



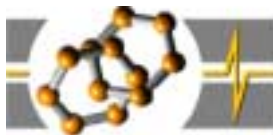
Ph.D. értekezés

**Fotoszenzibilizátorok felhalmozódásának
nyomonkövetése és mennyiségi
szerkezet – hatás összefüggései**

Vanyúr Rozália

Témavezető: Dr. Héberger Károly

Konzulens: Dr. Jakus Judit



MTA Kémiai Kutatóközpont
Kémiai Intézet
Bio-oxidációs csoport

2004.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	BEVEZETÉS.....	3
2.	IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ.....	6
2.1	Porfin-vázás molekulák gyógyászati alkalmazása.....	6
2.1.1	Fotodinamikus terápia.....	6
2.1.1.1	A fotodinamikus terápia története.....	6
2.1.1.2	A PDT mechanizmusa.....	8
2.1.1.3	Fotoszenzibilizátorok.....	9
2.1.2	Vírusellenes szerek.....	15
2.1.3	Porfirin koncentráció meghatározása szövetekben.....	16
2.2	Szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatok.....	20
2.2.1.	A modern QSAR története.....	20
2.2.2.	Tetrapirrol-vázás vegyületek QSAR tanulmányokban.....	23
2.2.3.	Paraméterek.....	25
2.2.3.1	Kísérletileg meghatározható leíró változók.....	25
2.2.3.2	Az elméleti molekuláris deskriptorok.....	25
2.2.3.3	Az indikátor, vagy nemvalódi változók.....	27
2.2.4	Változóselektálási módszerek.....	27
2.2.5	Modellezési eljárások.....	27
2.2.5.1	Többszörös lineáris regresszió (MLR).....	28
2.2.5.2	Parciális legkisebb négyzetek módszere (PLS).....	28
2.2.5.3	Mesterséges ideghálózatok (ANN).....	29
3.	KÍSÉRLETI RÉSZ.....	35
3.1	Szenzibilizátor – koncentráció meghatározás.....	35
3.1.1	Mérési módszer.....	35
3.1.2	Mérőműszer összeállítása.....	36
3.1.3	Vizsgált vegyületek.....	38
3.1.4	<i>In situ</i> mérések.....	40
3.1.5	<i>In vitro</i> mérések.....	41
3.1.5.1	Hematoporfirin koncentráció meghatározás májhomogenizátumban.....	41
3.1.5.2	Hp kalibráció májhomogenizátumban.....	41
3.1.6	Az <i>in situ</i> szenzibilizátor koncentráció kalibrálása.....	43
3.1.7	Az ACS3 felhalmozódási és kiürülési kinetikájának vizsgálata.....	49
3.1.8	Eredmények.....	51
3.2	Mennyiségi szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatok.....	51
3.2.1	Számítások menete.....	51
3.2.1.1	Geometria-optimalizálás és konformációanalízis.....	51
3.2.1.2	Leíró változók (deskriptorok).....	52
3.2.1.3	Többszörös lineáris regressziós számítások.....	54
3.2.1.4	Részleges legkisebb négyzetek módszere.....	54
3.2.1.5	Mesterséges ideghálózatok alkalmazása.....	55
3.2.1.6	Modellek ellenőrzése.....	56
3.2.1.6.1	<i>Bemenő adatok véletlenszerű összekeverése.....</i>	<i>56</i>
3.2.1.6.2	<i>Egy-elem-kihagyásos (leave-one-out, LOO) keresztellenőrzés.....</i>	<i>57</i>
3.2.1.6.3	<i>Több-elem-kihagyásos (leave-n-out, LNO) keresztellenőrzés.....</i>	<i>57</i>

3.2.1.6.4	<i>Ellenőrzés külső mintákon</i>	58
3.2.2	Pirofeoforbidok (PF) QSAR vizsgálata	58
3.2.2.1	Molekulák szerkezete.....	58
3.2.2.2	Mért PDT aktivitás és felhalmozódás.....	59
3.2.2.3	Biológiai aktivitás – lipofil jelleg összefüggések.....	59
3.2.2.4	A modellépítés eredményei.....	60
3.2.2.4.1	<i>Felhalmozódás</i>	60
3.2.2.4.2	<i>PDT aktivitás</i>	63
3.2.2.5	Következtetések.....	66
3.2.3	Porfirin és rokon vegyületek QSAR vizsgálata	68
3.2.3.1	Molekulák szerkezete.....	68
3.2.3.2	Biológiai adatok.....	69
3.2.3.3	Modellépítés eredményei.....	69
3.2.3.4	Az egyes deszkriptorok és az anti-HIV-1 aktivitás közötti összefüggések.....	71
3.2.3.5	Modellek ellenőrzése.....	73
3.2.3.6	Modellépítési eljárások összehasonlítása.....	75
3.2.3.7	Tervezett molekulák anti-HIV-1 aktivitásának becslése.....	76
3.2.3.8	Következtetések.....	78
4.	EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA TÉZISPONTOKBAN	79
5.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	82
6.	IRODALOMJEGYZÉK	83
7.	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	94

1. BEVEZETÉS

A modern orvostudomány a porfirin-vázis és rokon vegyületeket, mint fotoszenzibilizátorokat egyre szélesebb körben alkalmazza terápiás célokra. Fontos felhasználási területük a fotodinamikus terápia (nemzetközi nevén Photodynamic Therapy, PDT), ami egy olyan, főleg daganatos sejtek elpusztítására kifejlesztett kezelés, melynek során egy szelektíven felhalmozódott fényérzékenyítő vegyület (szenzibilizátor) és a szöveten áthatoló látható fény együttes alkalmazása oxigén jelenlétében olyan biokémiai folyamatokat indukál, amelyek a rákos sejtek pusztulásához vezetnek. A PDT egyéb, nem tumoros megbetegedések (pl. pikkelysömör (psoriasis), érlemezésedés (atherosclerosis), érvisszaszűkülés (vascular restenosis), ízületi gyulladás (rheumatoid arthritis), illetve az időskori vakság egyik fajtája, a makula degeneráció) kezelésére is alkalmas. Ezenkívül rovar-, illetve baktériumölő hatása is ismeretes.

A porfirin származékok egy másik fontos alkalmazási területe a vér és vértermékek fotodinamikus sterilizálása. Számos vértranszfúzióval terjedő kórokozó, mint például a szerzett immunhiányos betegséget kiváltó HIV-1 vírus, valamint a vírusos májgyulladás patogénjei is elpusztíthatók ezzel a módszerrel anélkül, hogy a vörös vértestek károsodnának. Több, fotoszenzibilizátorként megismert vegyület viszont fotodinamikus effektus nélkül is képes inaktiválni a HIV-1 vírust.

A PDT széleskörű klinikai bevezetésének egyik legfontosabb akadálya, hogy a forgalomban lévő szenzibilizátorok nem elég tiszták, illetve hatékonyak, ezért a porfirin-vázis fotoszenzibilizátor vegyületek fejlesztése a gyógyszerkutatás egyik kiemelt feladata. A fejlesztés ciklusai három nagyobb fázisra bonthatók:

1. Új vegyületek izolálása vagy szintézise.
2. Tesztelése biológiai rendszerekben.
3. Aktivitásadatok értékelése és felhasználása hatékonyabb szenzibilizátorok tervezéséhez.

A világ számos laboratóriumában foglalkoznak új szenzibilizátorok előállításával, köztük Magyarországon is [1,2], de a vegyületek nagyrésznél a biológiai tesztelés a munka bonyolultsága miatt mindeddig nem történt meg. A fotodinamikus aktivitás megállapításának szempontjából fontos, hogy a bevilágítás olyan pillanatban történjen meg, amikor a szenzibilizátor koncentráció aránya a kezelendő és az egészséges szövetek között optimális: vagyis a minél nagyobb, tumorban mért porfirin koncentráció mellett minél kisebb mennyiségű hatóanyag legyen az egészséges szervekben. Emellett, a különböző szervek szenzibilizátor tartalmának időbeli változása is egy fontos jellemző a vegyület gyógyászti alkalmazhatóságának vizsgálatánál. Ezért a tesztelés első, elengedhetetlen lépése a szenzibilizátorok felhalmozódásának nyomonkövetése a biológiai rendszerben.

Mivel egy új vegyület fotodinamikus aktivitásának meghatározása költséges és munkaigényes állatkísérletekben vagy sejtenyészetekben történik, az ígéretes fotoszenzibilizátorok és vírusellenes szerek kiválasztásában és fejlesztésében fontos szerepet kaphatnak a mennyiségi szerkezet – hatás összefüggés (QSAR) vizsgálatok. Ezekben ismert biológiai aktivitású molekulák alapján épített modellekkel becsülhető az eddig nem vizsgált porfirinek aktivitása. A hatástalan molekulák szintén elkülöníthetők pusztán kémiai szerkezetük alapján anélkül, hogy szintetizálnánk és bonyolult biológiai rendszerekben tesztelnénk azokat. Az irodalomban eddig fellelhető szerkezet - hatás összefüggés (SAR) vizsgálatokban a kísérleti munka bonyolultsága miatt csak kevés számú szenzibilizátor molekula biológiai aktivitását mérték meg azonos körülmények között s így az eredmények önmagukban nem alkalmasak a hatásosság előrejelzésére. Emellett, a különböző tanulmányok nagy számú aktivitásadata sem vethető össze egy QSAR vizsgálatban, mivel a világ laboratóriumaiban különböző módszerrel mérték meg és egymástól eltérő egységekben fejezték ki a szenzibilizátorok biológiai aktivitásait.

Munkánk célja, hogy hatékony fotoszenzibilizátor molekulák fejlesztéséhez járuljunk hozzá, amelyhez a jövőben nagyobb számú porfin-vázis vegyület fotodinamikus aktivitásának meghatározását tervezzük azonos laboratóriumi körülmények között. Első lépésként egy, a fenti vizsgálathoz kapcsolódó analitikai módszer kifejlesztését és a porfirinek mennyiségi szerkezet – hatás összefüggés vizsgálatára alkalmas kemometriai módszerek kiválasztását tűztük ki célul.

Ezért dolgozatom része egy olyan mérőrendszer és mérési módszer beállítása, amely kereskedelemben nem kapható és alkalmas a sejtekben illetve állati szövetekben felhalmozódott szenzibilizátor nyomonkövetésére és mennyiségi meghatározására száloptikás *in situ* fluoreszcens detektálással. A módszer lehetővé teszi, hogy nagyszámú porfin-vázis vegyület szöveti koncentrációját határozzuk meg rövid idő alatt, az extrakciós módszereknél jóval kevesebb állat felhasználásával.

A kísérleti munkával párhuzamosan irodalmi biológiai aktivitás adatok alapján választottuk ki a fotodinamikus aktivitás, a szelektív felhalmozódás valamint a nem fotodinamikus anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésére legalkalmasabb modellépítési eljárásokat. Kiszámú, homológ vegyület és nagyobb számú, szerkezetükben jobban eltérő szenzibilizátor tanulmányozása során lineáris és nemlineáris, változó kiválasztásra és modellépítésre alkalmas kemometriai módszereket hasonlítottunk össze a vizsgált aktivitásokat előrejelző tulajdonságaik alapján.

Ezek a mérési technikák és vizsgálati módszerek alapozzák meg a nagyobb számú (35-40) molekulát magába foglaló, nemzetközi együttműködés keretein belül tervezett saját kísérleti méréseinket, s az ezt követő szerkezet – hatás vizsgálatot.

2. IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

2.1. Porfin-vázis molekulák gyógyászati alkalmazása

2.1.1. Fotodinamikus terápia

A PDT egy szelektíven felhalmozódott fényérzékenyítő vegyület (szenzibilizátor) és a szöveten áthatoló fény együttes alkalmazása oxigén jelenlétében. A terápia első lépéseként a szenzibilizátort beadják a betegnek. A szer a véráramon keresztül eljut a szövetekbe, majd szenzibilizátoronként különböző idő elteltével az egészséges szövetekből kiürül, míg a daganatos szövetekben többé-kevésbé szelektíven felhalmozódik. A terápia második lépéseként a daganatot látható fénnel bevilágítják, minek hatására a szenzibilizátor gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztett molekulák több módon veszíthetik el többlet energiájukat, miközben olyan biokémiai folyamatokat indukálnak, amelyek a sejtek pusztulásához vezetnek.

2.1.1.1. A fotodinamikus terápia története [3,4]

E kevésbé ismert terület érdekes múltja ad okot egy kis történelmi kitérőre. Az emberiség már évezredekkel ezelőtt felismerte, hogy a napfény jótékony hatással van az egészségre. Az ókori Egyiptomban, Kínában és Indiában bőrbetegségek, pl. pikkelysömör, bőrpigmenthiány (vitiligo) és tumorok kezelésére alkalmazták, de az angolkórt és az elmebajt is gyógyították fényterápiával. Az ókori görögök és rómaiak külön helyiséget (szoláriumot) építettek arra, hogy napfürdőzzenek, s a napfürdőkúrát a gyógyászatban is alkalmazták, pl. a vitiligo és az izomsorvadás kezelésére. A XVIII. és XIX. századi Franciaországban ugyancsak napfénnel kezelték tuberkulózist, angolkórt, skorbutot, reumát, paralízist, ödémát és izomsorvadást. A fényterápiát a XX. század elején Niels Finsen fedezte fel újból, s a himlő elgennyesedésének megelőzésére vörös fénnel világította be a beteg bőrt. Később a bőrtuberkulózist (lupus vulgaris) szénszálas ívfénnyel előállított UV fénnel kezelte, amiért 1903-ban Nobel

díjat kapott. Fényterápia során, a sejten belüli kromofór vegyületek elnyelik a fényt, míg a fotokemoterápiánál egy kívülről bevitt kromofór és a fény együttes alkalmazásával érhető el a gyógyító hatás.

A fotokemoterápiával szintén az ókori civilizációkban találkozunk először. Indiában a vitiligo kezelésére a beteggel furokumarint tartalmazó *Psoralea corylifolia* kivonatot etettek, mielőtt napfényre fektették. Az első újkori alkalmazást Oscar Raab közölte 1900-ban. Megfigyelte, hogy az akridin narancs és a fény együttesen képes a *Paramecium* sejteket elpusztítani. Hermann von Tappeiner a jelenség magyarázatának kutatásakor felismerte, hogy az oxigén jelenléte nélkülözhetetlen a sejtpusztító hatás kifejeződéséhez. A jelenséget fotodinamikus effektusnak nevezte el. A fotodinamikus terápia a fotokemoterápiának egy, a fotodinamikus effektuson alapuló szűkebb területe; fotoszenzibilizátor és fény együttes alkalmazása oxigén jelenlétében. 1903-ban von Tappeiner és Jesionek bőr tumorokra alkalmazták a helyi eozinos kezelést követő bevilágítást. Két évvel később már különféle szenzibilizátorok és fényforrások használatával egészítették ki kísérleteiket.

