czerwony – HBA, niebieski - PI)<br>Pharmacophoric features<br>(yellow - AR/H, green – HBD,<br>red – HBA, blue – PI) | Rozkład elektrostatycznego<br>potencjału (ESP) z rozpoznanymi<br>funkcjami farmakoforowymi<br>Distribution of electrostatic<br>potential (ESP) with<br>pharmacophoric features<br>identified | Poszczególne<br>reprezentacje<br>farmakoforowe<br>Individual<br>representations of<br>pharmacophore |
|----------------------------------|---|--|---|
| 1a                               |    |    | HBA <sub>1</sub> -HBD-<br>AR/H  |
| 1b                               |   |   | HBA <sub>1</sub> -PI-AR/H   |
| 2                                |    |    | HBA <sub>1</sub> -PI-AR/H   |
| 3                                |    |    | HBA <sub>1</sub> -PI-AR/H   |

|    |   |   |  |  |
|----|---|---|--|--|
| 4a |    |    |    | HBA <sub>1</sub> -HBA <sub>2</sub> -<br>AR/H |
| 4b |    |    |    | HBA <sub>1</sub> -HBA <sub>2</sub> -<br>AR/H |
| 5a |   |   |   | HBA <sub>1</sub> -HBA <sub>3</sub> -<br>AR/H |
| 5b |  |  |  | HBA <sub>1</sub> -HBA <sub>3</sub> -<br>AR/H |

Analiza funkcji farmakoforowych (tab. 2) pozwoliła sprecyzować ogólne cechy powinowactwa badanych ligandów do receptora. Obszar atomu azotu N<sub>12</sub>, początkowo elektrofilowy (1), jest donorem wiązania wodorowego (HBD), jednocześnie zasadowy atom azotu N<sub>12</sub> (struktury 1, 2 i 3) jest regionem zdolnym do dodatniej jonizacji (PI). W przypadku struktur 4a(b) i 5a(b) modyfikacja prowadzi do utworzenia obszaru będącego akceptorem wiązań wodorowych (HBA<sub>2</sub> lub HBA<sub>3</sub>). Wizualizację sterycznych relacji pomiędzy funkcjami farmakoforowymi badanych alkaloidów (tab. 2) przedstawiono za pomocą prostego modelu farmakoforowego (SPM) (rys. 3).





Rys. 3. Proponowane trzypunktowe modele farmakoforowe receptora smaku gorzkiego.  
 Fig. 3. Proposed 3-point pharmacophore models of bitter taste receptor.

Przedstawiony prosty model farmakoforowy (SPM) zawiera dwa podstawowe obszary powinowactwa: aromatyczno-hydrofobowy (AR/H) oraz (HBA<sub>1</sub>) ulokowany na grupie karbonylowej. W regionie atomu azotu N<sub>12</sub> przedstawiony model farmakoforowy wykazuje znaczące zmiany w budowie obszaru wiążącego. Jak wcześniej zaobserwowano, trzeciorzędowy atom azotu N<sub>12</sub>, pierwotnie będący donorem wiązania wodorowego (HBD), ulega modyfikacji w region o dodatniej jonizacji (PI), a następnie staje się akceptorem wiązania wodorowego (HBA<sub>2</sub> i HBA<sub>3</sub>). Lokalizacja obszarów HBA<sub>2</sub> i HBA<sub>3</sub> jest dyssymetryczna z uwagi na równowagę konformacyjną pomiędzy formami cis- i transoidowymi związków 4 i 5. Odległości pomiędzy poszczególnymi obszarami podano w tab. 3.

Odległości przedstawione w tab. 3. są odczytem struktur związków 1 - 5 zoptymalizowanych metodą DFT (B3LYP/6-31G(2d,p)) w wodzie. Wartości średnich odległości (d<sub>2</sub>-d<sub>3B</sub>) pomiędzy poszczególnymi obszarami modelu SPM wskazują na zmianę

rozmieszczenia cech elektronowych farmakofora z reprezentacji HBA<sub>1</sub>-Ar/H-HBD poprzez HBA<sub>1</sub>-Ar/H-PI do HBA<sub>1</sub>-Ar/H-HBA<sub>2(3)</sub>. Reprezentacje konformerów 4a i 4b (5a i 5b) stanowią w rzeczywistości jedną wzajemnie uzupełniającą się reprezentację. Równocześnie ta wynika z braku istotnych różnic pomiędzy odległościami d<sub>2A</sub> i d<sub>2B</sub> (d<sub>3A</sub> i d<sub>3B</sub>) konformerów N- acetylo- i N-propionylocytyzyny.

