

**Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave**  
**Fakulta prírodných vied**



Tibor Maliar

**ŠTÚDIE BIOLOGICKEJ AKTIVITY**  
***IN VITRO***

TRNAVA 2023

**ŠTÚDIE BIOLOGICKEJ AKTIVITY IN VITRO**  
**(učebné texty)**

**Autor:**

doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.

**Recenzenti:**

doc. RNDr. Renata Gašparová, PhD.

doc. Ing. Peter Šafář, PhD.

Učebné texty boli schválené Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty Prírodných Vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave pre študentov vysokých škôl.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.

Všetky práva vyhradené. Bez súhlasu majiteľa práv toto dielo a ani jeho časti nemožno reprodukovat'.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2023

Vydanie: prvé

ISBN 978-80-572-0333-9

## OBSAH

<b>1</b>	<b>PREDSLOV</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>DEFINOVANIE ZÁKLADNÝCH POJMOV</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>PRÍPADY ŠTÚDII BIOLOGICKEJ AKTIVITY IN VITRO</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>VYMEDZENIE POJMU BIOAKTÍVNA LÁTKA</b> .....	<b>13</b>
4.1	LIPINSKÉHO PRAVIDLÁ LIEČIV	13
4.2	DELENIE SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV	14
<b>5</b>	<b>PREHLAD ATRAKTÍVNYCH CIELOV BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTOK</b> .....	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>ŠTÚDIE TYPU SAR</b> .....	<b>18</b>
6.1	CHARAKTERISTIKA SAR ŠTÚDII	18
6.2	TYPY SAR	20
6.3	VÝPOČTOVÁ ČASŤ	21
6.3.1	Proteínová databanka	21
6.3.2	Biologické deskriptory	21
6.3.3	Fyzikálno-chemické deskriptory	22
6.3.4	Elektrónové parametre	23
6.3.5	Lipofilno – hydrofilné vlastnosti	24
6.3.6	Stéricita molekuly	25
6.3.7	Indikátorové premenné	26
6.3.8	Lipinského pravidlá	26
6.4	KVANTITATÍVNE MODELY SAR	28
6.4.1	Hanschova analýza	28
6.4.2	Free - Wilsonova analýza	28
6.4.3	Nelineárne vzťahy	29
6.4.4	3D SAR metódy	30
6.4.5	Softvér	31
6.5	TEORETICKÁ ANALÝZA INTERAKCIE LIEČIVO – RECEPTOR	32
6.5.1	Molekulová mechanika	32
6.5.2	Kvantová mechanika	34
6.5.3	Semi-empirické metódy	34
6.5.4	Molekulová dynamika	35
6.5.5	Matematické metódy hľadanie energetického minima	36
<b>7</b>	<b>VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA</b> .....	<b>37</b>
7.1	STACIONÁRNE A MOBILNÉ FÁZY PRE SYSTÉM LLC	40
7.2	VYBRANÉ ELUČNÉ CHARAKTERISTIKY	41
7.3	INŠTRUMENTÁCIA V HPLC	44
7.4	STANOVENIE LOD A LOQ ANALYTOV	45
<b>8</b>	<b>STAVBA A REALIZÁCIA SKRÍNINGOVÝH EXPERIMENTOV</b> .....	<b>46</b>
8.1	ÚVOD	46
8.1.1	Skríningové systémy	46

8.1.2	Fotometria.....	49
8.1.3	Mikroplatničková technika.....	51
8.1.4	Systém merania na miroplatničkách.....	52
8.1.5	Primárny dátový procesing.....	55
8.1.6	Sekundárny dátový procesing.....	56
8.2	PRÍKLADY APLIKÁCIE SAR ŠTÚDIÍ.....	57
8.2.1	Vzťah štrukturálnych parametrov voči inhibičnej aktivite.....	57
8.2.2	Vzťah interakčnej energie voči inhibičnej aktivite.....	62
8.2.3	Matematické vzťahy aktivita ako funkcia koncentrácie.....	67
8.3	APLIKOVANÉ ŠTATISTICKÉ METÓDY KOLEKCIÍ VZORIEK.....	69
8.3.1	Dátový processing skriningových kolekcí.....	69
8.3.2	Príklady konkrétnych histogramov, preložených Gausovou funkciou.....	72
8.3.3	Interpretácia parametrov Gausovej krivky.....	74
8.3.4	Analýza hlavných komponentov.....	76
8.3.5	Zhluková analýza.....	78
9	VÝZNAM TOHTO MATERIÁLU V KONTEXTE ŠTÚDIA.....	80
10	LITERATÚRA.....	81

## ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1. Základné skupiny enzýmov s príslušným EC. Číslom. ....	18
Tabuľka 2. Príklady vybraných enzýmov - atraktívnych „targetov“ a ich klinických súvislostí. ....	18
Tabuľka 3. Typy intermolekulárných interakcií medzi dvoma molekulami, respektíve intramolekulárne v rámci jednej molekuly. ....	25
Tabuľka 4. Príspevok CADD pre rozvoj nových liečiv. ....	31
Tabuľka 5. Druhy interakcií analytu so stacionárnou fázou. ....	39
Tabuľka 6. Stacionárne a mobilné fázy v LLC. ....	40
Tabuľka 7. Inhibičné aktivity testovaných látok zo skupiny flavonoidov vyjadrenej parametrom IC <sub>50</sub> na boviný $\beta$ -trypsín. ....	59
Tabuľka 8. Prehľad vypočítaných fyzikálnochemických parametrov vybraných flavonoidov pomocou QSAR modulu v programe Hyperchem po cyklickej optimalizácii náboja semiempirickou metódou AM1 a optimalizácii geometrie látok MM metódou AMBER. ....	62
Tabuľka 9. Tabuľka SAR parametrov kolekcie vybraných flavonoidov. ....	64
Tabuľka 10. Prehľad vypočítaných štatistických parametrov lineárnej regresie prvého stupňa vybraných flavonoidov pomocou programu Datafit. ....	65

## ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Biosyntéza izopentenylidifosfátu klasickou a alternatívnou dráhou (Ramak a kol., 2012).....	15
Obrázok 2: Biosyntéza polyketidov na príklade biosyntézy kyseliny karmínovej (Walsh a Tang, 2017). ....	16
Obrázok 3. Schéma odvodenia vzťahov medzi štruktúrou a biologickou aktivitou /SAR/. .....	20
Obrázok 4. Algoritmus výpočtu molekulovej dynamiky.....	35
Obrázok 5. Grafické znázornenie lokálneho a globálneho minima hyperfunkcie pri hľadaní energetického minima.....	36
Obrázok 6. Porovnanie hľadanie energetického minima hyperfunkcie systému metódou steepest descent gradiendu (fialovým) a konjugovaného gradiendu (zeleným).....	37
Obrázok 7. Separácia dvojice analytov v separačnej kolóne delením medzi sorbent a eluent. ....	38
Obrázok 8. Koncentračný profil analytu v zóne a odpovedajúce elučné záznamy. ....	39
Obrázok 9. Základné elučné charakteristiky analytu. ....	41
Obrázok 10. Rozlíšenie $R_{ij}$ a prekrytie píkov dvoch analytov.....	42
Obrázok 11. Príklad analytickej informácie z HPLC zariadenia, alebo integrátora.....	43
Obrázok 12. Schéma kvapalinového chromatografu, 1- mobilná fáza, 2,3- zmiešavacie zariadenie, 4-depulzátor, 5- pumpa, 6 - dávkovacie zariadenie, 7 - slučka, 8 - predkolónka, 9 - kolóna, 10 - detektor, 11 - počítač, softvér, 12 - odpad.....	44
Obrázok 13. Príklad robotického systému pre dávkovanie veľkokapacitnej mikroplatničky a rôzne veľkokapacitné mikroplatničky v komerčnej ponuke.....	47
Obrázok 14. Princíp kombinatoriálnej syntézy v prípade troch (počet kombinácií = 27), respektíve štyroch (počet kombinácií = 81) odlišných stavebných blokov (cukry, aminokyseliny, iné chemické jednotky), znázornených v podobe symbolov guľčiek inej farby, guľčkou zelenej farby je znázornený nosič. ....	48
Obrázok 15. Schéma hodnotenia testovanej látky v supersystéme s radením testov na princípe rastúcej lipofility s výstupným parametrom percenta inhibičnej aktivity (%IA) v jednotlivých testoch. ....	49
Obrázok 16. Princíp a zloženie fotometra, pozostávajúci zo zdroja svetla, monochromátora, kyvety s roztokom testovanej entity, vzorky, fotodektora, násobiča s detekciou výstupu.....	50
Obrázok 17. Ukážka rôznych typov kyviet pre spektrofotometriu. ....	51
Obrázok 18. Príklad jednoduchých „reader“-ov, konkrétne typu OPSYS MR, od firmy Dynex a Elx80, od firmy Biotek. ....	52
Obrázok 19. Princíp a príklad multikanálových pipiet (A,B) a multikanálového steppera (C).....	53
Obrázok 20. Templát mikroplatničky pre hodnotenie 8 látok – inhibítorov ( $I_1, I_2, I_3 \dots I_8$ ), blanku (B) a kontroly (K) a v ôsmich paralelných meraniach v smere riadkov. ....	54
Obrázok 21. Príklad mikroplatničkového „skaker“-a PMS-1000 od firmy Grant Bio a mikroplatničkový termostat PST-100HL od firmy Biosan. ....	55
Obrázok 22. Správne a akceptovateľné rozloženie dát pri výpočte parametrov $IC_{50}$ ( $ED_{50}$ , $LD_{50}$ ).....	57
Obrázok 23. Štruktúry hodnotených flavonoidov.....	59
Obrázok 24. Optimalizovaná geometria kvercetínu v modeli $S^1$ regiónu hovädzieho $\beta$ -trypsinu po výpočte v programe Hyperchem cyklickou optimalizáciou náboja látky semiempirickou metódou AM1 a optimalizáciou geometrie komplexu enzým-látka	

metódou molekulovej mechaniky AMBER /frontálny a inverzný pohľad/ s vyznačením katalytickej triády. ....	60
Obrázok 25. Schématické znázornenie dvoch možných prístupov molekuly flavónov do katalytickej kavity enzýmov. ....	61
Obrázok 26. Závislosť interakčnej energie $E_{int}$ , aplikovaná je minimálna hodnota $E_{int}$ a priemerná hodnota $E_{int}$ . V grafe sú znázornené rovnice priamky a hodnota korelačného koeficienta $r^2$ pre oba prípady. ....	66
Obrázok 27. Porovnanie celkovej geometrie a torzie molekúl typických predstaviteľov rôznych štrukturálnych typov flavonoidov vo vákuu po výpočte v programe Hyperchem cyklickou optimalizáciou náboja semiempirickou metódou AM1 a optimalizáciou geometrie látky metódou molekulovej mechaniky AMBER, kvercetín-flavonol (fialová), biochanín – izoflavón (zelená) a naringenín – flavanón (čierna).....	66
Obrázok 28. Rozdelenie množiny $n$ na podmnožiny $n_1, n_2$ až $n_i$ , histogram rozdelenia v podobe stĺpcového grafu a v podobe X-Y závislosti, preloženého Gausovou funkciou. ....	70
Obrázok 29. Gausova krivka, fitujúca frekvenčný histogram rozdelenia vlastnosti – antioxidačnej aktivity metódou DPPH extraktov jačmeňa ( $n=100$ ), v podobe X-Y závislosti, preloženého Gausovou funkciou. ....	72
Obrázok 30. Gausova krivka, fitujúca histogramy rozdelenia nasledovných vlastnosti – inhibičná aktivita $n=100$ početnej kolekcie vzoriek extraktov rôznych genotypov jačmeňa na proteolytické enzýmy (trypsín, trombín, urokináza, kolagenáza a cyklooxygenáza). ..	73
Obrázok 31. Gausova krivka, fitujúca histogramy rozdelenia nasledovných vlastnosti, A – antioxidačná aktivita rôznymi metódami (mechanizmami), B – inhibičná aktivita na vybrané proteolytické enzýmy, $n=15$ početnej kolekcie vzoriek extraktov potravinárskych odrôd maku.....	74
Obrázok 32. Gausova krivka, fitujúca histogramy rozdelenia nasledovných vlastnosti, A – antioxidačná aktivita rôznymi metódami (mechanizmami), B – inhibičná aktivita na vybrané proteolytické enzýmy, $n=30$ početnej kolekcie vzoriek pív, získaných z obchodných reťazcov.....	74
Obrázok 33. Dvojrozmerná PCA analýza všetkých primárnych údajov ôsmich extraktov zo <i>Salvia officinalis</i> L. (zelený kríž), <i>Salvia divinorum</i> , <i>Salvia apiana</i> (červený kruh) a dvoch extraktov kalusových kultúr, odvodených zo šalvie(modré diamanty).....	77
Obrázok 34. Zhluková /CA/ analýza všetkých primárnych údajov ôsmich extraktov zo <i>Salvia officinalis</i> L. (zeleným), <i>Salvia apiana</i> (červeným) a <i>Salvia divinorum</i> + dvoch extraktov kalusových kultúr, odvodených zo šalvie(modrým).....	79

## 1 PREDISLOV

Vývoj bioaktívnych látok je vývoj látok s biologickým účinkom pre rôzne aplikácie. Jednou z kategórií bioaktívnych látok je aj vývoj liečiv. Vývoj rozmanitých liečiv, či vývoj pesticídov predstavuje vývoj látok, ktoré svojou aktivitou musia interagovať s nejakým biologickým objektom, počnúc najmenším objektom, akými sú viroidy až po ľudský organizmus.

Vývoj či objav takejto látky, skupiny látok nie je vec jednoduchá, vyžaduje koncentrovaný, ucelený a usmernený výskum, ktorý má svoje pravidlá, schémy a svoje zákonitosti. Výskum, ktorý má svoju logiku, svoju krásu, svoje čaro. Pre tento účel bolo pripravené a spísané nasledovné skriptum, ktoré prezentuje tie najdôležitejšie fakty a zákonitosti potrebné pre ktorýkoľvek formát biologickej štúdie na úrovni *in vitro*. Či už s cieľom realizovať plošný skrining kolekcie vybraných látok, realizáciu štúdie typu SAR, molekulový dizajn formátu CADD prepojený na biologické testovanie, alebo distribučné štúdie hľadania vybranej biologickej aktivity v *n*-početnej kolekcii vzoriek s formuláciou štatistických alebo chemometrických záverov. Skriptum je určené predovšetkým pre študentov biologických disciplín. Výpočet všetkých chemických a matematických aspektov je redukovaný na racionálne optimum a tieto kapitoly sú doplnené o zákonitosti skriningu, techniky a vybavenia, potrebnej pre tento typ práce v biochemickom laboratóriu, podobne ako základný návod ako pristupovať k spracovaniu nameraných dát – k dátovému „*processing*“-u. Skriptum je pripravené na uvedený účel ako komplexná pomôcka napríklad aj pre tých, ktorí realizujú obe časti štúdiu typu SAR i tú počítačovú, i tú laboratórnu časť avšak svojím rozsahom a obsahom, či zameraním nepostačuje pre študentov orietovaných svojou odvornosťou len na počítačovú, či matematickú stránku SAR štúdií.

Čo sa týka formy, skriptum je písané jazykom, ktorý je bežne používaný vo vedeckých kruhoch, ktoré sa danou problematikou zaoberajú, z týchto dôvodov sú v texte ponechané niektoré slová v pôvodnom anglickom tvare, doplnené vhodným vysvetlením. Matematické tvary, rovnice a vzťahy sú písané zvlášť s číslovaním matematických vzťahov, vysvetlenie zložitejších pojmov sú doplnené o vhodné grafické ilustrácie.

Autor



## 2 DEFINOVANIE ZÁKLADNÝCH POJMOV

**štúdia** – vedecký experiment s vyslovenou hypotézou, ktorého cieľom je hypotézu potvrdiť, alebo vyvrátiť, alebo experimentom prispieť k definitívnemu stanovisku,

**biologická aktivita** – chemická aktivita interakcie (v našom prípade nízko molekulových látok) so subcelulárnym (virálna partikula, enzým, protilátka, receptor, proteín, signálna molekula), celulárnym (mikrobiálna, rastlinná, alebo živočíšna bunka), alebo hypercelulárnym objektom, alebo systémom (tkanivo, pletivo, orgán, rastlina, živočích, človek),

**biologicky aktívna látka** – skrátene aj „bioaktívna látka“ je látka, „schopná“ prejavu biologickej aktivity,

**virálna partikula** – vírus – „nukleoproteínový kryštál“, infekčná častica, ktorá prejavuje známky života len v hostiteľskej bunke,

**enzým** – biokatalyzátor, molekula schopná katalýzy za fyziologických podmienok, najčastejšie proteín, alebo glykoproteín, schopná vlastného pasívneho pohybu – neukotvená molekula,

**inhibítor** – nízkomolekulová látka (často označovaná ako ligand), schopná reverzibilne, alebo ireverzibilne blokovat' časť enzýmovej aktivity,

**receptor** – väčšia, ukotvená molekula, najčastejšie v membráne, schopná špecifickej interakcie s konkrétnym ligandom, molekula so schopnosťou posúvať jednotkovú informáciu ďalej do bunky, respektíve do tkaniva,

**agonista** – látka, schopná špecifickej interakcie s receptorom, ktorá vedie k cieľnému odovzdanie informácie bunke, alebo tkanivu,

**antagonista** – látka schopná blokovania interakcie agonistu s receptorom, ktorý vedie k bloku cieľného odovzdanie informácie bunke, alebo tkanivu,

**signálna molekula** – regulačná molekula, schopná interakcie s konkrétnym receptorom, alebo enzýmom, ktorá sprostredkuje mimobunkovú, mimotkanivovú komunikáciu,

**QSAR/SAR** – skratka anglického výrazu „*quantitative structure activity relationship/structure activity relationship*“ – kvantitatívny/vzťah štruktúra aktivita – matematický vzťah, medzi konkrétnou aktivitou kolekcie štruktúralne príbuzných látok na jednej strane a spoločnou štruktúrnou vlastnosťou (štruktúrnymi vlastnosťami) na strane druhej,

**CADD** - skratka anglického výrazu „*computer aided (assisted) drug desing*“ počítačom sprostredkovaný dizajn liečiv,

**docking** – štúdie interakcie (kotvenia) medzi látkou (ligandom) na jednej strane a enzýmom, alebo receptorom na strane druhej, interakcie v prevažnej miere nekovalentné,

**biologické deskriptory (aktivitné parametre – syn.)** – parametre popisujúce biologickú aktivitu testovaných látok,

**fyzikálno-chemické deskriptory** – parametre popisujúce fyzikálno-chemické parametre testovaných látok,

**kompozitné parametre** – parametre kvantifikujúce obsah vybraných zložiek v kolekcii testovaných vzoriek,

**trénovacia množina látok** – množina látok, testovaním ktorých je cieľom získať množinu dát vypočítaných parametrov i nameraných údajov pre komparatívnu analýzu,

**aplikačná množina štruktúr** – množina štruktúr, podrobená výpočtu SAR parametrov, podľa výsledkov ktorých sú štruktúry vyberané pre testovanie.

**proteínová databanka** (<http://www.rcsb.org/pdb>) – databáza štruktúr biologických polymérov (proteínov, lipidov, nukleových kyselín, polysacharidov) samostatne alebo v podobe komplexov s ligandami,

**DPPH** – metóda antioxidačnej aktivity, schopnosť zhášať radikál DPPH°,

**ABTS** – metóda antioxidačnej aktivity, schopnosť zhášať radikál ABTS°,

**FRAP** – „*ferric reducing antioxidant power*“ – metóda antioxidačnej aktivity, schopnosť redukcie Fe<sup>3+</sup>, detegovaného komplexom s ,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazínom,

**RS** (redukčná sila) – metóda antioxidačnej aktivity, schopnosť redukcie Fe<sup>3+</sup>, detegovaného komplexom hexakyanoželezitanu sodného,

**IA\_ENZ** – inhibičná aktivita vzoriek na zvolený enzým (TY –trypsín, TR-trombín, UR – urokinázu, ELA-elastázu, CATB /CTSB/ – katepsín B, COL – kolagenázu, COX – cyklooxygenázu a pod.)

### 3 PRÍPADY ŠTÚDII BIOLOGICKEJ AKTIVITY IN VITRO

Príklady štúdií testovania biologickej aktivity *in vitro* môžu byť nasledovné, radené od najjednoduchších po zložité, vyžadujúce špecifický softvér:

- testovanie spektra biologických aktivít pre konkrétnu látku, bez hľadania súvislosti k štruktúre danej látky,
- testovanie spektra biologických aktivít pre konkrétnu (komplexnú) vzorku, bez hľadania súvislosti k analytickej kompozícii danej vzorky,
- testovanie konkrétnej, vybranej biologickej aktivity pre konkrétnu (komplexnú) vzorku s paralelnou analýzou zostavy komplexnej vzorky *off line*, alebo *on line* systémom,
- testovanie konkrétnej vybranej aktivity pre kolekciu štrukturálne príbuzných látok /SAR/, pričom nie je známy receptor a do relácie voči aktivite sú dané fyzikálno-chemické vlastnosti látok,
- testovanie konkrétnej vybranej aktivity pre kolekciu štrukturálne príbuzných látok /“*docking*“ látok v danom receptore/, pričom je známa 3D štruktúra receptora a do relácie voči aktivite sú dané hodnoty interakčnej energie, vypočítané na základe CADD simulácie interakcie (kovalentnej, nekovalentnej interakcie) medzi látkou (ligandom) a receptorom,
- testovanie spektra biologických aktivít pre kolekciu príbuzných (komplexných) vzoriek, hľadanie štatistických súvislostí výskytu danej biologickej vlastnosti v množine príbuzných vzoriek, bez hľadania súvislosti k analytickej kompozícii danej vzorky,
- testovanie spektra biologických aktivít pre kolekciu príbuzných (komplexných) vzoriek, hľadanie štatistických súvislostí výskytu danej biologickej vlastnosti v množine príbuzných vzoriek, s hľadaním súvislosti k analytickej kompozícii vzoriek,

Štúdie biologickej aktivity testovaných lát na úrovni *in vitro*, sú štúdie, ktoré prebiehajú mimo živého organizmu, to znamená štúdie s vhodným modelom, na vhodnom aplikačnom systéme, ktoré môžeme následne rozdeliť na:

- štúdie bioaktívnych látok s využitím chemických reakcií a detekcií (napr. stanovenie antioxidačnej aktivity látok, čiže schopnosť terminovať modelový radikál DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•</sup> a pod.),
- štúdie bioaktívnych látok na imunologické procesy a mechanizmy s využitím niektorej z modifikácií ELISA testov s využitím bifunkčných protilátok – jedná sa o subcelulárnu úroveň s aplikáciou protilátok,
- štúdie bioaktívnych látok, ako inhibítorov rôznych enzýmov so začlenením izolovaných, purifikovaných enzýmov, alebo parciálne purifikovaných frakcií s enzýmovou aktivitou (napríklad inhibičná aktivita na trypsín, cyklooxygenázu a pod.) – jedná sa o subcelulárnu úroveň,
- štúdie bioaktívnych látok ako látok s antimikrobiálnou aktivitou s začlenením živých mikroorganizmov do testov (vybraný bakteriálny, kvasinkový, myceliárny taxón určuje povahu testu, či sa jedná o antibakteriálnu aktivitu, antikvasinkovú aktivitu, antimyceliárnu, respektíve antifungálnu aktivitu) – jedná sa o celulárnu úroveň, tento model si však vyžaduje aseptické prostredie, ktoré zaručí rast a proliferáciu len testovaného objektu v daných podmienkach,
- štúdie aktivity bioaktívnych látok na proliferáciu vybraných buniek ľudského i živočíšneho pôvodu, teda jedná sa o celulárnu úroveň, pričom jednotlivé bunkové línie môže byť normálne fyziologické línie (V79 – fibroblasty čínskeho škrečka, CHO – ovariálne bunky čínskeho škrečka a pod.) a vtedy sa jedná o meranie miery toxicity testovaných látok, alebo sa jedná o nádorovo metamorfované línie (napríklad L1210, HepG2, bunky myššieho melanómu B16 a pod.) a v tom prípade sa jedná o meranie miery žiaduceho cytotoxického účinku,

Pod pojmom vhodný aplikačný model rozumieme stavbu modelu, kde prebieha reakcia, alebo interakcia s vybraným subcelulárnym subjektom (enzým, protilátka), alebo vybraným celulárnym biologickým objektom (mikroorganizmus, živočíšna, rastlinná bunka). Štúdie *in vitro* môžu prebiehať v bankách, Petriho miskách, plastových mikroplatničkách (6, 12, 24, 48, 96 a viacjamkových) s detekciou výstupných parametrov, najčastejšie ide o fotometrickú detekciu, prípadne fluorometrickú pri konkrétne zvolenej vlnovej dĺžke/dĺžkach, minoritne sa jedná o turbidimetrickú, alebo aglutinačnú detekciu.

## 4 VYMEDZENIE POJMU BIOAKTÍVNA LÁTKA

Bioaktívna látka je látka schopná biologickej interakcie, t.j. látka prejavujúca biologickú aktivitu. Na jednej strane je nutné poznamenať, že mimo farmakologických aspektov sa aplikácie jedná napríklad aj o látky s pesticídnym (insekticídnym, herbicídnym, mikrobicídnym) účinkom, tento pojem sa však v očiach laickej verejnosti čím ďalej zužuje a aplikuje ako „*terminus technicus*“ pre látky s liečivým účinkom, teda liečivá – farmaká. Na druhej strane sa tento termín v očiach populárno-vedeckej verejnosti zužuje na nízkomolekulové látky, t.j. látky s molekulovou hmotnosťou do  $500 \text{ g.mol}^{-1}$ , v súlade so zaužívanými Lipinského pravidlami liečiv, čo prezentuje nasledovná kapitola. Treba však poznamenať, že v súčasnosti majú obe tvrdenia svoje isté obmedzenia.