Policard 1924-ben megfigyelte, hogy a természetes porfirinek fluoreszcenciája tumoros sejtekben megnő. A második világháború alatt Auler és Banzer német tudósok egyértelműen kimutatták a tumor fotonekrózis jelenségét. 1948-ban Figge és munkatársai fluoreszcenciás módszerrel detektálták, hogy a természetes porfirinek (hematoporfirin és cink komplexe) egér tumorokban felhalmozódnak. 1960-as években Winkelman szintetikus porfirineket (tetrafenil-szulfonátokat) használt a tumor kimutatására. 1955-ben Schwartz felfedezte, hogy az azidáig hematoporfirinnek nevezett anyag különböző tulajdonságú porfirinek keveréke, majd 1961-ben izolált egy tumorban felhalmozódó komponenst (Hp Derivative, HpD). Lipson a HpD-t a tumoros szövetek kimutatására használva azt tapasztalta, hogy a vegyület fotoszenzibilizátorként viselkedik és pusztítja a tumoros szöveteket. Az 1970-es években Dougherty újra izolálta a HpD-t, amiről kiderült, hogy acetilált porfirin oligomerek keveréke.

A legaktívabb HpD frakciót az 1980-as években választotta el, ami Photofrin II (QLT PhotoTherapeutics Inc.) néven került forgalomba.

2.1.1.2. A PDT mechanizmusa

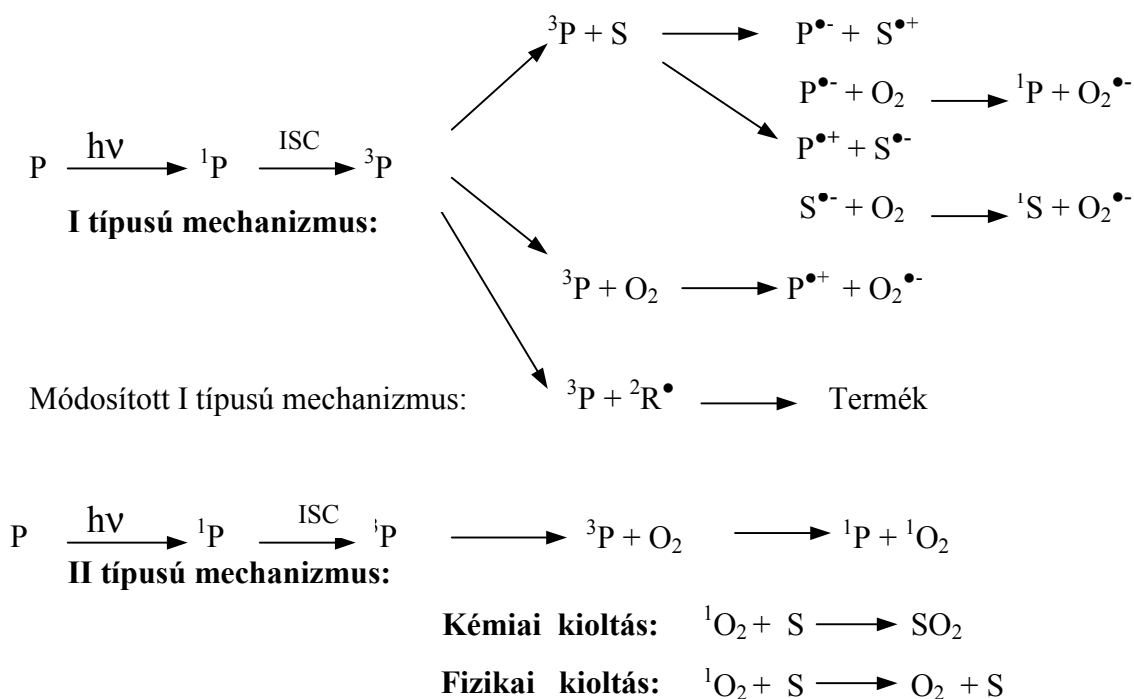
Már az 1930-as években több különböző elmélet született a fotodinamikus terápia mechanizmusának magyarázatára. A ma is érvényesnek tekintett mechanizmus szerinti szingulett oxigén képződést Kautsky 1931-ben kísérletileg igazolta [5]. Szerinte a gerjesztett szenzibilizátor aktiválja a környezetében lévő alapállapotú oxigén molekulát (1. ábra, II típusú mechanizmus). A PDT szempontjából meghatározó a fotoszenzibilizátoron keresztül képződő szingulett oxigén mennyisége, amelynek mechanizmusa mára már jól ismert [3,6].

Ebben a folyamatban a triplett állapotú szenzibilizátor egy elektroncserélődéses energia átvitelen keresztül adja át felesleges energiáját a környezetében lévő alapállapotú oxigén molekulának. A keletkező szingulett oxigén élettartama kicsi (vizes közegben néhány μs), nagyon reaktív, emiatt a fotodinamikus károsodás helye a fotoszenzibilizátor közvetlen környezetére korlátozódik.

Az I-es mechanizmus meghatározó lehet oxigénhiányos környezetben, illetve akkor, ha a szenzibilizátor koncentrációja magas [3]. Ezekben az esetekben a szenzibilizátor és egy szubsztrát reakciójából keletkezett gyökök reagálhatnak a molekuláris oxigénnel, ami főleg szuperoxid-anion gyök képződéséhez és ugyancsak irreverzibilis oxidatív sejtkárosodáshoz vezethet. A módosított I-es mechanizmus szerint közvetlenül a triplett állapotú szenzibilizátor is reagálhat a környezetében lévő gyökökkel [7].

A legtöbb porfin-vázis szenzibilizátor a sejtszervecskék membránjaiban lokalizálódik. A membránok biomolekulái és a szingulett oxigén reakciójából keletkező peroxidok morfológiai változásokhoz vezetnek, amit a transzport tulajdonságok megváltozása, valamint az enzimaktivitások csökkenése követ. Ez gátolja a sejtek működését.

1. ábra. A PDT lehetséges mechanizmusai



P: alapállapotú fotoszenzibilizátor, ${}^1\text{P}$:szingulett gerjesztett fotoszenzibilizátor, ${}^3\text{P}$: triplett gerjesztett fotoszenzibilizátor, $\text{P}^{\bullet-}$ és $\text{P}^{\bullet+}$: ionizált gyökös szenzibilizátorok, S: szubsztrát, $\text{S}^{\bullet-}$ és $\text{S}^{\bullet+}$ ionizált gyökös szubsztrátok, O_2 : alapállapotú (triplett) oxigén molekula, ${}^1\text{O}_2$: szingulett gerjesztett oxigén, $\text{O}_2^{\bullet-}$:szuperoxid-anion gyök, ${}^2\text{R}^{\bullet}$:szabadgyök, ISC: spinváltó átmenet.

2.1.1.3. Fotoszenzibilizátorok

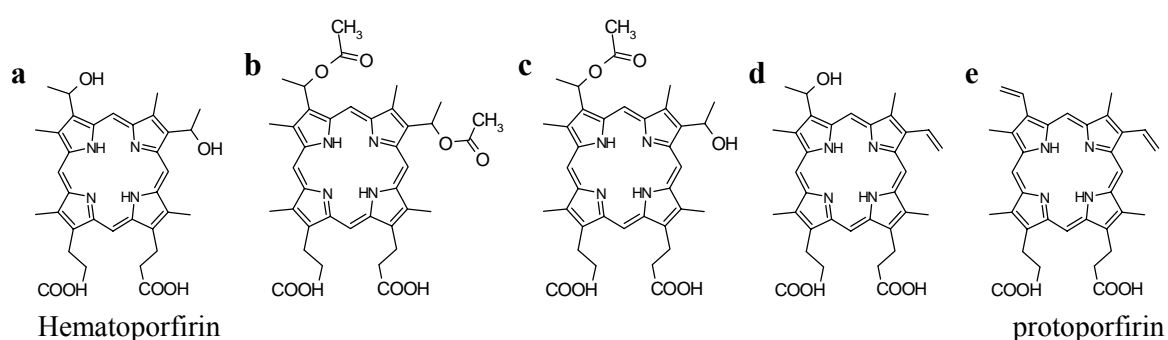
A PDT-ben alkalmazható lehetséges szenzibilizátor vegyülettel szembeni elvárás az, hogy (i) kémiaileg tiszta legyen; (ii) tárolás során ne veszítsen a stabilitásából; (iii) bevilágítás nélkül ne legyen toxikus; (iv) szelektíven halmozódjon fel a tumorban majd az egészséges szövetekből gyorsan kiürüljön; és (v) moláris abszorpciós koefficiense viszonylag nagy (optimális esetben $\epsilon \geq 50000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) legyen a látható fény vörös tartományában (600-800 nm), ahol a fény legmélyebbre képes behatolni a szövetekbe. A humán gyógyászatban elsőként és ma is széles körben alkalmazott Photofrin II[®] a fenti követelményeknek több szempontból sem felel meg, ezért van szükség új, hatékonyabb fotoszenzibilizátorok fejlesztésére.

A mára előállított fotoszenzibilizátorok három csoportba sorolhatók:

1) Az első generációs szenzibilizátorok közé a HpD (Hematoporphyrin Derivative), a Photofrin[®], illetve Photoheme tartozik [5].

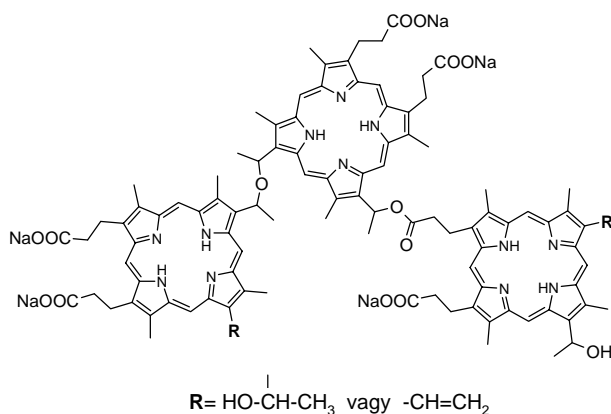
A hematoporfirin (2a ábra) az egyik, tisztán a legnehezebben előállítható természetes porfirin, mivel két nagyon reaktív benzil-alkoholszerű funkcióscsoporttal rendelkezik. A szárított vér tömény kénsavas kezelésével kapott terméket ecetsavban 5 %-os kénsavval tovább tisztítva a hematoporfirin származék első frakciójához (HpD I) jutunk.

2. ábra. Az első hematoporfirin frakciót alkotó porfirin monomerek



A HpD I fő alkotóeleme a *b* jelű hematoporfirin diacetát.

3. ábra. A Photofrin II[®] dimerek és oligomerek keveréke, amelyekbe 1-7 porfirin molekula kapcsolódhat össze éter, illetve észter kötésekkel [9].



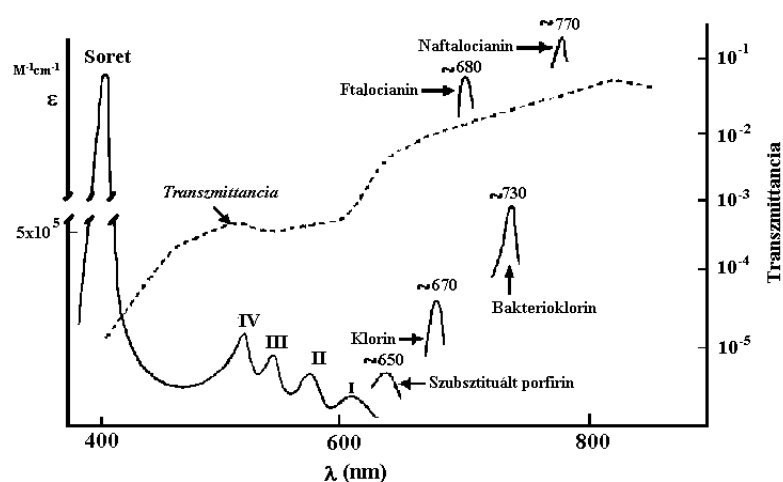
A HpD I lúgos kezelésekor az acetát csoportok hidrolízisével porfirin monomerek állíthatók elő, és a közeg kedvez az oligomerek kialakulásának is. Az 1980-as években nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszerrel elválasztott oligomer frakció

biológiailag igen aktívnak bizonyult, amelyet Photofrin II[®] néven hoztak forgalomba (3. ábra).

2) A második generációs fotoszenzibilizátorok már egyértelműen meghatározható szerkezetű molekulák, amelyek a vörös tartományban is elnyelik a fényt. Ilyen vegyületek, pl. a hematoporfirin és a protoporfirin különböző szubsztituált származékai, a mezo-tetrafenilporfirinek, benzoporfirinek, klorinok, feoforbidok, bakterioklorinok, a texapirinek és a ftalocianinok [5,9,10].

A porfirin-vázú vegyületek előnye, hogy jó hatásfokkal generálnak fotokémiai reakcióban szingulett oxigént, nem toxikusak, a látható fény vörös tartományában nyelnek el és meglehetősen stabilak. Ez utóbbi tulajdonságuk egyben hátrányuk is, mivel a szövetből való kiürülésük lassú. A legtöbb újonnan szubsztituált porfirin esetében a legalacsonyabb energiájú abszorpciós csúcs eltolódik a vörös tartomány felé és/vagy intenzitása megnő (4. ábra). Mivel a molekula a szövet mélyebb rétegeiben is gerjeszthető, a PDT aktivitása több tízszeresére is nőhet a HpD-éhoz képest.