Tabela 3. Odległości pomiędzy obszarami aktywnymi badanej grupy alkaloidów.

Table 3. Distances between active areas of group of alkaloids studied.

| Nr związku<br>Compound number      | Odległości / Distances [nm] |                |                |                 |                 |                 |                 |
|------------------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                    | d <sub>1</sub>              | d <sub>2</sub> | d <sub>3</sub> | d <sub>2A</sub> | d <sub>2B</sub> | d <sub>3A</sub> | d <sub>3B</sub> |
| 1a                                 | 0,410                       | 0,409          | 0,495          | -               | -               | -               | -               |
| 1b                                 | 0,410                       | 0,410          | 0,498          | -               | -               | -               | -               |
| 2                                  | 0,410                       | 0,410          | 0,498          | -               | -               | -               | -               |
| 3                                  | 0,407                       | 0,408          | 0,493          | -               | -               | -               | -               |
| 4a                                 | 0,410                       | -              | -              | 0,535           | -               | 0,523           | -               |
| 4b                                 | 0,410                       | -              | -              | -               | 0,454           | -               | 0,583           |
| 5a                                 | 0,411                       | -              | -              | 0,569           | -               | 0,566           | -               |
| 5b                                 | 0,410                       | -              | -              | -               | 0,484           | -               | 0,610           |
| Średnia odległość<br>Mean distance | 0,410                       | 0,409          | 0,496          | 0,552           | 0,469           | 0,545           | 0,597           |

### **Prognozowanie natężenia smaku gorzkiego ISG ligandów 1 - 5**

Prognozowanie intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub>) badanych ligandów przeprowadzono na podstawie deskryptorów molekularnych. Każdy ligand charakteryzowano deskryptorami określającymi liczbę miejsc aktywnych (tzw. liczbę punktowych interakcji – LPI) oraz liczbę możliwych wpasowań w hipotetyczny obszar receptorowy (tzw. liczbę interaktywnych stymulacji – LIS). Prognozowany indeks smaku gorzkiego wyrażono sumą parametru LIS i LPI (ISG<sub>p</sub> =  $\sum$ LPI +  $\sum$ LIS × 12). W tab. 4. przedstawiono prognozowane i sensoryczne wartości ISG.

Przedstawione wartości prognozowanych i sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG<sub>p</sub> i ISG<sub>s</sub>) ligandów 1 - 5 mają porównywalne wartości. Największą prognozowaną i sensoryczną intensywność smaku gorzkiego wykazała cytyzyna. Powinowactwo cytyzyny do receptora można scharakteryzować za pomocą dwóch reprezentacji farmakoforowych HBA-HBD-AR/H oraz HBA-PI-AR/H (tab. 2). Oznacza to, że związek ten ma dwie możliwości aktywacji receptora oraz cztery obszary aktywne (LIS + LPI = 2 + 4). Pozostałe z badanych ligandów wykazują tylko jedną trójcentrową reprezentację farmakoforową (LIS + LPI = 1 + 3), co skutkuje osłabieniem aktywacji receptora smaku gorzkiego.

Tabela 4. Wartości prognozowanych i sensorycznych intensywności smaku gorzkiego (ISG) związków 1 - 5.

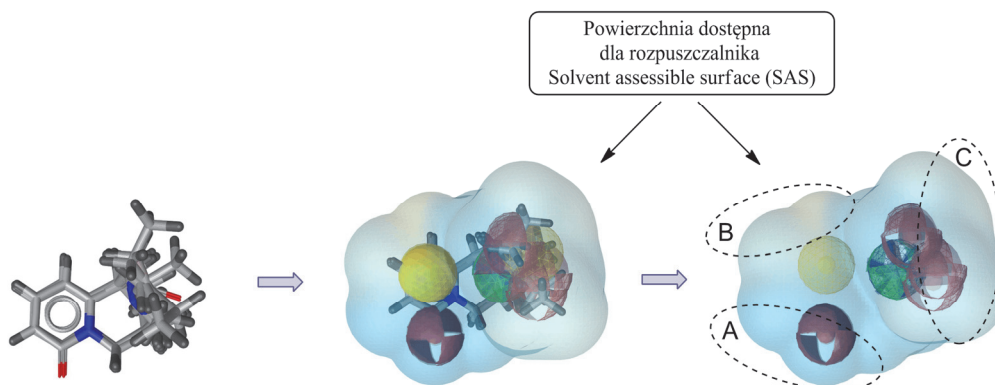
Table 4. Predicted and sensory values of intensity of bitter taste (IBT) for 1 – 5 compounds.