### 4.1 LIPINSKÉHO PRAVIDLÁ LIEČIV

Je zrejmé, že látky použiteľné ako liečivo majú mať známy biologický a toxikologický profil. Metódy *in silico* v dnešnej dobe slúžia na určenie či je alebo nie je daná látka vhodným kandidátom na liečivo a či daná látka v mieste pôsobenia vyvolá v určitej dávke terapeutické účinky (DUCHOWICZ a kol. 2007). Je známe, že miera absorpcie látky je závislá od dávky, rozpustnosti a povahy podanej látky. Prieskum veľkých databáz obsahujúcich biologicky dostupné orálne liečivá, čiže zlúčeniny, ktoré sú absorbované difúziou cez gastrointestinálny trakt, viedol k formulácii široko akceptovaných pravidiel piatich Lipinského pravidiel – kritérií pre liečivá, alebo medzinárodne formulované ako „*Rules of five*“ (DUCHOWICZ a kol., 2007). Tieto pravidlá hovoria, že látka môže byť vhodným kandidátom na liečivo ak spĺňa nasledovné kritériá:

- molekulová hmotnosť látky je menšia ako  $500 \text{ g.mol}^{-1}$ , vzhľadom na jej schopnosť pasívne prestupovať kompartmentové bariéry,
- rozdeľovací koeficient v systéme n-oktanol/voda v logaritmickej tvare  $\log P$  musí mať hodnotu  $\leq 1, 5 \geq$ , pod tento interval je látka veľmi polárna a veľmi rýchlo sa z organizmu vylučuje, nad tento interval je látka veľmi nepolárna a nedochádza k jej sorpcii do GI systému, ale je eliminovaná tráviacim traktom stolicou,
- počet donorov vodíkových väzieb, t.j. funkčných skupín vodíkov na heteroatómoch (OH, NH<sub>2</sub>, SH, COOH, funkčné skupiny), teda vodíkov s parciálnym nábojom väčším ako +0,2 nie je väčší ako 5,
- počet akceptorov vodíkových väzieb (heteroatómy s minimálne jedným voľným elektrónovým párom (-O-, -S-, -N-)) nie je väčší ako 10,

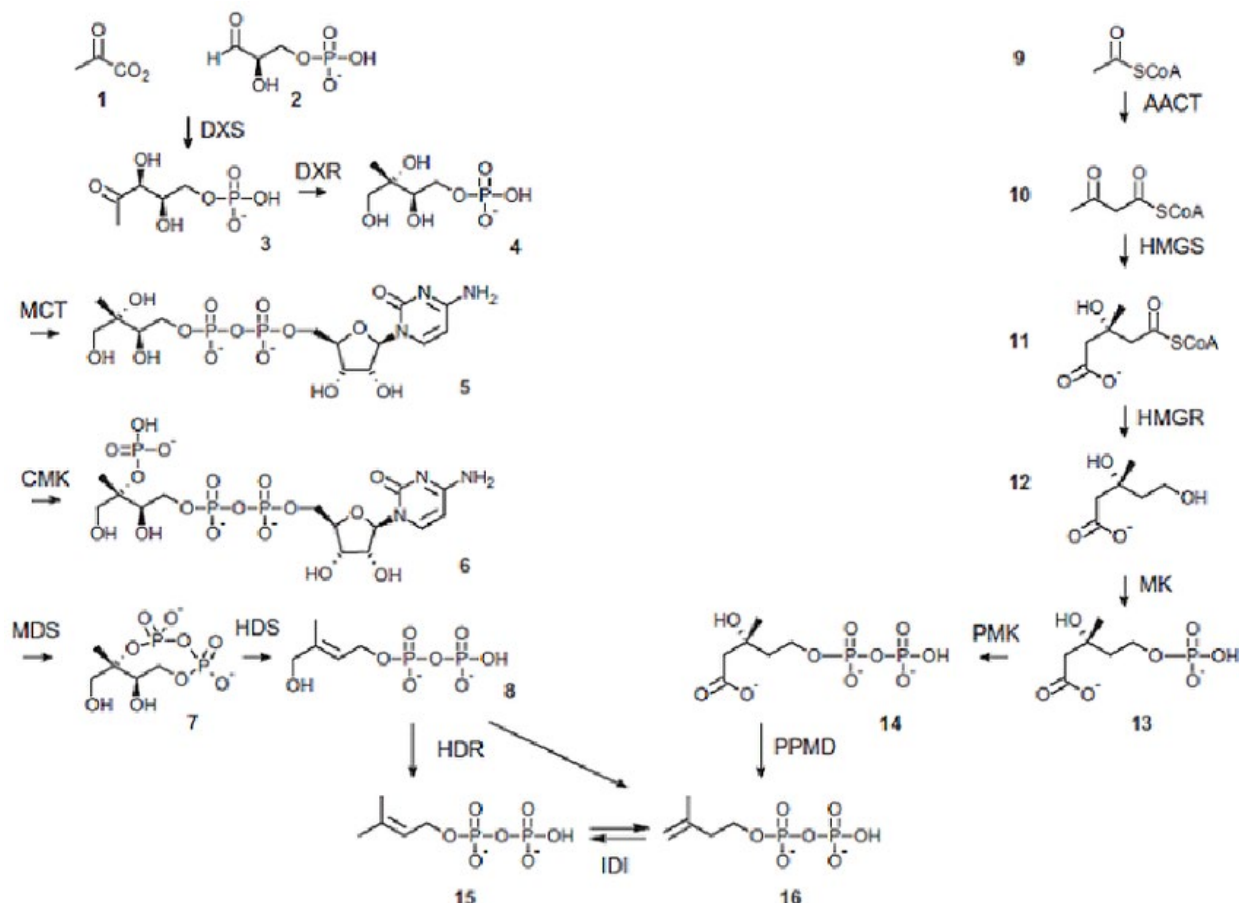
- počet rotovateľných väzieb ( $sp^3$  hybridizácia atómov), má byť čo najmenší, maximálne 10.
- k týmto pravidlám je nutné ešte dodať pravidlo, že účinnosť kandidátov liečiv, vyjadrená parametrom  $IC_{50}$  – inhibičná koncentrácia, zodpovedná za 50 % inhibíciu by mal byť ideálne pod úrovňou  $10\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $10000$

Medzi perspektívnych kandidátov liečiv patria nízkomolekulové látky, kam môžeme zaradiť napríklad monoméry, diméry, oligoméry odvodené od biologických polymérov, v zmysle definície primárnych metabolitov (proteíny, polysacharidy, lipidy, polynukleotidy a pod.), ale predovšetkým významná skupina sekundárnych metabolitov, ktorých funkcia v biologickom organizme môže byť, ale nemusí, byť známa. Často sa jedná o sekundárne metabolity rastlín v zmysle obranných látok s fytoncídny účinkom, produkciu ktorých rastlina reaguje na abiotické a biotické podnety zo svojho okolia. K tejto kategórii látok radíme polyfenoly, alkaloidy, terpény, teda skupinu látok, ktorá vzniká buď spájaním dvojuhlíkatého segmentu v podobe acetylkoenzýmu A a následnou post-syntetickou, enzýmovou úpravou molekuly (polyketidy, terpenoidy), alebo transamináciou niektorých aminokyselín, následnou derivatizáciou v zmysle do-stavby molekuly a terminálnou postskeletálnou úpravou molekuly.

#### 4.2 DELENIE SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV

Jedným z možných delení sekundárnych metabolitov je delenie podľa sumárneho vzorca a prítomnosti heteroatómov. Ako heteroatóm je definovaný každý atóm iný ako uhlík a vodík. Z tohto pohľadu môžeme rozdeliť sekundárne metabolity na dusíkaté, sírne, kyslíkaté a podobne. Pre časť dusíkatých a sčasti i kyslíkatých sekundárnych metabolitov používame názov alkaloidy. Sekundárne metabolity možno ďalej deliť napríklad podľa biosyntetických dráh. Poznáme tri veľké, základné skupiny metabolitov a to polyketidy a terpény. Prvé dve, uvedené skupiny začínajú svoju biosyntézu jednoduchou molekulou acetylkoenzýmom A. Dvojuhlíkatý, koenzýmom A „aktivovaný“ štep sa spája tri krát na 3-hydroxy-3-metylglutaryl koenzým A, kde začína postsyntetická časť biosyntézu terpénov.

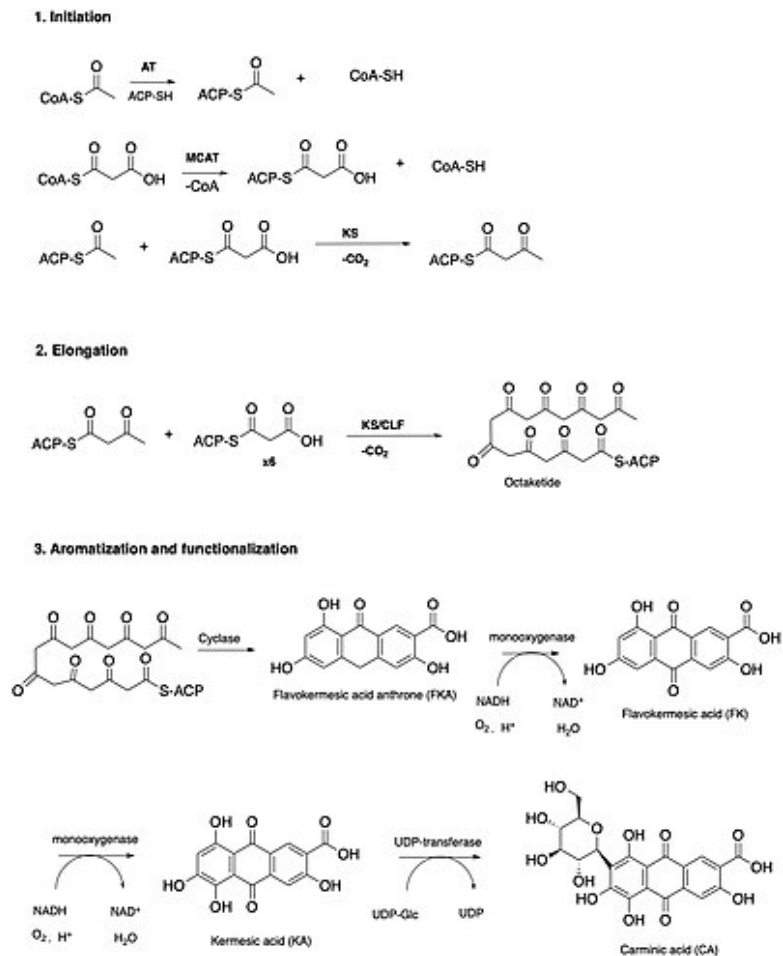
Obrázok 1 popisuje biosyntézu kľúčového prekursora syntézy terpénov - izopentenylidifosfátu klasickou a alternatívnou dráhou.



Obrázok 1: Biosyntéza izopentenylidifosfátu klasickou a alternatívnou dráhou (Ramak a kol., 2012).

Pre syntézu terpénov je typická redukcia všetkých atómov kyslíka až na izopentenylidifosfát, ktorý je stavebnou jednotkou izoprenoidov a širokej skupiny terpenoidov. Po reťazení tejto základnej jednotky môže prebiehať ešte aj terminálna post-skeletálna úprava molekuly s opätovným vnesením atómu/atómov kyslíka do molekuly.

V prípade biosyntézy polyketidov a im príbuzným látkam, dochádza k spájaniu acetylkoenzýmu A do dlhších molekúl a k terminálnej skeletálnej syntéze bez redukcie atómov kyslíka vo forme karbonylových funkčných skupín. Kľúčovým medziproduktom pri biosyntéze je rôzne dlhý polyketidový reťazec v lineárnej forme a ďalšie intermediáty. Obrázok 2 popisuje príklad biosyntézy polyketidov na konkrétnom príklade biosyntézy kyseliny karmínovej.



**Obrázok 2: Biosyntéza polyketidov na príklade biosyntézy kyseliny karmínovej (Walsh a Tang, 2017).**

Tretiu veľkú skupinu biologicky významných sekundárnych metabolitov tvoria alkaloidy. Jedná sa o tak veľkú skupinu sekundárnych metabolitov, že by si vyžadovala samostatný priestor. Na tomto mieste by bolo vhodné a správne aspoň v krátkosti predstaviť a uviesť a odcitovať aktuálne skriptom, ktoré je venované týmto látkam s názvom: „alkaloidy rastlín a húb“ (Piršelová a Havrlentová, 2022). Alkaloidy podľa tohto literárneho zdroja delíme na tri základné skupiny:

- Pravé alkaloidy sú zvyčajne heterocyklické dusíkaté bázy odvodené od aminokyselín. Vykazujú široké spektrum fyziologických účinkov a pre človeka a živočíchy sú veľmi toxické (napr. nikotín, chinín, ópiové alkaloidy a ďalšie).
- Pseudoalkaloidy sú taktiež skupinou heterocyklických dusíkatých báz, ale ich prekuzory nie sú aminokyseliny. Sú obvykle menej toxické než pravé alkaloidy (piperidínové, purínové, steroidné a diterpénové alkaloidy).



- Protoalkaloidy predstavujú bázičné amíny odvodené od aminokyselín, ale dusík nie je súčasťou ich aromatického systému (pyrolizidínové alkaloidy).

Biogeneticky sú alkaloidy odvodené väčšinou od nasledovných aminokyselín: ornitín, lyzín, fenylalanín, tyrozín, tryptofán a histidín. Niektoré alkaloidy vznikajú z kyseliny antranilovej alebo kyseliny nikotínovej a ďalšie vznikajú z medziproduktov biosyntézy terpenoidov a steroidov za prítomnosti amoniaku. Na syntéze alkaloidov sa môžu zriedkavejšie zúčastňovať i ďalšie aminokyseliny, ako glycín, cysteín, metionín, kyselina asparágová a prolín.

Na základe biosyntetických prekursorov možno heterocyklické alkaloidy rozdeliť do niekoľkých skupín:

- Alkaloidy odvodené od ornitínu – pyrolizidínové, tropánové a pyrolizidínové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od lyzínu – piperidínové a chinolizidínové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od kyseliny nikotínovej – pyridínové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od fenylalanínu – tetrahydroizochinolínové a benzyltetrahydro-izochinolínové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od tryptofánu – indolové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od kyseliny anthranilovej – chinolínové a akridínové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od histidínu – imidazolové alkaloidy.
- Alkaloidy odvodené od kyseliny mevalonovej – terpénové a steroidné alkaloidy.
- Deriváty xantínu – purínové alkaloidy.

## 5 PREHLAD ATRAKTÍVNYCH CIEĽOV BIOLOGICKY AKTÍVNYCH LÁTKOK

Prehľad atraktívnych cieľov – „*targetov*“ pre biologicky aktívne látky je možné prezentovať napríklad na základe inhibítorov enzýmov, ktoré stále zatiaľ výrazne prevažujú nad agonistami, antagonistami farmakologicky významných receptorov, Inhibítory farmakologicky významných enzýmov možno radiť napríklad podľa klinických súvislostí, alebo z pohľadu jednotlivých skupín enzýmov. Ako je známe enzýmy sa delia do šiestich kategórii v súlade s nasledujúcou Tabuľkou 1. Príklady vybraných enzýmov – atraktívnych „*targetov*“ a ich klinických súvislostí prezentuje nasledovná Tabuľka 2.

**Tabuľka 1. Základné skupiny enzýmov s príslušným EC. Číslom.**

P. č.	Skupina enzýmov	Klasifikácia
1	Oxidoreduktázy	EC. 1.x.x.x
2	Transferázy	EC. 2.x.x.x
3	Hydrolázy	EC. 3.x.x.x
4	Lyázy	EC. 4.x.x.x
5	Izomerázy	EC. 5.x.x.x
6	Ligázy	EC. 6.x.x.x

**Tabuľka 2. Príklady vybraných enzýmov - atraktívnych „targetov“ a ich klinických súvislostí.**

Enzým, skupina enzýmov	Klinické súvislosti hyperaktivity
kinázy, topoizomerázy, histónacetylázy	nádorové ochorenia,
cyklooxygenázy, lipooxygenázy	zápalové ochorenia,
nitrat oxid syntázy, fosfodiesterázy	kardiovaskulárne ochorenia,
trypsín, chymotrypsín	ochorenia pankreasu,
fosfolipázy	obezita, dystrofické ochorenia,
kaspázy	epilepsia, nádorové ochorenia, ochorenia spojené s nekrozou tkaniva,
katepsín B, elastázy	atritídy, reumatitídy, imunitné a topické ochorenia,
trombín, kalikreín, hemokoagulačné faktory	cievne a trombotické ochorenia,
monoaminoxidázy	psychózy, depresie,
leucínaminopeptidázy, glukozidázy	diabetes typu II.
metaloproteinázy	nádorové ochorenia, artritídy, reumatitídy,
reverzné transkriptázy, inegrázy, proteinázy	virálne ochorenia

## 6 ŠTÚDIE TYPU SAR

### 6.1 CHARAKTERISTIKA SAR ŠTÚDII

Riešenia vzťahov štruktúra – aktivita (Kuchař a Rejholec, 1987; Debnath, 2001) vyžadujú paralelné, simultánne skúmanie v dvoch rovinách. Prvou rovinou je virtuálna realita, ktorá sa realizuje predovšetkým na vhodnom hardvéri s aplikáciou vhodného softvéru a druhou rovina je rovina experimentálna, ktorá predstavuje súbor meraní v experimentálnom (reálnom) priestore, prevažne v špecializovanom laboratóriu. Terminálnym krokom výskumu, ktorého cieľom je porovnanie záverov a zistení reálnej a virtuálnej reality, je komparatívna analýza vhodnými štatistickými metódami. Cieľom je nájsť súlad medzi oboma realitami, ktorý predstavuje argument pre formuláciu, predikciu ďalších záverov na základe výpočtov vo virtuálnej realite s cieľom obísť nutnosť fyzického

testovania, čo predstavuje nemalú úsporu finančných prostriedkov nutných na syntézu, respektíve izoláciu a testovanie nových látok.

Na základe uvedeného, možno SAR štúdie rozdeliť na niekoľko fáz:

- trénovacia fáza, ktorej cieľom je kolektovanie množiny virtuálnych dát a reálnych, nameraných dát pre trénovaciu množinu prvkov (entít – testovaných objektov),
- komparatívna fáza, kedy sa hľadá korelácia medzi virtuálnymi parametrami a reálnymi parametrami, nameranými v podmienkach reálneho testovania,
- aplikačná fáza, ktorej cieľom je predikcia reálnych fyzikálnych parametrov len na základe parametrov vypočítaných pomocou počítačov vo virtuálnej realite.

Špecifický prípadom vývoja bioaktívnych látok je optimalizácia existujúcej primárnej štruktúry nazývanej aj „*lead structure*“ – vedúcej štruktúry. Po objave účinnej látky – vedúcej štruktúry, je ďalšie štádium – charakterizovanie možných štruktúrnych obmien základnej štruktúry, ktorých úlohou je modifikácia biologického efektu v kvalitatívnom aj kvantitatívnom zmysle. Syntéza alebo vývoj nových látok sa sústreďuje na obmeny základnej účinnej štruktúry, ktorej cieľom je hlavne:

- zvýšenie účinku,
- zvýšenie selektivity účinku,
- zmena farmakokinetického profilu látky, stability, dostupnosti a pod.,

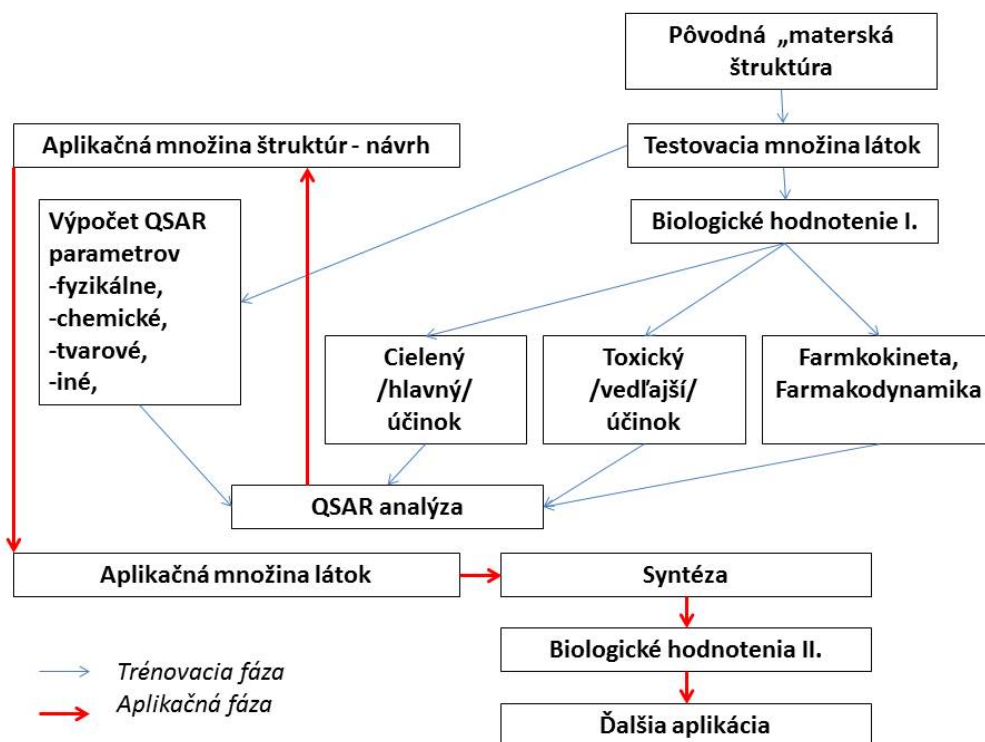
Optimalizácia biologickej aktivity sa robí s kolekciami /množinou/ látok, ktorá vykazuje isté, spoločné štrukturálne prvky. Tieto štrukturálne prvky – štrukturálny základ, vysvetľujeme ako súhrn štruktúrnych znakov, ktoré sú /predpokladá sa, že sú/ kauzálne pre biologický účinok.

Všetky látky v množine sú charakterizované súborom fyzikálno-chemických vlastností, nazvaných štrukturálne deskriptory, a na druhej strane parametrami biologickej aktivity. Matematický vzťah, čiže závislosť biologickej aktivity  $Y$  na vhodne vybraných fyzikálno-chemických deskriptoroch  $x_i$  vyjadruje nasledovná funkcia (I):

$$Y = f(\sum k_i x_i), \quad (I),$$

kde konštanty  $k_i$  sú koeficientami k príslušným fyzikálno-chemickým deskriptorom  $x_i$ .

SAR prístup a interpretácia týchto matematických vzťahov predstavuje jeden z najvýznamnejších nástrojov molekulárnej farmakológie. V prípade vývoja nových účinných liečiv umožňujú techniky SAR formuláciu štrukturálnych obmien vo vedúcej štruktúre, ktoré v študovanej kolekcii látok podmieňujú potenciáciu účinnosti a pomáhajú vysvetliť fyzikálno-chemickú interpretáciu mechanizmu účinku. Odvodenie vzťahov SAR v prípade liečiv, je znázornené na Obrázku.3.



Obrázok 3. Schéma odvodenia vzťahov medzi štruktúrou a biologickou aktivitou /SAR/.

## 6.2 TYPY SAR

SAR štúdie, respektíve QSAR štúdie možno rozdeliť na dve základné skupiny: štúdie SAR keď nie je známy receptor, ale je možné korelovať účinok predovšetkým v modeloch na úrovni *in vitro* voči fyzikálno-chemickým a tvarovým parametrom, a druhá skupina, keď je popísaný receptor, respektíve komplex receptora a ligandu a ten je dostupný napríklad v proteínovej databanke. Proteínová databanka obsahuje súbory receptorov, prípadne receptorov a ligandov, súborov ktoré sú vlastne množinou karteziánskych súradníc pre každý atóm, získané po vhodnej X-ray, respektíve NMR analýze. V takom prípade hovoríme o dokovaní štruktúr trénovacej, alebo aplikačnej množiny látok.

## 6.3 VÝPOČTOVÁ ČASŤ

### 6.3.1 Proteínová databanka

Na tomto mieste je vhodné predstaviť si proteínovú databanku, nakoľko je jedným len z niekoľkých, ale majoritným zdrojom, verejne prístupných štruktúr biologických polymérov (proteínov, lipidov, nukleových kyselín, polysacharidov a ďalších) samostatne alebo v podobe komplexov s ligandami. Obsahuje aj kovalentne viazané komplexy, v prevažnej miere sa jedná o nekovalentné asociáty medzi biologickým polymérom. Tieto súbory možno primárne rozdeliť podľa fyzikálneho princípu, ktorý bol základom ich riešenia na X ray súbory – súbory riešené kryštalografickou analýzou biologického polyméru, respektíve jeho komplexov, NMR súbory, kde štruktúra je riešená v solvatomanom stave modernými NMR metódami a minoritne súbory riešené pomocou elektrónového mikroskopu či neutrónovej difrakcie v nadväznosti na teoretické doriešenie modelu, v niektorých prípadoch sa uplatňujú aj hybridné prístupy. Ďalším dôležitým selekčným parametrom je presnosť rozlíšenia, ktorá sa udáva v jednotkách v angstrónoch – Å,  $1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$ . Súbory, vyriešené s najvyšším rozlíšením, sú prezentované ako riešené s rozlíšením menej ako 1,5 Å. Daná proteínová databanka umožňuje uplatnenie ďalších filtrov, akými sú napríklad: filtrovanie súborov podľa taxonomických súvislostí, organizmu, typu polyméru, enzýmovej klasifikácie, proteínovej symetrie, stechiometrie proteínu či dátumu, kedy bol predmetný súbor zverejnený a sprístupnený.

### 6.3.2 Biologické deskriptory

Biologické deskriptory sú biologické parametre, ktoré vhodným spôsobom vyjadrujú, kvantifikujú účinok látky na študovaný biologický systém. Delíme ich podľa časovej následnosti a miery dátového procesingu na:

- primárne, ktoré sú priamym výstupom s meracích zariadení, respektíve procesované základným výpočtom (percento reziduálnej aktivity -  $\%RA = [(A_{\text{vzorka}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}})] * 100$ ], respektíve percento inhibičnej aktivity -  $\%IA = \{[1 - (A_{\text{vzorka}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{blank}})] * 100\}$ . Alebo v skrátenej tvare  $\%IA = 100 - \%RA$ .

- sekundárne, ktoré sú vypočítané z primárnych deskriptorov - rýchlostné konštanty  $k_i$ , rovnovážne konštanty  $K_i$ , parametre Michaelis-Mentonovej rovnice  $K_M$  a  $V_{max}$  a pod.),
- biologické deskriptory, ktoré sa viažu k oblasti *in vivo*, napríklad efektívna dávka  $ED_{50}$ , letálna dávka  $LD_{50}$  a podobne.

Pre vývoj aktívnych látok je nutná presnosť stanovenia daného parametra, ktorá je jedným z limitujúcich faktorov interpretácie záverov SAR.

Biologické deskriptory možno kvantifikovať pre rôzne úrovne biologického systému, úroveň *in vitro* - izolované makromolekúly (enzýmové reakcie, väzba na proteíny), izolované tkanivové kultúry - úroveň *ex vivo*, celý živý modelový organizmus, napríklad experimentálne zvieratá - úroveň *in vivo*, prípadne sa môže jednať aj o klinické hodnotenie na probandoch a dobrovoľníkov, čo charakterizujeme ako úroveň *in clinico*.

Rastúca zložitosť biologického systému súčasne znamená aj rastúci počet biochemických dejov a mechanizmov, ktoré nám látku menia, modifikujú a metabolizujú. Preto je nutné pri SAR štúdiách na úrovniach *in vivo* brať do úvahy vplyv rôznych procesov: absorpciu, distribúciu, metabolizmus, elimináciu a reakciu s receptorom v mieste účinku. Logicky to však znamená, že účinok hodnotený v *in vitro* podmienkach nemusí byť adekvátny účinku na úrovni *in vivo*, respektíve *in clinico*, od ktorého sa môže dramaticky líšiť. Voľba modelu je podriadená cieľu, či chceme riešiť účinnosť hotové liečiva v zložitejšom biologickom systéme, alebo chceme poznať zákonitosti primárnej odpovede zmeny účinku na štrukturálne variácie, na čo model na úrovni *in vitro* vhodnejší.

### 6.3.3 Fyzikálno-chemické deskriptory

Jeden z prvých, základných a najznámejších prístupov, využívaných v štúdiách typu SAR je Hanschov prístup (Jhanwarb a kol., 2011), ktorý vychádza z predpokladu, že správanie sa látky v biologickom systéme je podmienené fyzikálno - chemickými vlastnosťami interagujúcej látky a zložkami v biologickom systéme.

Na charakterizáciu fyzikálno - chemických vlastností možno použiť konštanty, ktoré kvantifikujú termodynamické parametre systému. Konštanty odvodené v modelových podmienkach možno aplikovať aj na biologický systém, pričom ich hodnoty sú porovnávané so zmenou Gibbsovej energie, entropiou a entalpiou.

### 6.3.4 Elektrónové parametre

Na určenie elektrónových efektov substituentov sú v SAR štúdiách využívané veličiny, ktoré sa dajú priamo experimentálne merať (rovnovážne, rýchlostné konštanty, spektrálne veličiny) alebo majú charakter štatistických konštánt. Polárne konštanty sú založené na lineárnych vzťahoch s Gibbsovou energiou.