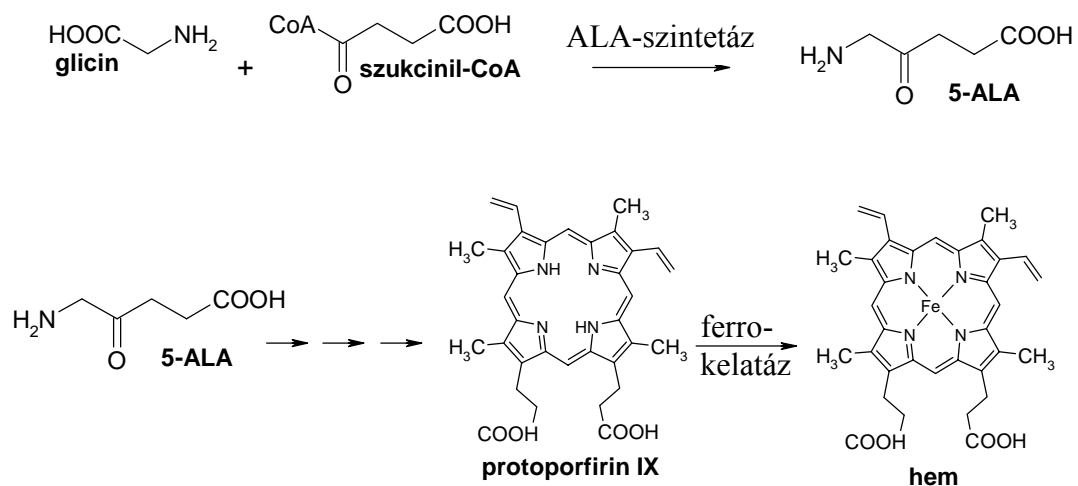
4. ábra. Fotoszenzibilizátorok abszorbanciája és a szövetek fényáteresztő-képessége közötti kapcsolat. Az új vegyületsaládok esetében csak az I jelű sáv jellegzetes porfirin spektrumtól (bal oldali teljes spektrum) való eltérése látható [5].



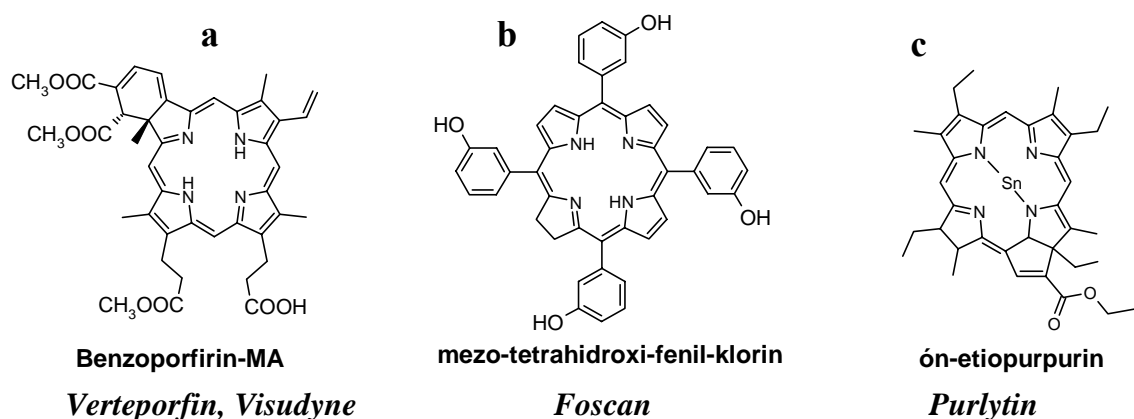
A fotoszenzibilizátor-fejlesztés egyik legérdekesebb iránya, amikor a szervezetben, bioszintézis útján állítanak elő nagy mennyiségű protoporfirint. Ennek elmélete, hogy a hem

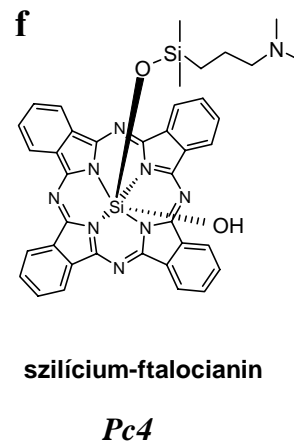
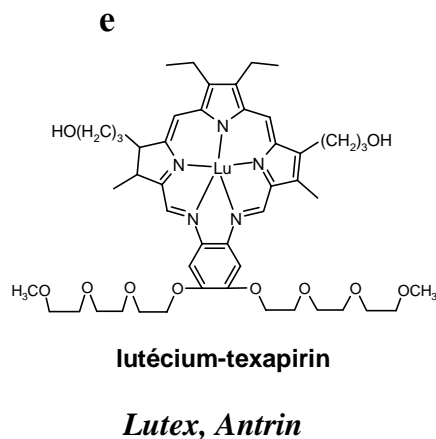
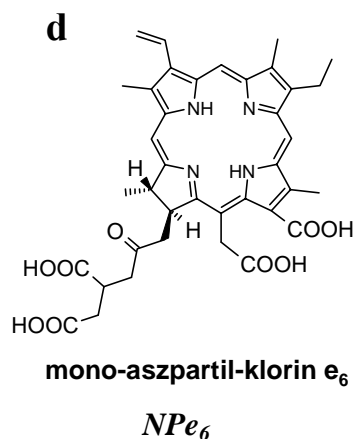
bioszintézis (5. ábra) sebességmeghatározó lépése a glicin és a szukcinil-koenzim A δ -aminolevulinsavvá (5-ALA) alakulása. A lépést negatív visszacsatolás kontrollálja, vagyis bizonyos szabad hem mennyiség felett a szintézis leáll [12]. A hem a ferrokelatáz enzim működését szintén gátolja. Az 5-ALA koncentrációt mesterségesen megnövelve, a hem bioszintetikus apparátus természetes porfirint, protoporfirin IX-et állít elő és halmoz fel. Az 5-ALA injekcióban, szájon át illetve krémbe, közvetlenül a kezelendő területre vive is eljuttatható a beteg szövetbe.

5. ábra. A hem bioszintézis [11-13] egyszerűsített vázlata



6. ábra. Klinikai kipróbálás alatt álló második generációs fotoszenzibilizátorok [3,14-16] (dőlt betűvel a vegyületek gyári neve olvasható)





A protoporfirin IX számos benzoporfirin származék (BPD) szintézisének kiindulási anyaga is egyben. PDT hatás szempontjából a porfin-váz A gyűrűjéhez kapcsolódó benzo-származék monokarbonsavas analógja (BPD-MA, 6a ábra) a leghatékonyabb. Hátránya, hogy nem szelektív módon halmozódik fel a daganatokban, valamint nagyon gyorsan kiürül a vérből és a szövetekből, beleértve a tumoros szöveteket is. Ez a tulajdonsága viszont alkalmassá teszi a retina érújráképződés és az időskori makuladegeneráció kezelésére, ahol a bevilágítást kevéssel a szenzibilizátor beadása után végzik. A vegyület Visudyne (injekcióban Verteporfín) név alatt került forgalomba.

A mezo-tetrafenilporfirin család legígéretesebb tagja az 5,10,15,20-tetrakis-(m-hidroxifenil)-porfin, ami laboratóriumi vizsgálatokban jelentős fototoxikus hatást mutatott, és 25-30-szor hatékonyabbnak bizonyult, mint a HpD.

A klorin és bakterioklorin típusú molekulák esetében a porfirin vázban egy, illetve két kettőskötés telített, emiatt erős abszorpciós maximumuk van 650 illetve 710 nm körül. A mezo-tetrahidroxifenil-klorin szingulett oxigén generálási kvantumhatásfoka magas, fotobiológiai aktivitása kb. 100-szorosa a 10-20-szoros fénydózissal bevilágított, 20-szor nagyobb koncentrációban beadott Photofrin II[®] aktivitásnak. A vegyület sikeresen alkalmazható nyelőcső-, gége-, mellkasi, tüdő- és bőrrák kezelésére. Foscan néven került kereskedelmi forgalomba. A család másik ígéretes tagja az ón-etioapurin, ami visszatérő metasztázisos mellrák és szaruhártya érújráképződés esetén alkalmazható eredményesen.

A klorofill lebontás intermedier molekulái, a forbidok és a feoforbidok, szintén intenzíven kutatott vegyületcsoport. Előnyük a Photofrin II[®]-höz képest, hogy fényelnyelésük a vörös régióban 660 nm fölött van, s az egészséges szövetekből gyorsabban kiürülnek.

A texapirin típusú molekulák vízben jól oldhatók, 5 planáris N atomot tartalmaznak és 720-760 nm körül gerjeszthetők. Ez a hullámhosszúságú fény a pigmentált vagy vérben gazdag szövet mélyebb régióiba is behatol, így a vegyület alkalmas melanoma kezelésére is.

A ftalocianinok szintén ígéretes második generációs fotoszenzibilizátorok. Az alapvázukban lévő négy izoindol gyűrűt nitrogén atomok kapcsolják össze. Abszorpciós spektrumukban a porfin-vázis vegyületekre jellemző Soret sávon kívül nagyon erős csúcs jelenik meg 680 nm körül is. Moláris abszorpciós koefficiensük két nagyságrenddel nagyobb ($\epsilon \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), mint a HpD hasonló tulajdonsága. A viszonylag magas triplett képződés kvantumhatásfok ($\Phi_T > 0.4$) és triplett élettartam ($\tau_T > 200 \mu\text{s}$) a Zn^{2+} , Al^{3+} és Ga^{3+} központi fématomot magában foglaló vegyületeket alkalmassá teszi fotoszenzibilizátorként való felhasználásra. A vízoldható ftalocianinok (szulfonált, karboxilált származékok) aggregációra hajlamosak, ami a fotodinamikus aktivitás elvesztéséhez vezethet. Az aggregáció kiküszöbölhető a molekulák nanorészecskékhez való kötésével. A szilikon ftalocianin (Pc4) a rákos megbetegedések kezelésénél valamint a vér és vértermékek sterilizálásánál alkalmazható. A cink-ftalocianint fázis I/II-ben vizsgálják svájci orvosok felső emésztőszervek laphámkarcinóma kezelésére. A Photosense márkanév alatt ismert szulfonált ftalocianinok keverékét Oroszországban több mint száz betegen tesztelték. Bazális és laphám sejteket érintő bőrtumorok, különféle nyaki és fejtumor, mellrák, nyelv, száj nyálkahártya, alsóajak, tüdő, gége és egyéb rákok gyógyítására alkalmazták 0,1-1 mg/kg koncentrációban. Az esetek 50%-ban teljes gyógyulást tapasztaltak. Bőrrákok esetében a gyógyulás a 85%-ot is elérte.

2.1.2. Vírusellenes szerek [17,18]

Az utóbbi évtizedekben előtérbe kerültek a vértranszfúzió biztonságossá tétele érdekében folytatott fejlesztések. Számos kórokozó, pl. a szerzett immunhiányos betegséget (AIDS) okozó HIV vírusok, a T-sejt leukémiát illetve limfómát okozó HTLV vírusok, a vírusos májgyulladás HAV, HBV és HCV vírusai, vérkészítményeken keresztül fertőzőek. Afrikában, Ázsiában és Dél-Amerikában a malária és tripanoszóma jelent komoly problémát [19,20].

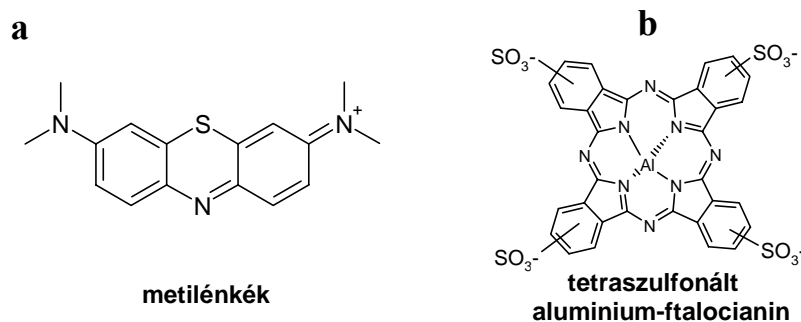
Az infekció elkerüléséhez szükség lenne szűrő tesztekre, illetve kórokozó inaktiválási eljárásokra mint vérplazma pasztörözése [21], hó illetve oldószer-detergenses [22] kezelése, UV besugárzása [23], vagy a minden vérkomponensre kiterjeszhető fotokémiai csíramentesítése.

Német és svájci kutatók frissen fagyasztott plazma fotodinamikus kezelését végezték metilénkékekkel (7a ábra), ami 655 nm hullámhosszúságú fénnel gerjeszhető. Fehér fényt alkalmazva, a lipidburokkal rendelkező vírusokat inaktívták, de a kezelés sajnos nem volt hatással a véresejtekbe bejutott kórokozókra [24].

A vörösvérsejt koncentrátumok sterilizálásánál fontos elvárás a szenzibilizátorral szemben, hogy 600 nm-nél nagyobb hullámhossz tartományban legyen abszorpciós maximuma, mivel a kisebb hullámhosszúságú fényt a hemoglobin elnyeli. Az amfifil tulajdonságú porfirin-vázak molekulák főleg a különböző membránokban lokalizálódnak, így várhatóan a lipid-kapszidos vírusok ellen alkalmazhatók [25]. A HpD szenzibilizátort sikeresen alkalmazták különféle vírusok inaktiválására szövettenyészetekben és teljes vérben [26]. A kezelés kapszid-nélküli vírusokra nem volt hatással, vagyis a fotodinamikus effektus a vírus kapszidot károsítja. A benzoporfirin monokarbonsav (BPD-MA, 6a. ábra) és vörös fény együttes alkalmazása eredményesnek bizonyult szabad és sejthez kapcsolódott HIV-1 vírus ellen vérben [27]. A tetrafenilporfirinek [28] és a klorinok [29] vírusellenes hatását szintén kimutatták.

A vér és vértermékek sterilizálásának egy másik ígéretes szenzibilizátor családja a ftalocianinok. Az alumínium-ftalocianin szulfonált származékai (7b ábra) nagyon hatékonyak a vesicular stomatitis (VSV) vírus ellen, minimális vörösvérsejt károsodás mellett [30,31]. A legnagyobb fotodinamikus aktivitással rendelkező ftalocianin a központi atomként szilíciumot tartalmazó Pc4 (6f ábra). Ez a vegyület a HIV vírus mellett a maláriát okozó parazitát is képes inaktiválni [32].

7. ábra. Vér és vértermékek sterilizálásánál alkalmazott szenzibilizátorok



A porfirinek vírusölő hatásának vizsgálatakor kiderült, hogy egyes fotoszenzibilizátorként megismert vegyületek fotodinamikus effektus nélkül is képesek inaktiválni a HIV-1 vírust [33]. A vírus kapszidját két glikoprotein, a gp120 és gp41 fehérjék alkotják. Mindkét kapszidfehérje tartalmaz olyan doméneket, amelyek az infekció létrejötte szempontjából kritikusak [34]. Ezenkívül mindkét fehérje magába foglal membránfúziót segítő alegységet is. A vírus limfocitához való kötődése antitestek mellett bizonyos alacsony tömegű molekulákkal is megakadályozható. Az egyik inhibitor vegyület család tagjai, a porfirinek, a gp120-as vírus kapszidfehérje V3-as hurkához kapcsolódnak [35]. Számos vízoldható poliszulfonált és polikarboxilált porfirin és ezek fémközpontú (Mn, Fe és Ni) származéka képes ily módon megakadályozni a vírusinfekciót [36].