| Numer związku<br>Compound number | Deskryptory molekularne<br>Molecular descriptors |         | Wartości prognozowane intensywności smaku gorzkiego (ISG <sub>p</sub> )<br>Predicted values of intensity of bitter taste (IBT <sub>p</sub> ) | Wartości sensoryczne intensywności smaku gorzkiego (ISG <sub>s</sub> )<br>Sensory values of intensity of bitter taste (IBT <sub>s</sub> ) |
|----------------------------------|--|---------|--|---|
|                                  | LPI/LIS  | LPI+LIS |  |   |
| 1                                | 2/4  | 6       | 72   | 74 ± 4,9  |
| 2                                | 1/3  | 4       | 48   | 48 ± 4,2  |
| 3                                | 1/3  | 4       | 48   | 46 ± 4.1  |
| 4a                               | 1/3  | 4       | 48   | 45 ± 4,0  |
| 4b                               |  |         |  |   |
| 5a                               | 1/3  | 4       | 48   | 42 ± 4,1  |
| 5b                               |  |         |  |   |

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviation

### Analiza powierzchni receptora (RSA)

W celu przedstawienia zasadniczych obszarów oddziaływań badanych ligandów we wnętrzu kieszeni receptorowej przeprowadzono tzw. analizę powierzchni receptora (RSA). Struktury 1 - 5 nałożono metodą superpozycji, wyznaczono funkcje farmakoforowe i powierzchnię dostępną dla rozpuszczalnika (SAS). Do uzyskania klarowności obrazu z modelu usunięto struktury nałożonych na siebie związków 1 - 5.



Rys. 4. Wizualizacja hipotetycznych obszarów receptora dostępnych dla ligandów 1 - 5.

Fig. 4. Visualization of hypothetical receptor areas accessible to 1 - 5 ligands.

Otrzymany hipotetyczny model powierzchni receptora smaku gorzkiego (rys. 4) scharakteryzowano trzema obszarami o zmiennych właściwościach do tworzenia wiązań wodorowych (A – niebieski – obszar akceptorów wiązań wodorowych, C – szaroniebieski – obszar akceptorów lub donorów wiązań wodorowych, B – żółtoszary (AR/H) – obszar niezawierający wiązań wodorowych). Obszary A, B i C pseudo-receptora ilustrują kierunki zasadniczych punktowych interakcji (PI) ligand - receptor na powierzchni obszaru SAS. Teoretyczny model powierzchni receptora ligandów 1 - 5 umożliwia klasyfikację potencjalnych ligandów należących do analogów cytyzyny pod względem ich gorzkiej aktywności.

### Wnioski

1. Wyrażona za pomocą tzw. prostego modelu farmakoforowego (SPM) analiza cech strukturalno-przestrzennych serii gorzkich alkaloidów chinolizydynowych określa ich powinowactwo do receptora smaku gorzkiego.
2. Proponowany model SPM precyzuje trzy obszary powinowactwa: aromatyczno-hydrofobowy (AR/H) i akceptorowy ( $HBA_1$ ) oraz, kluczowy dla intensywności smaku gorzkiego, obszar atomu azotu  $N_{12}$ , przejawiający zarówno cechy donorowe (HBD), akceptorowe (HBA), jak i regionu o dodatniej jonizacji (PI).
3. Dowiedziono, że gorzką aktywność smakową wszystkich analizowanych ligandów charakteryzują trzy trójcentrowe reprezentacje farmakoforowe tj. HBA-HBD-AR/H, HBA-PI-AR/H i HBA-HBA-AR/H. Z kolei powinowactwo cytyzyny do receptora charakteryzują dwie reprezentacje farmakoforowe: HBA-HBD-AR/H oraz HBA-PI-AR/H, a pozostałe ligandy tylko jedną (HBA-PI-AR/H lub HBA-HBA-AR/H).
4. Łączną charakterystykę powinowactwa ligand/receptor badanych alkaloidów dobrze precyzują deskryptory, takie jak: LPI – wyrażający liczbę obszarów pobudzających receptor oraz LIS – określający liczbę wpasowań pojedynczego liganda w hipotetyczny obszar receptorowy. Powinowactwo to ( $ISG_p$ ) opisuje równanie smakowe w postaci  $ISG_p = \sum LPI + \sum LIS \times 12$ .
5. Analiza powierzchni receptora (RSA) oraz powierzchni dostępnej dla rozpuszczalnika (SAS) potwierdza trzy podstawowe kierunki (A, B i C) interakcji ligand - receptor, charakteryzujące się zmienną predyspozycją do tworzenia wiązań wodorowych.
6. Wartości intensywności smaku gorzkiego ( $ISG_p$ ) przewidywane za pomocą równania smakowego potwierdziły wyniki testów sensorycznych wodnych roztworów badanych alkaloidów.
7. Prosty model farmakoforowy (SPM) może być skutecznie stosowany w badaniach różnic pomiędzy wartościami intensywności smaku gorzkiego ( $ISG_p$ ) gorzkich składników żywności, takich jak alkaloidy chinolizydynowe.