Základ hodnotenia elektrónového vplyvu substituentov na fyzikálno – chemické vlastnosti aromatických zlúčenín predstavuje Hammettova rovnica (II):

$$\log \frac{k}{k_0} = \rho \sigma, \quad (\text{II}),$$

kde  $k$ ,  $k_0$  sú rýchlostné, alebo rovnovážne konštanty substituovanej a nesubstituovanej látky,  $\rho$  a  $\sigma$  sú empirické konštanty.  $\rho$  charakterizuje reakciu a nezávisí na substituentoch a  $\sigma$  závisí na substituentoch, ale nie ovplyvnená druhom reakcie a jej podmienkami. Hodnota  $\rho$  je pozitívna pre nukleofilnú a negatívna pre elektrofilnú reakciu. Polárne konštanty  $\sigma$  sú pozitívne pre substituenty priťahujúce elektróny a negatívne pre substituenty poskytujúce elektróny. Počiatok a meradlo stupnice týchto konštánt predstavuje  $\sigma = 0$  pre vodík a  $\sigma = 1$  pre disociáciu benzoových kyselín vo vode.

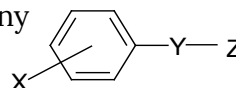
Hammettova  $\rho$  konštantka je sumou indukčného a mezomerného efektu. Z tohto dôvodu sa dá akákoľvek substituentová konštantka vyjadriť ako Hammettova  $\rho$  konštantka, cez lineárnu kombináciu indukčného efektu  $F$  a mezomerného efektu  $R$ . Potom pre  $\rho$  platí rovnica (III):

$$\sigma = r R + f F, \quad (\text{III}),$$

kde  $F$  a  $R$  závisia na type substituenta,  $f$  a  $r$  sú závislé na druhu použitej substituentovej konštanty.

Hammettova rovnica platí, ak :

- platnosť rovnice neobmedzuje príliš objemný substituent, ktorý môže interagovať s reakčným centrom,
- zmena entropie  $\Delta S$  je v sérii študovaných látok konštantná; vhodný systém predstavujú *meta*- a *para*- substituované aromatické zlúčeniny



všeobecného vzorca, kde X je substituent, Y spojovací reťazec medzi reakčným centrom Z a aromatickým jadrom.

- mechanizmus reakcie je v celej sérii zlúčenín konštantný a nie príliš zložitý; nejednotnosť mechanizmu sa prejavuje odchýlkami od lineárneho vzťahu,
- dĺžka postranného reťazca negatívne neovplyvňuje prenos efektov substituentov na reakčné centrum, čo sa prejaví zmenou hodnoty konštanty

### 6.3.5 Lipofilno – hydrofilné vlastnosti

V biologickom systéme pri distribúcii látka prekonáva niekoľko fázových rozhraní v dôsledku fragmentácii biologického systému na jednotlivé kompartmenty, ohraničené fosfolipidovou dvojrúvkou. Schopnosť látok prechádzať fázovým rozhraním, nazývame lipofilitou. Táto vlastnosť má niekoľko parametrov (Franke a Schmidt, 1973), najznámejším a najpoužívaným je rozdeľovací koeficient, definovaný rovnicou (IV):

$$P = \frac{C(o)}{C(v)}, \quad \text{resp. používa sa prevažne jeho logaritmický tvar} \quad (IV),$$

t.j. rozdeľovací koeficient je podiel rovnovážnych koncentrácií látky v organickom rozpúšťadle (o) a vo vode (v), to jest koncentrácií, ktoré sa ustália po dosiahnutí rovnovážneho stavu najčastejšie v systéme n-oktanol/voda.

Pre experimentálne stanovenie rozdeľovacích koeficientov biologicky aktívnych látok sa používa okrem zmesi n-oktanol/voda, aj zmes n-oktanol/pufor vzhľadom k analógii a snahe simulovať vnútorné prostredie.

Nakoľko sú hodnoty rozdeľovacích koeficientov stanovené najčastejšie pri teplote 20°C, zatiaľ čo biologické procesy prebiehajú väčšinou pri 37°C je nutné rátať s nutnosťou negatívnej korekcie hodnoty P, log P v prospech väčšej rozpustnosti vo vodnej fáze.

Analógiou Hammetovej konštanty je substituentová Hanschova  $\pi$  konštanta charakterizujúca lipofilné efekty v tvare (V):

$$\pi = \log P_x - \log P_H, \quad (V),$$



pričom  $P_x$  je rozdeľovací koeficient substituovanej zlúčeniny a  $P_H$  je rozdeľovací koeficient materskej referenčnej zlúčeniny. S rastúcou kladnou hodnotou  $\pi$  sa zvyšuje schopnosť lipofilnej interakcie v mieste účinku.

### 6.3.6 Stéricita molekuly

Stérické efekty, pozorované buď v rámci jednej molekuly, alebo medzi dvoma molekulami, sú javy v dôsledku konkrétnych štrukturálnych prvkov. Jedná sa príťažlivé, alebo odpudivé interakcie, pričom sa uplatňujú niektoré zo síl, uvedených v nasledujúcej Tabuľke 3.

**Tabuľka 3. Typy intermolekulárnych interakcií medzi dvoma molekulami, respektíve intramolekulárne v rámci jednej molekuly.**

Typ interakcie	Príklad	Väzobná energia (kJ.mol <sup>-1</sup> )
Disperzné sily	Medzi všetkými atómami, ktoré nie sú viazané priamou kovalentnou väzbou	0.11
Elektrostatické interakcie	Medzi iónmi: -COO <sup>-</sup> ..... <sup>+</sup> H <sub>3</sub> N-	21
	Medzi dipólmi: >C <sup>σ+</sup> =O <sup>σ-</sup> ..... O <sup>σ-</sup> = C <sup>σ+</sup> <	1.2
Vodíkové väzby	Voda(lad): -O-H ..... O<	17
	Polypeptidová kostra: >N-H .....O=C<	12
Hydrofóbne interakcie	V prípade lipofilných látok, látok s malou afinitou k molekulám vody, látok solvatovaných vo vode	10

Stérické pôsobenie môže viesť k deformáciám väzbových uhlov, k tzv. torzii, č ku zmenšeniu atómových polomerov. Použiteľnou numerickou definíciou stérického efektu je stérická konštanta  $E_s$  definovaná nasledovným vzťahom (VI):

$$E_s = \log \frac{k_X}{k_H}, \quad (\text{VI}),$$

v ktorom  $k_X$  a  $k_H$  sú rýchlostné konštanty kyslej hydrolýzy esterov RCOOR', ktorá bola zvolená ako štandardná reakcia. Hodnota CH<sub>3</sub>COOR' je počiatok stupnice, takže  $E_s(\text{CH}_3) = 0$ . Objemnejšie substituenty, ktoré viac brzdia hydrolýzu, majú hodnotu  $E_s < 0$ , zatiaľ čo pre menej objemné platí  $E_s > 0$ .  $E_s$  nie je čistým stérickým parametrom, ale čiastočne zahŕňa aj elektrónové efekty.

Nakoľko  $E_s$  hodnoty neexistujú pre všetky substituenty, v dôsledku nestability v podmienkach kyslej hydrolýzy, bola zistená závislosť medzi  $E_s$  a van der Waalsovými polomerami. Chartonove parametre  $v_x$  sú definované vzťahom (VII) nasledovne:

$$v_x = r_{vx} - r_{vH} = r_{vx} - 1,20, \quad (\text{VII}),$$

kde  $r_{vx}$  je minimálny van der Waalsovov polomer pre syntetický substituent X a  $r_{vH}$  je van der Waalsovov polomer pre atóm vodíka. Na vyjadrenie sféricity sa často využívajú aj parametre súvisiace s molárnym objemom (napr. molárna refrakcia daná Lorentz - Lorentzovou rovnicou).

### 6.3.7 Indikátorové premenné

Popis pomocou lipofilného, elektrónového alebo sterickeho parametra často nestačí na popis konkrétneho štruktúrneho prvku, napríklad konkrétnej funkčnej skupiny. Tento nedostatok sa odstraňuje pomocou tzv. indikátorovej premennej, ktorá iba charakterizuje prítomnosť alebo neprítomnosť daného štruktúrneho prvku pomocou binárneho hodnotami 0 a 1. Jej hodnota udáva priamo príspevok štruktúrneho prvku k hodnotenej aktivite.

### 6.3.8 Lipinského pravidlá

Lipinského pravidlá piatich („*Lipinski's rule of five*“ – eng.), tiež známe ako „*Pfizer's rule*“, alebo jednoducho „*Rule of five*“ (RO5) predstavujú základný pojem, pravidlá pre vývoj nových kandidátov liečiv, všeobecne známy vedeckej verejnosti v danom odbore. Existuje niekoľko úprav Lipinského pravidiel liečiv, pre liečivá všeobecne, pre orálne podávané liečivá, intra- systémovo podávané liečivá. K týmto pravidlám je možné ešte doplniť hranicu inhibičnej aktivity, vyjadrenej rôznymi inhibičnými konštantami, ktoré definujú hranicu, pri ktorej je daná látka významná ako liečivo. Lipinského 5 pravidiel ako kritérií pre nových kandidátov liečiv prezentovať nasledovne:

- molekulová hmotnosť látky 300 až 500 g.mol<sup>-1</sup>, vzhľadom na schopnosť pasívne prestupovať kompartmentové bariéry,
- rozdeľovací koeficient v systéme n-oktanol/voda musí mať hodnotu 1 až 5, pod tento interval je látka veľmi polárna a veľmi rýchlo sa z organizmu vylučuje, nad tento interval je látka veľmi nepolárna a nedochádza k jej sorpcii do systému, ale je eliminovaná tráviacim traktom,

- počet donorov vodíkových väzieb, t.j. funkčných skupín vodíkov na heteroatómoch (OH, NH<sub>2</sub>, SH, COOH, COH funkčné skupiny), teda vodíkov s parciálnym nábojom väčším ako +0,2, čo najnižší, nie však vyšší ako 5,
- počet akceptorov vodíkových väzieb (heteroatómy s minimálne jedným voľným elektrónovým párom (-O-, -S-, -NN-) čo najnižší, nie však vyšší nie viac ako 10,
- počet rotovateľných väzieb (sp<sup>3</sup> hybridizácia atómov), čo najnižší, nie však vyšší ako 5.
- k týmto pravidlám je nutné ešte dodať pravidlo, že účinnosť kandidátov liečiv, vyjadrená parametrom IC<sub>50</sub> – inhibičná koncentrácia, zodpovedná za 50 % inhibíciu by mala byť ideálne pod hranicu 1μM.

Medzi perspektívnych kandidátov liečiv tým pádom patria nízkomolekulové látky, kam môžeme zaradiť napríklad monoméry, diméry, oligoméry odvodené od biologických polymérov – v zmysle primárnych metabolitov (proteíny, polysacharid a pod.), ale predovšetkým obrovskú skupinu sekundárnych metabolitov, ktorých funkcia v biologickom organizme môže byť a nemusí byť známa. Často sa jedná o sekundárne metabolity rastlín v zmysle látok s fytoncídnyim účinkom, produkciou ktorých rastlina reaguje na abiotické a biotické podnety zo svojho okolia. K tejto kategórii látok radíme polyfenoly, alkaloidy, terpény, teda skupinu látok, ktorá vzniká buď spájaním dvojuhlíkatého segmentu v podobe acetylkoenzýmu A a následnou post syntetickou, enzýmovou úpravou molekuly (polyketidy, terpenoidy), alebo transamináciou niektorých aminokyselín, následnou derivatizáciou v zmysle dostavby molekuly a terminálnou postskeletálnou úpravou molekuly. (napríklad alkaloidy). Obrázky 1 a 2 v texte vyššie prezentujú základný pohľad na chemizmus biosyntézy sekundárnych metabolitov z kategórie polyketidov a terpenoidov.

Tieto základné biosyntetické dráhy poskytujú priestor pre biosyntézu obrovského počtu metabolitov rádovo v desať tisícoch až sto tisícoch molekúl. Mnohé z nich sú predmetom testovania ako perspektívni kandidáti liečiv pre mnohé indikačné oblasti priamo ale ako takzvané stavebné bloky („*building blocks*“ – eng.), ktoré po vhodnej derivatizácii nadobúdajú významnú biologickú aktivitu.

## 6.4 KVANTITATÍVNE MODELY SAR

### 6.4.1 Hanschova analýza

Všetky parametre používané v tejto analýze sú veličiny, ktoré sa vzťahujú k voľnej energii. Takýto prístup sa označuje ako extratermodynamický a je vyjadrený nasledujúcou rovnicou (VIII):

$$\log 1/C = a\pi + b\sigma + cE_s + \dots + const. \quad (\text{VIII}),$$

Hansch a Unger formulovali k tomuto prístupu nasledovné pravidlá:

- musí sa vyskúšať veľký rozsah rozličných parametrov, napr.  $\log P$  alebo  $\pi$ ,  $\sigma$ , MR a sterické parametre. Parametre vybrané pre „najlepšiu“ rovnicu by mali byť nezávislé,
- všetky „priaznivé“ parametre sa musia overiť vhodnou štatistickou procedúrou, napr. postupnou regresiou. „najlepšou“ rovnicou je tá s najnižšou štandardnou odchýlkou,
- ak sú všetky modely rovnaké, treba prijať najjednoduchší model,
- z dôvodov vylúčenia náhodnej korelácie musí byť k dispozícii najmenej päť alebo šesť bodov dát na jednu premennú;
- je dôležité postaviť model, ktorý je konzistentný s najnovšími poznatkami fyzikálnej, organickej a biofarmaceutickej chémie o študovanom procese,

Z Hanschových vzťahov sa môže predikovať hodnota biologickej aktivity. Ak je predikovaná hodnota mimo rozsah uvažovaných parametrov, SAR analýza je nepresná a nepoužiteľná. Hlavné ťažisko využiteľnosti Hanschovej analýzy však spočíva v lepšom pochopení kvantitatívnych vzťahov medzi štruktúrou a biologickou aktivitou.

### 6.4.2 Free - Wilsonova analýza

Free - Wilsonov prístup je pravým modelom vzťahu štruktúra-aktivita a opiera sa o indikátorové premenné. Pre každú štruktúrnu črtu sa generuje indikátorová premenná, ktorá určuje odlišnosť od ľubovoľne zvolenej referenčnej látky.

Všeobecný matematický model vyjadruje rovnica (IX):

$$A = \sum a_i x_i + \mu , \quad (IX),$$

A je údaj o aktivite,  $a_i$  je príspevok  $i$ -teho substituenta k celkovej aktivite a  $x_i$  má hodnotu 1 alebo 0. Hodnoty 1 indikujúce prítomnosť určitého substituenta alebo štruktúrneho prvku, a 0 indikujúce jeho neprítomnosť. Pre matematické spracovanie tejto závislosti je možné aplikovať vhodný softvér s využitím lineárnej mnohonásobnej regresnej analýzy (Kubinyi, 1997). Free-Wilsonová metóda má svoje synonymá - matematický model, aditívny model alebo prístup „*de novo*“.

Free-Wilsonova metóda je ľahko aplikovateľná a ponúka sa pre aplikáciu v počítačovej fáze hodnotenia vzťahov štruktúra-aktivita. Umožňuje jednoduchý spôsob na určenie aktivného príspevku jednotlivých substituentov. Free-Wilsonova metóda má však aj niektoré nedostatky. Predovšetkým štruktúrna variácia je nevyhnutná najmenej v dvoch polohách substitúcie. Predpovede pre substituenty, ktoré nie sú zahrnuté do analýzy, nie sú možné. Táto analýza je obmedzená len na lineárne závislosti.

### 6.4.3 Nelineárne vzťahy

Predchádzajúce kapitoly popisovali lineárne vzťahy v rámci korelácie štruktúra aktivita. Nelineárne vzťahy sú typické napríklad medzi biologickou aktivitou a lipofilitou. Hodnoty biologickej aktivity vzrastajú s lipofilitou látok lineárne, po prekročení určitej hranice so vzrastom lipofility biologická aktivita buď zostáva konštantná alebo postupne prudko klesá. Najčastejšie sa tento fenomén vysvetľuje distribúciou látky v biologických systémoch a v jednotlivých kompartmentoch biologického objektu a asociáciou s lipofilnými štruktúrami. Dôležitú úlohu hrá aj tvorba micel a obmedzená rozpustnosť lipofilných zlúčenín a v neposlednom rade tiež princíp minimálnej obsadenosti receptora.

Matematicky opísal nelineárne vzťahy Hansch vo svojom parabolickom modeli, ktorý prezentuje vzťah (X):

$$\log 1/C = a(\log P)^2 + b \log P + c + \dots + \text{konšt.} \quad (X),$$

Istým posunom je model, ktorý odvodil Franke. Sformuloval dve rovnice. Jednu pre ľavú lineárnu časť a druhú pre pravú nelineárnu časť ( $\log P_x$ ) je kritická hodnota  $\log P$ , pri ktorej sa lineárna závislosť mení na nelineárnu, závislosť prezentujú vzťahy (XI) a (XII):

$$\log 1/C = a \log P + c, \text{ ak } \log P < \log P_x \quad (\text{XI}),$$

$$\log 1/C = \alpha(\log P)^2 + \beta \log P + \gamma, \text{ ak } \log P > \log P_x \quad (\text{XII}),$$

Ďalšie modifikácie nelineárneho matematického popisu ponúkli McFarland a Hyde. McFarlandov prístup slúžil na odvodenie populárneho bilineárneho modelu, ktorý popisuje závislosť (XIII):

$$\log 1/C = a\pi + b \log(\beta \cdot 10^\pi + 1) + c \quad (\text{XIII}),$$

Bi-lineárny model sa dá použiť na kvantitatívny popis rozmanitých nelineárnych vzťahov medzi lipofilitou a aktivitou. Popri parametroch vypočítaných z lineárnej regresie obsahuje tento model aj nelineárny parameter  $\beta$ , ktorý sa určí postupnou iteráciou.

#### 6.4.4 3D SAR metódy

Hanschov prístup ku SAR vystihuje kvantitatívny vzťah medzi parametrami popisujúcimi zmeny v štruktúre látky voči referenčnej látke a jej fyziologickým alebo biologickým účinkom. Je to nepostačujúci matematický popis pre nové alebo netradičné substituenty, na vytvorenie optimálnej štruktúry na základe rovnice navrhutej pomocou SAR vyžaduje veľké znalosti z oblasti fyzikálnej a organickej chémie.

Tieto nedostatky môžu byť odstránené použitím 3D SAR metód (Ferreira, 2002), ktoré využívajú niekoľko rôznych prístupov a programov :

- CoMFA analýza,
- program GRID / GOLPE,
- program Cerius<sup>2</sup> MFA,
- metóda HASL,
- metóda Compass,

- metóda APEX-3D,
- SOMFA metóda,

#### 6.4.5 Softvér

Existuje množstvo softvérových nástrojov na projektovanie ligandov. Pracujú na princípe modelovania nových molekúl, optimalizácie ich štruktúry a kotvenia do aktívneho centra s cieľom určenia všetkých kofaktorov (stérické a elektrostatické interakcie, vodíkové väzby, hydrofóbne interakcie), ktoré sú zodpovedné za väzbu liganda s proteínom. Efektívnosť väzby liganda na receptor sa kvantifikuje pomocou zdanlivej energie väzby. Príkladmi úspešnej aplikácie takýchto metód je vyprojektovanie početných inhibítorov HIV-proteinázy a iných ligandov. (Remko, M. 2005.)

Softvér na dizajnovanie bioaktívnych látok, vrátane liečiv možno rozdeliť podľa operačných systémov, na ktoré je daný softvér stavaný. Pre pracovné stanice typu Silicon graphics pod operačným systémom UNIX, LINUX je to napríklad softvér Insight, alebo Cerius II. Pre bežné osobné počítače, pracujúce pod operačným systémom Windows sú to napríklad aplikácie Hyperchem, Gaussian, ACDlab, WeLabViewever a pod. Softvér HyperChem, dokáže všetky potrebné parametre počítať a prispôbovať kotvenie inhibítora do aktívneho centra proteínu. Príklady dizajnovaných skupín inhibítorov s pomocou CADD prístupu prezentuje Tabuľka 4.

**Tabuľka 4. Príspevok CADD pre rozvoj nových liečiv.**

<b>Ligandy</b>	<b>Proteíny/ Enzýmy</b>
<b>Projekcia založená na znalostiach 3D štruktúry proteínov</b>	
Inhibítory aspartických proteináz	Renín, HIV proteináza, katepsíny D a E
Inhibítory serínových proteináz	Trypsín, Trombín, plazminogénový aktivátor, Factor Xa, Elastáza, $\beta$ -laktamáza
Ďalšie inhibítory enzýmov	Aldóza reduktáza, Karbonát anhydráza, Dihydrofolát reduktáza, Glycolické enzýmy, Neuraminidáza, Proteínkinázy, Purín nucleoyid fosforyláza, Reverzná transkriptáza, Tymidilát syntáza
Ligandy proteínov	FKBP-viažuci proteín, cladding proteíny rinovírusov
<b>Projekcia založená na modeloch farmakofóru a D štruktúry ligandov</b>	
Inhibítory metaloproteináz	Enzýmy konvertujúce angiotenzín, Neutrálne endopeptidázy 24.11
Ďalšie inhibítory enzýmov	Proteínová tyrozín kináza, HIV-1 integráza
Antagonisti receptorov	Receptory integrínu

## 6.5 TEORETICKÁ ANALÝZA INTERAKCIE LIEČIVO – RECEPTOR

Ako bolo uvedené v predchádzajúcich kapitolách, je možné jednoducho získať vhodný komplex biopolymér – ligand z verejných zdrojov. Ideálne za experimentálnych podmienok musí byť väzba ligandu (L) na receptor (R) reverzibilná, nesaturovaná a špecifická. Podstata reakcie je definovaná nasledujúcou rovnicou (XIV):



L je ligand, R je receptor,  $k_{\text{asoc}}$  a  $k_{\text{disoc}}$  sú rýchlostné konštanty asociácie, respektíve disociácie komplexu. Pokiaľ chceme študovať „*docking*“ ligandu v nejakej väzobnej kavitě receptora metódami molekulového modelovania je nevyhnutné poznať geometriu ligandu (liečiva) /L/, receptora (biologického polyméru) /R/, komplexu receptor-ligand /RL/ a k nim korešpondujúcich energií  $E_L$ ,  $E_R$  a  $E_{RL}$ . Interakčná energia, ktorá by mala byť v matematickom vzťahu k biologickej aktivite (účinku) danej látky – ligandu /L/ je definovaná ako pokles energie komplexu voči súčtu parciálnych energií samotného receptora / $E_R$ / a samotného ligandu / $E_L$ /, definovanú vzťahom (XV):

$$\Delta E = \{- [E_{RL} - (E_R + E_L)]\} \quad (\text{XV}),$$

Energiu, akéhokoľvek systému je možné vypočítať všeobecne dvoma skupinami odlišných metód:

- metódy založené na úplnom, alebo parciálne parametrizovanom riešení Schrödingerovej rovnice,
- empirickými metódami s využitím empirických potenciálov  $V_{(r)}$ ,

Molekulové modelovanie (Remko, 2000) využíva princípy molekulovej mechaniky, kvantovej mechaniky, respektíve i molekulovej dynamiky.

### 6.5.1 Molekulová mechanika

Molekulová mechanika je aplikovaná na riešenie optimalizácie geometrie systému, pričom pod systémom rozumieme prítomnosť viac ako jedného objektu, pričom objekty môžu byť a nemusia byť v asociácii, alebo jedného objektu. Výpočty molekulovej



mechaniky sú relatívne rýchle a dávajú efektívne odpovede. Výhodou tohto druhu výpočtov je riešenie veľkých systémov, pozostávajúcich z niekoľkých tisícov atómov.

Molekulová mechanika popisuje molekuly ako súbor atómov (gumičiek pospájaných pružinami), ktoré je možné riešiť Newtonovou mechanikou. Táto mechanika berie do úvahy potenciálnu energiu vnútro molekulových interakcií a medzi molekulových interakcií ( $U$ ). Výpočet potenciálnej energie vnútro molekulových interakcií možno vypočítať ako sumu  $U_1$  - energie kovalentnej väzby každej dvojice atómov („*stretching*“ - eng.) vzťah (XVI),  $U_2$  - energie uhlov každej trojice atómov („*bending*“ - eng.) vzťah (XVII),  $U_3$  - energie odchýlky - torzie každej štvorice atómov vzťah (XVIII),  $U_4$  - príspevku elektrostatickej energie medzi nábojmi vzťah (XIX) a nakoniec  $U_5$  - príspevku energie interakcie medzi neutrálnymi atómami - van der Waalsových síl, ktoré doplnené o odpudivé sily vystihuje Leonard-Jonesov potenciál vzťah (XX):

$$U_1 = \sum K_b \cdot (b - b_0)^2 / 2 \quad (\text{XVI}),$$

$$U_2 = \sum K_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2 / 2 \quad (\text{XVII}),$$

$$U_3 = \sum K_\varphi \cdot (1 + \cos(n \cdot \varphi - \delta))^2 \quad (\text{XVIII}),$$

$$U_4 = \sum K \cdot q_1 \cdot q_2 / r \quad (\text{XIX}),$$

$$U_5 = \sum -A \cdot (r_0/r)^6 + B \cdot (r_0/r)^{12} \quad (\text{XX}),$$

Kde  $K_b$ ,  $K_\theta$ ,  $K_\varphi$ ,  $K$ ,  $\delta$ ,  $A$ ,  $B$  sú príslušné konštanty,

$b$  - dĺžka príslušnej väzby,  $b_0$  - konštanta, optimálna dĺžka väzby v rovnovážnom stave,

$\theta$  - uhol troch atómov,  $\theta_0$  - konštanta, optimálny uhol troch atómov v rovnovážnom stave,

$\varphi$  - veľkosť torzného uhla štyroch atómov,

$q_1$ ,  $q_2$  - parciálne náboje na príslušných atómoch,

$r$  - vzdialenosť dvoch atómov,  $r_0$  - vzdialenosť dvoch atómov v rovnovážnom stave,

Na základe uvedené je možné vypočítať energiu systému  $U$  podľa vzťahu (XXI) ako sumu všetkých príspevkov nasledovne:

$$U = U_1 + U_2 + U_3 + U_4 + U_5 \quad (\text{XXI}),$$

teda v plnom tvare

$$U = \sum \sum K_b \cdot (b - b_0)^2 / 2 + \sum K_\theta \cdot (\theta - \theta_0)^2 / 2 + \sum K_\varphi \cdot (1 + \cos(n \cdot \varphi - \delta))^2 + \sum K \cdot q_1 \cdot q_2 / r + \sum -A \cdot (r_0 / r)^6 + B \cdot (r_0 / r)^{12}$$

Softvér, aplikujúci výpočet molekulovej mechaniky, má k dispozícii výpočet niekoľkých metód - „forcefield“ -ov /silových polí, ktoré sa líšia parametrizáciou konštánt  $K_b$ ,  $K_\theta$ ,  $K_\varphi$ ,  $K$ ,  $\delta$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $b_0$ ,  $\theta_0$  a  $r_0$ . Základnými metódami pre výpočet molekulovej mechaniky sú AMBER, MM+, OPLS a BIO+, CVFF, ďalšie.

### 6.5.2 Kvantová mechanika

Metódy využívajúce kvantovú mechaniku, buď exaktne alebo s pomocou čiastočnej parametrizácie riešia Schrödingerovu rovnicu, ktorá je známa v tvare (XXII):

$$H\Psi = E\Psi \quad (XXII),$$

Hamiltonov operátor má pre systém, pozostávajúci z  $n$  elektrónov a  $N$  atómových jadier nasledovný tvar (XXIII):

$$H = T_e + T_n + V_{en} + V_{ee} + V_{nn}, \quad (XXIII),$$

kde  $T$  sú členy kinetickej energie a  $V$  členy potenciálovej energie elektrónov a neutrónov,  $E$  je energia v tvare, ktorý je popísaný vlnovou funkciou  $\Psi$ .