2.1.3. Porfirin koncentráció meghatározása szövetekben [37]

A szenzibilizátorok szelektív felhalmozódása a tumor speciális tulajdonságaira vezethető vissza [38]. Ezek:

- 1) alacsonyabb pH, amit a glikolízis során keletkezett tejsav megnövekedett mennyisége okoz, s ezzel a csökkenő pH mellett növekvő lipofilicitással rendelkező vegyületek felvételét és megkötését segíti elő;
- 2) nagy mennyiségű alacsony sűrűségű lipoproteinek (LDL) kötő membrán receptorok expressziója, ami kedvezően befolyásolja az LDL fehérjéhez kötött fotoszenzibilizátorok endocitózis útján való felvételét;
- 3) ritkás erezettség és szegényes nyirokcsatornázottság, ami meggátolja a gyors kiürülést, s ezzel helyi szenzibilizátor koncentráció-növekedést eredményez;
- 4) nagy szövetközi tér, ami gyűjtőedényként fogja fel a bejuttatott vegyületet;
- 5) fokozott makrofág sűrűség, amelyek maguk is nagy mennyiségű szenzibilizátort képesek megkötni, s ezzel a tumoros sejtekbe juttatni.

A szervezetbe bejutott kémiai anyagok felhalmozódási és kiürülési kinetikája fontos paraméter a mennyiségük megbecsülésében. Azok a módszerek, amelyek általánosan használatosak egy vegyület mennyiségi változásának *in vitro* követésére, csak bizonyos megszorítások mellett alkalmasak a hatóanyag meghatározására *in vivo*. Ennek egyik oka a megfigyelőrendszer érzékenysége, a másik a közeg természete, amelyben az eloszlást vizsgáljuk. Emellett a hatóanyag bejuttatásának módszere is lényeges hatással lehet a szervezetben való eloszlás időbeli változására.

Az abszorpciós spektroszkópia széles körben alkalmazható átlátszó rendszerekben lezajló folyamatok kinetikai vizsgálatára, de biológiai rendszerekben való alkalmazása számos akadályba ütközik. Az abszorbancia megbízható mérése homogén, áttetsző rendszert kíván, ami a legritkább esetben fordul elő biológiai mintáknál. A módszer főként a vérplazma különböző fehérje frakcióihoz kötött porfirinek kimutatásánál alkalmazható [39,40], de történt néhány próbálkozás szövetek szenzibilizátor tartalmának meghatározására is [41-43].

Egy másik lehetséges, de máig nem elterjedt mérés technika a hatóanyagok fotoakusztikus nyomonkövetése [44].

A radioaktív izotópok alkalmazása *in vitro* és *in vivo* rendszerekben sokkal érzékenyebb és pontosabb koncentráció-meghatározást tesz lehetővé [45-47]. A módszer hátránya, hogy csak állat modelleken alkalmazható, mivel az alkalmazott izotópok (^3H , ^{14}C) nem adhatók be betegeknek, emellett drága műszerparkot és speciális laboratóriumokat igényel.

A szövetek hatóanyagtartalmának mennyiségi meghatározására különféle kromatográfias eljárások is alkalmazhatók, ami szintén komoly beruházásokat igényel [48]. Főként testnedvek, pl. vér, vizelet porfirin-tartalmát tanulmányozzák ezzel a módszerrel [49].

A fluoreszcencia spektroszkópia egy különösen érzékeny módszer, viszonylag könnyen kivitelezhető és nem igényel áttetsző vagy homogén rendszert, ezért széles körben alkalmazzák biológiai rendszerek tanulmányozására [48,50]. A fluoreszcencia spektroszkópia farmakológiai alkalmazásában a következő eljárást fogadják el [37]:

- 1) a hatóanyagot több állatba beoltják;
- 2) az állatokat a beoltás után különböző időpontokban leölik;
- 3) a különböző szövetekből vagy szervekből biokémiai extrakcióval kinyerik a vegyületet;
- 4) minden extraktumban fluoreszcencia spektroszkópiával meghatározzák a hatóanyag koncentrációt.

A módszer bár hosszadalmas, azzal az előnnyel rendelkezik, hogy a szenzibilizátor mennyiségileg kiértékelhető egy *in vitro* kalibrációs görbe segítségével, ami a hatóanyag analitikai oldatának közvetlen fluoreszcenciás mérésével nyerhető.

Az *in vivo* fluoreszcenciás mérésekről az utóbbi évtizedben több cikk is megjelent [50-54]. A módszer előnye, hogy gyors és az állatot sem kell minden esetben megölni. Az eljárás nehézsége, hogy a fluoreszcencia intenzitás és a specifikus szövetekben

felhalmozódott szenzibilizátor koncentrációja közötti korreláció megállapítása nem egyértelmű. Mivel a fluoreszcenciás fény áthatoló képessége szövetenként változik, a szenzibilizátor analitikai oldata nem alkalmas önmagában a kalibrációra. A hatóanyag eloszlás makroszkopikus heterogenitása a szövetben tovább bonyolítja a kiértékelést.

Ennek ellenére, az állat bőrén keresztül mérhető szenzibilizátor fluoreszcencia változásának *in vivo* nyomonkövetése elterjedt módszer a fluoreszcens fotoszenzibilizátorok farmakokinetikai viselkedésének tanulmányozására [50].

A vizsgálatokban alkalmazott száloptikás spektrofluorometriás rendszerekben a gerjesztő sugárzást lézerrel állítják elő, amit egy reflexiós szondába [51,52] illetve egy optikai táblára fókuszálnak [37]. A fluoreszcenciás fény optikai szálakon jut el a detektorba.

A szelektív felhalmozódás vizsgálatokor általában a tumorban és az egészséges környezetében mérhető fluoreszcenciás intenzitás egymáshoz való viszonyát illetve arányát (pl. a tumorban mért intenzitás kisebb, egyenlő vagy nagyobb, mint az egészséges szövetben [37,53,54]) adják meg. Az *in vivo* méréseket *in situ* mérésekkel kiegészítve az egyes szervek szenzibilizátor-tartalmának aránya pontosabban meghatározható.

Bár a szenzibilizátor abszolút mennyisége nem határozható meg ezzel a módszerrel, az egyes szervekben mérhető szenzibilizátor fluoreszcencia időbeli változása jól korrelál az extrakciós módszerrel kapott kinetikával [37].

2.2. Szerkezet - hatás összefüggés vizsgálatok

A szerkezet - hatás összefüggés (SAR) megfigyelések a biológiai aktivitásban meglévő változás szabályszerűségeit tanulmányozzák a kémiai szerkezet meghatározott különbségeinek függvényében [55]. A kapott válasz sokszor igen/nem jellegű, más esetekben sorrendiség állapítható meg. A módszer sikeresen alkalmazható nemfolytonos, illetve különböző osztályba sorolható adatokra is. Segítségével szerkezetileg egymáshoz közel álló vegyületek közül kiválaszthatók a megfelelő aktivitással rendelkező származékok, és azonosíthatók a vizsgált aktivitást befolyásoló szerkezeti jellemzők [3].

A mennyiségi szerkezet - hatás összefüggés vizsgálatok (QSAR) alkalmazásakor az egyes, kémiai szerkezetből levezethető leíró változók (deszkriptorok) illetve fiziko-kémiai tulajdonságok és az aktivitás között számszerűsíthető függvénykapcsolatot határozzuk meg. Célja azoknak a faktoroknak a kiválasztása, amelyek az adott biológiai aktivitás kialakulásában fontos szerepet játszanak. Majd ezek alkalmazásával kiszámítjuk, előrebecsüljük a várható hatást, és a fontosnak tartott faktorok segítségével, megértjük a vizsgált jelenséget. A QSAR lehetővé teszi, hogy könnyen mérhető aktivitások alapján nehezen meghatározható sajátságokat becsüljünk.

Az elmúlt évtizedekben közölt QSAR tanulmányok nagy segítséget nyújtottak abban, hogy a különböző fiziko-kémiai tulajdonságok szerepét meghatározzuk a hatóanyag és a receptor kölcsönhatásban, megértsük a lipofil jelleg és a ionizáció befolyását a hatóanyag transzportjára és felhalmozódására biológiai rendszerekben [56].

2.2.1. A modern QSAR története [55-58]

Az 1900-as évek elején figyelték meg a mennyiségi szerkezet – hatás vizsgálatok alapegyenletének számító összefüggést, hogy a kémiai szerkezet megváltoztatása által

kiváltott biológiai aktivitás eltérése ($\Delta\Phi$) korrelál a fiziko-kémiai tulajdonságok megváltozásával (ΔC).

$$\Delta\Phi=f(\Delta C) \quad (1.1)$$

Később megfigyelték, hogy bizonyos aktivitás értékek logaritmusai összerakhatóak a molekula fragmentumaira vonatkozó hozzájárulásokból.

A modern QSAR kezdete 1964-re tehető, amikor Hansch és Fujita [59] szubsztituált fenoxil-ecetsavak lipofil jellegét és biológiai aktivitását vizsgálták. Hansch megállapította, hogy az oktanol/víz megoszlási hányados logaritmusával leírt lipofilicitást ($\log P$) a molekula fragmentumok $\log P$ értékeinek összegzésével számíthatjuk ki. Egy Hammett típusú egyenletet állított fel az aromás vegyületek (R-X) lipofil jellegének becslésére.

$$\log P_{R-X} - \log P_{R-H} = \pi_X \quad (1.2)$$

π_X az X szubsztituensnek a molekula $\log P$ -jéhez történő hozzájárulását megadó állandó.

Fujita javasolta, hogy több fiziko-kémiai paraméter lineáris kombinációjával közelítsék a megkívánt biológiai hatás eléréséhez szükséges mólnyi mennyiség reciprokának logaritmusát.

$$\log 1/C = a \log P + b \sigma + \dots + \text{konst.} \quad (1.3)$$

Az 1.3 egyenletben a, b, stb. regressziós koefficiensek, σ a szubsztituált és szubsztituálatlan benzoészav disszociációs állandójával képzett Hammett állandó. A modell előnye, hogy könnyen alkalmazható különféle biológiai aktivitások leírására.

Ugyanabban az évben Hanschtól függetlenül, Free és Wilson is előállt egy matematikai modellel, amely Free Wilson analízis néven vonult be a köztudatba. Az egyenlet szerint, a biológiai aktivitás érték logaritmusai ($\log 1/C$) az alapvegyület aktivitásának (μ) és az X_i szubsztituensek aktivitáshoz való hozzájárulásainak a_i összegzésével közelíthető.

$$\log 1/C = \sum a_i + \mu \quad (1.4)$$

A két módszer kombinációja, amikor a Hansch analízist indikátorváltozókkal (lásd 2.2.3.3. fejezet) egészítették ki, jelentősen növelte a QSAR modellek alkalmazhatóságát.

Ahhoz, hogy a hatóanyag a szervezetben megfelelő időben és koncentrációban a megfelelő helyre kerüljön (pl. receptorhoz), több vizes illetve lipidben gazdag közegen kell átjutnia. A hatékony molekulák lipofil jellege optimum körüli értéket vesz fel, amely lipofil és hidrofil közegen is lehetővé teszi a transzportot. Ebben az esetben az aktivitás – lipofil jelleg összefüggés lineáris modellel nem írható le. A Hansch analízis *in vivo* alkalmazhatósága nagymértékben megnövekedett, amikor egy parabolikus függvénnyel becsülték a biológiai aktivitást.

$$\log 1/C = a (\log P)^2 + b \log P + c \sigma + \dots + \text{konst.} \quad (1.5)$$

Hamarosan kiderült, hogy az erősen poláros molekulák esetében az aktivitás – lipofil jelleg összefüggés nemlineáris, ezért Kubinyi egy lineáris-nemlineáris egyenletet [57] alkalmazott a vizes és lipid fázisokon keresztüli hatóanyag transzportra, ahol a, b β és c együtthatók.

$$\log 1/C = a \log P - b \log (\beta P + 1) + c \quad (1.6)$$

A tapasztalat szerint a Hansch analízis főleg *in vivo* rendszerek leírásakor eredményes, míg kevésbé bonyolult rendszerek, mint pl. sejttenyészet esetén az (1.6) modell ad jobb becslést a biológiai aktivitásra.

A QSAR fejlődését toxikológiai megfigyelések indították el, s napjainkban is számos kutató alkalmazza a toxikológiai folyamatok megértéséhez [60,61].

A háromdimenziós QSAR a nem kovalens receptor – ligandum közötti kapcsolatok tanulmányozásából fejlődött ki. A receptor felületét próbálták feltérképezni úgy, hogy a különböző pozíciókban szubsztituált ligandumokkal való kölcsönhatásokat QSAR függvényekkel modellezték. A kölcsönhatás kialakulása függ a molekula fragmens ionos és

hidrofób tulajdonságaitól, valamint hidrogénkötés-kialakítási képességétől. A fehérjék aktív centrumának háromdimenziós szerkezetét meghatározva megfelelő molekulák tervezhetők, s ezzel lehetőség nyílik, pl. kórokozók létfontosságú enzimjeit gátló inhibitorok molekulászerkezetének meghatározására. Számos tanulmány született például a HIV vírus replikációs ciklusát szabályozó proteáz [62-64], integráz [65,66] és reverz transzkriptáz enzimek [67,68] működését gátló vegyületek szerkezet-hatás összefüggés vizsgálatáról.

Az általánosan elterjedt 3D QSAR módszertana az egy vegyület – egy szerkezet – egy paraméter érték elvet követi, ahol a vizsgált szerkezetet a legkisebb energiájú konformer képviseli. Biológiai rendszerekben ez a megközelítés nem feltétlenül helytálló, mivel oldatban és a transzportfolyamatok során a molekulák több konformációban is megjelenhetnek. Mekenyan és munkatársai a lehetséges diszkrét konformációkból egy konformáció teret határoztak meg, s ez alapján számítottak deskriptorokat. A módszert dinamikus 3D QSAR-nak nevezték el [69].