### Literatura

- [1] Allen R.N., Shukla M.K., Reed D., Leszczynski J.: Ab initio study of the structural properties of ascorbic acid (vitamin C). *Int. J. Quantum Chem.*, 2006, **106** (14), 2934-2943.
- [2] Anderson D.J., Arneric S.P.: Nicotinic receptor binding of [3H]-cytisine, [3H] nicotine and [3H] methylcarbamyloxy-choline in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, **253** (3), 261-267.
- [3] Barone V., Cossi M., Tomasi J.: Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. *J. Comput. Chem.*, 1998, **19** (4), 404-417.
- [4] Behrens M., Meyerhof W.: Bitter taste receptor research comes of age: from characterization to modulation of TAS2Rs. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2013, **24** (3), 215-221.
- [5] Behrens M., Meyerhof W.: Mammalian bitter taste perception. *Res. Probl. Cell Differ.*, 2009, **47**, 203-220.
- [6] Botuha C., Galley C.M.S., Gallagher T.: A short synthesis of (±)-cytisine. *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2**, 1825-1826.
- [7] Brockhoff A., Behrens M., Massarotti A., Appendino G., Meyerhof W.: Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 6236-6243.
- [8] Caballero J.: 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. *J. Mol. Graph. Model.*, 2010, **29** (3), 363-371.
- [9] Chandrashekar J., Hoon M.A., Ryba N.J., Zuker C.S.: The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 2006, **444** (7117), 288-294.
- [10] Chen Z., Baker N.A., Wei G.W.: Differential geometry based solvation model I: Eulerian formulation. *J. Comput. Phys.*, 2010, **229** (22), 8231-8258.
- [11] Delwiche J.F., Halpern B.P., Lee M.Y.: A comparison of tip of the tongue and sip and spit screening procedures. *Food Qual. Prefer.*, 1996, **7** (3-4), 293-297.
- [12] Dong D., Jones G., Zhang S.: Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evol. Biol.*, 2009, **9**, 12. doi: 10.1186/1471-2148-9-12.
- [13] Frank O., Blumberg S., Krümpel G., Hofmann T.: Structure determination of 3-O-caffeoyl-epiquinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56** (20), 9581-9585.
- [14] Gaimarri A., Moretti M., Riganti L., Zanardi A., Clementi F., Gotti C.: Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression. *Brain Res. Rev.*, 2007, **55** (1), 134-143.
- [15] Galasso V., Przybył A.K., Christov V., Kovac B., Asaro F., Zangrando E.: Theoretical and experimental studies on the molecular and electronic structures of cytisine and unsaturated ketosparteines. *Chem. Phys.*, 2006, **325**, 365-377.
- [16] Kikut-Ligaj D., Jasiczak J.: Bitter taste, its prognostication and role in nourishment. *Pol. J. Comm. Sci.*, 2006, **1**, 15-28.
- [17] Kikut-Ligaj D., Jasiczak J.: The application of molecular mould of bitter taste receptor in combination with the QSAR method for prediction of taste. Part II. *Ann. Polish Chem. Soc.*, 2004, **3**, 675-679.
- [18] Klimacka-Nawrot E., Suchecka W.: Metody badań wrażliwości smakowej. *Wiad. Lek.*, 2008, **61** (7-9), 207-210.
- [19] Kuhn C., Bufe B., Batram C., Meyerhof W.: Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem. Senses*, 2010, **35** (5), 395-406.
- [20] Langer T., Wolber G.: Pharmacophore definition and 3D searches. *Drug Discov. Today*, 2004, **1** (3), 203-207.