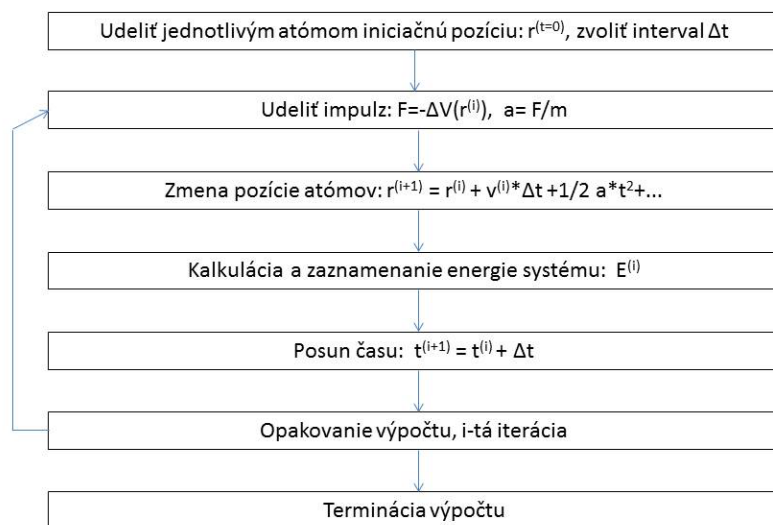
### 6.5.3 Semi-empirické metódy

Semiempirické, kvantové metódy boli vyvinuté ako alternatívny prístup na počítanie štruktúr a ich vlastností. Sú založené na podobnom prístupe ako „*ab initio*“ metódy, s rozdielom, že namiesto kompletnej analýzy všetkých elektrónov v molekule, sú niektoré elektrónové interakcie zanedbané. Podľa stupňa ignorácie elektrónových interakcií rozoznávame CNDO („*Complete Neglect of Differential Overlap*“) a INDO („*Intermediate Neglect of Differential Overlap*“) prístupy. V rámci Hucklovho prístupu sú zvažované a riešené len vplyvy „vonkajších“ elektrónov, zatiaľ čo vplyv vnútorných elektrónov je ignorovaný. Ďalšie semiempirické metódy nahrádzajú tieto obmedzenia čiastočnou

parametrizáciou, odvodenou do experimentálnych dát (Stewart; 1990; Levine, 1991). Medzi semiempirické kvantové metódy, zaradené do bežne používaných softvérov môžeme menovať: CNDO, INDO, MINDO, ZINDO, TNDO a najpoužívanejšie AM1 a PM3.

#### 6.5.4 Molekulová dynamika

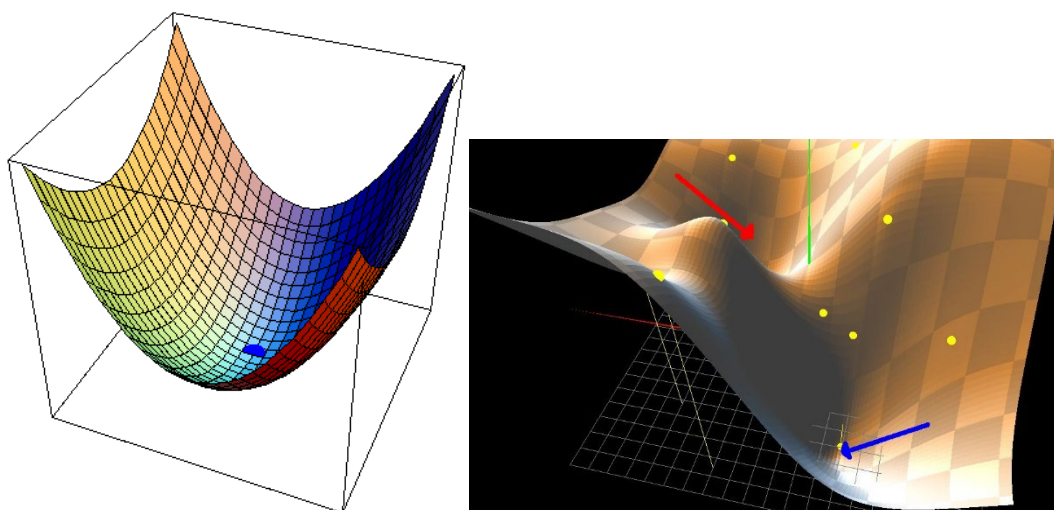
Molekulová mechanika a plne empirické, či semiempirické kvantové metódy rátajú daný systém, danú štruktúru v presnej orientácii a optimalizáciu geometrie prevádzajú na základe poklesu energie systému iteračným výpočtom do splnenia uvedených podmienok na termináciu výpočtu. Molekulová dynamika na rozdiel od predchádzajúcich prístupov simuluje časovo závislé správanie molekuly, respektíve atómov, kombinovaním výpočtu energie s uplatnením vhodnej metódy, vhodného „forcefield“-u, s Newtonovými pohybovými rovnicami. Simulácia je inicializovaná impulzom silového vektora, pre každý atóm v molekule a pokračuje kalkuláciou pozície a hybnosti každého atómu v molekule, Obrázok. 4.



Obrázok 4. Algoritmus výpočtu molekulovej dynamiky.

Cieľom simulácie je náhodný objav energetických miním systému/molekuly. Tento prístup poskytuje dynamický pohľad na správanie systému, čo sa často využíva na štúdium kinetiky procesov, napríklad “skladania“ globulárnych proteínov, alebo difúzia iónov v okolí makroolekúl, respektíve biologických proteínov. Výhodou tohto prístupu je skutočnosť, že ak výpočet systému „uviazne“ v lokálnom energetickom minime, termický impulz umožňuje únik z tohto energetického stavu a pokračovanie výpočtu hľadania

globálneho energetického minima daného systému, grafické znázornenie lokálneho a globálneho minima, prezentuje Obrázok 5. Štrukturálne, dynamické a termodynamické údaje z výpočtov molekulovej poskytujú pohľad na vzťahy štruktúra – funkcia, väzobné afinity, mobility a stabilita proteínov, nukleových kyselín a ďalších makromolekúl, údaje, ktoré nie možné získať statickými modelmi s výpočtami semiempirických metód a metód molekulovej mechaniky.



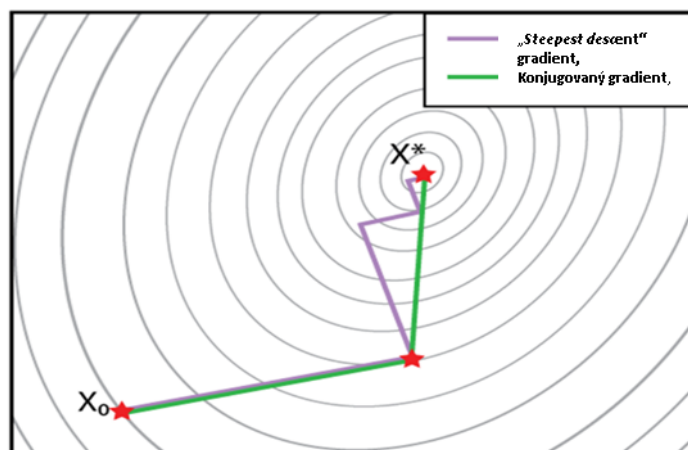
**Obrázok 5. Grafické znázornenie lokálneho a globálneho minima hyperfunkcie pri hľadaní energetického minima.**

### 6.5.5 Matematické metódy hľadanie energetického minima

Na úvod je vhodné vysvetliť pojem energie, pojem lokálneho energetického minima, globálneho energetického minima systému. Akákoľvek sústavu objektov, ktorá je predmetom rátania, nazývame systém. Systém má v danom stave jasne definovanú energiu ( $E_s$ ) a iniciačné vektory pre každý atóm v zmysle zníženia energie systému. Je všeobecne zaužívaný predpoklad – axióm, že systém má vo všeobecnosti práve jedno globálne minimum, ktoré však nie je exaktne známe a výpočtom sa k nemu systém limitne blíži, preto matematicky sa jedná o iteračný výpočet s kalkuláciou gradientu medzi každými dvoma cyklami výpočtu. Prakticky sa pri štartovaní výpočtu zadávajú terminálne podmienky, kedy má výpočet zastať, buď uvedením počtu cyklov výpočtu, ale najčastejšie uvedením hodnoty gradientu po ktorý výpočet prebieha.

Na vysvetlenie hľadania minima sa používa pojem hyperplochy  $n$ -rozmerného priestoru, všetkých možných stavov systému, znázorneného na príklade trojrozmerného

priestoru, pomocou vrstevníc /úrovní/ znázornený zvrásnený priestor s minimom. S grafických prezentácii je možné znázorniť lokálne minimá i globálne energetické minimum, vid' Obázok. 6. Na hľadanie minima tejto zložitej funkcie sa najčastejšie používajú dva algoritmy: krokový, klesajúci gradient /"steepest descent gradient" – eng./, kde systém prechádza sústavou stavov v smeru gradientu. Jeho výhodou je že sa pomerne rýchlo priblíži energetickému minimu sústavy, ale veľmi ťažko hľadá presnú polohu minima v blízkosti globálneho minima, čo zbytočne predlžuje výpočet. Tento problém bol odstránený konjugovaným gradientom /"conjugate gradient"–eng./, ktorý vedie systém výpočtom cez stavy ktoré sú definovaným kompromisom medzi vektormi gradientov v aktuálnom a predchádzajúcom kroku výpočtu. Tento prístup pomalšie hľadá minimum v prvej fáze výpočtu, ale zbytočne sa „nemoce“ v terminálnej fáze výpočtu. Nasledujúci Obrázok 6. prezentuje porovnanie hľadanie energetického minima hyperfunkcie systému oboma spomínanými metódami.



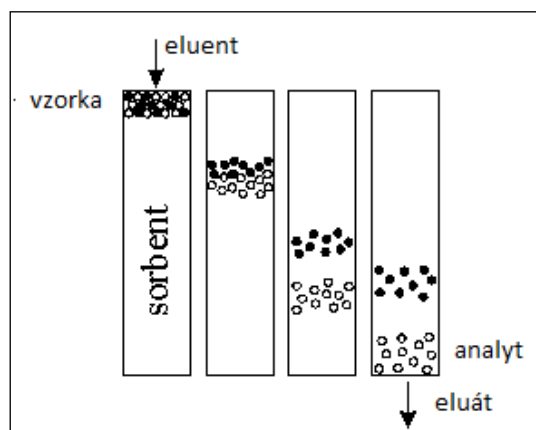
Obrázok 6. Porovnanie hľadanie energetického minima hyperfunkcie systému metódou steepest descent gradiendu (fialovým) a konjugovaného gradiendu (zeleným).

## 7 VYSOKOÚČINNÁ KVAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIA

Chromatografia, ako učebný celok, je zaradená do tejto problematiky, nakoľko umožňuje priradiť látkam jeden významný parameter, ktorý je často aplikovaný v štúdiách typu SAR, Jedná sa konkrétne parameter – retenčný čas, ktorý je pre dané chromatografické usporiadanie charakteristický a odpovedá predovšetkým polarite (lipofilite) danej látky, do istej miery kvantifikuje interakčné možnosti danej látky, ktoré vyplývajú z typu skeletu molekuly, ale predovšetkým z funkčných skupín, rozmiestnených na základnom skelete molekuly.

Chromatografia je vo svojej podstate fyzikálna metóda, vyvinutá na separáciu látok. Separované látky sú delené medzi dve fázy, z ktorej jedna je nepohyblivá (stacionárna) a druhá (mobilná) sa pohybuje v definovanom smere. Kvapalinová chromatografia („*liquid chromatography*“ – eng. /LC/) je separačná metóda, kde pohyblivou fázou je kvapalina a nepohyblivou fázou je tuhá látka, alebo kvapalina zakotvená na inertnom nosiči.

Podľa druhu nepohyblivej fázy rozlišujeme chromatografiu: kvapalina – tuhá fáza (označovaná ako LSC) a kvapalina – kvapalina (označovaná ako LLC). Kvapalinová chromatografia sa podľa princípu separácie delí na rozdeľovaciu, adsorpčnú, ionexovú, gélovú, afinitnú a iónovopárovú chromatografiu. Pri nástreku dvojice analytov A a B (vzorka) do chromatografickej kolóny naplnenej sorbentom (stacionárna fáza) sa najprv vytvorí elučný pás obsahujúci zmes oboch analytov. Tie sú potom unášané mobilnou fázou a na stacionárnej fáze dochádza ku ich separácii, Obrázok 7.



**Obrázok 7. Separácia dvojice analytov v separačnej kolóne delením medzi sorbent a eleunt.**

Pri prechode separovaného analytu kolónou prejde každá molekula vzorky mnohokrát z pretekajúcej fázy do sorbentu a späť. Doba, počas ktorej separovaný analyt zotrúva na sorbente, závisí od miery interakcií a určuje poradie, v akom vychádza z kolóny. Čím sú väčšie interakcie analytu so stacionárnou fázou, tým väčší je elučný čas, t. j. tým neskôr analyt opúšťa kolónu. Interakcie separovaného analytu so stacionárnou fázou majú rôzny charakter a závisia od štruktúry analytu a stacionárnej fázy, prezentuje Tabuľka 5.

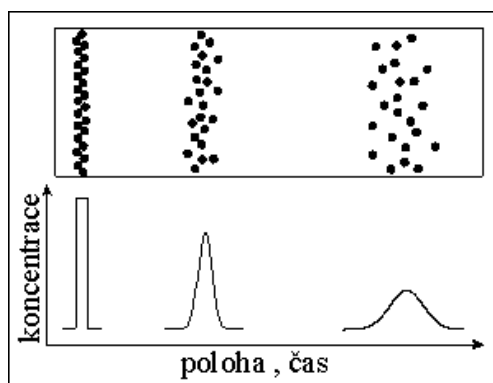
Ak sa od seba dostatočne líšia distribučné konštanty delených analytov, dôjde po určitom čase k ich čiastočnému až k úplnému rozdeleniu do izolovaných pásov - zón. Po výstupe prvého analytu z kolóny indikuje jeho prítomnosť v eluáte detektor a zaznamená

elučný pík. Oba rozdelené analyty sú záznamovým zariadením zaznačené ako dve elučné krivky, tomuto záznamu hovoríme chromatogram.

**Tabuľka 5. Druhy interakcií analytu so stacionárnou fázou.**

Druhy interakcií	Štruktúrálny podstata interakcií
hydrofóbne interakcie (van der Waalsove sily)	
interakcie dipól-dipól	
vodíková väzba	
elektrostatické interakcie	

Zóny separovaných látok (analytov) sa počas prechodu kolónou rozširujú. Zóne analytu odpovedá pík (elučná vlna), ktorá charakterizuje koncentračný profil analytu v zóne, znázorňuje Obrázok 8. Šírka píkov odráža šírku zóny príslušného analytu v kolóne. Šírka píku sa udáva v dĺžkových alebo časových jednotkách [mm, cm, s, min].



**Obrázok 8. Koncentračný profil analytu v zóne a odpovedajúce elučné záznamy.**

Stavba chromatografickej kolónky nie je zložitá, chromatografická kolóna je v podstate tenká rúrka z inertného materiálu s dĺžkou 5 - 30 cm a vnútorným priemerom 3, 4 alebo 4,6 mm naplnená sorbentom s priemerom zrn 3, 5, 10  $\mu\text{m}$ , ktorý je držaný v kolóne pomocou frít.

## 7.1 STACIONÁRNE A MOBILNÉ FÁZY PRE SYSTÉM LLC

Podľa polarít stacionárnej fázy sa rozlišujú dve základné usporiadania LLC a to systém s normálnymi fázami NP (stacionárna fáza je polárna a mobilná fáza je nepolárna) a systém s obrátenými /reverznými/ fázami („reverse phases“ – eng. /RP/) – (stacionárna fáza je nepolárna a mobilná fáza je polárna). V Tabuľke 6 sú uvedené najčastejšie používané typy stacionárnych fáz v systémoch NP a RP a k nim prislúchajúce organické rozpúšťadlá (mobilné fázy).

**Tabuľka 6. Stacionárne a mobilné fázy v LLC.**

LLC	Stacionárna fáza	Mobilná fáza
NP („normal phase“)	- $(\text{CH}_2)_3\text{-CN}$ - $(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$ - $\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{-OH}$	pentán, heptán, chloroform a ich zmesi
RP („reverse phase“)	$\equiv\text{Si-C}_{18}\text{H}_{37}$ (skratka C18) - $\text{C}_8\text{H}_{17}$ (skratka C8) - $(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$ (skratka fenylová)	metanol, acetonitril, tetrahydrofurán, voda a ich zmesi, možný prídavok pufov, prípadne organických kyselín na úpravu pH

Usporiadanie chromatografickej analýzy môže byť nasledovné:

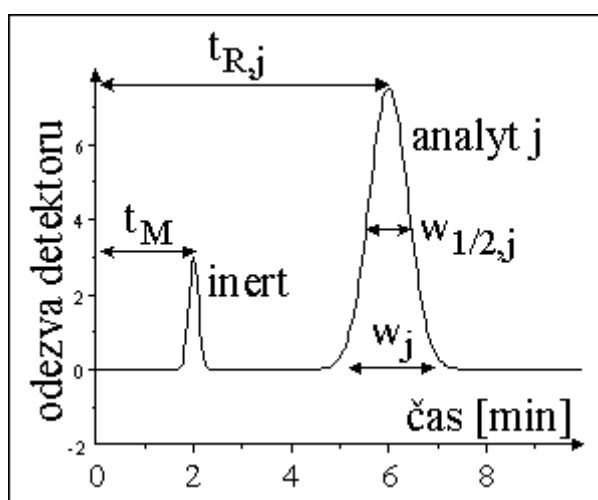
- izokratická elúcia - zloženie mobilnej fázy sa počas elúcie analytu z kolóny nemení, teda zostáva konštantné, tento typ elúcie sa používa vtedy, ak sa afinita zložiek vzorky k nepohyblivej fáze výrazne nelíši, čiže separujeme látky s približne rovnakými fyzikálno - chemickými vlastnosťami.
- gradientová elúcia - zloženie mobilnej fázy sa počas elúcie mení, tá sa používa predovšetkým na urýchlenie separačného procesu látok so značne rozdielnymi vlastnosťami v danom separačnom systéme. Zloženie pohyblivej fázy sa mení tak, aby sa zvyšovala elučná sila. Zmenu zloženia môžeme uskutočniť naprogramovaným pridávaním vzájomne miešateľných rozpúšťadiel alebo roztokov do mobilnej fázy, čím meníme polaritu, pH a iónovú silu pohyblivej fázy. Gradient pridávania môže byť



naprogramovaný rôzne a môže mať rôzny charakter, napríklad konvexný, konkávny, lineárny či schodovitý.

## 7.2 VYBRANÉ ELUČNÉ CHARAKTERISTIKY

Retenčný (elučný) čas  $t_{R,i}$ : predstavuje čas, ktorý uplynie od nástreku analytu do kolóny až po dosiahnutie maxima elučnej krivky. Mŕtvy čas  $t_M$ : odpovedá elučnému času nesorbovanej látky, teda látky ktorá sa pohybuje kolónou rovnakou rýchlosťou ako MF,  $w_j$  je šírka j-teho píku v základni a  $w_{1/2,j}$  je šírka j-teho píku v polovici jeho výšky. Základné elučné charakteristiky analytu prezentuje nasledovný Obrázok 9.



Obrázok 9. Základné elučné charakteristiky analytu.

Selektivita chromatografickej kolóny charakterizuje, ako veľmi sa analyty na kolóne zadržujú a je vyjadrená retenčným faktorom  $k_i$  (kapacitný faktor) podľa nasledujúcej rovnice (XXIV):

$$k_i = (t_{R,i} - t_M) / t_M = t'_{R,i} / t_M \quad (\text{XXIV}),$$

Retenčný faktor v praxi udáva, koľko krát je elučný objem separovanej látky väčší ako mŕtvy objem. Veľkosť retenčného faktoru umožňuje odhadnúť, do akej miery možno eluovať látky z kolóny v prijateľnom čase. Veľkosť  $k_i$  je ovplyvnená vlastnosťami použitého sorbentu, elučného činidla a samotným analytom.

Účinnosť chromatografickej kolóny charakterizuje, ako veľmi sa zóny separovaných analytov na kolóne vzdalujú. Mierou účinnosti chromatografickej kolóny je počet teoretických priehradiek danej kolóny ( $N$ ) pre daný analyt, vypočítaný podľa rovnice (XXV) nasledovne:

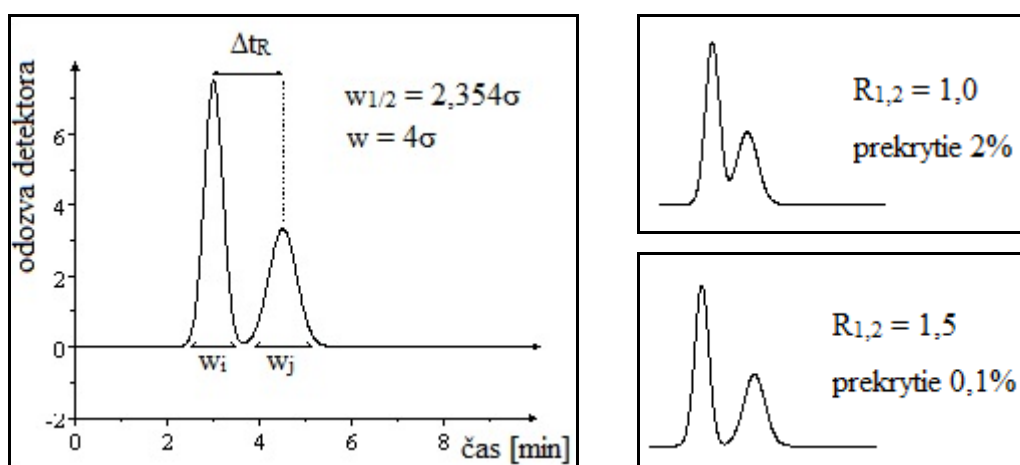
$$N = 16 * (t_{R,j}/w_j)^2 = 5,545 * (t_{R,j}/w_{1/2j})^2 \quad (XXV),$$

a ďalším parametrom je výškový ekvivalent teoretickej priehradky ( $H$ ), uplatniteľný pri porovnávaní kolón rôznej dĺžky ( $L$ ), podľa rovnice (XXVI) nasledovne:

$$H = L/n = \{L/16 * (w_j/t_{R,j})^2\} = \{L/5,545 * (w_{1/2j}/t_{R,j})^2\} \quad (XXVI),$$

Rozdelenie dvoch susedných analytov môže byť dokonalé alebo nedokonalé. Rozlíšenie ( $R_{i,j}$ ) charakterizuje mieru relatívnej separácie príp. mieru vzájomného prekryvania dvoch susedných píkov prezentuje nasledovný Obrázok 10 a počíta sa podľa vzťahu (XXVII), nasledovne:

$$R_{i,j} = \{2 * (t_{R,i} - t_{R,j}) / (w_i + w_j)\} = \{2 * \Delta t_R / (w_i + w_j)\} \quad (XXVII),$$



Obrázok 10. Rozlíšenie  $R_{i,j}$  a prekrytie píkov dvoch analytov.

Získaný chromatogram nám poskytuje jednak kvalitatívnu informáciu - polohu píkov, čiže  $R_T$  - retenčný čas. V kvalitatívnej analýze sa využíva metóda porovnávania retenčných časov štandardov a analyzovanej zložky za tých istých podmienok merania. Kvantitatívnou informáciou je plocha píkov (v špeciálnych prípadoch stačí aj výška ) určená integrátorom, ktorá je priamo úmerná obsahu danej zložky v zmesi. Kalibrácia sa uskutočňuje metódou kalibračnej priamky (externá kalibrácia), metódou vnútorného štandardu a metódou štandardného prídavku. Príklad analytickej informácie z chromatogramu prezentuje nasledujúci Obrázok 11.

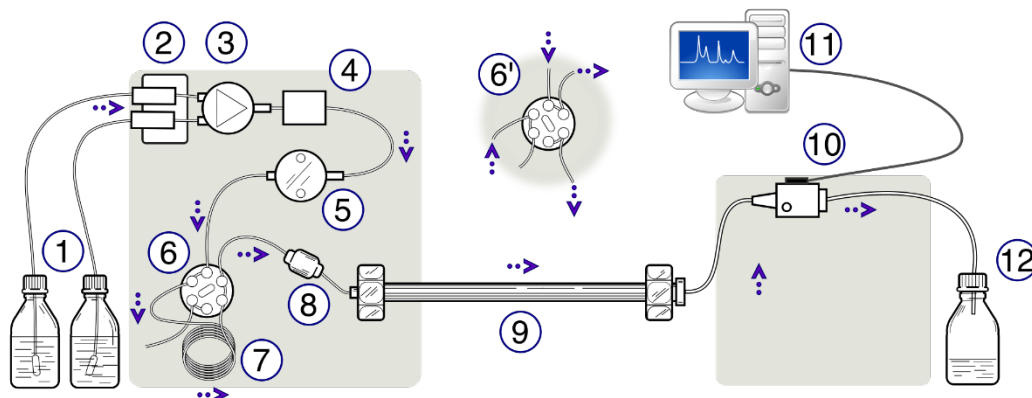
RESULTS				
Peak	RT(min)	Height	Area	W0,5
1	4.328	0.957	7.827	0.123
2	14.256	2.547	69.946	0.448
3	17.973	3.563	127.562	0.573
4	20.127	0.657	26.181	0.672
5	28.006	1.949	112.721	0.945

**Obrázok 11. Príklad analytickej informácie z HPLC zariadenia, alebo integrátora.**

HPLC („*High Performance Liquid Chromatography*“ - eng.) - vysokoúčinná kvapalinová chromatografia patrí v súčasnosti medzi najfrekvencovanejšie metódy inštrumentálnej analýzy. Oproti klasickej kvapalinovej chromatografii, kde sa používali častice s veľkosťou 100-200  $\mu\text{m}$  sa v HPLC používajú častice 3-10  $\mu\text{m}$ , s čím súvisí aj nárast odporu kolóny- nárast tlaku v systéme a preto treba mobilnú fázu do kolón privádzať pod tlakom.

### 7.3 INŠTRUMENTÁCIA V HPLC

Schému HPLC zostavy – zariadenia pre HPLC analýzu prezentuje Obrázok 12.



**Obrázok 12. Schéma kvapalinového chromatografu, 1- mobilná fáza, 2,3- zmiešavacie zariadenie, 4-depulzátor, 5- pumpa, 6 - dávkovacie zariadenie, 7 - slučka, 8 - predkolónka, 9 - kolóna, 10 - detektor, 11 - počítač, softvér, 12 - odpad.**

Základom prístroja je vysokotlakové čerpadlo, ktoré pracuje na princípe dvoch oproti sebe pracujúcich piestov. Piestové čerpadlo vyvinie tlak až 40 MPa pri voliteľnom prietoku mobilnej fázy. Pred použitím musí byť MF zbavená rozpusteného vzduchu, čo sa dosiahne v našom prípade použitím ultrazvukových vln v zariadení s názvom degasér (odplyňovač). Čerpadlo pretláča MF do chromatografickej kolóny. Účinnosť kolón závisí nielen od kvality, ale aj od jej dĺžky, materiálu z ktorého je zhotovená, od vnútorného povrchu, spôsobu plnenia. Dĺžka kolón sa štandardne pohybuje od 50 do 300 mm, s veľkosťou zŕn 3-10  $\mu\text{m}$ . Povrch silikagélov je slabo kyslý, takže viac zadržiava bázické látky než kyslé alebo neutrálne. Hodnota pH mobilnej fázy nesmie byť vyššia ako 8, pretože nad túto hodnotu je silikagél už chemicky nestabilný.