A holografikus QSAR (HQSAR) egy új technika, amely a molekula lehetséges fragmentjeinek 2D szerkezete alapján egy hologrammot hoz létre. A hologram az egyéb fragmens alapú ujjenyomat módszerekkel ellentétben a lineáris, az elágazó és az átlapoló fragmenseket, emellett egyéb háromdimenziós információt, úgymint hibridizációt illetve kiralitást is képes kódolni [70]. Mivel nem igényel konformációanalízist, nagyszámú vegyület gyors tesztelését teszi lehetővé [71]. Egyes tanulmányok szerint alkalmazásával legalább olyan jó modellek építhetők, mint a 3D QSAR egyik legfejlettebb módszerével a CoMFA-val [70,72], míg más kutatók szerint legfeljebb egy gyors, de nem precíz rálátást adhat a vizsgált mennyiségi szerkezet-aktivitás összefüggésre [73].

2.2.2. Tetrapirrol-vázás vegyületek QSAR tanulmányokban

Az elmúlt tizenöt évben több SAR tanulmányt közöltek a fotoszenzibilizátor molekulák kémiai szerkezete és PDT-aktivitásuk [74-79], illetve tumorban való felhalmozódásuk [80-

83], valamint fotohemolitikus [84] és baktériumölő [85] tulajdonságuk közötti kapcsolatról. A lipofil jelleg – fotodinamikus aktivitás összefüggést vizsgálva megállapították, hogy a kapcsolat nem lineáris, az amfifil tulajdonságokkal rendelkező molekulák hatékonyabbnak bizonyultak PDT-ben mint a csak lipofil illetve hidrofil csoportokat tartalmazó származékok [83].

Barbara Henderson és munkatársai 1997-ben [86] egy szerkezet – PDT aktivitás összefüggés tanulmányt közöltek, melyben egynemű pirofeoforbid vegyületekből álló sorozat tumorban való felhalmozódását és PDT aktivitását vizsgálták. Az 1.6 egyenlet alapján épített modellt (1.7) alkalmazva megállapították, hogy az anyagi minőségre jellemző, oktanol-víz megoszlási hányados logaritmus (log P -vel definiált lipofil jelleg), alkalmas paraméter a fotoszenzibilizátorok PDT aktivitásának előrejelzésére, miközben a tumorszövetben való felhalmozódás szükséges, de nem elégséges feltétele a megfelelő tumorölő hatás kifejeződéséhez.

$$\log(1/Y) = a \log\left(\frac{P}{P_3}\right) - b \log\left(\beta \frac{P}{P_3} + 1\right) + c \quad (1.7)$$

Az egyenletben P a vizsgált vegyület lipofilicitása, P_3 a propil oldallánccal rendelkező analóg lipofilicitása, a , b , β és c empirikusan meghatározott együtthatók. A szerzők a modell PDT aktivitást előrejelző képességét nem számszerűsítették (valójában nem vizsgálták), s az ellenőrző eljárásokat, pl. egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzést, sem alkalmazták.

Egy további tanulmányukban a fenti függvény alapján egy háromkomponensű (vizes fázis- lipid réteg- vizes fázis) farmakokinetikai modellt építettek, amelyben a szenzibilizátor molekulák rétegek közötti diffúziójának sebességi állandói és a lipofil jelleg alapján becsülték a szenzibilizátor koncentrációt [87].

Az első 3D QSAR modellt alkalmazó tanulmányban Debnath és munkatársai [88] 21, nem egynemű tetrapirrol vázas vegyület anti-HIV-1 aktivitását vizsgálták. Az általuk épített

CoMFA modell az egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzéssel (leave-one-out, LOO) meghatározott előrejelző képessége ($Q^2=0.59$) alapján fontos segédeszköz lehet további HIV-1 vírusellenes szerek fejlesztésében. A szerzők kimutatták, hogy a tetrafenil-porfirinek akkor a leghatékonyabbak, ha a négy fenilcsoportjuk közül legalább három negatív töltéssel rendelkező szubsztituens van.

A metalloporfirin komplexek általános modellként szolgálnak a citokróm P450 enzim élettani folyamatokban kifejtett katalitikus tulajdonságának tanulmányozására. Kínai kutatók [89] vas központi atommal rendelkező, halogénezett tetrafenilporfirin származékok esetében az izobután katalitikus oxidációját leíró modellt építettek kvantumkémiai paraméterek (HOMO energia, a két fenil csoport közötti lapszög és a központi vas töltése) felhasználásával.

2.2.3. Paraméterek [90]

Míg a kezdetekkor csak néhány paraméter (pl. σ , $\log P$, π , moláris refrakció, E_s szterikus paraméter) állt rendelkezésre, mára több ezerre tehető a számuk [91].

A molekuláris deszkriptorok olyan leíró változók, amiket jól definiált algoritmusok által a molekulaszervezetből egyértelműen számítunk ki, vagy amelyekhez reprodukálható kísérleti eljárások alkalmazásával jutunk.

2.2.3.1. Kísérletileg meghatározható változók:

- a.) fiziko-kémiai tulajdonságok, mint molekula-deszkriptorok: pl. törésmutató, molrefrakció, oldhatóság, megoszlási hányados, dipólusmomentum, retenciós idő, spektrum, sebességi állandó, egyensúlyi állandó, disszociációs állandó, gőznyomás, forráspont, fagyáspont, stb.;
- b.) biológiai aktivitások, pl. toxicitás, környezeti paraméterek, tumorölő hatás, enzimaktivitás.

2.2.3.2. Elméleti molekuláris deszkriptorok:

A molekula szimbolikus megjelenítése alapján több csoportba sorolhatók:

- a.) Az összegképlet alapján számított 0D (0 dimenziós) deskriptorok (pl. az atomszám, a különféle atomok száma, a molekulatömeg) s az atomi tulajdonságok, mint atomtömeg, atomi töltés, van der Waals sugár, atomi polarizáció.
- b.) A funkciócsoportokat részletező molekulaképletből az ún. 1D deskriptorok határozhatók meg. Leginkább bizonyos funkciós csoportok számát, meglétét illetve hiányát kódolja.
- c.) A szerkezeti képlet alapján az atomok közötti kapcsolatok 2D topológiai deskriptorokba sűrítethetők össze. A legismertebb topológiai paraméterek a konnektivitási (elágazási) indexek (Randić index), pl. amikor a hidrogén nélküli molekulaváz alapján az egyes kötésekben résztvevő két atom kötésszámát összeszorozzák, majd a szorzatok reciproknégyzetgyökeit összegzik. A konnektivitási indexek jól korrelálnak a molekula polarizációval, vízdoldhatósággal, forrásponttal, megoszlási hányadossal, a van der Waals térfogattal, stb.
- d.) A háromdimenziós (3D) deskriptorok, geometriai deskriptorok, pl. kvantumkémiai deskriptorok (elektronegativitás, HOMO és LUMO energiák, töltések, molekuláris energiák), térfogatra jellemző deskriptorok (van der Waals térfogat), felületet leíró deskriptorok (oldószerrel bevonható felület), gravitációs indexek, WHIM deskriptorok, stb.
- e.) A molekula sztereokémiai állapotait is figyelembe vevő 4D deskriptorokat a rács alapú QSAR technikák alkalmazzák. A molekuláris interakciós mező meghatározásakor a vizsgált molekula és egy próba közötti kapcsolat energiáját egy rácsba ágyazva jelenítik meg. Ilyen technika a CoMFA, s ez az alapja a G-WHIM deskriptoroknak is.
- f.) A sztereodinamikai megjelenítés a háromdimenziós molekulaszerkezet időbeni változását is figyelembe veszi a dinamikus QSAR tanulmányokban.

2.2.3.3. Az indikátor, vagy nem valódi változók

Akkor alkalmazhatók, ha a lényeges információ nem sűrítető egy konkrét számba s általában pozitív, negatív vagy nulla értéket vesznek fel. A legelterjedtebb indikátor változók a bináris deskriptorok, 1 és 0 számértékekkel jelzik bizonyos jellemzők, pl. szubsztituens, adott molekula fragmens, aromás szerkezet, cisz/transz izomer, kiralitásbeli különbség meglétét, illetve hiányát.

2.2.4. Változószelektálási módszerek [92]

A paraméterek számának növekedésével szükségessé vált, hogy változókiválasztási módszereket fejlesszenek ki. Céljuk a jelenséget döntően befolyásoló változók kiválasztása nagyszámú korrelált változó közül, illetve a nem fontos változók elhagyása, vagyis a zajszűrés. A változók összehasonlításánál a statisztikában alkalmazott regressziós módszerek a legelterjedtebbek, úgymint a többváltozós lineáris modellek építése (multiple linear regression, MLR) [93] előre irányuló változóbevonással (forward selection, FS), illetve visszafelé irányuló változótörléssel (backward elimination, BE), a lépésenkénti lineáris regresszió (stepwise linear regression). De a főkomponens–elemzés (principal component analysis, PCA [94]), a részleges legkisebb négyzetek módszere (partial least squares, PLS [93-99]), a párkorrelációs módszer (pair-wise correlation method, PCM [102-106]), a mesterséges ideghálózatok (artificial neural networks, ANN [107-109]) és a genetikus algoritmus (GA [110-112]) is változószelektálásra alkalmas eljárások.

2.2.5. Modelllezési eljárások

Ezek a módszerek komplex eljárások, de a modellépítés függetleníthető a változókiválasztástól, vagyis az alkalmazott modellépítési eljárástól eltérő módon kiválasztott deskriptorokból is építhetünk modelleket bármely módszerrel.

2.2.5.1. Többszörös lineáris regresszió (MLR) [93]

A több független változót tartalmazó lineáris függvény illesztését többváltozós lineáris regressziónak nevezzük. Az illesztő függvény általános mátrix alakja:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X} \cdot \boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon} \quad (2.1)$$

ahol \mathbf{Y} a megfigyelések n elemű oszlopvektora (n a megfigyelések száma), \mathbf{X} a független változók $n \times m$ méretű mátrixa (m a leíró változók száma), $\boldsymbol{\varepsilon}$ a hibák n elemű oszlopvektora, és $\boldsymbol{\beta}$ a paraméterek m elemű oszlopvektora.

Az illesztéshez a legkisebb négyzetek módszerét alkalmazzuk. A $\boldsymbol{\beta}$ együtthatóvektort \mathbf{b} -vel becsülve:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \mathbf{X})^{-1} \mathbf{X}^T \mathbf{Y} \quad (2.2)$$

Ekkor az illesztett függvény: $\hat{\mathbf{Y}} = \mathbf{X} \mathbf{b} \quad (2.3)$

Az adott illesztés jóságát a többszörös determinációs együtthatóval (R^2) jellemezzük:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum (Y_i - \bar{Y})^2} \quad (2.4)$$

ahol \hat{Y}_i a függő változó becsült értéke és \bar{Y} az átlaga. Az R^2 értéke 0 és 1 között változhat.

2.2.5.2. Parciális legkisebb négyzetek módszere (PLS) [100,92]

A parciális legkisebb négyzetek módszerének első lépésében a vizsgált folyamatot legjobban leíró modellt (általános alakja $Y=f(X)$) választjuk ki. A második lépésben a modell paraméterei (regressziós együtthatói) segítségével az X független változók (itt deskriptorok) ismeretében az új minták (molekulák) függő változóit (biológiai aktivitások) becsüljük. A PLS modellben a független változók mátrixával (\mathbf{X}) egyidejűleg a függő változók (\mathbf{Y}) adattáblázatát is két mátrix szorzatára bontjuk fel:

$$\mathbf{X}_{N,M} = \mathbf{T}_{N,L} \mathbf{P}_{L,M}^T + \mathbf{E}_{N,M} \quad (2.5)$$

$$\mathbf{Y}_{N,K} = \mathbf{U}_{N,L} \mathbf{V}_{L,K}^T + \mathbf{F}_{N,K} \quad (2.6)$$

ahol N a megfigyelések száma, M a független változók száma, K a függő változók száma, L az \mathbf{X} mátrix rangja (a lineárisan független sor- vagy oszlopvektorainak maximális száma), \mathbf{E} és \mathbf{F} hiba mátrixok, \mathbf{T} a független és \mathbf{U} a függő változók rejtett változóinak mátrixa, míg \mathbf{P} és \mathbf{V} a hozzájuk tartozó PLS együtthatók mátrixai. Az egy mátrixhoz tartozó rejtett változók korrelálatlanok.

A két adatmátrix rejtett változói között lineáris kapcsolatot feltételezünk, amit belső összefüggésnek nevezünk.

$$\mathbf{U}_{N,L} = \mathbf{T}_{N,L} \mathbf{Q}_{L,L} + \mathbf{H}_{N,L} \quad (2.7)$$

ahol \mathbf{U} az eredeti \mathbf{Y} mátrixra vonatkozó rejtett változó mátrix, \mathbf{T} az \mathbf{X} mátrixra vonatkozó rejtett változó mátrix, \mathbf{Q} a keresett regressziós együtthatók és \mathbf{H} hibatagok mátrixai.

A 2.5 és 2.7 egyenletekből \mathbf{Y} -t kifejezve megkapjuk az X-Y kapcsolatot leíró matematikai

modellt:

$$\mathbf{Y}_{N,K} = \mathbf{T}_{N,L} \cdot \mathbf{Q}_{L,L} \cdot \mathbf{V}_{L,K}^T + \mathbf{F}_{N,K} \quad (2.8)$$

A PLS komponensek képzésével előrejelzésre alkalmas modelleket nyerhetünk. A módszer kiválóan alkalmazható még abban az esetben is, ha a deskriptorok száma meghaladja a mintaszámot.