- [21] Lauria A., Ippolito M., Fazzari M., Tutone M., Di Blasi F., Mingoia F., Almerico A.M.: IKK-beta inhibitors: an analysis of drug-receptor interaction by using molecular docking and pharmacophore 3D-QSAR approaches. *J. Mol. Graph. Model.*, 2010, **29** (1), 72-81.
- [22] Liu Q., Zhang D., Zhang F., Zhao Y., Hsia K.J., Wang P.: Biosensor recording of extracellular potentials in the taste epithelium for bitter detection. *Sens. Actuators B. Chem.*, 2013, **176**, 497-504.
- [23] Lyne P.D.: Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discov. Today*, 2002, **7** (20), 1047-1055.
- [24] Max M., Meyerhof W.: Taste Receptors. *The Senses: A Comprehensive Reference*, 2008, **4**, 197-217.
- [25] Marrière E., Rouden J., Tadino V., Lasne M.: Synthesis of analogues of (-)-cytisine for *in vivo* studies of nicotinic receptors using Positron Emission Tomography. *Org. Lett.*, 2000, **2** (8), 1121-1124.
- [26] Martin Y.C.: Pharmacophore Modeling: 1-Methods. *Comprehensive Med. Chem. II*, 2007, **406**, 119-147.
- [27] Nunes S.C.C., Eusébio M.E.S., Jesus A.J.L., Ermelinda M., Redinha J.S.: Conformational preferences of 2-isopropyl-aminoethanol in aqueous solution using the CPCM continuum solvation model. *J. Mol. Struct.*, 2008, **867** (1 - 3), 101-106.
- [28] PN-ISO 8586-1(2):1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne wyboru, szkolenia i monitorowania oceniających. Wybrani oceniający.
- [29] PN-ISO 8589:1998. Analiza sensoryczna. Ogólne wytyczne dotyczące projektowania pracowni analizy sensorycznej.
- [30] PN-ISO 6658:1998. Analiza sensoryczna. Metodologia. Wytyczne ogólne.
- [31] Reed D.R., Knaapila A.: Genetics of taste and smell: poisons and pleasures. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 2010, **94**, 213-240.
- [32] Stevens D.A., Dooley D.A., Laird J.D.: Explaining individual differences in flavour perception and food acceptance. Ed. D.M.H. Thomson, *Food Acceptability*, Elsevier Appl. Sci., London 1988.
- [33] Travers S.P., Geran L.C.: Bitter-responsive brainstem neurons: Characteristics and functions. *Physiol. Behav.*, 2009, **97** (5), 592-603.
- [34] Vijayan R.S., Ghoshal N.: Structural basis for ligand recognition at the benzodiazepine binding site of GABAA alpha 3 receptor, and pharmacophore-based virtual screening approach. *J. Mol. Graph. Model.*, 2008, **27** (3), 286-298.
- [35] Wolber G., Dornhofer A.A., Langer T.: Efficient overlay of small organic molecules using 3D pharmacophores. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2006, **20** (12), 773-788.
- [36] Yarmolinsky D.A., Zuker C.S., Ryba N.J.: Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 2009, **139** (2), 234-244.

## PREDICTING BITTER TASTE OF SELECTED QUINOLIZIDINE ALKALOIDS

### S u m m a r y

Bitter taste perception plays a particularly vital role when assessing qualitative properties of food. When differentiating between the acceptable flavour composition and the excessively bitter and potentially toxic one, a consumer focuses exclusively on the intensity (volume) of bitter taste perception. The volume diversity of bitter taste stimuli can be assessed by analyzing the reproducibility of structural properties in a set of bitter ligands. An effective research method to investigate the intensity of bitter taste perception are 3D pharmacophore models. A simple pharmacophore model (SPM that stands for *Simple Pharmacophore Model*) was used to analyze taste interactions of a series of small molecule ligands from a group of quinolizidine alkaloids. The SPM model made it possible to distinguish two basic affinity domains of the

alkaloids being studied: aromatic/hydrophobic (AR/H) and acceptor ( $\text{HBA}_1$ ). Moreover, there was identified a region of  $\text{N}_{12}$  nitrogen atom being fundamental for the intensity of bitter taste and exhibiting donor (HBD), acceptor (HBA), and positive ionization (PI) properties. The predicted intensity of bitter taste of quinolizidine alkaloids was described by two molecular descriptors, such as a number of regions stimulating the receptor (NPI that stands for the number of point interactions) and a number of alignments of a single ligand into a hypothetical receptor area (NIS that stands for the number of interactive stimulations). The assigned descriptors (NPI and NIS) were used to formulate a taste equation representing qualitative changes in the predicted intensity of bitter taste ( $\text{IBT}_p$ ) for the group of alkaloids analyzed. The predicted  $\text{IBT}_p$  values were confirmed by sensory values of the intensity of bitter taste ( $\text{IBT}_s$ ).

**Key words:** bitter taste perception, prediction of bitter taste, quinolizidine alkaloids, simple pharmacophore model (SPM) 