Vzorka sa do dávkovača vstrekuje špeciálnou chromatografickou ihlou (má guľatú špičku). Najjednoduchšie je dávkovanie pri prerušení toku mobilnej fázy, pomocou dávkovacieho zariadenia je možné veľmi pohodlne a prakticky bez tlaku dávkovať injekčnou striekačkou. Objem dávkovacej slučky je nastaviteľný v mikrolitroch. Na kolóne sa zmes rozdelí na jednotlivé zložky a tie unášané mobilnou fázou MF putujú do detektora. Detektor sleduje pomocou vhodného snímača niektorú z vlastností eluátu a signál sa po zosilnení vyhodnocuje počítačovým softvérom. Detektory delíme podľa princípu nasledovne:

- UV-VIS detektor,

- fluorescenčný detektor,
- konduktívny detektor,
- hmotnostná detektor (MSD),
- refrakčný detektor (RI, alebo RID),
- scintilačný detektor,
- chirálny detektor,

Jedným z najpoužívanějších detektorov je UV-VIS detektor, ktorý sleduje absorpciu ultrafialového alebo viditeľného žiarenia pri prechode MF obsahujúcej eluovanú zložku. Signál z detektora je zapísaný záznamovým zariadením. Softvér často samočinne vyhodnocuje, spracováva a ukladá získané dáta. S uloženými dátami je možné kedykoľvek pracovať a sú možné aj korekčné úpravy.

#### 7.4 STANOVENIE LOD A LOQ ANALYTOV

Jedným z mnohých parametrov analytickej metódy je medza detekcie a medza stanovenia, ktorými sa hodnotí jej citlivosť. Tieto parametre sa stanovujú v rámci validácie analytickej metódy.

Medza detekcie LOD je také množstvo alebo koncentrácia analytu, ktorú možno detegovať s postačujúcou istotou pre daný analytický postup. V chromatografii sa medza detekcie udáva ako koncentrácia látky, pri ktorej je výška elučnej vlny 3-krát vyššia ako šum základnej línie.

Medza stanovenia LOQ je také množstvo alebo koncentrácia analytu, ktorá môže byť kvantitatívne analyzovaná s postačujúcou spoľahlivosťou daným analytickým postupom. Prakticky sa ako medza stanovenia udáva koncentrácia látky, pri ktorej je výška elučnej vlny desaťnásobne vyššia ako šum základnej línie.

## 8 STAVBA A REALIZÁCIA SKRÍNINGOVÝH EXPERIMENTOV

### 8.1 ÚVOD

Snaha o získanie kvalitných údajov o biologickej aktivite testovaných entít tvorí rovnocennú súčasť štúdiu typu SAR, štúdiu kvantitatívnych vzťahov štruktúra- aktivita. Pod pojmom testovacie entity chápame subjekty, ktoré sú predmetom testovania, t.j. čisté chemické látky (chemické individuá), ich zmesi, zmesné vzorky extraktov rastlinného, živočíšneho i mikrobiálneho pôvodu. Aby získané údaje boli použiteľné a hodnoverné, má i táto časť SAR štúdií svoje pravidlá a systém, ktorý je predmetom nasledovných kapitol.

#### 8.1.1 Skriningové systémy

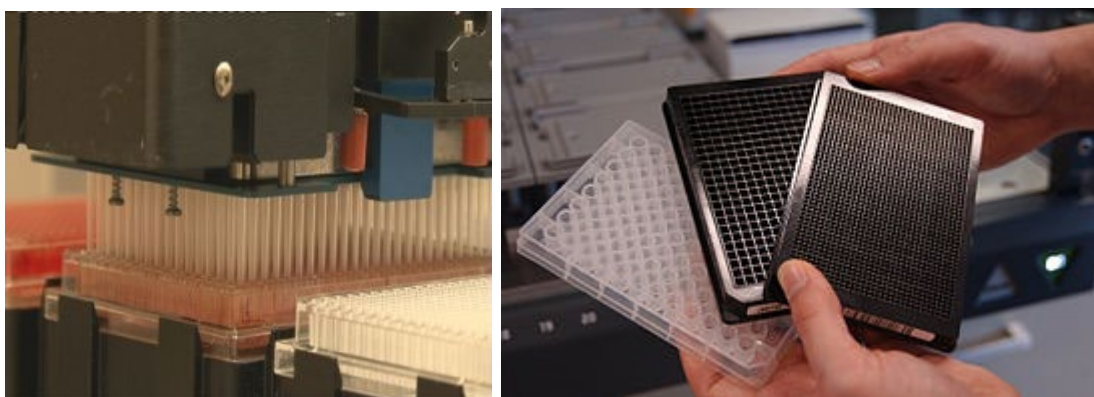
Skrining je vedecká, presnejšie výskumná metóda hodnotenia kolekcie testovaných objektov, spravidla početnej množiny s  $n > 10$ , často i podstatne viac. Skriningové systémy majú za cieľ vybrať v časovo tolerantom limite jeden alebo niekoľko testovaných objektov z veľkej množiny testovaných objektov na základe účinnosti, odlišnosti. Na skriningové metódy nadväzujú detailné hodnotenie vybraných objektov. Z týchto dôvodov sú kritéria na skriningové hodnotenie iné, spravidla menej prísne ako na testovanie vybraných látok, pretože ich cieľom je výber perspektívnych objektov a nie detailná, presná kvantifikácia ich účinnosti. Ako príklad možno uviesť nároky na čistotu testovaných látok, pre skriningové štúdie je realizovaná syntéza veľkej kolekcie látok, /tkzv. „*screening samples*“ – eng./ v množstvo niekoľko miligramov, postačuje čistota 90% (HPLC, plošné %), pre štúdie farmakokinetiky a farmakodynamiky sa syntetizujú už z primárnej množiny len niekoľko vybraných látok v gramových množstvách, nutná je čistota látky nad 98 % a schválenie žiadosti o prvé podanie látky človeku, kam sa vyberá na základe výsledkov jedna látka z pôvodnej množiny sa vyžaduje väčšie množstvo látky čistoty nad 99,5 %.

Napriek nižším kritériám na kvalitu testovaných látok i na kvalitu výstupného parametra je možné tieto data aplikovať do SAR štúdie o to viac, ak testované látky majú štruktúrnu príbuznosť a data pre komparatívnu analýzu tvoria jeden viazaný celok.

Skrining látok sa môže odohrávať vo virtuálnej realite na úrovni *in silico* (napríklad „*docking*“ látok v molekulách biologických polymérov), ale predovšetkým vo fyzickej realite.

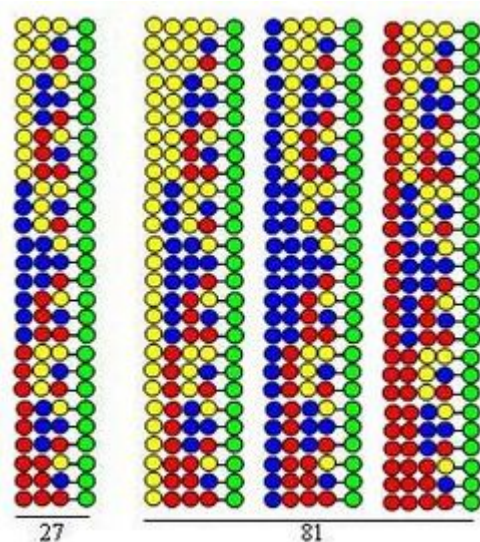
Špeciálnou kategóriou skriningových systémov je vysokovýkonný, vysokokapacitný skriningový systém – („*High Throughput Screening*“ – eng. /HTS/, ktorý predpokladá skrining veľkého množstva testovaných entít/. Jedná sa predovšetkým o pracovisko s robotickým systémom skriningu, s využitím novej generácie mikroplatničiek s počtom testovacích jamiek 384, 1536, alebo 3456, čo sú násobky klasickej mikroplatničky formátu 8 x 12 teda 96 jamiek.

Príklad techniky na HTS prezentuje Obrázok 13, na ktorom je robotický systém pre dávkovanie veľkokapacitnej mikroplatničky a rôzne veľkokapacitné mikroplatničky v komerčnej ponuke.



**Obrázok 13. Príklad robotického systému pre dávkovanie veľkokapacitnej mikroplatničky a rôzne veľkokapacitné mikroplatničky v komerčnej ponuke.**

Pre zvýšenie kapacity skriningu sú testované entity (látky) syntetizované a testované v podobe tzv. knižníc látok („*compounds libraries*“ – eng.), t.j. zmes látok napríklad po 10 látok. Ak je medzi 10-timi látkami minimálne jedna látka účinná, prejaví sa to účinnosťou celej knižnice, ktorá je potom testovaná systémom hodnotenia každej látky zvlášť, po ich dosyntetizovaní na požadované množstvo. Pri syntéze látok sa často uplatňuje kombinatoriálny prístup syntézy (Remko, 2002) na nosiči s varírovaním jednotlivých nasledujúcich stavebných „*building*“ blokov látok a terminálnom uvoľnené syntetizovanej molekuly z nosiča po ukončení syntézy. Princíp kombinatoriálnej syntézy v prípade troch, respektíve štyroch odlišných stavebných blokov (cukry, aminokyseliny, iné chemické jednotky), znázornených v podobe symbolov guľičiek inej farby, prezentuje nasledovný Obrázok 14.



**Obrázok 14. Princíp kombinatoriálnej syntézy v prípade troch (počet kombinácií = 27), respektíve štyroch (počet kombinácií = 81) odlišných stavebných blokov (cukry, aminokyseliny, iné chemické jednotky), znázornených v podobe symbolov guľičiek inej farby, guľičkou zelenej farby je znázornený nosič.**

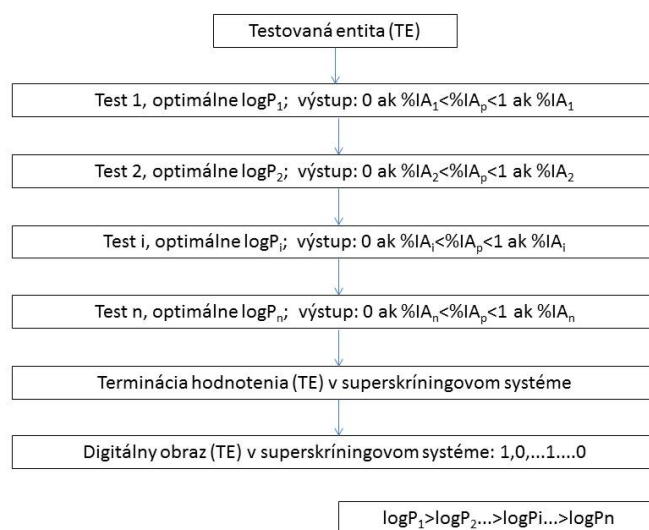
Na tomto mieste je vhodné poznamenať, že kombinatoriálna syntéza prebieha v platničkách, v ktorých sa následne realizuje aj samotné testovanie produktov syntézy.

Moderné skriningové systémy sú majetkom a súčasne „*know-how*“ veľkých nadnárodných spoločností, predovšetkým farmaceutických firiem, ktoré skriningový systém zdokonaľovali pre maximálnu účinnosť, rýchlosť a spoľahlivosť výberu z početných kolekcii ( $n = 1000 - 1000\ 000$ ) testovaných entít. Skriningové testy sa skladajú do supersystémov, tak, že testovaná entita je podrobená testovaniu v danom teste 1, potom postupuje do testu 2, až do testu  $n$ , kedy sa testovanie končí. Radenie jednotlivých testov môže byť napríklad na základe klesajúcej polarizácie optimálne účinnej látky, to znamená, že pre každý test je možné odhadnúť optimálnu polaritu virtuálne účinnej štruktúry a tieto testy zoradiť v smere klesajúcej polarizácie, respektíve rastúcej lipofily.

Ďalším prvkom organizácie skriningových supersystémov je skutočnosť, že pre každý test je definovaná účinnosť hodnotou výstupného parametra, nad ktorú získava testovaná entita v primárnom hodnotení symbol 1 – účinná, respektíve pod definovanú hodnotu získava symbol 0 – neúčinná. Takto každá látka, ktorá prejde hodnotením v skriningovom supersystéme získava obraz o svojej účinnosti, zapisateľný v digitálnom kóde, napríklad: 1,0,1,1,0,0,1,0,0,1. Tento kód hovorí o perspektívach danej látky pre daný účel, napríklad pre účely vývoja ako liečivo, nakoľko časť testov v supersystéme sa môže týkať účinnosti, časť toxicity, či nežiaducich účinkov. Ak sa testovaná entita javí ako



perspektívna je realizované detailné, presné hodnotenie už len vo vybraných testoch. Schéma supersystému popisuje nasledujúci Obrázok 15.



**Obrázok 15. Schéma hodnotenia testovanej látky v supersystéme s radením testov na princípe rastúcej lipofility s výstupným parametrom percenta inhibičnej aktivity (%IA) v jednotlivých testoch.**

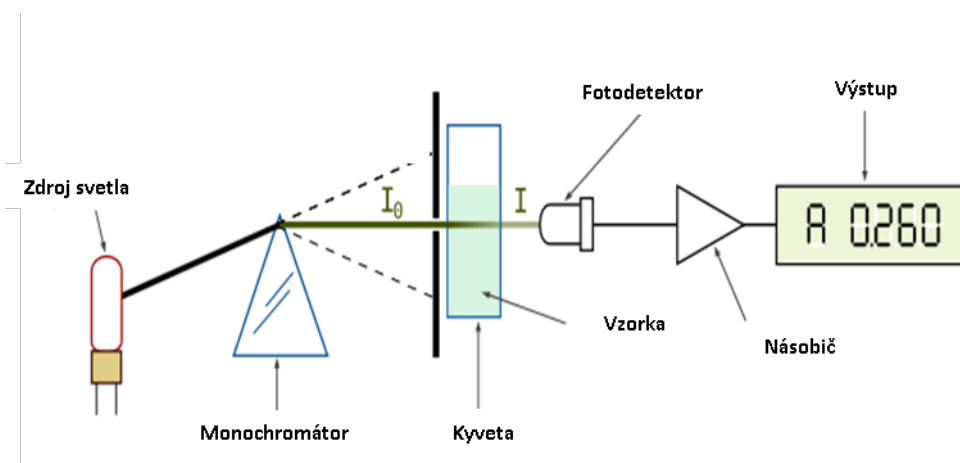
V spojení s robotickým vybavením ponúka tento prístup veľmi účinných nástroj na hodnotenie testovaných entít a objav nových účinných štruktúr.

### 8.1.2 Fotometria

Aby bolo možné merať účinnosť testovanej entity, v praxi sa uplatňuje komparatívny, „bi-line“ systém, kde v testovacom systéme je paralelne testovaná sústava s testovanou entitou ako vzorka a bez nej ako kontrola. Na základe komparácie s uplatnením dátového procesingu a metód primárnej a sekundárnej štatistiky je možné vyčísliť a kvantifikovať účinnosť testovanej entity. Aby bola možná táto komparácia je nutný meraný parameter na primárnu kvantifikáciu. Parameter, jasne merateľný, fyzikálne opodstatnený, meraný buď gravimetricky (vážením), opticky využívajúc vhodné zložky elektromagnetického spektra, alebo scintilačne, merajúc počet impulzov rádioaktívnych častíc po fotonásobiči v scintilačnom detektore.

Z hľadiska rýchlosti, bezpečnosti a užívateľskej komfortnosti sa v praxi uplatnili a do rôznych podôb rozvinuli fotometrické stanovenia. Tieto stanovenia sa opierajú

o zákonitosti Lambert-Beerovho zákona. Princíp fotometra prezentuje schéma na Obrázku 16.



**Obrázok 16. Princíp a zloženie fotometra, pozostávajúci zo zdroja svetla, monochromátora, kvety s roztokom testovanej entity, vzorky, fotodektora, násobiča s detekciou výstupu.**

Fotometria, respektíve spektrofotometria patrí do skupiny spektrálnych optických metód založených na meraní a vyhodnocovaní absorpčných spektier. Pri prechode elektromagnetického žiarenia vrstvou absorbujúceho prostredia dochádza, okrem iných javov, k čiastočnej alebo úplnej absorpcii. Fyzikálna podstata javu absorpcie súvisí s excitáciou atómov a molekúl a s pohltením energie žiarenia.

Základný zákon, ktorý kvantitatívne popisuje absorpciu svetla pri prechode vrstvou absorbujúceho prostredia (roztokom absorbujúcej látky) je spomínaný Lambertov – Beerov zákon (XXVIII):

$$\log \Phi_0/\Phi = A = \varepsilon.d.c \quad (\text{XXVIII}),$$

kde  $\Phi_0$  je intenzita svetla pri vstupe do absorbujúceho prostredia,  $\Phi$  – intenzita svetla zoslabeného absorpciou po prechode absorbujúcou vrstvou,  $A$  – veličina, ktorá kvantitatívne charakterizuje absorpciu a nazýva sa absorbancia,  $\varepsilon$  – mólový absorpčný koeficient [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $d$  – hrúbka absorbujúcej vrstvy [ $\text{cm}$ ],  $c$  – látková koncentrácia absorbujúcej látky [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

V rozsahu platnosti Lambertovho – Beerovho zákona je mólový absorpčný koeficient konštantou, ktorá má význam absorbancie roztoku s koncentráciou  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  pri hrúbke

absorbujúcej vrstvy 1 cm. Pomer  $\Phi/\Phi_0$  sa nazýva transmitancia (priepustnosť), označuje sa  $T$  a často sa vyjadruje v %. Udáva, koľko % svetelnej energie absorbujúca vrstva prepúšťa.

Lambertov – Beerov zákon platí presne len za určitých podmienok:

- svetlo prechádzajúce vrstvou roztoku musí byť monochromatické,
- koncentrácia absorbujúcej látky nesmie byť vysoká, ideálne je meranie absorbancie v intervale linearity, do hodnoty 0,6,
- absorbujúca vrstva musí byť pravý roztok. V koloidných roztokoch a suspenziách Lambertov – Beerov zákon v dôsledku veľkého rozptylu svetla na koloidných a suspendovaných časticách neplatí,
- platnosť Lambertovho – Beerovho zákona je porušená tiež vtedy, ak zriedovaním roztoku dochádza k posunu chemickej rovnováhy, na ktorej sa zúčastňuje meraná látka,

Nevýhodou spektrofotometrie/fotometrie v klasickom usporiadaní je veľká spotreba roztokov a reagentii nakoľko objem klasických kyviet je 3 ml s možnosťou detekcie vzorky v roztoku s objemom 2 ml, ďalej pracnosť klasického usporiadania merania výmenou kyviet. Tento nedostatok vhodným spôsobom rieši používanie mikroplatničkového systému. Obrázok 17 prezentuje ukážku kyviet do spektrofotometra.



Obrázok 17. Ukážka rôznych typov kyviet pre spektrofotometriu.

### 8.1.3 Mikroplatničková technika

Mikroplatničková technika je technika, ktorá využíva na fotometrické meranie mikrotitračné platničky. Sú to platničky z plastu, ktoré majú definovaný počet jamiek, kde každá jamka nahrádza jednu meráciu kyvetu. Jedná sa vlastne o fotometer s „repeating“ – eng. usporiadaním, kedy prístroj meria, skenuje postupne každú jamku v definovanom

rozsahu v smere stĺpcov, alebo riadkov. Mikroplatničková technika má význam, ak meranie každej jamky má náležitosti merania v kvete, to znamená prístroj svojou „seba“ kontrolou /„selftest“ –eng./ musí skontrolovať, že v každom impulze (meranie jednej jamky) emituje rovnaké množstvo svetla, príslušnej vlnovej dĺžky a detektor deteguje meraný výstup fotonásobiča v istom definovanom intervale. Mikroplatničkové meranie má ďalej význam ak je rýchle a šetrí tak okrem nákladov na reakčnú zmes aj čas nutnú na meranie. Princíp mikrolatničkových čítačov /fotometrov, spektrofotometrov/ je rovnaký ako je popísaný na Obrázku 16, s tým rozdielom, že sa jedná o opakované impulzné meranie, ktoré pri najmodernejších prístrojoch trvá niekoľko sekúnd. Nasledujúci Obrázok 18 prezentuje príklad niekoľkých mikrolatničkových čítačov.



**Obrázok 18. Príklad jednoduchých „reader“-ov, konkrétne typu OPSYS MR, od firmy Dynex a Elx80, od firmy Biotek.**

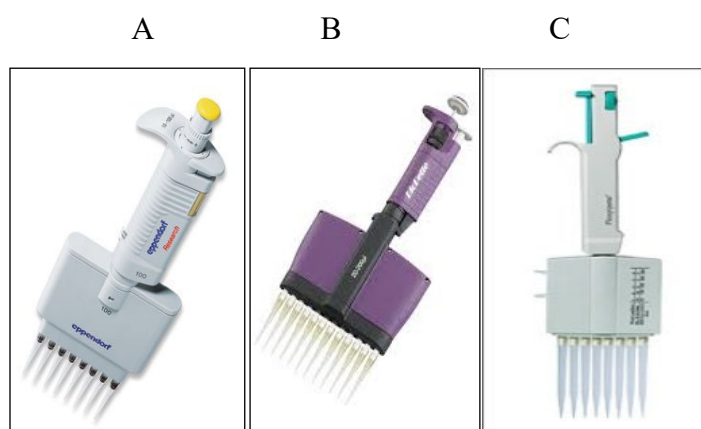
#### **8.1.4 Systém merania na mikroplatničkách**

Systém merania s využitím mikroplatničkovej techniky pozostáva z niekoľkých fáz:

- príprava mikroplatničky,
- štartovanie mikroplatničky,
- kultivácia mikroplatničky,
- meranie mikroplatničky,
- dekontaminácia, umytie, likvidácia mikroplatničky,

Príprava mikroplatničky môže prebiehať s využitím robotických, plniacich, mikroplatničkových systémov, alebo manuálne s použitím multikanálových

automatických pipiet. Jedná sa o rovnaký systém pipiet, ako bežne používané pipety s tým rozdielom, že majú takzvané „*multistroke*“ – eng., usporiadanie pre 4, najčastejšie pre 8 respektíve 12 kanálov. Práca s takou pipetou, respektíve i presnosť práce je rovnaká ako s bežne používanou automatickou pipetou v biochemickom laboratóriu. Okrem multikanálových pipiet sa často využívajú takzvané „*stepre*“ – eng., multikanálové pipety, usporiadané na 1 nasatie dávkovaného roztoku a niekoľkonásobné plnenie roztoku do riadkov, alebo stĺpcov, zatiaľ čo multikanálová pipeta vyžaduje vhodnú nádobu a nasatie roztoku pred každým plnením. Čo sa týka špičiek, existuje široká ponuka podľa objemu, farebne rozlíšená. Príklad multikanálových pipiet prezentuje nasledujúci Obrázok 19.



**Obrázok 19. Princíp a príklad multikanálových pipiet (A,B) a multikanálového stepera (C).**

Mikroplatnička ponúka široké možnosti organizácie dát, vyplývajúce z definovania jednotlivých jamiek, pričom ktorákoľvek z jamiek môže byť definovaná ako blank (B), kontrola (K), štandard (Š), alebo testovaná jamka (T), pričom štandard býva testovaný vo viacerých, minimálne piatich koncentráciách ( $\check{S}_1, \check{S}_2, \check{S}_3 \dots \check{S}_i$ ). Každá z týchto uvedených kategórií býva multiplikovaná v podobe paraleliek ( $j=4$  a viac). Paralelky môžu byť radené v smere riadkov, alebo stĺpcov s ohľadom na charakter multikanálovej pipety ( $n= 4, 8, 12$ ), tak aby každá špička multikanálovej pipety pracovala s jednou paralelkou. Tejto organizácii mikroplatničky odborné hovoríme Templát mikroplantičky. Príklad jedného z templátov prezentuje nasledujúci Obrázok 20.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>B</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>C</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>D</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>E</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>F</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>G</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B
<b>H</b>	B	K	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>8</sub>	K	B

**Obrázok 20. Templát mikroplatničky pre hodnotenie 8 látok – inhibítorov (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> ... I<sub>8</sub>), blanku (B) a kontroly (K) a v ôsmich paralelných meraniach v smere riadkov.**

Príprava mikroplatničky vychádza zo skutočnosti, či sa meranie uskutočňuje bez rizika mikrobiálnej kontaminácie – vtedy sa využívajú sterilné mikroplatničky, alebo na čistej, nesterilnej mikroplatničke. Sterilný systém práce, umožňuje práce s mikroorganizmami a bunkovými kultúrami.

Štartovanie mikroplatničky je prídavok roztoku, ktorý je kauzálny, vzhľadom na nárast meranej veličiny – najčastejšie absorbancie, alebo fluorescencie. Zásadou je pridávať tento roztok naraz a čo najrýchlejšie, ideálne multikanálovou, automatickou pipetou, alebo multikanálovým stepperom. Čas, ktorý uplynie po sken prvých dát sa nazýva mŕtvý čas a v meraní by mal menší ako 1 minúta.

Kultivácia mikroplatničky by mala prebiehať pri definovaných, nemenných podmienkach, spoločných pre každú jamku, pre celú mikroplatničku. Definované podmienky sú najčastejšie teplota, miešanie a svetelný režim. Na zabezpečenie týchto režimu sú komerčne k dispozícii rôzne kultivačné boxy a „shaker“-e, s rozsahom teplôt 0-60°C, s otáčkami pri miešaní do 1000 RPM. Pokiaľ sú predmetom experimentu bunky /mikrobiálne, zvieracie, či ľudské / býva často nutným krok výmeny média, čo sa deje centrifugáciou mikroplatničiek v centrifúgach s vhodným nastavením, pričom pre tento účel sú vhodné mikroplatničky typu U, s jamkami s profilom v tvare U oproti platničkám typu P, ktoré majú ploché dno a sú určené pre bežnú biochémiu. Nasledujúci Obrázok 21 prezentuje ukážku mikroplatničkových „shaker“-ov.



**Obrázok 21. Príklad mikroplatničkového „skaker“-a PMS-1000 od firmy Grant Bio a mikroplatničkový termostat PST-100HL od firmy Biosan.**

Meranie mikroplatničky vychádza zo spôsobu merania, v princípe sú možné dva módy merania:

- takzvané „*endpoint*“ – eng., meranie, kedy je nárast meranej veličiny (absorbancia, fluorimetria) ukončený, napríklad prídavkom terminujúceho roztoku, ktorý zmenou pH, iónovou silou, denaturáciou alebo iným procesom zabezpečí koniec procesu a koniec nárastu meranej veličiny, v tomto prípade nie je tak prísne dôležité terminálne meranie v stanovenom čase,
- takzvané kinetické meranie (kinetický mód) , kedy kontinuálne prebieha nárast meranej veličiny a je skenovaný v presne definovaných časoch, kedy je meranie spustené buď manuálne a je nutné presne dodržať čas snímania dát mikroplatničky, alebo je využitý kinetický mód zariadenia, alebo obslužného softvéru, ktorý presne spúšťa jednotlivé merania,

Po meraní je nutné mikroplatničky zlikvidovať umytím, v prípade, že predmetom merania je potenciálne infekčný agens tak aj dekontamináciou dekontaminačným roztokom, napríklad roztokom ajatínu.