2.2.5.3. Mesterséges ideghálózatok (ANN) [107,109]

Az ANN-t (Artificial Neural Network) eredetileg az agy tanulási folyamatainak modellezésére fejlesztették ki. Hamar kiderült, hogy az agy működését nem képesek ugyan utánozni, viszont eddig matematikailag nehezen kezelhető problémák (pl. nemlineáris összefüggések vagy sokváltozós folyamatok) esetében kiválóan alkalmazhatók. Előnyük a tanulási képesség, hogy adott bemenetre az ismert, kívánt választ adják (felügyelt tanulású hálózatok), illetve, hogy csupán a bemenetek alapján szabályosságot (hasonlóságot, különbségeket) lelnek fel az adatokban (nem felügyelt tanulású hálózatok). Nem igénylik,

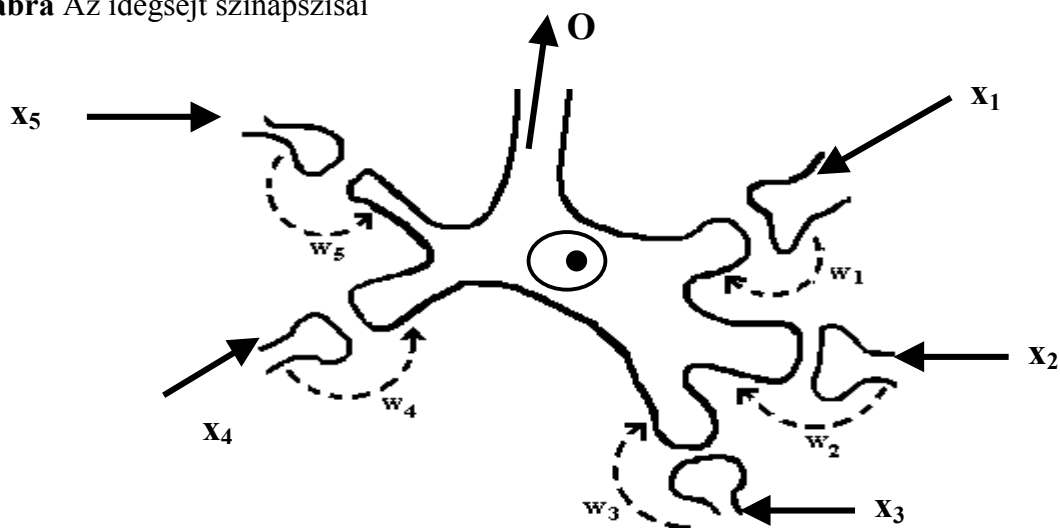
hogy legalább ugyanannyi minta álljon rendelkezésre, mint változó, s korrelált leíró változók esetén is megbízhatóan működnek. Alkalmazhatók [107]:

- a) asszociációs feladatokra, úgymint hiányos, vagy hibás minták kiegészítésére, minták azonosítására, vagy helyének meghatározására;
- b) osztályozásra, amikor az adott osztályra jellemző tulajdonságok alapján soroljuk be a mintát;
- c) transzformációra, vagyis többdimenziós problémák alacsonyabb dimenzióba való leképzésére;
- d) modellezésre, amikor függvényt vagy modellt adunk meg bizonyos függő változókra és bármely m változós bemenő jelre.

A módszer nem igényli a függvénykapcsolat pontos, analitikus ismeretét, de csak interpolálásra alkalmazható.

A mesterséges ideghálózatok egymással összekapcsolt modell-idegsejtekből épülnek fel. Az idegsejtek közötti kapcsolatot a szinapszis erősségének megfelelője, a súly (w) jellemzi.

8. ábra Az idegsejt szinapszisai



Egy neuron több szinapszisban vesz részt, így az idegsejt működése matematikailag egy összegzéssel modellezhető:

$$I = \sum_{i=1}^m x_i w_i \quad (2.9)$$

A kezdeti x_i „ingerek” egy vektort alkotnak (\mathbf{x}), így az idegsejtre beérkező eredő input (I) két vektor szorzataként is felírható:

$$I = \mathbf{w} \cdot \mathbf{x} \quad (2.10)$$

A lineáris egyenletnek megfelelően, egy ϑ tengelymetszettel kiegészítve írhatjuk:

$$I = \mathbf{w} \cdot \mathbf{x} + \vartheta = \sum_{i=1}^m w_i x_i + \vartheta \quad (2.11)$$

A ϑ tengelymetszet egy további inputot jelent, ahol $x_{i+1}=1$, így $\vartheta = w_{m+1} \cdot 1$.

Az adott neuron kimenőjelét (output, O) a bemeneti jelek súlyozott összegéből az f átviteli függvény alakítja át:

$$O = f \left(\sum_{i=1}^m w_i x_i + \vartheta \right) \quad (2.12)$$

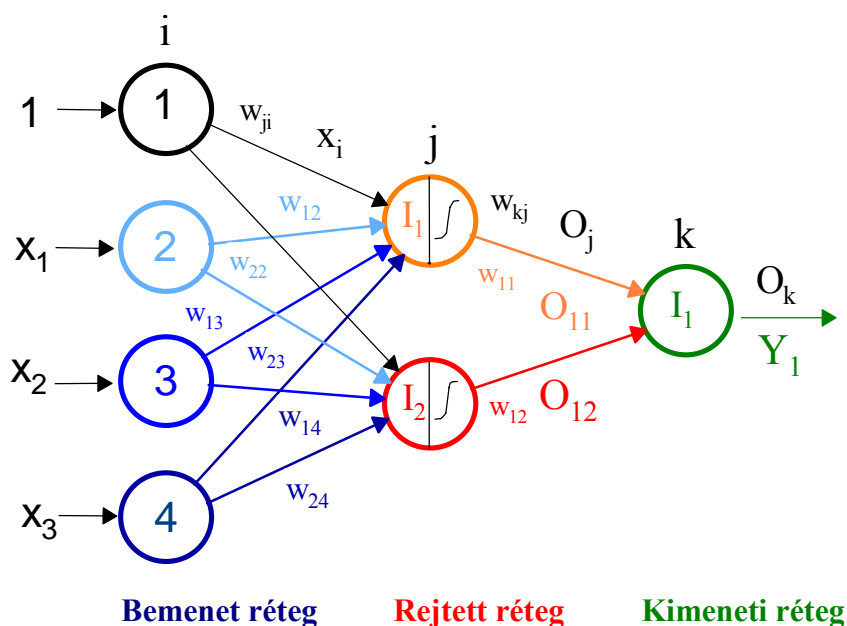
A szigmoid átviteli függvény ($O=1/(1+e^{-I/a})$) az eredő inputot 0 és 1, a tangens hiperbolikus függvény ($O=(e^{-I/a}-e^{I/a})/(e^{-I/a}+e^{I/a})$) -1 és 1 közé transzformálja át. Az „a” értéke mindkét függvénynél az erősítést adja meg. Az idegsejtek átviteli függvényei az alkalmazott programban rögzítettek.

A mesterséges idegsejtekből tetszőleges elrendezésű hálózat építhető fel. A leggyakrabban alkalmazott mesterséges ideghálózatok három réteget tartalmaznak, ahol az első a bemeneti egységek rétege, ami egy rejtett réteggel áll összeköttetésben, amely a kimeneti egységek rétegéhez kapcsolódik (11. ábra).

A leíró változók fontosságának meghatározásához a bemenő adatokat 0 és 1 közé skálázzuk a 2.13 formula alapján, ahol n a sorok és m az oszlopok száma.

$$X_{nm}^* = \frac{x_n - x_m(\min)}{x_m(\max) - x_m(\min)} \quad (2.13)$$

9. ábra Háromrétegű mesterséges ideghálózat



A mesterséges ideghálózatokat meghatározott feladatok elvégzésére taníthatjuk meg. A leggyakrabban alkalmazott tanítási módszer a visszafuttatásos algoritmus, amikor a hálózatot gyakorló példákkal látják el, pl. úgy, hogy az adott molekula szerkezetét reprezentáló bemeneti értékekhez tartozó kimeneti értéket, vagyis a mért aktivitást is megadják.

Az egyes idegsejtek közötti kapcsolatot kezdetben az algoritmus véletlenszerűen súlyozza. A hálózat kimeneteleként kapott számított aktivitás (O_k) és a kísérletileg mért aktivitás érték (Y) közötti eltérés szerint változtatja a kimeneti réteg idegsejtjébe érkező inputokhoz tartozó súlyokat (w_{kj}).

A rejtett rétegre:
$$O_j = f(\sum O_i w_{ji}) \quad (2.14)$$

majd a kimeneti rétegre:
$$O_k = f(\sum O_j w_{kj}) \quad (2.15)$$

A számított aktivitás hibája lineáris függvény esetén:

$$\delta_{nk} = Y_{nk} - O_{nk} \quad (2.16)$$

szigmoid függvényre:
$$\delta_{nk} = (Y_{nk} - O_{nk}) [O_{nk}(1 - O_{nk})] \quad (2.17)$$

ahol Y_{nk} a várt kimeneti érték, O_{nk} a számított kimeneti érték, n a mintaszám és k a kimeneti csomópontok száma. A hiba visszafelé terjed, s egy adott idegsejten belül a súly változásának irányát és mértékét az ismeretlen hibafüggvény (ϵ) minimalizálásával kapjuk meg. Különböző többváltozós minimumkeresési módszerek, mint pl. a legmeredekebb lejtő, a szimplex, a legkisebb négyzetek módszere, vagy a genetikusan áll rendelkezésre a megfelelő szélsőérték közelítésére.

Ezzel a hálózati súly változása:
$$\Delta w_{kj} = w_{kj}(\text{új}) - w_{kj}(\text{régi}) = -\kappa d\epsilon/dw \quad (2.18)$$

ahol κ egy pozitív skálázó faktor. Ha a $d\epsilon/dw$ derivált pozitív, az új súly számértéke kisebb kell, hogy legyen, mint az előző ciklusban volt. A korrigált súly alapján a rejtett rétegre visszaterjedő hiba:

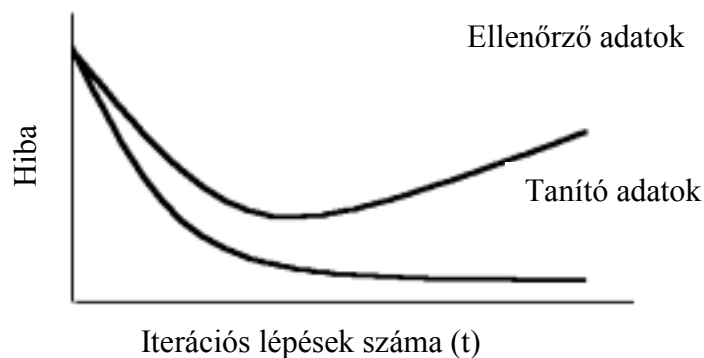
$$\delta_j = (\sum \delta_k w_{kj}) O_j (1 - O_j) \quad (2.19)$$

és a bemeneti súlyok változása:
$$\Delta w_{ji(t)} = \eta \delta_j O_i + \mu w_{ji(t-1)} \quad (2.20)$$

ahol η a tanulási sebesség, μ egy csillapítási tényezőként működő momentum, ami a lokális minimumhelyekről történő kijutást segíti, és t az iterációs lépések száma. Az eljárást a mintaszámnak megfelelően, az adott mintához tartozó x - Y párral megismételjük. Az iteráció befejeződik, ha $t = t_{\max}$, vagy δ_k kisebb, mint az előre megadott érték, egyébként a számítás újból indul.

A mesterséges ideghálózatok alkalmazásakor leggyakrabban előforduló probléma a túlillesztés.

10. ábra Túlillesztés [106]



Mivel a mintahalmaz minden esetben hibával terhelt, a betanított ideghálózat illesztő függvénye a zaj ingadozását is követi. A túlillesztés elkerüléséhez többféle ellenőrzést kell végezni. A rendelkezésre álló mintákból egy betanító és egy ellenőrző készletet képezünk. A tanítás hibája az iterációs lépések számával monoton csökken, míg az ellenőrzés hibafüggvényének az optimális lépésszámnál van minimuma (10. ábra).

Az ellenőrzés legelterjedtebb módszerei az egy-elem-kihagyásos, a több-elem-kihagyásos keresztellenőrzés és az előrejelzés külső mintákon, amit szintén szokás kereszt-ellenőrzésnek nevezni. Nagy mintaszám esetén eredményes az adathalmaz felezése, illetve több részre osztása.

A túlillesztés veszélye a rejtett idegsejtek számával nő, ezért a belső csomópontok számát is optimalizálni kell. Az ideális rejtett idegsejtszám próbálgatással határozható meg, amit néhány program maga végrehajt. Elfogadott empirikus szabály, hogy kiindulópontként a bemeneti és kimeneti rétegek számának mértani közepével kezdjük a modellépítést, és két ugyanolyan pontosságú hálózat közül azt választjuk, amelyben a rejtett neuronok száma kevesebb.

3. KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1. Szenzibilizátor - koncentráció meghatározás

Egy vegyület fotodinamikus aktivitását abban az időpontban célszerű meghatározni, amikor a tumorban és az egészséges szövetben felhalmozott koncentrációinak aránya optimális, vagyis a beteg szövetben minél több, míg annak egészséges környezetében kevés szenzibilizátor molekula található. Az ideális arány meghatározásához a különböző szervek szenzibilizátor tartalmának időbeli követése szükséges, ami maga is fontos jellemző egy vegyület gyógyászti alkalmazhatóságának vizsgálatánál.

Mivel terveink között szerepel egy nagyobb számú fotoszenzibilizátor vegyületcsoport fotodinamikus aktivitásának meghatározása azonos laboratóriumi körülmények között, ezért olyan mérési módszer és mérőműszer fejlesztését tűztük ki célul, ami lehetővé teszi, hogy nagyszámú porfin-vázás vegyület szöveti koncentrációját határozzuk meg rövid idő alatt *in situ*, a relatív értékeket meghatározó *in vivo* méréseknél pontosabban, s az extrakciós módszereknél jóval kevesebb állat felhasználásával. A felhalmozódott hatóanyag koncentrációját a kibocsátott fluoreszcenciás fény intenzitása alapján határoztuk meg.

3.1.1. Mérési módszer

Mivel a szenzibilizátor koncentráció méréséhez nem készíthető közvetlenül *in vivo* kalibrációs görbe, ezért egy olyan módszer kidolgozásába fogtunk bele, amely alkalmas az *in situ* mért fluoreszcencia intenzitás és az adott szervben felhalmozott szenzibilizátor mennyisége közötti összefüggés meghatározására.

Az állatkísérleteket az MTA Kémiai Kutatóközpont Állatkísérleti Etikai Kódexe szerint, a Munkahelyi Állatkísérleti Bizottság engedélyével végeztük. A különböző szövetekben felhalmozódott szenzibilizátor koncentrációját 20 ± 1 grammos NMRI hím fehér egereken (Toxicoop Kft., Budapest) vizsgáltuk. Az eljárás során az egerek hátának egy részét

szórtelenítettük, hogy később a reflexiós szondával közvetlenül a bőr felületén mérhessük a fluoreszcenciáját. A hatóanyagot bejuttattuk az altatott egér farokvénájába, majd meghatározott idő után pentobarbitál narkózisban (Nembutál, Sanofi – Phylaxia Kft.) dekaptáltuk és felboncoltuk az állatot, majd felvettük az egyes szervek fluoreszcenciás spektrumát.