### **8.1.5 Primárny dátový procesing**

Primárny dátový procesing je spracovanie dát, ktoré mikroplatničkový čítač meria a emituje ako primárny záznam dát, buď vo formáte listingu, alebo vo formáte matice s príslušným popisom. V zásade je možný primárny dátový „*processing*“ – eng., priamo

na mikroplatničkovom čítači, alebo na počítači s využitím príslušného softvéru (napríklad softvér „Revelation quicklink“), alebo je možné získať maticu dát po realizácii konverzie v bežnom číselnom formáte, alebo v textovom formáte a spracovanie dát v programe MS Excel (základná súčasť balíka Office), eventuálne v iných programoch. Predmetom primárneho „processing“-u je výpočet základných parametrov a to konkrétne % zvyškovej - reziduálnej aktivity (%RA) a % inhibičnej aktivity (%IA) podľa nasledujúcich vzťahov (XXIX) a (XXX) nasledovne:

$$\%RA = \{((A_{VZ}-A_B)/(A_K-A_B))*100\} \quad (XXIX),$$

$$\%IA = \{[1-((A_{VZ}-A_B)/(A_K-A_B))]*100\}, \text{ resp. } \%IA = 100 - \%RA \quad (XXX),$$

Pričom  $A_{VZ}$  je absorbancia vzorky,  $A_B$  je absorbancia blanku a  $A_K$  je absorbancia kontroly. Primárne parametre %RA, respektíve %IA musia byť vypočítané pre každú jamku štandardu ( $\check{S}_{i,j}$ ) a pre každú jamku s testovanou entitou ( $T_{i,j}$ ).

### 8.1.6 Sekundárny dátový procesing

Sekundárny dátový „processing“ nadväzuje na primárny a jeho cieľom je výpočet základných parametrov. Základným, sekundárnym parametrom pre meranie účinnosti látok ako testovaných entít je výpočet nasledovných parametrov: inhibičná koncentrácia  $IC_{50}$  – koncentrácia zodpovedná za 50% mieru inhibície, podobne vypočítaná efektívna dávka  $ED_{50}$ , respektíve letálna dávka  $LD_{50}$  a podobne. Podstata výpočtu je výpočet presnej koncentrácie, ktorá odpovedá 50%-álnej miere odozvy (inhibícia, účinok, mortalita) z lineárnej závislosti koncentrácie (c) a odozvy (Y), respektíve koncentrácie (c) v logaritmickej tvare podľa nasledujúceho vzťahu (XXXI), nasledovne:

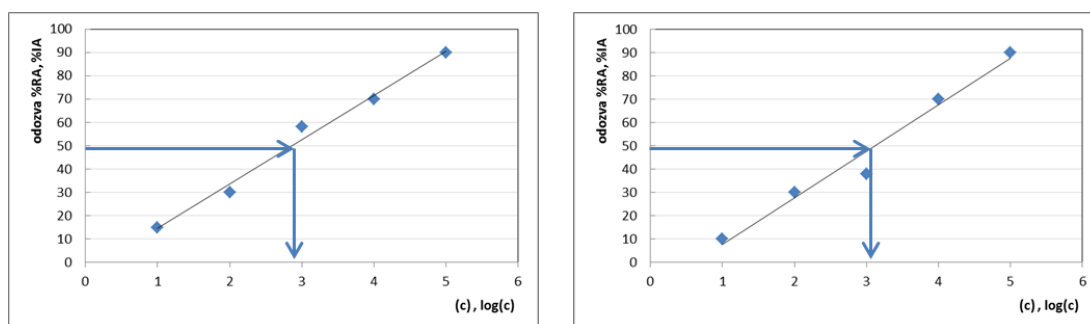
$$Y = a + b*(c), Y = a + b*\log(c) \quad a,b \text{ -- konštanty lineárnej regresie} \quad (XXXI),$$

Zistenie hodnôt konštánt v aplikácii MS Excel je možné priamo pridaním lineárnej trendovej závislosti do grafu s vyznačením rovnice priamky, prípadne aj hodnoty korelačného koeficienta  $r^2$ , alebo výpočtom s pomocou vzorcov ( $a=$  INTERCEPT,  $b=$



SLOPE,  $r = \text{CORREL}$ ). Pre ideálny výpočet parametra  $IC_{50}$  ( $ED_{50}$ ,  $LD_{50}$ ) musia byť splnené nasledovné predpoklady:

- máme k dispozícii minimálne 5 dvojíc bodov závislosti odozvy (Y) od koncentrácie (c),
- minimálne 2 dvojice bodov sú pod a dve dvojice bodov nad predpokladanou hodnotou  $IC_{50}$  ( $ED_{50}$ ,  $LD_{50}$ ), vid' Obrázok 22,
- závislosť odozvy (Y) od koncentrácie (c), respektíve  $\log(c)$  dáva hodnota korelačného koeficienta  $r^2 > 0,95$ , v ideálnom prípade 0,99,



**Obrázok 22. Správne a akceptovateľné rozloženie dát pri výpočte parametrov  $IC_{50}$  ( $ED_{50}$ ,  $LD_{50}$ ).**

Posledným krokom v rámci sekundárneho dátového „processing“-u je vzťahnutie nameraných dát k definovanému štandardu. Bežne používaným štandardom pri meraní antioxidačnej aktivity býva TROLOX – chemicky sa jedná o nasledovnú látku: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboxylová kyselina – vodorozpustný analóg vitamínu E, častým štandardom pri enzým-inhibičných testoch býva epigalokatechín galát EGCG a jednoduchým prepočtom je možný akýkoľvek nameraný/vypočítaný parameter vyjadriť v jednotkách miligramov zvoleného štandardu. Najčastejšie sa tento prístup aplikuje pre zmesných vzorkách – napríklad vzorkách extraktov. Takto získaný parameter sa intenzifikuje vzťahnutím na 1 g natívnej hmoty, alebo 1 ml extraktu, čím je umožnené vzájomné porovnanie vzoriek extraktov medzi sebou.

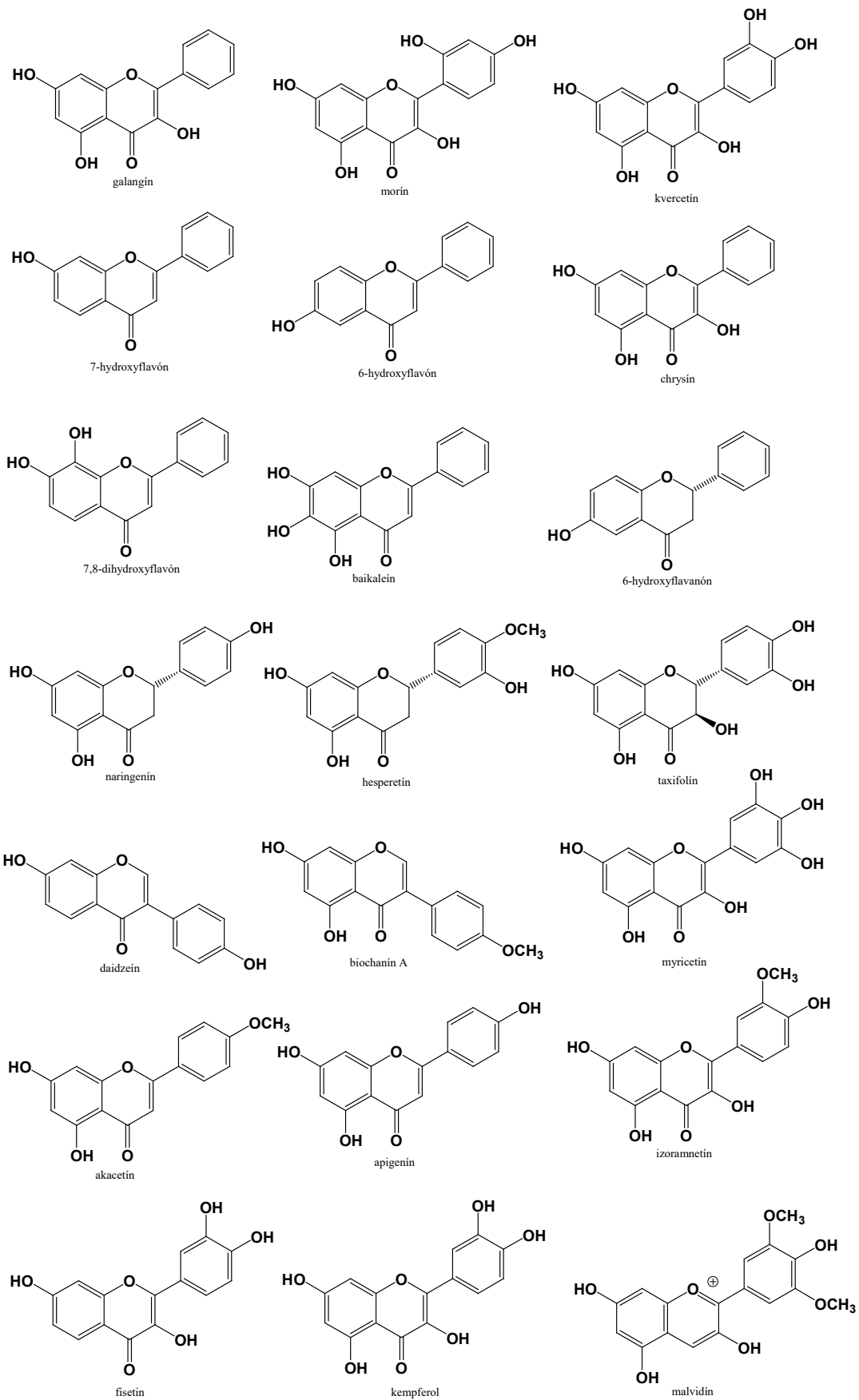
## 8.2 PRÍKLADY APLIKÁCIE SAR ŠTÚDIÍ

### 8.2.1 Vzťah štruktúrnych parametrov voči inhibičnej aktivite

Ako bolo preukázané v mnohých pôvodných a vedeckých publikáciách, flavonoidy sú nepochybne účinnými inhibítormi farmakologicky atraktívnych enzýmov. Antioxidačný

účinok flavonoidov je rovnako dobre známy a bohato publikovaný. Obe biologické aktivity sú determinované spoločnou vlastnosťou polyfenolických látok, vrátane flavonoidov.

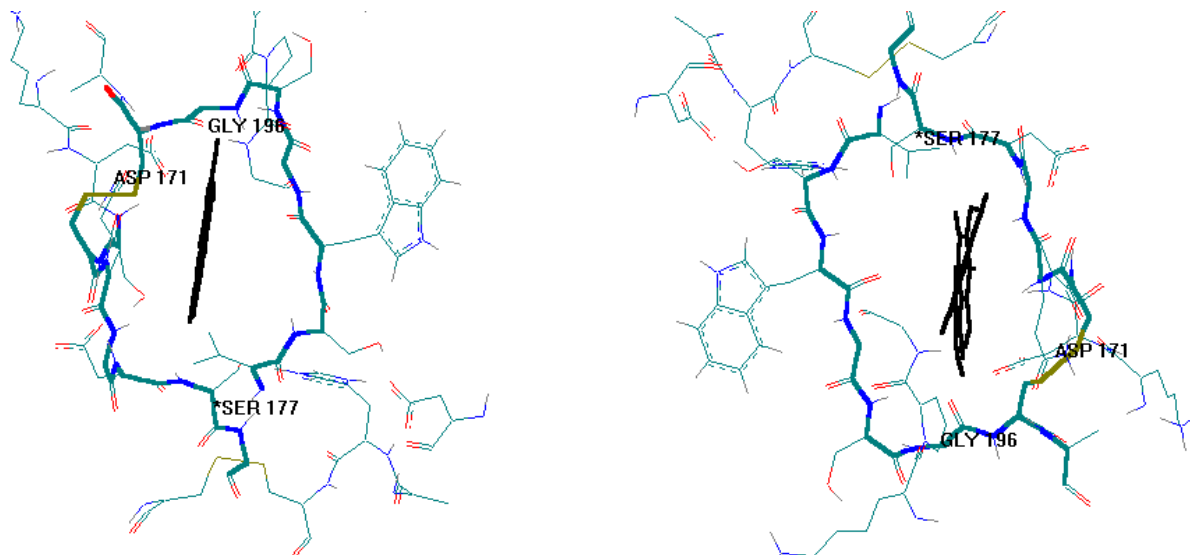
Výsledky inhibičnej aktivity flavonoidov na boviný  $\beta$ -trypsín prezentuje (štruktúry flavonoidov, uvedených v tejto kapitole prezentuje Obrázok 23) Tabuľka 7 (Maliar a kol., 2004). Z výsledkov je zrejмый výrazný rozdiel v inhibičnej aktivite v prospech tri-, tetra- a pentahydroxysubstituovaných flavonoidov, čo podporuje myšlienku významu hydroxyskupín ako donor-akcetorných funkčných zoskupení pre vodíkové interakcie v S<sup>1</sup> regióne  $\beta$ -trypsínu a urokinázy. Najúčinnějšíe látky zo skupiny flavonoidov sú rádovo potentnějšíe ako hydroxysubstituované aromatické kyseliny, čo poukazuje na to, že flavonoidový skelet ideálne „okupuje“ priestor S<sup>1</sup> regiónu  $\beta$ -trypsínu, potvrdzujú to i závery počítačových štúdií nekovalentných interakcií medzi vybranými flavonoidmi a modelom  $\beta$ -trypsínu, vid' prípad nekovalentnej interakcie kvercetínu v katalytickej kavite boviného  $\beta$ -trypsínu, Obrázok 24. Vzájomným porovnaním rôznych štruktúrálnych flavonoidov, ako inhibítorov trypsínu príbuzných proteínáz, možno podľa klesajúcej inhibičnej aktivity získať nasledovnú radu: flavonoly >flavóny >flavanoly> izoflavonoidy> flavanóny. Počítačové štúdie potvrdili význam vhodnej lokalizácie hydroxy skupín, preferovaná je konformácia 3,5,7-trihydroxy, ktorá sa zdá byť esenciálna pre inhibičnú aktivitu na oba enzýmy.



Obrázok 23. Štruktúry hodnotených flavonoidov.

**Tabuľka 7. Inhibičné aktivity testovaných látok zo skupiny flavonoidov vyjadrenej parametrom IC<sub>50</sub> na boviný β-trypsín.**

Testovaná látka	IC <sub>50</sub> na trypsín (mM)
<i>Flavonoly</i>	
Galangín	0.035
Morín	0.027
Kvercetín	0.010
<i>Flavóny</i>	
6-Hydroxyflavón	>1.024
7-Hydroxyflavón	>1.024
Chrysin	>1.024
7,8-Dihydroxyflavón	0.657
Baikaleín	0.055
<i>Flavanóny</i>	
6-hydroxyflavanón	0,252
Naringenín	0.484
Hesperetín	>1.024
<i>Flavanoly</i>	
Taxifolín	>1.024
<i>Izoflavonoidy</i>	
Daidzeín	>1.024
<i>Antokyány</i>	
Malvidin	0,040

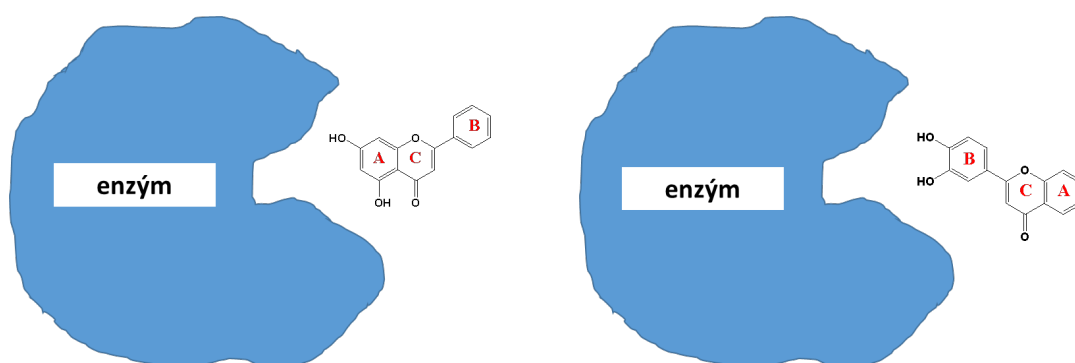


**Obrázok 24. Optimalizovaná geometria kvercetínu v modeli S<sup>1</sup> regiónu hovädzieho β-trypsínu po výpočte v programe Hyperchem cyklickou optimalizáciou náboja látky semiempirickou metódou AM1 a optimalizáciou geometrie komplexu enzým-látka metódou molekulovej mechaniky AMBER /frontálny a inverzný pohľad/ s vyznačením katalytickej triády.**

Inhibičná aktivita 15-tich vybraných flavonoidov (Tabuľka 6) na trypsín slúžila ako základ štúdie kvantitatívnych vzťahov štruktúra – aktivita. Do štúdie boli zaradené rozmanité látky zo skupiny flavonoidov, konkrétne flavóny a to monohydroxy

substituované - 6-hydroxy, 7-hydroxyflavón, ďalej dihydroxysubstituované flavóny (chrysin, 7,8-dihydroxyflavón), trihydroxysubstituované flavóny (galangín, baikaleín), ďalej rôzne substituované flavanóny (6-hydroxyflavanón, naringenín, hesperetin, jeho diglykozid hesperidín), ďalej taxifolín ako predstaviteľ flavanolov, daidzeín ako predstaviteľ izoflavónov a nakoniec malvín ako predstaviteľ antokyánov.

Prevedená bola jednoparametrická príčinná analýza zvolených parametrov u ktorých sa predpokladala vzťahová súvislosť s inhibičnou aktivitou látok (suma parciálnych nábojov na kyslíkoch hydroxyskupín  $\Sigma\delta O^-$ , suma parciálnych nábojov na vodíkoch hydroxyskupín  $\Sigma\delta H^+$ , rozdeľovací koeficient (logP), hydratačná energia  $E_H$ , dipólový moment D, energia najnižšieho voľného orbitálu eHOMO, energia najvyššieho obsadeného orbitálu eLUMO, povrch molekuly S, objem molekuly V a refraktivita R). Prehľad vypočítaných parametrov prezentuje nasledovná Tabuľka 8. Boli zistené významné vzťahy medzi inhibičnou aktivitou látok na trypsín a polaritou látok vyjadrenou ako log P ( $r=0,849$ ,  $F=10,366$ ), resp. sumou parciálnych nábojov na vodíkoch hydroxy skupín flavonoidov ( $r=0,890$ ,  $F=15,204$ ). Výsledky SAR štúdií potvrdzujú už v predošlom zdôrazňovanú skutočnosť, že inhibítormi trypsínu sa stávajú polárne látky s reaktívnymi konformáciami poskytujúcimi protóny vodíka ako donory tvoriacich sa vodíkových interakcií v katalytickom centre trypsínu. Poznatky tejto kapitoly práce v nadväznosti na predchádzajúce zistenia poukazujú na skutočnosť, že molekuly flavonoidov môžu vstúpiť do interakcie s katalytickým centrom trypsínu dvoma spôsobmi a to prostredníctvom hydroxyskupín na A kruhu do centra enzýmu, alebo hydroxyskupinami na bočnom kruhu (kruh B), vid' Obrázok 25.



**Obrázok 25. Schématické znázornenie dvoch možných prístupov molekuly flavónov do katalytickej kavity enzýmov.**

Z SAR-ových štúdií bola postulovaná potreba selektívnej derivatizácie (acylácie, alkylácie) susediacich hydroxy skupín (vicinálne zoskupenie, meta-dihydroxy, alebo susedné trihydroxy zoskupenie) len na kruhu B, alebo naopak len na kruhu C. Problémy selektívnej derivatizácie porovnateľne reaktívnych hydroxyskupín flavonoidov chemickou cestou viedli k predpokladaným lepším perspektívam cieľovej enzýmovej transformácie, a to na celulárnej úrovni, alebo na úrovni izolovaných enzýmov *in vitro*.

**Tabuľka 8. Prehľad vypočítaných fyzikálnochemických parametrov vybraných flavonoidov pomocou QSAR modulu v programe Hyperchem po cyklickej optimalizácii náboja semiempirickou metódou AM1 a optimalizácii geometrie látok MM metódou AMBER.**

Testované látky	$\Sigma\delta O^-$	$\Sigma\delta H^+$	log P	eHOMO [eV]	eLUMO [eV]	$E_H$ [kcal.mol <sup>-1</sup> ]	D [debye]	S [Å <sup>2</sup> ]	V [Å <sup>3</sup> ]	R [Å <sup>3</sup> ]
Galangín	-0,964	0,738	-1,96	-0,015	0,3321	-20,56	3,386	439,8	720,66	79,96
Morín	-1,427	1,184	-4,01	-0,3907	0,0691	-29,48	4,207	459,19	760,4	83,17
Kvercetín	-1,475	1,207	-4,01	-0,004	0,1618	-32,88	3,174	461,35	761,9	83,17
6-hydroxy flavón	-0,679	0,219	-0,04	-0,378	0,0798	-11,39	4,761	426,87	691,33	76,67
7-hydroxy flavón	-0,687	0,225	-0,04	-0,3067	0,0345	-11,47	4,447	426,87	691,58	76,67
Chrysin	-0,969	0,494	-1,06	-0,4033	0,043	-17,12	5,15	436,99	706,49	78,28
7,8-Dihydroxy flavón	-0,958	0,484	-1,06	-0,0551	0,0418	-16,19	4,407	434,04	707,24	78,28
Baikaleín	-1,18	0,729	-2,09	-0,0061	0,0623	-21,08	6,104	445,67	724,97	79,88
Taxifolín	-1,55	1,175	-3,02	-0,2932	0,0099	-33,21	2,277	459,08	771,31	81,2
6-hydroxy flavanón	-0,737	0,218	0,49	-0,5763	0,1298	-10,79	3,366	435	702,81	75,05
Naringenín	-1,274	0,71	-1,56	-0,0109	0,1094	-23,28	3,44	451,65	740,26	78,26
Hesperetín	-1,185	0,711	-2,56	-0,0752	0,3298	-20,75	3,048	422,04	694,23	84,63
Hesperidín	-4,274	1,824	-4,76	-0,6033	0,0131	-38,22	4,32	827,68	1495,5 5	148,15
Daidzeín	-0,935	0,446	-1,03	-0,4491	0,0786	-19,41	2,395	429,33	700,59	77,08
Malvín	-4,62	1,97	-7,12	-0,4104	0,1873	-40,09	820,8	820,8	1534,3 8	157,42

## 8.2.2 Vzťah interakčnej energie voči inhibičnej aktivite

Pokiaľ je k dispozícii súbor s 3D štruktúrou enzýmu, alebo receptora a príslušný softvér s určitými parametrami, je možné uskutočniť štúdiu modelovanie nevazobných interakcií látok v katalytickom centre vybraného enzýmu. X-ray, NMR alebo teoreticky riešené modely nekovalentných komplexov enzýmov a ligandov, v zmysle inhibítorov

ponúka verejne prístupná Brookhavenská proteínová databáza, vid' Kapitola 6.31. Táto databáza obsahuje veľké množstvo súborov proteínáz, špecificky aj napríklad súbory trypsínu, z ktorých je možné pomocou vhodného softvéru pripraviť modelový systém na štúdium nekovalentných interakcií s rôznymi ligandami v pozícii inhibítorov. Ako príklad možno uviesť štúdiu modelovanie nekovalentných interakcií bovinného  $\beta$ -trypsínu s predmetnou kolekciovou vybraných látok zo skupiny flavonoidov (Maliar a kol., 2004). Nakoľko boli flavonoidy testované ako vhodné stavebné bloky inhibítorov s cieľom zameniť kyselinu guanidínobenzoovú ako xenobiotický prvok v molekulách liečiv na báze inhibície serínových proteínáz trypsínovej rodiny bol ako štartovný súbor vybraný komplex bovinného  $\beta$ -trypsínu s guanidínobenzoovou kyselinou (GBA). Pred tým, ako boli jednotlivé molekuly flavonoidov zamieňané za GBA bol systém študovaný, tak, aby štartovné pozície čo najviac odpovedali realite. Ukázalo sa, že molekula flavonoidov ideálne zapadá do tzv. S<sup>1</sup> regiónu enzýmu, ktorý tvorí prázdny priestor v blízkosti katalytickej triády, vstupnú bránu tvoria fragmenty polypeptidového reťazca šošovkovitého tvaru, kam môže molekula flavonoidov vklízuť v dvoch možných geometriách, v jednom prípade je rovina kruhu orientovaná tak, že karbonyl v polohe 4 mieri do vnútra enzýmu (štartovná pozícia A), respektíve smerom von z enzýmu (štartovná pozícia B). Ďalším parametrom bol reálny stav karboxy skupiny Asp<sup>189</sup>, ktorý môže byť za daných podmienok v ionizovanom stave (COO<sup>-</sup>), alebo v neionizovanom stave (COOH). Kombinácia všetkých možností určuje 4 štartovné súbory rátania pre každú molekulu testovaného flavonoidu. Klasický formát výpočtu štúdiu „docking“-u, t.j. interakcie testovanej štruktúry v katalytickom priestore enzýmu má stavbu výpočtu celkovej energie čistého enzýmu  $E_{enzým}$ , celkovej energie samotnej štruktúry ligandu  $E_{ligand}$  a celkovej energie komplexu enzým-ligand  $E_{komplex}$ . Interakčná energia je definovaná ako miera zníženie celkovej energie pri asociácii enzým – testovaná štruktúra  $E_{int}$ , ktorá sa vypočíta podľa nasledovného vzťahu (XXXII).

$$E_{int} = E_{komplex} - (E_{enzým} + E_{ligand}) \quad (XXXII),$$

Nakoľko boli definované štyri možné, štartovné pozície, pre každý výpočet sa získa hodnota  $E_{int}$ . Nasledujúca Tabuľka 9 uvádza výsledky SAR štúdie kolekcie testovaných entít zo skupiny flavonoidov, ktorá prezentuje hodnotu parametra IC<sub>50</sub>, záporný logaritmickej tvar hodnoty IC<sub>50</sub> teda PIC<sub>50</sub>, molekulovú hmotnosť látky/štruktúry (MW)

a hodnoty  $E_{int}$ , vyjadrené ako minimálna (maximálna) hodnota z výpočtov štyroch štartovných pozícií, respektíve priemerná hodnota z uvedených štartovných pozícií s predpokladom, že testované štruktúry môžu náhodne obsadiť obe geometrie A i B a 50% enzýmu sa nachádza v stave ionizovanej formy karboxylu Asp<sup>189</sup>. Tabuľka 10 prezentuje komplexné štatistické SAR výpočtu.

**Tabuľka 9. Tabuľka SAR parametrov kolekcie vybraných flavonoidov.**

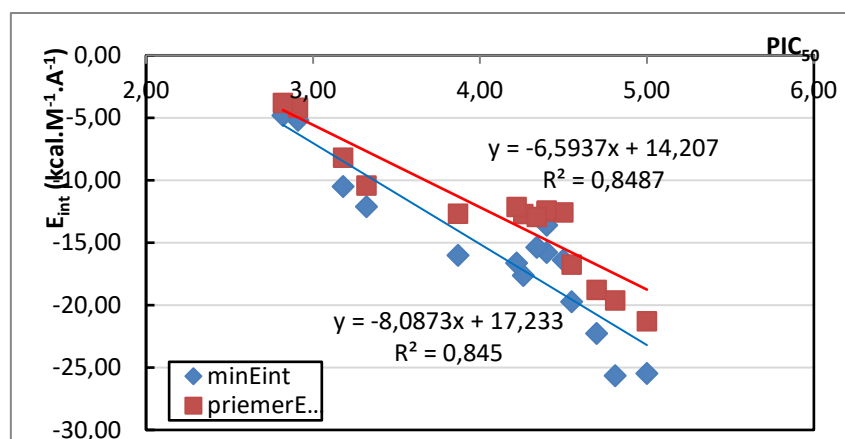
P. č.	Látka	IC <sub>50</sub>	PIC	MW	minE <sub>int</sub>	priemerE <sub>int</sub>
1	Kvercetín	0,01	5,00	302,20	-25,47	-21,28
2	Myricetín	0,02	4,81	318,20	-25,64	-19,61
3	Morín	0,02	4,70	302,20	-22,27	-18,77
4	Akacetín	0,02	4,55	284,30	-19,73	-16,76
5	Baikaleín	0,02	4,26	270,20	-17,62	-12,69
6	Galangín	0,04	4,50	270,20	-16,39	-12,56
7	Apigenín	0,04	4,40	270,20	-15,77	-12,49
8	Izoramnetín	0,04	4,40	316,30	-13,60	-12,42
9	Fisetín	0,05	4,34	286,20	-15,37	-12,94
10	Kempferol	0,06	4,22	286,20	-16,61	-12,14
11	Biochanín A	0,13	3,87	284,30	-16,01	-12,68
12	Naringenín	0,48	3,32	272,30	-12,12	-10,42
13	6-Hydroxyflavón	0,66	3,18	254,20	-10,50	-8,20
14	7-Hydroxyflavón	1,24	2,91	238,30	-5,20	-4,20
15	7,8-Dihydroxyflavón	1,52	2,82	238,30	-4,80	-3,80



**Tabuľka 10. Prehľad vypočítaných štatistických parametrov lineárnej regresie prvého stupňa vybraných flavonoidov pomocou programu Datafit.**

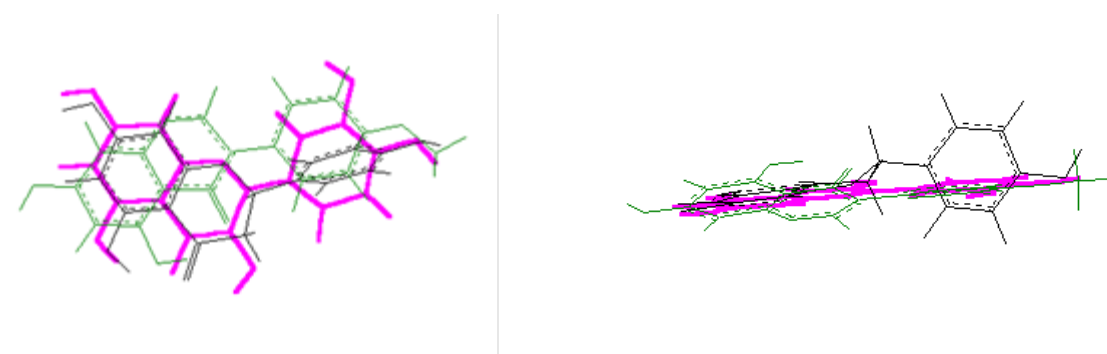
Y	IC <sub>50</sub> [μM]									
X	log P	eHOMO [eV]	eLUMO [eV]	E <sub>H</sub> [kcal.mol <sup>-1</sup> ]	D [debye]	S [Å <sup>2</sup> ]	V [Å <sup>3</sup> ]	R [Å <sup>3</sup> ]	ΣδO <sup>-</sup>	ΣδH <sup>+</sup>
<b>A</b>	<b>0,529</b>	<b>1,388</b>	<b>1,243</b>	<b>0,107</b>	<b>-0,087</b>	<b>-0,039</b>	<b>-0,022</b>	<b>-0,125</b>	<b>3,246</b>	<b>-2,353</b>
Štandardná odchýlka	0,164	2,476	3,545	0,032	0,335	0,016	0,009	0,124	1,422	0,603
T-test	3,220	0,560	0,351	3,309	-0,258	-2,382	-2,567	-1,007	1,824	-3,899
Prob(t)	0,032	0,605	0,744	0,030	0,809	0,076	0,062	0,371	4,668	0,018
95% Interval spoľahlivosti (+/-) pre a	0,456	6,873	9,843	0,090	0,931	0,045	0,024	0,345	3,480	1,675
Dolná hranica intervalu spoľahlivosti	0,073	-5,486	-8,600	0,017	-1,017	-0,084	-0,046	-0,470	-0,235	-4,028
Horná hranica intervalu spoľahlivosti	0,985	8,261	11,086	0,197	0,844	0,006	0,002	0,220	6,726	-0,678
<b>B</b>	<b>0,408</b>	<b>-0,815</b>	<b>-1,101</b>	<b>1,628</b>	<b>-0,589</b>	<b>16,362</b>	<b>15,088</b>	<b>9,227</b>	<b>3,116</b>	<b>1,030</b>
Štandardná odchýlka	0,458	0,406	0,574	0,797	1,406	7,266	6,249	10,098	1,794	0,530
T-test	0,890	-2,006	-1,917	2,042	-0,419	2,252	2,415	0,914	1,322	1,943
Prob(t)	0,424	0,115	0,128	0,111	0,697	0,087	0,073	0,413	4,910	0,124
95% Interval spoľahlivosti (+/-) pre b	1,272	1,128	1,594	2,213	3,904	20,174	17,349	28,037	4,391	1,472
Dolná hranica intervalu spoľahlivosti	-0,864	-1,943	-2,694	-0,585	-4,492	-3,813	-2,261	-18,810	-1,274	-0,442
Horná hranica intervalu spoľahlivosti	1,679	0,313	0,493	3,841	3,315	36,536	32,437	37,265	7,507	2,503
Priemerná reziduálna odchýlka	1,85E-17	-4,63E-16	7,40E-17	-5,18E-16	5,55E-17	-5,92E-16	1,18E-15	5,92E-16	-7,40E-17	2,96E-16
Súčet druhých mocnín priem. rez. odchýliek	0,828	2,759	2,887	0,796	2,926	1,230	1,124	2,373	1,111	0,619
Štandardná reziduálna odchýlka	0,455	0,831	0,850	0,446	0,855	0,555	0,530	0,770	0,527	0,394
Korelačný koeficient r <sup>2</sup>	0,722	0,073	0,030	0,732	0,016	0,587	0,622	0,202	0,626	0,792
<b>F-test</b>	<b>10,366</b>	<b>0,314</b>	<b>0,123</b>	<b>10,951</b>	<b>0,067</b>	<b>5,675</b>	<b>6,587</b>	<b>1,015</b>	<b>6,704</b>	<b>15,204</b>
Prob(F)	0,032	0,605	0,744	0,030	0,809	0,076	0,062	0,371	0,061	0,018

Nasledovný Obrázok 26 prezentuje závislosť interakčnej energie E<sub>int</sub>, aplikovaná je minimálna hodnota E<sub>int</sub> a priemerná hodnota E<sub>int</sub> zo štyroch výpočtov rôznych štartovných pozícií od aktívneho parametra PIC<sub>50</sub>.



**Obrázok 26.** Závislosť interakčnej energie  $E_{int}$ , aplikovaná je minimálna hodnota  $E_{int}$  a priemerná hodnota  $E_{int}$ . V grafe sú znázornené rovnice priamky a hodnota korelačného koeficienta  $r^2$  pre oba prípady.

Graf na Obrázku 24 demonštruje význam a možnosti SAR, prípade keď je známe 3D štruktúra väzobného miesta, ako v danom uvedenom prípade, čo možno vysvetliť nasledovne. Kolekcia vybraných flavonoidov predstavuje trénovaciu množinu, ktorá vysvetľuje aspekty závislosti interakčnej energie od štruktúrálnej prvkov molekúl flavonoidov na jednej strane a matematicky dokazuje súvislosť medzi vypočítanou interakčnou energiou  $E_{int}$  a aktivným parametrom  $PIC_{50}$ . Na tomto mieste je vhodné vysvetliť význam štruktúrálnej prvkov molekúl flavonoidov, na príklade „rigidity“ – eng., molekuly, akou je napríklad celo-molekulová miera konjugácie dvojitých väzieb, ktoré vedie k lineárnemu tvaru molekuly bez torzie, čo je príklad flavónov, vrátane účinných flavón-3-olov kvercetínového typu, naproti flavánom, kde  $sp^3$  hybridizované atómy v pozíciách 2 a 3 vedú k torzii molekuly, podobne aj v prípade izoflavonoidov. Túto skutočnosť prezentuje Obrázok 25.



**Obrázok 27.** Porovnanie celkovej geometrie a torzie molekúl typických predstaviteľov rôznych štruktúrálnej typov flavonoidov vo vákuu po výpočte v programe Hyperchem, kvercetíflavonol (fialová), biochanín – izoflavón (zelená) a naringenín – flavanón (čierna).

Tak ako klesá strata planarity kruhov A, B a C flavonoidov, teda rastie torzia (odchýlka) atómov fenylu v polohe 2 pre všetky flavonoidy s výnimkou izoflavonoidov (poloha 3), tak klesá inhibičná aktivita nielen na boviný  $\beta$ -trypsín, ale prakticky voči väčšine enzýmov, ktoré tieto látky inhibujú.

Výhľadovo je možné každú novú štruktúru flavonoidu zaradiť do výpočtu interakčnej energie  $E_{int}$  a výpočtom z rovnice závislosti získať predstavu o jej inhibičnej aktivite na boviný  $\beta$ -trypsín. Táto aplikácia novej štruktúry, netestovanej látky a odhad jej inhibičnej aktivity platí o to viac v prípade predpokladu, čím je nová látka bližšia testovanej kolekcií z hľadiska štruktúry, tým je vyššia správnosť odhadu jej aktivity. Táto skutočnosť sa pri vývoji liečiv, ale aj nových účinných látok využíva ako selekčný parameter, ktoré deriváty syntetizovať a investovať tak do nákladov na ich syntézu.

### 8.2.3 Matematické vzťahy aktivita ako funkcia koncentrácie

Štúdie SAR, alebo štúdie vzťahov aktivita versus koncentrácia, predstavujú matematický súvis medzi aktivitou na jednej strane a koncentráciou testovanej látky, respektíve nejakého štruktúrného deskriptora, spoločného pre celú skupinu látok na strane druhej, podľa nasledovných vzťahov (XXXIII) a (XXXIV) nasledovne:

Aktivita =  $f(c)$ , aktivita v rôznom vyjadrení,  $c$ = koncentrácia (XXXIII),

Aktivita =  $f(d)$ , aktivita v rôznom vyjadrení,  $d$ = akýkoľvek deskriptor, (XXXIV),

Aktivita, ako závislá premenná „Y“, môže vyjadrená niektorým z primárne procesovaných parametrov, %RA, alebo %IA, v prípade inhibičnej aktivity na nejaký enzým, prípadne parametrom MIC (minimálna inhibičná koncentrácia), používaným v prípade hodnotenie antimikrobiálnej aktivity, alebo niektorým zo sekundárne procesovaných parametrov, ako napríklad parameter  $IC_{50}$ , prípadne  $IC_{90}$ , respektíve  $IC_{10}$ . Koncentrácia testovanej látky, vzorky, skratka entity môže byť ako nezávislá premenná „x“, vyjadrená buď v priamom tvare alebo inverznom tvare  $1/C$ , respektíve v logaritmickom tvare  $\log C$ , alebo v kombinácii inverzného a logaritmického vzťahu  $1/\log C$ . Aplikáciou týchto možností sa môžeme dostať k rôznym matematickým vzťahom, ktoré môžu vykazovať lineárny, polynomiálny, exponenciálny, logaritmický

priebeh, alebo napríklad ja veľmi pravdepodobná sigmoideálny priebeh. Rovnicové vyjadrenie spomínaných funkcií prezentujú nasledovné vzťahy (XXXV):

$Y = a + b \cdot x$ , lineárny vzťah, polynóm prvého stupňa,

$Y = a + b \cdot x + c \cdot x^2$ , polynomiálna funkcia druhého stupňa,

$Y = a + b \cdot x + c \cdot x^2 + \dots + n \cdot x^m$ , polynomiálna funkcia m-tého stupňa,

$Y = a \cdot e^{(b \cdot x)}$ , exponenciálna funkcia,

$Y = a \cdot \log(c)$ , logaritmická funkcia,

$Y = \sqrt{((x^2/a^2) - 1) \cdot b^2}$ , odvodená hyperbolická funkcia,

$Y = (d - a) / (1 + ((x/c)b))$ , Hillova funkcia - sigmoideálna funkcia, (XXXV),

Nie je vhodné namerané údaje „napasovať“ do niektorých konkrétnych matematických tvarov, pri spracovaní dát je možné síce spustiť fitovanie nameraných dát všetkými spomenutými funkciami a to vo všetkých tvaroch nezávisle premennej „x“, v prípade jednom konkrétnom tvare závisle premennej „Y“, ale správne je vychádzať z matematického predpokladu súvislosti. O kvalite fitovaných údajov a teda pri výbere konkrétnej funkcie pre popis získaných dát jednoznačne rozhodnú parametre popisujúce koreláciu funkcie  $Y_{\text{vyp.}} = f(x)$ , voči nameraným hodnotám  $Y_{\text{nam.}}$ . Najčastejšie aplikovaným je parameter - korelačný koeficient =  $r^2$ , ktorý nadobúda hodnoty z intervalu (0,1), pričom hodnota 0 indikuje absolútnu „ne“-koreláciu a hodnota 1 indikuje absolútnu koreláciu. Vo všeobecnosti hodnoty  $r^2 > 0,9$  predstavujú významnú mieru korelácie a hodnoty  $r^2 > 0,95$  vysokú mieru korelácie, to znamená logiku a homogénnosť nameraných dát a správny výber funkcie na fitovanie dát. Na fitovanie všetkých možných tvarov matematických funkcií v krátkom čase, v jednom hodnotiacom kroku existuje špecializovaný softvér, akými sú napríklad programy Statgraphic, Origin, alebo program DataFit. Kvalita uvedeného softvéru sa zlepšuje zaradeným aktuálnych verzií jednotlivých programov, pri ich výbere je vhodné podľa možností získať aktuálne najvyššie verzie, kde je predpoklad lepšej výbavy daného softvéru, viacerých aplikačných možností, alebo lepšie užívateľské prostredie, lepšia grafika a podobne.

Pre fitovanie nameraných dát sa ako postačujúci javí napríklad aj program DataFit verzia 9.0, respektíve program DataFitX verzia 2.0 od spoločnosti Oakdaleengineering (dnes už dostupný len na špeciálnych úložiskách). Tento program je formátovo kompatibilný s programom MS Excel a umožňuje realizáciu regresie, respektíve interpolácie v n-rozmernom prostredí s určením, či sa má jednať o lineárnu, respektíve

nelineárnu regresiu. Tento softvér má predvolené niekoľko desiatok najbežnejšie používaných matematických fitovacích modelov používaných vo vedeckých štúdiách (vrátane polynomiálnych, exponenciálnych, hyperbolických, logaritmických, rôznych distribučných funkcií), pričom je možné vytváranie vlastných, užívateľom definovaných modelov. Výhoda tohto programu je, že ponúka fitovanie uvedených dát všetkými ponúkanými modelmi, pričom vo výsledkovej časti ponúka prehľad všetkých štatistických a grafických výsledkov jednotlivých modelov, zoradených podľa kvality fitovania uvedených nameraných dát.

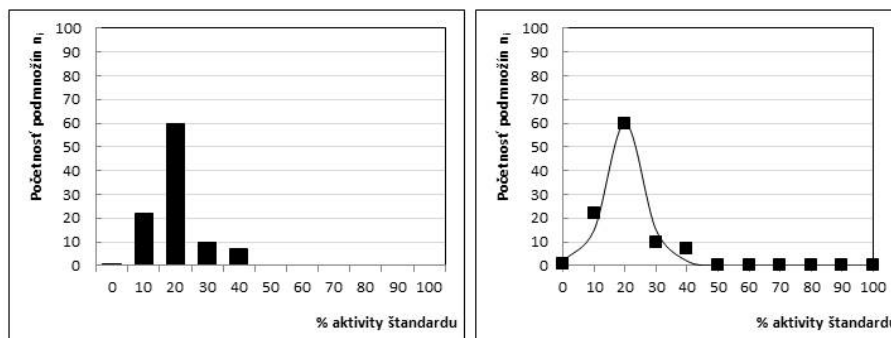
### 8.3 APLIKOVANÉ ŠTATISTICKÉ METÓDY KOLEKCIÍ VZORIEK

#### 8.3.1 Dátový processing skrínigových kolekcii

Skrínigové kolekcie obsahujú väčšie množstvo testovaných entít, či sa už jedná o jednotlivé látky – chemicky definované individuá, alebo vzorky extraktov, ktoré sú zmesou viacerých látok, najčastejšie porovnávané voči zvolenému štandardu. Pri skrínigovej kolekcii vzoriek je možné uplatniť štatistiku o jednej premennej (priemer, smerodajná odchýlka, maximálna, minimálna hodnota a pod.) v podobe primárneho i sekundárneho paramatera. Nadstavbou k tomuto vyjadreniu aktivity je možnosť štatistického spracovania celej kolekcie do histogramov. Histogram nám prezentuje rozdelenie celej množiny  $n$  do jednotlivých  $i$  kategórii, podľa definovaných parametrov, čím sa nám celá množina výsledkov  $n$  rozdelí do podmnožín  $n_1, n_2, \dots$  až  $n_i$ , pričom platí že  $n_1 + n_2 + \dots + n_i = n$ . Príklad, množinu výsledkov – výstupných parametrov s počtom  $n = 100$ , rozdelíme do  $i = 5$  podmnožín podľa hodnôt tak, že prvá podmnožina  $n_1$  s počtom  $n_1 = 1$  vykázala nulovú aktivitu, podmnožina  $n_2 = 22$ , vykázala 10%-nú aktivitu voči štandardu, podmnožina  $n_3 = 60$ , vykázala 20%-nú aktivitu voči štandardu,  $n_4 = 10$ , vykázala 30%-nú aktivitu voči štandardu a nakoniec podmnožina  $n_5 = 7$  vykázala 40%-nú aktivitu voči štandardu a žiadna vzorky nevykázala aktivitu vyššiu ako 40% hodnoty aktivity štandardu. Túto závislosť je vhodné znázorniť ako Histogram v podobe stĺpcového diagramu, ako to prezentuje nasledujúci Obrázok 26. Dátové body histogramu je možné znázorniť ako funkciu % aktivity štandardu ako X-Y závislosť. Nakoľko sa jedná o náhodné - normálové štatistické rozdelenie početnosti v rámci nejakej vlastnosti, platí pre túto závislosť Gausova funkcia a jednotlivé body je možné preložiť Gausovou krivkou v tvare podľa vzťahu (XXXVI) nasledovne:

$$Y = a * e^{-\left(\frac{(x-b)^2}{2 * c^2}\right)} \quad (\text{XXXVI}),$$

kde a, b a c sú konštanty, e je základ prirodzeného logaritmu, pre výpočet konštant a, b a c je určený špecializovaný softvér na lineárnu a nelineárnu regresiu, napríklad rada programov DataFit a DataFit X. Príklad preloženia nameraných bodov frekvenčného (ale i absolútneho) histogramu prezentuje Obrázok 26.



**Obrázok 28. Rozdelenie množiny n na podmnožiny  $n_1, n_2$  až  $n_i$ , histogram rozdelenia v podobe stĺpcového grafu a v podobe X-Y závislosti, preloženého Gausovou funkciou.**

Jednotlivé konštanty majú svoj význam, konštantu „b“ determinuje x-ovú súradnicu maxima krivky a istým spôsobom určuje posun krivky v smere x pokiaľ porovnávame viac kriviek vzájomne (viac nameraných účinkov pre tú istú kolekciu testovaných vzoriek). Parameter „c“ determinuje mohutnosť danej krivky, či je široká, alebo je úzka a istým spôsobom podáva informáciu či rozdelenie danej vlastnosti je široké, indukované nejakými premennými, alebo naopak úzke, javiac sa ako konštitutívne. Samozrejme je možný výčet konkrétnych vzoriek v každom bode stĺpčeka histogramu, respektíve v každom bode krivky, čo nadobúda význam v pozíciách za maximom krivky, kde sa nachádzajú vzorky účinnejšie ako je priemer množiny, vzhľadom na štandard. Podobne je možné z priebehu funkcie špecifikovať s akou pravdepodobnosťou je možné nájsť jednu vzorku s aktivitou na úrovni napríklad 50%, 70%, či 100% štandardu a k tejto pravdepodobnosti vypočítať koľko vzoriek by bolo treba testovať pre nájdenie jednej vzorky požadovanej účinnosti.

### 8.3.1.1 Porovnanie dát viacerých skríningových kolekcii

Ako príklad porovnanie je možné uviesť vlastné výsledky kolektívu autora, ktoré už boli publikované. S cieľom hľadať štatistický rozptyl konkrétnych parametrov v kolekcii

rôznych genotypov jačmeňa (*Hordeum vulgare*), ovsa siateho (*Avena sativa*), ďalej rôznych, prevažne farebných odrôd pšenice (*Triticum aestivum*), boli kolekcie koncipované tak, aby obsahovali modelovo  $n=100$  vzoriek genotypov, ktoré boli vyberané tak, aby maximálne možné pokrývali genotypovú a fenotypickú variabilitu, teda pripravené boli kolekcie maximálnej diverzity. Tieto štúdie mali jednoznačný cieľ a to pre potreby ďalšieho šľachtenia vybrať odrody, kde je predpoklad žiadanej genetickej individuality na jednej strane a na strane druhej by tieto vzorky mohli/mali byť zaujímavé pre prednostnú aplikáciu v potravinárskom priemysle pri výrobe tzv. funkčných potravín a nápojov, eventuálne zaujímavé pre izoláciu účinných látok a frakcií a možné farmaceutické aplikácie.

V druhom kroku, v súlade s plánovaným chemometrickým hodnotením boli stanovované parametre rozdelené na dve kategórie:

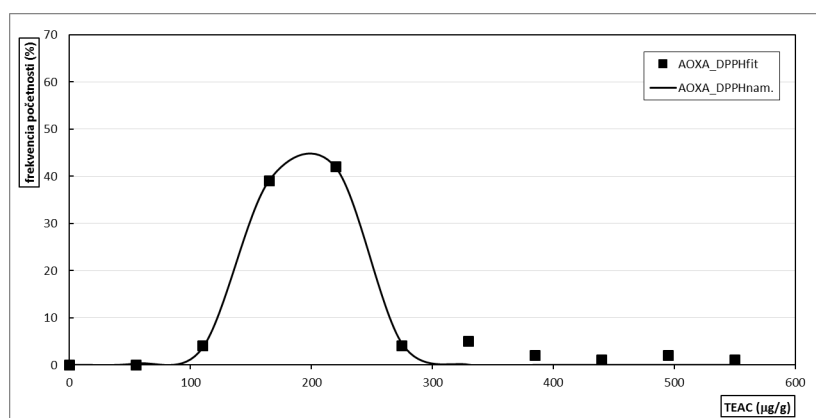
- kompozitné parametre stanovenia obsahu celkových polyfenolov (TPF), celkových polyfenolových kyselín (TPFA), celkových flavonoidov (TFI), celkových antokyánov (TAnt), celkových amínov (TA) a celkových tiolov (TT),
- aktivitné parametre:
  - aktivitné parametre antioxidačnej aktivity nazvané podľa príslušnej metódy (mechanizmu) antioxidačnej aktivity DPPH, ABTS, FRAP, RS,
  - aktivitné parametre inhibičnej aktivity na vybrané enzýmy, nazvané podľa príslušného enzýmu, známych z progresie konkrétnych humánnych patológií IA\_TY, IA\_TR, IA\_UR, IA\_CATB a pod.,

V rámci hodnotenia boli všetky vzorky,  $n=100$  početných kolekcii vybraných agrárnych komodít, podrobené stanoveniu vybraných kompozitných a aktivitných parametrov. Na výsledky bol uplatnený primárny a sekundárny dátový procesing. Celé kolekcie s  $n=100$  boli po výsledkov v rámci každého parametra delené do frekvenčných histogramov, vid' Obrázok 26. Pre lepšie pochopenie možno uviesť, že v prvom stĺpci histogramu sa nachádza počet odrôd z celej kolekcie  $n=100$ , ktoré dosahujú 0 až 10% hodnoty zvolenej maximálnej aktivity, v druhom stĺpci počet odrôd, ktoré dosahujú 10 až 20% hodnoty zvolenej maximálnej aktivity atď. Nakoľko je početnosť všetkých hodnotených kolekcii vhodne setovaná presne na  $n=100$  dané údaje v histogramoch sú absolútne početnosti a súčasne aj hodnoty vo frekvenčnom (percentuálnom) vyjadrení. Voľba maximálnej hodnoty aktivity sa odvíja buď od aktivity testovaného štandardu,

testovaných paralelne so vzorkami za rovnakých podmienok, alebo od maximálnej hodnoty, ktorá sa v testovanej množine vzoriek vyskytla.

### 8.3.2 Príklady konkrétnych histogramov, preložených Gausovou funkciou

Ak sa jedná o distribúciu nejakej, akejkoľvek vlastnosti v množine, v kolekcii testovaných vzoriek, priebeh distribúcie ako je to uvedené v texte vyššie by mala vystihovať Gausova funkcia, graficky prezentovaná Gausovou krivkou. Matematický tvar Gausovej funkcie prezentuje vzťah (XXXIII). Príklad distribúcie nasledovnej vlastnosti – antioxidačnej aktivity stanovenej metódou /mechanizmom zhášania radikálu/ DPPH, v kolekcii 100 vzoriek extraktov jačmeňa prezentuje nasledujúci Obrázok 29 (Maliar a kol., 2015).

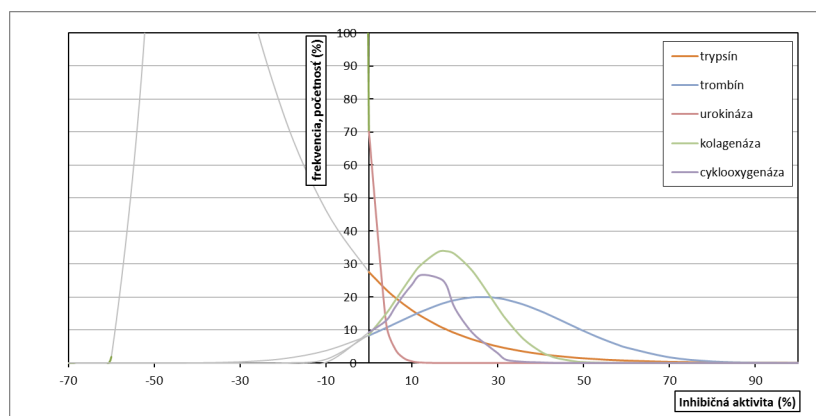


**Obrázok 29. Gausova krivka, fitujúca frekvenčný histogram rozdelenia vlastnosti – antioxidačnej aktivity metódou DPPH extraktov jačmeňa (n=100), v podobe X-Y závislosti, preloženého Gausovou funkciou.**

Tvar Gausovej krivky závisí od dvoch pohľadov, konkrétne od voľby mierky na osi x-ovej, kde môže byť mierka prispôbená jednému, konkrétnemu parametru, podstatne viac aplikovateľná je možnosť zobrazenia distribúcie viacerých vlastností v grafe, kde je nutné mierku upraviť na spoločný parameter. Túto možnosť prezentuje nasledovný Obrázok 30, kde je znázornená biologická aktivita – konkrétne inhibičná aktivita 100 početnej kolekcie vzoriek extraktov jačmeňa na 5 vybraných enzýmov, na trypsín (promótor pankreatických ochorení), trombín (promótor trombotických ochorení), urokinázu (promótor malígných nádorových ochorení, kolagenázu (promótor ochorení,



spojených s degradáciou extracelulárneho matrixu) a nakoniec na cyklooxygenázu (promótor zápalových ochorení a ochorení muskuloskeletálnej sústavy).