A módszernél alkalmazott lépések a következők voltak:

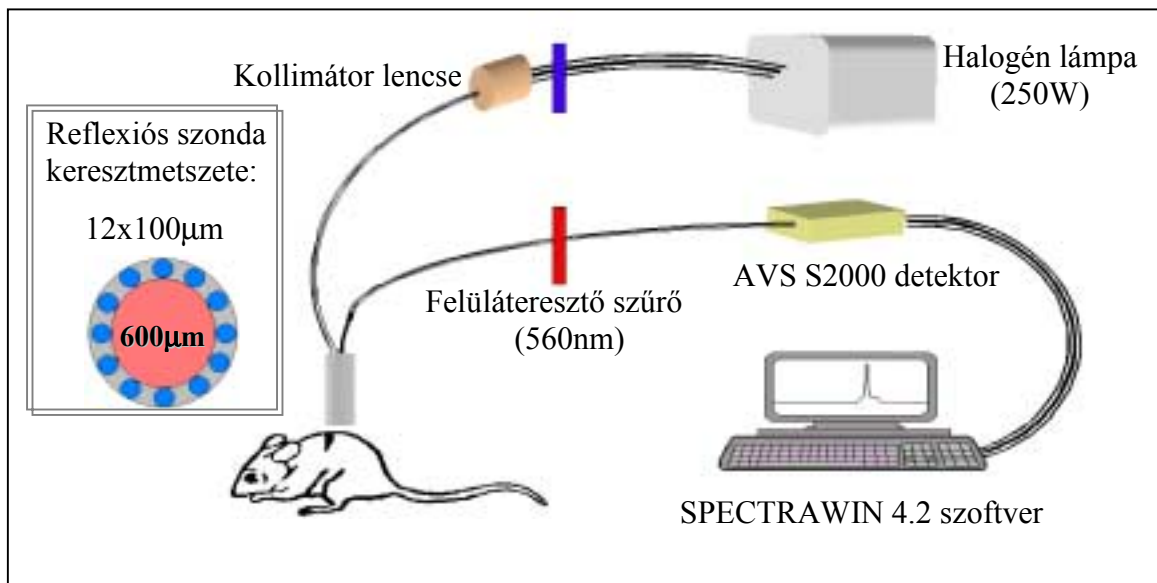
- 1) A kezelt állat szerveiben a felületi reflexiós szondával *in situ* fluoreszcenciát mértünk.
- 2) Boncolás után az adott szervből mintákat vettünk, aminek a tömegét analitikai mérlegen lemértük.
- 3) Desztillált víz hozzáadásával az adott szövetből 10, 20 és 50%-os szervhomogenizátumokat készítettünk.
- 4) Reflexiós szonda alkalmazásával felvettük a szervhomogenizátumok fluoreszcenciás spektrumát.
- 5) Olyan állatok szerveiből is készítettünk szervhomogenizátumokat, amelyek nem kaptak szenzibilizátort. A kontroll állatok szervhomogenizátumához ismert mennyiségű szenzibilizátor hozzáadásával kalibrációs görbéket vettünk fel.
- 6) A kezelt szervekből készült homogenizátumok szenzibilizátor tartalmát a fenti kalibrációs görbék alapján kiszámítottuk, majd a hígítással korrigálva a 100%-os szervtartalmú minta hatóanyagtartalmát megbecsültük.
- 7) A különböző állatokban mért *in situ* fluoreszcenciás intenzitás és a hozzájuk tartozó becslt (homogenizátumból meghatározott) szenzibilizátor koncentráció alapján az adott szervre egy *in situ* alkalmazható kalibrációs görbét kaptunk.

3.1.2. Mérőműszer összeállítása

A céljainknak megfelelő mérőműszer összeállítás nem kapható, ezért a gyártó céggel közösen egy, a vásárolt hordozható fluorométerhez csatlakoztatható 12 fényszálas szondát

fejlesztettünk ki, aminek segítségével extrahálás nélkül, közvetlenül a szervekben vehettük fel a szenzibilizátor fluoreszcenciás spektrumát. A megfelelő optikai rendszer összeállítása és *in situ* mérésekre alkalmassá tétele több, előre nem látott nehézségbe ütközött, de megfelelő lencserendszerek és szűrők beépítésével elértük, hogy a szenzibilizátor vegyületek által kibocsátott fluoreszcenciás jeleket *in situ* is tudjuk mérni (11. ábra).

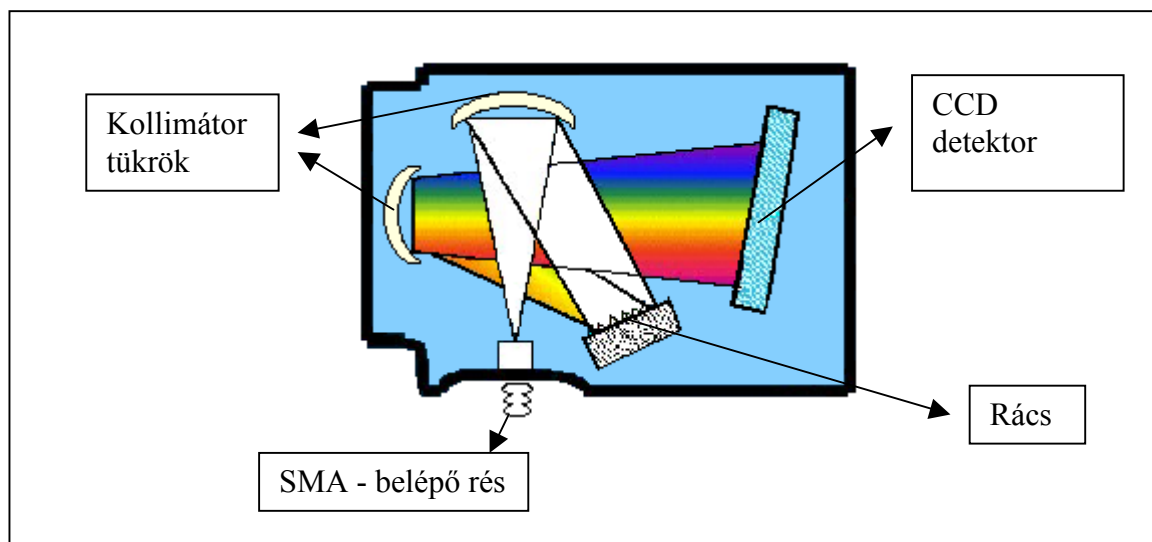
11. ábra. MÉRŐMŰSZER



A szervekben felhalmozódott szenzibilizátor molekulákat 420 nm-nél maximális intenzitású kék fényel gerjesztettük. A fényt a 250 W teljesítményű halogénlámpából egy 8 mm átmérőjű optikai szál továbbítja az interferenciaszűrőhöz, majd a fény egy kollimátor lencse segítségével a reflexiós szonda megvilágító száljába fókuszálódik. A holland Avantes cég és a csoportunk által közösen fejlesztett, reflexiós elven működő szonda vezet 12 db. 100 µm átmérőjű üvegszálon át a megvilágító fényt a mérendő felületre, s onnan 1 db. 600 µm átmérőjű leolvasó szál viszi a jelet a spektrométerbe. A reflektált gerjesztő elektromágneses sugarakat egy 560 nm-nél vágó felüláteresztő szűrővel a detektorba érkezés előtt szűrtük ki.

A szűrt fény 200 μm szélességű, 1000 μm magas belépő résen keresztül jut a spektrométer optikai padjára. A belépő fény homorú tükör közvetítésével a diffrakciós rácsra vetődik, ahol megtörténik a fehér fény felbontása. A felbontott fény egy másik homorú tükrön keresztül a Si alapú, 2048 pixelből álló CCD detektorra verődik.

12. ábra. Spektrométer



A képen is látható kialakítással, az ún. kereszttezett Czerny-Turner típusú elrendezéssel lehetővé válik a spektrométer méretének csökkentése.

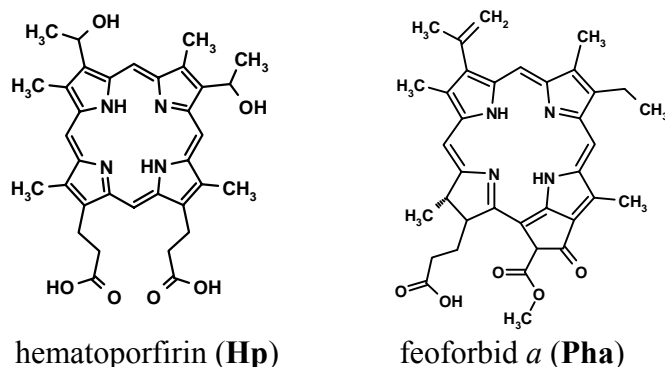
Az analóg jel egy DAQ700 típusú átalakító kártyán keresztül jut el a számítógéphez, majd a Spectrawin 4.2 szoftver segítségével megkapjuk a fluoreszcenciás spektrumot.

A kapott jelet egy kezeletlen, vagyis szenzibilizátorral nem beoltott egér azonos szervéből felvett háttérsugárzással korrigáljuk. Az így kapott spektrumon már csak a beadott vegyületre jellemző csúcsok jelennek meg. A szenzibilizátor koncentrációját a nagyobb intenzitású csúcs magassága alapján határoztuk meg.

3.1.3. Vizsgált vegyületek

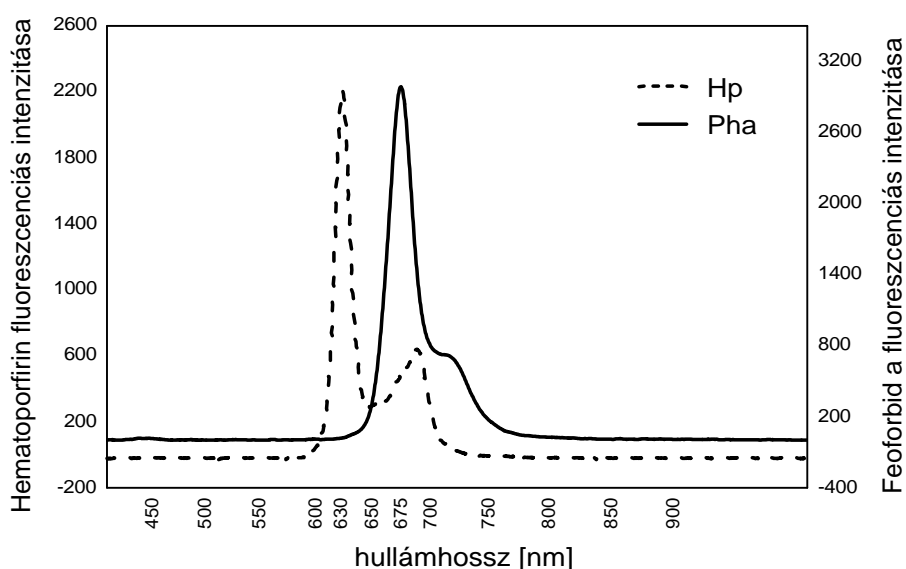
Az analitikai módszer beállításához két jól ismert fotoszenzibilizátort, a hematoporfírint (**Hp**, Sigma, Németország) és a feoforbid *a*-t (**Pha**, Porphyrin Products Inc., USA) használtuk (13. ábra).

13. ábra. Molekulák kémiai szerkezete



A **Hp** abszorpciós spektrumában 398 nm, 501 nm, 533 nm 571 nm és 616 nm hullámhosszoknál, míg fluoreszcenciás spektrumában (14. ábra) 628 és 690 nm-nél jelennek meg csúcsok [113]. A legkisebb energiájú Q sáv intenzitása viszonylag kicsi, $\epsilon_{630} = 3500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [114]. A **Hp** fluoreszcencia kvantumhatásfoka (Φ_F) ≈ 0.1 , míg a triplett állapot képződés kvantumhatásfoka (Φ_T) = 0.83 [115].

14. ábra. Szenzibilizátorok fluoreszcenciás spektruma etanolban, küvétában mérve [10^{-5}M]



A **Pha** a második generációs fotoszenzibilizátorok közé tartozik. Abszorpciós spektrumában a porfirinekre jellemző, 420 nm körüli erős Soret sáv mellett 507 nm, 537 nm, 608 nm és 667 nm hullámhossz értékeknél a kisebb intenzitású Q sávok is megjelennek. A PDT aktivitás

szempontjából kitüntetett 667 nm-es sáv moláris abszorpciós koefficiense $\epsilon_{667} = 44\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Fluoreszcenciás spektrumának jellemző csúcsai 675 nm és 690 nm hullámhosszoknál jelennek meg (14. ábra és [113]). A **Pha** fluoreszcencia kvantumhatásfoka (Φ_F) 0.28 [116].

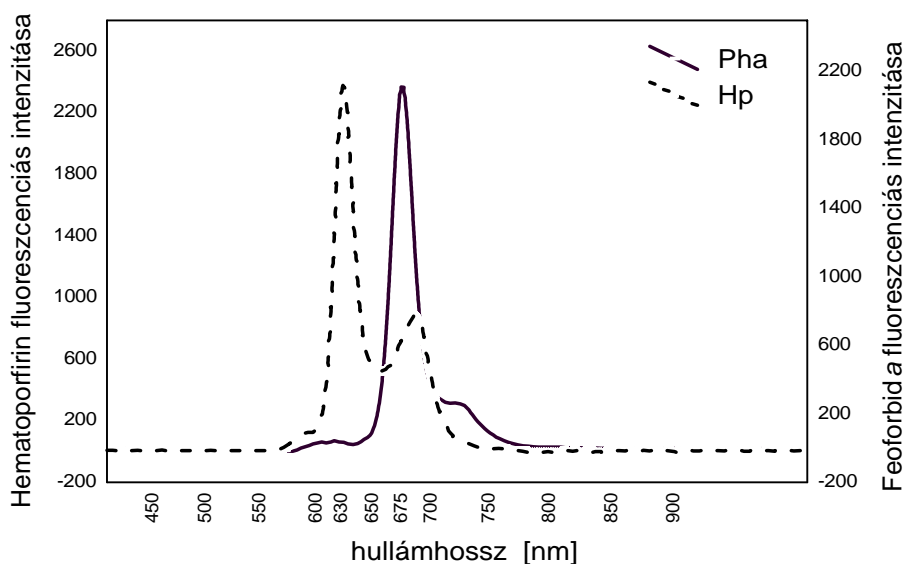
A vízben nem oldódó anyagokat egy Chremofor E (Sigma, Németország) nevű olajelegyben oldottuk fel, majd négyszeres mennyiségű fiziológias sóoldat hozzáadásával szuszpenziót készítettünk. A fotoszenzibilizátorok 10 mM-os szuszpenzióját felhasználáskor fiziológias sóoldattal a kívánt koncentrációra tovább hígítottuk.