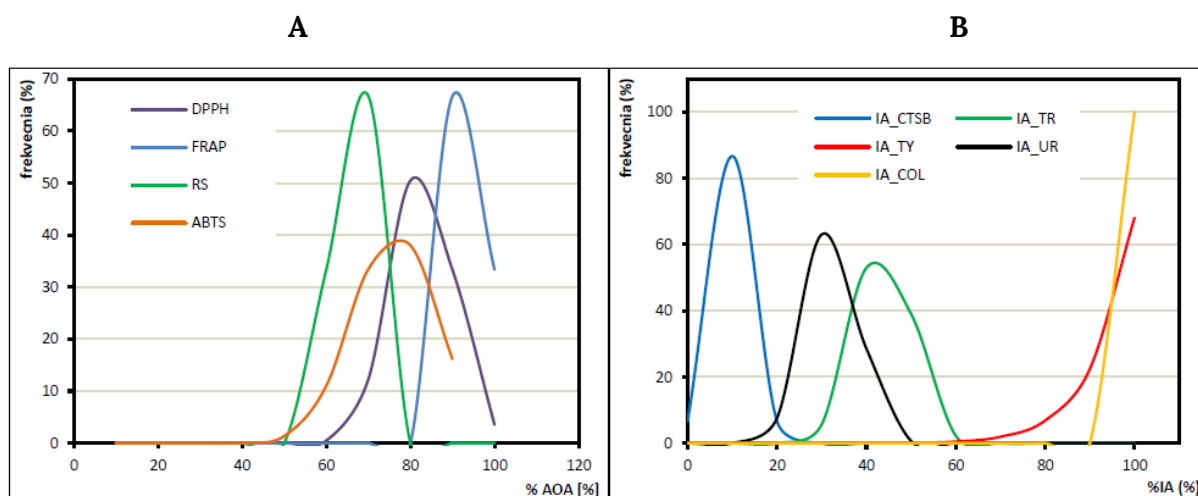
**Obrázok 30. Gausova krivka, fitujúca histogramy rozdelenia nasledovných vlastností – inhibičná aktivita n=100 početnej kolekcie vzoriek extraktov rôznych genotypov jačmeňa na proteolytické enzýmy (trypsín, trombín, urokináza, kolagenáza a cyklooxygenáza).**

Z grafu na Obrázku 30 je zrejme rôznych priebeh Gausovej funkcie pre jednotlivé enzýmy a tým determinovaný rôzny tvar Gausových kriviek. Poloha vrcholu krivky a jej pozícia, vzhľadom na os x determinuje s akou pravdepodobnosťou a akým významom má zmysel hľadať, očakávať danú vlastnosť – inhibičnú aktivitu v kolekcií vzoriek extraktov jačmeňa. Na prvý pohľad je zrejme, že jačmeň, plodina ako taká a výrobky z nej by mali vykazovať inhibičnú aktivitu na uvedené enzýmy v poradí klesajúceho inhibičného účinku: trombín>kolagenáza>cyklooxygenáza>urokináza>trypsín a v tomto istom poradí aj očakávať prevenciu, respektíve kuratívny účinok chorôb asociovaných z hyperaktivitou jednotlivých enzýmov pri konzumácii jačmeňa a výrobkov z nich.

Pre komplexnú ilustráciu sú v grafe naznačené pokračovanie distribúcií, preložených Gausovou funkciou v zápornom, nereálnom (virtuálnom) kvadrante ktorý demonštruje skutočnosť že rôzna pozícia krivky, pozdĺž osi x nám môže odhaliť celú krivku, respektíve len jej pol-vlnu, alebo len jej okrajový fragment. Jedná sa o čisto virtuálny, matematický pohľad.

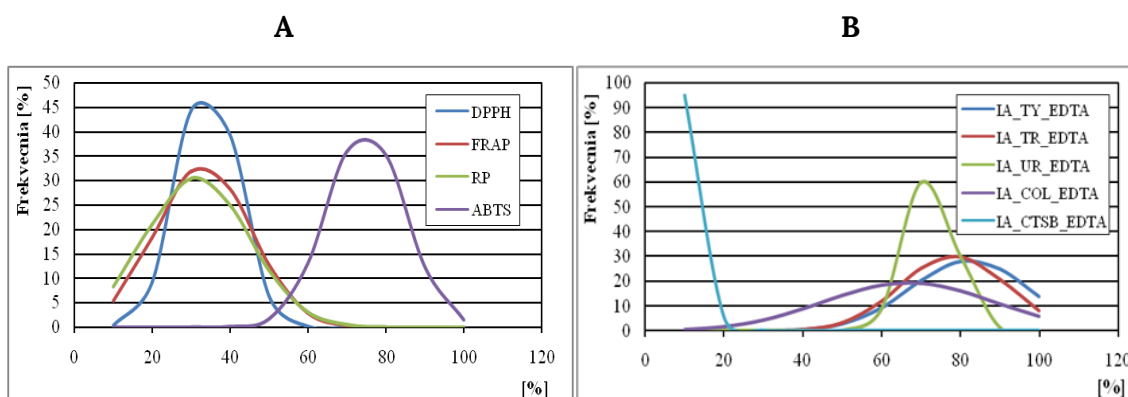
Tento prístup je uplatniteľný na vzorky akejkoľvek povahy, podmienkou je kolekcia dostatočne početnej množiny (ideálne n=100). Takýto spôsob interpretácie je uplatniteľný na látky, zmesné, chemické vzorky, vzorky extraktov rastlín, extraktov mikrobiálnych kultivátov, environmentálnych vzoriek, potravinárskych vzoriek a pod. Na ilustráciu

nasledujúci Obrázok 31 prezentuje distribúcie biologických aktivít, fitovanú Gausovou funkciou pre kolekciu potravinárskych odrôd maku siateho, n=15 (Krošlák a kol., 2017).



**Obrázok 31. Gausova krivka, fitujúca histogramy rozdelenia nasledovných vlastnosti, A – antioxidantná aktivita rôznymi metódami (mechanizmami), B – inhibičná aktivita na vybrané proteolytické enzýmy, n=15 početnej kolekcie vzoriek extraktov potravinárskych odrôd maku.**

Ďalší Obrázok 32 prezentuje distribúcie biologických aktivít, fitovanú Gausovou funkciou pre kolekciu vybraných vzoriek piva (n=30).



**Obrázok 32. Gausova krivka, fitujúca histogramy rozdelenia nasledovných vlastnosti, A – antioxidantná aktivita rôznymi metódami (mechanizmami), B – inhibičná aktivita na vybrané proteolytické enzýmy, n=30 početnej kolekcie vzoriek pív, získaných z obchodných reťazcov.**

### 8.3.3 Interpretácia parametrov Gausovej krivky

Pre účely porovnanie viacerých vzoriek (komodít) vzájomne medzi sebou, respektíve pre porovnanie viacerých vlastností v rámci jednej vzorky (komodity) je vhodné uviesť všetky možné intepretácie Gausovej krivky, Gausovej funkcie.

Parameter „a“ Gausovej funkcie, ktorou fitujeme získané údaje početnosti distribučných histogramov, či už v absolútnom vyjadrení, alebo vo frekvenčnom vyjadrení demonštruje výšku krivky. Parameter „b“ Gausovej funkcie demonštruje polohu maxima krivky vo vyjadrení rozmerovo osi „x“ a parameter „c“ vyjadruje šírku krivky v polovici výšky krivky, parameter  $r^2$ - korelačný koeficient určuje kvalitu miery fitovania nameraných údajov touto funkciou a súčasne aj skutočnosť, že nakoľko daný distribučný priebeh opisuje (vystihuje) Gausova funkcia.

Ako už bolo spomenuté, poloha vrcholu krivky, teda parameter „b“ determinuje s akou pravdepodobnosťou a akým významom má zmysel hľadať, očakávať danú vlastnosť v kolekcii vzoriek, respektíve pri porovnaní viacerých typov vzoriek (komodít), kde má zmysel danú vlastnosť očakávať.

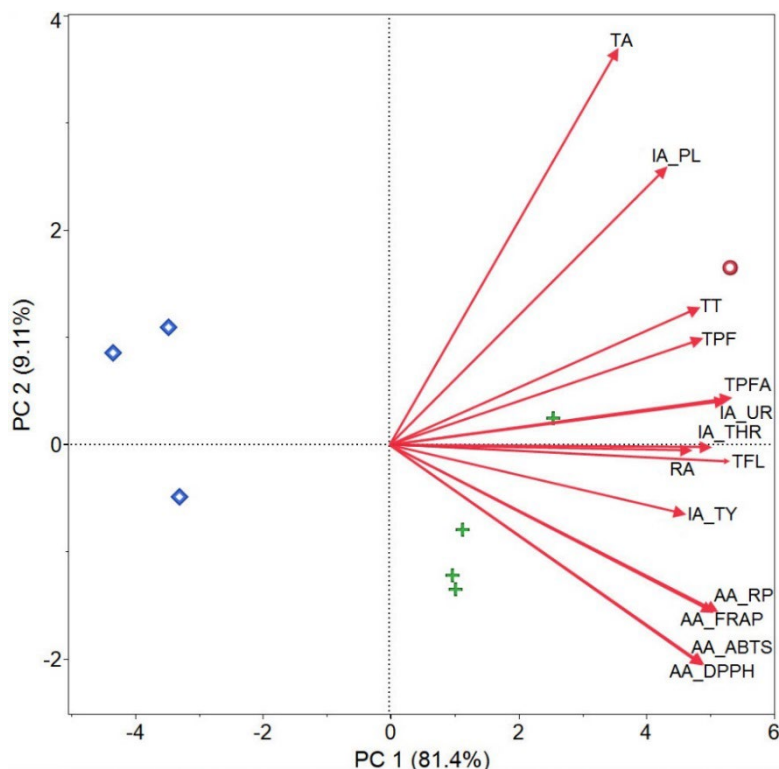
K logickej interpretácii Gausovej krivky sa viažu parametre „a“, „c“ a  $r^2$ . Parametre „a“ a „c“ určujú tvar krivky, sú vo vzájomnej, nepriamo úmernej relácii. Čím je krivky užšia (menšia hodnota parametra „c“) je tým pádom vyššia (väčšia hodnota parametra „a“) a často v týchto prípadoch má aj vyššiu hodnotu korelačného koeficienta „ $r^2$ “. Znamená to, že získané data sú štatisticky logické, „homogénne“ bez vedľajších vplyvov. Dva prípady kriviek s vysokými hodnotami korelačného koeficienta „ $r^2$ “ a súčasne s rôznymi hodnotami parametra „c“ indikujú či je daná vlastnosť úzko-variabilná (nižšia hodnota parametra „c“), alebo vysoko-variabilná (vyššia hodnota parametra „c“), čo je možné ohľadom vzoriek sekundárne aplikovať na poznatok, odkiaľ vlastnosť pochádza, teda že daná vlastnosť je konštitutívna, respektíve indukovaná /indukovateľná/ v prípade rastlinných vzoriek, alebo determinovaná viac- či menej technologickým procesom pri príprave potravinárskych vzoriek a pod. Týchto interpretácii je viac, závisia od povahy a podstaty testovanej vzorky.

Posledná interpretácia sa viaže ku konkrétnym vzorkám, ktorých data sú schované v stĺpci histogramu na konci Gausovej krivky, lokalizované za maximom krivky. Napríklad ak posledná nenulová hodnota početnosti je rovná hodnote 1 a súčasne odpovedá na osi x konkrétnej hodnote vlastnosti a tá je súčasne maximálna v hodnotenej kolekcii s  $n=100$ , znamená to že tak výnimočnú (kvalitnú, hodnotnú a pod.) vzorku môžeme nájsť s pravdepodobnosťou  $1/100$ , alebo naopak, aby sme našli jednu tak kvalitnú vzorku štatisticky musíme hľadať a testovať 100 vzoriek.

### 8.3.4 Analýza hlavných komponentov

Analýza hlavných komponentov („*Principal Component Analysis*“ – eng., skrátene PCA) je matematická štatistická metóda, ktorá využíva ortogonálnu transformáciu na to, aby previedla prvky množiny pozorovaní, u ktorých je možné, že sú korelované, na prvky takej množiny hodnôt, ktoré sú lineárne nekorelované. Tieto sa potom označujú ako hlavné komponenty. Pri analýze hlavných komponentov ide teda o to, že hľadáme takú množinu lineárnych kombinácií pôvodných premenných (pozorovaní), ktorá zachováva čo najväčšie množstvo informácií o pôvodných premenných (pozorovaniach) a zároveň jej dimenzia bude menšia alebo nanajvýš rovná ako dimenzia pôvodnej množiny (počet prvkov novej množiny bude menší alebo nanajvýš rovný ako počet prvkov pôvodnej množiny). Týmto postupom sa docieľa to, že bude možné študovať daný štatistický problém v podpriestore s menšou dimenziou, čo má veľký význam pri ďalšej analýze štatistického súboru /testovanie hypotéz, hľadanie oblastí spoľahlivosti, grafické znázorňovanie pozorovaní, a pod./ (Lamoš a kol., 1998). Toľko definícia. Ďalej v texte budeme používať zaužívanú anglickú skratku PCA analýzy. Nesporne má tento štatistický prístup, táto metóda mnoho aspektov a významov. My sa však v ďalšom zúžime na význam tejto štatistickej metódy pre štúdie biologickej aktivity *in vitro* kde poukážem na jeden dôležitý aspekt. Je ním skutočnosť že v testoch *in vitro* často krát dostaneme veľké množstvo údajov, v ktorých sa ťažko orientovať. Predstavme si že výsledková matica pozostáva z „n“ riadkov hodnotených entít a „m“ stĺpcov nameraných parametrov. Pokiaľ by sme spektrum „n“ hodnotených entít chceli posúdiť z pohľadu jedného parametra je to jednoduché, uplatníme na to štatistiku o jednej premennej (vygenerujem MAX, MIN, AVG a STD hodnoty). Pokiaľ z pohľadu dvoch parametrov, teda pohybujeme sa v dvojdimenzionálnom priestore to sa ešte dá, v troj- a „m“-dimenzionálnom priestore je to už nemožné. Potrebujeme systematickú redukciu „m“-rozmerného priestoru na dvoj, prípadne trojdimenzionálny priestor tak, aby sme si výsledkov vedeli znázorniť aj graficky. Systematicky znamená, že softvér vybavený na túto štatistickú operáciu vygeneruje dva alebo tri (podľa voľby) virtuálne parametre PCA1, PCA2, PCA3, pričom platí, že každý z tých PCA<sub>i</sub> parametrov je virtuálnou, lineárnou kombináciou reálnych jestvujúcich výstupných parametrov  $p_1$  až  $p_n$  na základe korelovateľnosti, viď definíciu o korelovateľnosti pôvodných premenných vyššie v texte. Laicky vysvetlené sa môže stať že prvá pôvodná premenná koreluje napríklad s treťou, piatou a siedmou a z nich sa vytvorí virtuálny

parameter PCA1. Podobne sa do PCA2 môže napríklad zliať druhá a štvrtá pôvodná premenná a do PCA3 šiesta, ôsma a deviata premenná a došli sme tak redukcie 9-rozmerného priestoru do trojrozmerný. To znamená, že miesto pôvodnej matice s „n“ entitami a 9-timi stĺpcami pôvodných premenných, máme teraz novú maticu zdôrazňujem virtuálnych, vypočítaných dát, ktorá pozostáva z „n“ entít a troch (PCA1, PCA2, PCA3) stĺpcov. Takto si vieme každú entitu z „n“-členného súboru znázorniť v trojdimenzionálnom priestore. V praxi sa častejšie používa redukcia „m“ dimenzionálnej matice na dvojrozmernú maticu dát (PCA1 a PCA2), čo je vhodnejšie pre formát tlačenej vedeckých časopisov, V princípe vieme týmto mechanizmom, touto metódou urobiť redukciu akéhokoľvek „m“-dimenzionálneho priestoru na dvoj, respektíve trojrozmerný. Samozrejme vhodnosť tejto redukcie nám popisuje kumulatívne percento, uvedené pod jednotlivými PCA<sub>i</sub> (i=2, alebo 3) parametrami. Pre potreby tohto skriptu vyberám kvôli jednoduchosti výsledok PCA analýzy 8-ich extraktov rôznych jedincov a taxónov šalvie *Salvia sp.*, (Vulganová a kol., 2019) ktorú prezentuje nasledovný Obrázok 33.



**Obrázok 33.** Dvojrozmerná PCA analýza všetkých primárnych údajov ôsmich extraktov zo *Salvia officinalis* L. (zelený križ), *Salvia divinorum*, *Salvia apiana* (červený kruh) a dvoch extraktov kalusových kultúr, odvodených zo šalvie(modré diamanty).

Na vysvetlenie Obrázku 30 je vhodné uviesť, že 8 pripravených extraktov šalvie, (6 z natívnych rastlín a dva z kalusov, odvodených od šalvie) bolo podrobených na obsah nasledovných kompozitných parametrov (TPF – obsah celkových polyfenolov, TPFA- obsah celkových polyfonických kyselín, TFL- obsah celkových flavonoidov, TA- obsah celkových amínov, TT- obsah celkových tiolov), ďalej na antioxidačnú aktivitu /AA/ nasledovnými metódami (DPPH, ABTS, RP a FRAP/, ďalej na inhibičnú aktivitu /IA/ voči nasledovným proteínázam (TY – trypsín, THR- trombín, PL-plazmín, UR-urokináza) a v neposlednom rade na analytický parameter na obsah kyseliny rozmarínovej (RA). Dvojrozmerná PCA analýza viedla ku vysokej hodnote kumulatívneho percenta 81,4% (PCA1) + 9,11% (PCA2) = 90,51%. Z prvého pohľadu na PCA graf je zrejmé, že pozície vektorov jednotlivých pôvodných premenných poukazujú na skutočnosť, že samostatný sub-klastor premenných tvoria AA všetkými metódami, ďalej zhruba ďalší zhhluk pôvodných premenných tvoria TPF TPFA, TFL, TT spolu s IA\_TY, IA\_THR, IA\_UR a RA a relatívne odlišný sub-priestor tvoria TA a IA\_PL. To poskytujú cenný zdroj informácií, ktorý typ sekundárnych metabolitov determinuje ktorý typ biologickej aktivity. Laicky vysvetlené, čím zvierajú vektory jednotlivých pôvodných premenných menší uhol, tým viac spolu súvisia. Napríklad ako sa zdá obsah kyseliny rozmarínovej v extraktoch /RA/ úzko súvisí s inhibičnou aktivitou na trombín, o niečo menej na trypsín a urokinázu.

### 8.3.5 Zhluková analýza

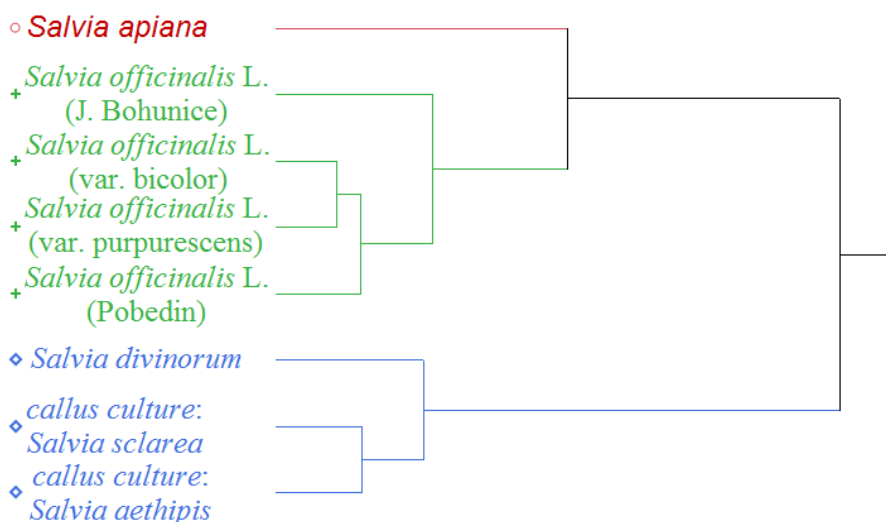
Zhluková analýza alebo klastrová analýza je „skupina metód, ktorých cieľom je rozklad súboru objektov na niekoľko relatívne rovnorodých podmnožín (zhlukov) tak, aby objekty patriace do rovnakého zhľuku si boli „čo najviac“ podobné, zatiaľ čo objekty pochádzajúce z rôznych zhľukov majú byť „čo najviac“ nepodobné.“

Klastrová analýza zahŕňa rôzne techniky, pričom sa členia na dve základné skupiny: hierarchické zhlukovacie metódy a nehierarchické zhlukovacie metódy. V rámci klastrovej analýzy sa rozlišujú sa 3 druhy úloh a to: nájsť dopredu nadefinované množstvo zhľukov, nájsť množiny zhľukov, ktorých počet nie je špecifikovaný, alebo vytvoriť hierarchický strom.

Pre všetky zhlukovacie metódy platí, že sú založené na niektorej miere vzdialenosti alebo podobnosti medzi jednotkami. Na výpočet vzdialeností možno použiť euklidovskú

vzdialenosť, Hammingovu vzdialenosť, Minkovskeho vzdialenosť alebo Mahalanobisovu vzdialenosť.

Pre logické a jednoduché vysvetlenie zhlukovej analýzy je možné použiť údaje, prezentované o výsledkov analýz obsahu bio-aktívnych komponentov a bio-aktivity 8 rôznych extraktoch natívnych rastliniek a kalusov šalvie, prezentované v predchádzajúcej kapitole. Poloha jednotlivých bodov - výsledkov jednotlivých extraktov šalvie v 2D-PCA grafe je pre vedca logická, pre laickú verejnosť ťažšie interpretovateľná. Tie isté dáta pôvodných premenných, začlenené do PCA analýzy je možné interpretovať prostredníctvom zhlukovej teda klastrovej analýzy („cluster analysis“ - eng. /CA/). Výsledok zhlukovej analýzy formou hierarchického stromu už vysvetlených pôvodných dát 8-ich extraktov matérie šalvie prezentuje nasledovný Obrázok 34.



**Obrázok 34.** Zhluková /CA/ analýza všetkých primárnych údajov ôsmich extraktov zo *Salvia officinalis* L. (zeleným), *Salvia apiana* (červeným) a *Salvia divinorum* + dvoch extraktov kalusových kultúr, odvodených zo šalvie (modrým).

Vo všeobecnosti platí, že v tomto type CA analýzy si treba všimnúť dĺžku úsečiek po najbližšie vetvenie. Z výsledkov CA analýzy na Obrázku 31 je zrejmé, že táto analýza odhalila zhluk, teda podobnosť všetkých vzoriek *Salvia officinalis* na jednej strane a *Salvia divinorum* spolu s extraktmi oboch kalusových kultúr na strane druhej. Úplne solitérne postavenie, ktoré vyplýva s odlišnosťou v bio-aktive extraktov vykázala *Salvia apiana*.

## 9 VÝZNAM TOHTO MATERIÁLU V KONTEXTE ŠTÚDIA

Prezentované skriptum s názvom: „ŠTÚDIE BIOLOGICKEJ AKTIVITY IN VITRO“ je na jednej strane len stručný výťah danej problematiky, ktorá je samozrejme veľmi obsiahla. Jeho cieľom je, respektíve bolo naznačiť čitateľovi danú problematiku v celej jej šírke. To znamená, počnúc teóriou k dizajnu a modelovaniu bio aktívnych molekúl pre ich výber pre hodnotenie v testoch biologickej aktivity *in vitro*, cez základy analytického stanovenia predovšetkým metódami HPLC až po samotné hodnotenie, primárny, sekundárny dátový „*procesing*“ až po aplikáciu nameraných dát pre štúdie typu SAR/QSAR.

Bohužiaľ pre komplexnosť, potrebnú pre výskum bioaktívnych molekúl ako kandidátov budúcich liečiv, je nutný taký široký záber a nutný je nadhľad nad základnými princípmi jednotlivých častí výskumu. Výskumu, kde úspešný výskumník v danej oblasti musí chápať všetky zložky tímu, ktorý nutne pozostáva z navrhovateľov (molekulových dizajnérov), chemikov (syntetikov, hľadačov reálnych štruktúr), analytikov, dátových analytikov až po biochemikov, ktorí prevádzajú samotné merania. Toto všetko tvorí jeden celok, ktorí sa snaží o objav nových kandidátov liečiv, preferenčne z oblasti jestvujúcich, prírodných látok, ale i syntetických látok a dokázať ich možný, terapeutický potenciál vedeckými metódami.

Ako autor by som rád týmito slovami o potrebe a komplexnosti takého výskumu uzavrel význam prezentovaného skripta v kontexte študijného materiálu, ktorý sa skrýva pod nie vždy na prvý pohľad jasným názvom – „bioaktivita“.

Pevne verím, že čitatelia tohto študijného materiálu si jeho čítanie užijú, podobne ako som si to užíval aj ja autor pri jeho písaní a koncipovaní a že im bude zaujímavým ale i praktickým sprievodcom pri ich výskume a v ich práci.



## 10 LITERATÚRA

- Debnath A.K.: Quantitative structure – activity relationship ( QSAR ) Paradigm – Hansh era to new millenium, *Mini Rev. Med. Chem.*, : 187 – 195, 2001.
- Ferreira M.M.C.: Multivariate QSAR, *J.Brazil.Chem.Soc.*, **13**: 742 – 753, 2002.
- Franke R. a Schmidt, W.: Parabolic relations between biological activity and hydrophobicity in congeneric series, *Acta Biol. Med. Ger.*, **31**: 273-287, 1973.
- Hansch C. a Fujita T.: r-s-p analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure, *J.Am.Chem.Soc.*, **86**: 1616 – 1626, 1964.
- Jhanwarb B. a kol.: QSAR - Hansch Analysis and Related Approaches in Drug Desig, *Pharmacologyonline* **1**: 306-344,2011.
- Krošlák a kol.: Antioxidant and Proteinase Inhibitory Activities of Selected Poppy (Papaver somniferum L.) Genotypes, *Chemistry and Biodiversity*, **14**: 1-10, 2017.
- Kubinyi H.: Quantitative structure – activity relationships. The bilinear model, a new model for nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character, *J.Med.Chem.*, **20**: 625 – 629, 1997.
- Kuchař M. a Rejholec V.: Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou, Academia, Praha, 264 s, 1987.
- Lamoš a kol.: Pravdepodobnosť a matematická štatistika - Štatistické analýzy. Bratislava, Univerzita Komenského v Bratislave, Vydavateľstvo UK, 344 s. 1998.
- Levine, I.: Quantum Chemistry, Prentice Hall, 4th edition, p.: 579–580, 1991.
- Maliar a kol., Structural aspects of flavonoids as trypsin inhibitors, *European Journal of Medicinal Chemistry* **39**: 241–248, 2004.
- Maliar a kol.: Antioxidants, Enzyme Inhibitors, and Biogenic Compounds in Grain Extracts of Barleys, *Chemistry and biodiversity*, **12**: 1678- 1694, 2015.
- Piršelová B., a Havrlentová M.: Alkaloidy rastlín a húb, 2022, 97 s., ISBN 978-80-572-0255-4.
- Ramak et al.: Biosynthesis, regulation and properties of plant monoterpenoids, *Academicjournals*, 9(28): 983 – 992, 2012.
- Remko M.: Medicínska chémia, SAP, spol. s.r.o., Bratislava, 315 s., 2002.
- Remko M.: Molekulové modelovanie (princípy a aplikácie ), Slovak Academic Press, Bratislava, 240 s., 2000.

Stewart, J.J.P.: *Reviews in Computational Chemistry*, **1**, Eds. K. B. Lipkowitz and D. B. Boyd, VCH, New York, 45, 1990.

Unger S.H. a Hansh C.: On model building in structure-activity relationships.

A reexamination of adrenergic blocking activity of b-halo-b-akrylalkylamines,  
*J. Med. Chem.*, **16**: 145 – 749, 1973.

Walsh C a Tang Y.: *Natural product biosynthesis*. 2017. OCLC 985609285.

**ŠTÚDIE BIOLOGICKEJ AKTIVITY IN VITRO  
(učebné texty)**

**Autor:**

doc. Ing. Tibor Maliar, PhD.

**Recenzenti:**

doc. RNDr. Renata Gašparová, PhD.

doc. Ing. Peter Šafář, PhD.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2023

Vydanie: prvé

Rozsah: 83 strán

Vydané: online <https://www.ucm.sk/sk/ucebne-texty-k-stiahnutiu/>

ISBN 978-80-572-0333-9