Méréseink során a gerjesztő fény intenzitásának állandóságát a reflexiós szonda kilépő pontján mérve, fénymérő segítségével folyamatosan ellenőriztük

3.1.4. *In situ* mérések

Fotodinamikus terápiában általában a szer beadása után 24 órával végzik el a bevilágítást [4], de a hematoporfirin alapú származékok lassan, míg a feoforbid *a* alapú vegyületek gyorsabban ürülnek ki a szervezetből [116]. Az *in situ* (bőr, belső szervek, vérplazma) szenzibilizátor koncentrációt olyan időpontokban határoztuk meg, amikor a vizsgált szervek hatóanyagtartalma magas. Így **Hp** esetében 3, míg a **Pha** esetében 1,5 órával a beadás után végeztük el a méréseket. A reflexiós szonda alkalmazásával nagyon jó minőségű fluoreszcenciás spektrumot kaptunk több szervben (máj, bőr, vérplazma és tumor).

15. ábra. Szenzibilizátorok *in situ* mért fluoreszcenciás spektruma egér bőrben



A 15. ábrán látható spektrumok felvételekor 10 mg **Hp** /kg állat és 5mg **Pha** /kg állat szenzibilizátor mennyiségeket adtunk be intravénásan az állatoknak.

3.1.5. *In vitro* mérések

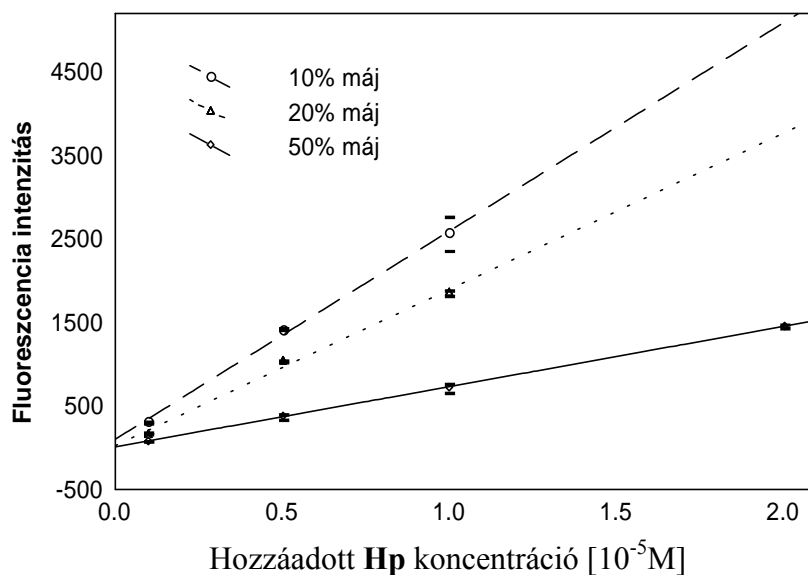
3.1.5.1. Hematoporfirin koncentráció meghatározás májhomogenizátumban

Az *in vitro* kalibrációs görbék készítését a hematoporfirinnal kezelt máj szenzibilizátor tartalmának meghatározásán mutatjuk be. A vizsgált szenzibilizátort három koncentrációban (2, 5 és 10 mg **Hp** /kg), 3-3 állatba adtuk be intravénásan. 3 órával a szer beadása után az állatokat felboncoltuk s reflexiós szondával, szervenként három helyen mértük az *in situ* fluoreszcencia intenzitást. A felhalmozott szenzibilizátor mennyiségének meghatározásakor minden egyes szervből mintákat vettünk, majd desztillált vizes homogenizálással az adott szövetre 10, 20 és 50%-os szervhomogenizátumokat készítettünk. 150 µl homogenizátumot egy 2 ml-térfogatú mikrocentrifuga csőbe (Sigma, Németország, T 3531) pipettáztunk, majd a reflexiós szondával közvetlenül mértük a fluoreszcenciát. Homogenizátumonként három párhuzamos mintát vizsgáltunk.

3.1.5.2. **Hp** kalibráció májhomogenizátumban

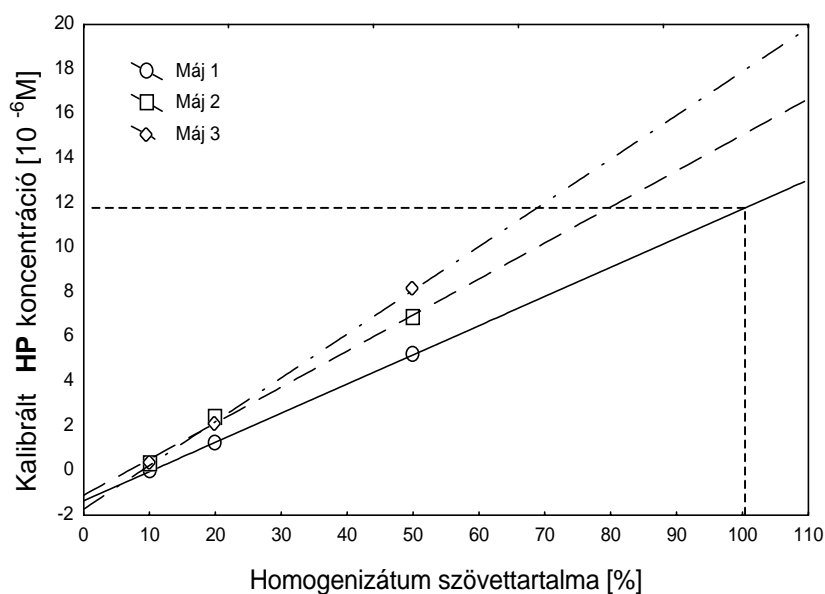
Kezeletlen egerek májából szintén 10, 20 és 50%-os szervhomogenizátumokat készítettünk, majd ismert mennyiségű szenzibilizátor hozzáadásával kalibráló (1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M és 1×10^{-4} M) sorozatot készítettünk. A kezelt mintákhoz hasonlóan, reflexiós szondával, 150 µl homogenizátumban mértük a 628 nm hullámhosszúságú fluoreszcenciás jel intenzitását. A nagyobb koncentrációknál elhajló, koncentráció – intenzitás görbék lineáris szakaszaira kalibrációs egyeneseket illesztettünk (16. ábra). Egy adott koncentrációhoz tartozó három párhuzamos minta szórása minden esetben 10% alatt volt (pl. 16. ábra).

16. ábra. Hp kalibrációs görbék lineáris szakaszai májhomogenizátumban



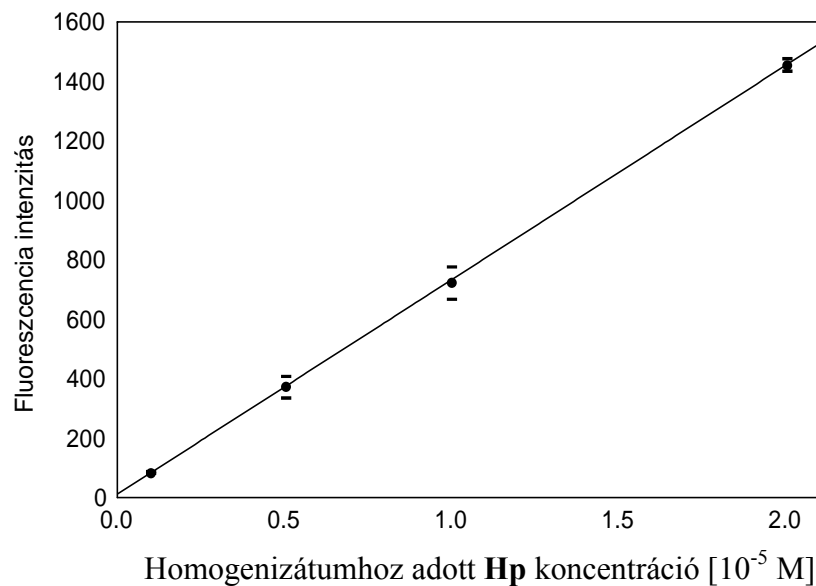
A 3.1.5.1 fejezet szerint elkészített homogenizátumokban mért fluoreszcencia intenzitás és a 16. ábra kalibrációs görbéi alapján meghatároztuk a minták **Hp** tartalmát. Minden egyes kezelt máj esetén a **Hp** koncentrációkat a homogenizátum szervtartalmának függvényében ábrázoltuk, s a 100%-os májtartalomra vonatkozó szenzibilizátor koncentráció értéket az illesztett egyenesről leolvastuk. A 17. ábrán három különböző májmintán mutatjuk be a lineáris extrapolációval nevezett eljárást.

17. ábra. Szenzibilizátor koncentráció becslése kezelt májban, lineáris extrapolációval



Mivel a lineáris extrapolációval meghatározott 100%-os májra vonatkoztatott (C_{100Lin} [10^{-6} M]) és az 50%-os májhomogenizátumból közvetlenül számított koncentrációk (C_{50} [10^{-6} M]) csak kis mértékben tértek el egymástól ($C_{100Lin} / 2 \times C_{50} = 1.106 \pm 0.022$), a továbbiakban csak 50% szervtartalmú májhomogenizátumokat készítettünk, s a hozzá tartozó kalibrációs görbe (18. ábra) alapján számítottuk a teljes máj szenzibilizátor tartalmát.

18. ábra. Hp kalibrációs egyenes 50%-os májhomogenizátumban

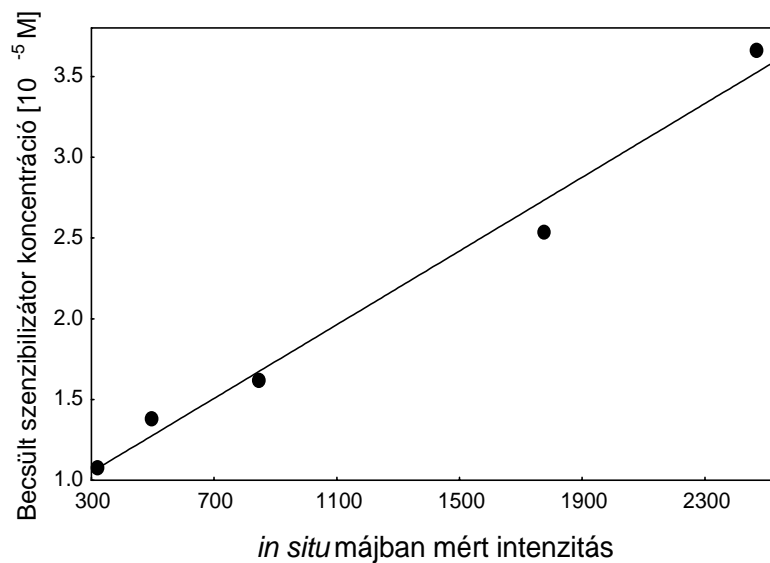


3.1.6. Az *in situ* szenzibilizátor koncentráció kalibrálása

Az *in situ* méréseknél a máj inhomogenitása miatt három különböző lebenyén mértük a fluoreszcencia intenzitást, majd az intenzitások átlagához rendeltük az adott állat májából *in vitro* becsült szenzibilizátor koncentrációt. Egy állaton belül, a különböző lebenyekben mért intenzitásokból számított szórás átlagosan 33% volt, míg a különböző állatokban mért átlagintenzitás értékek szórása 9,3% volt.

A teljes májra extrapolált szenzibilizátor koncentrációt az *in situ* mért intenzitás függvényében ábrázolva, egy újabb kalibrációs görbét kaptunk, amely segítségével a továbbiakban homogenizálás és extrakció nélkül becsülhettük meg a kezelt állatok májában az adott pillanatban felhalmozódott hematóporfirin koncentrációját (19. ábra).

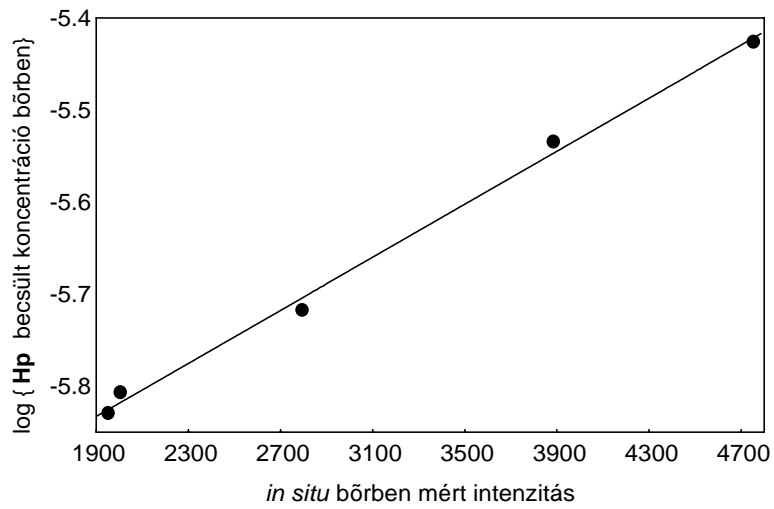
19. ábra. *In situ* mért Hp kalibrációs egyenes májban. (Az egyes pontok, az adott máj három különböző lebenyében mért *ex vivo* intenzitások átlagértéke.)



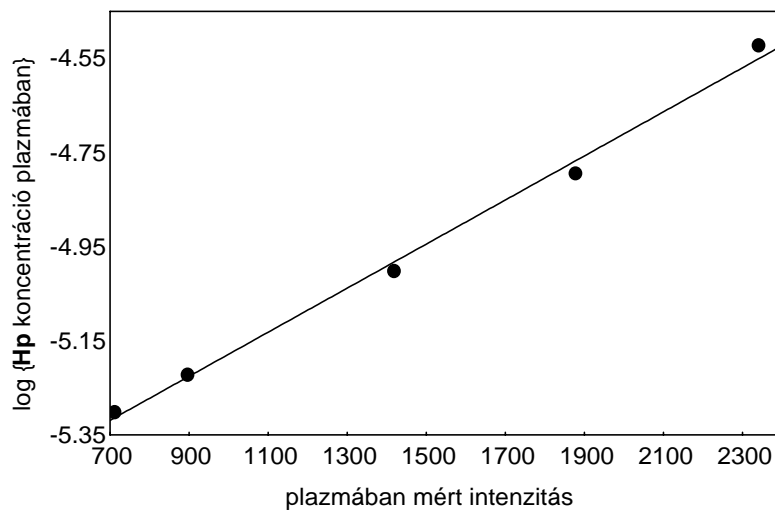
A fenti módszerrel májban, tumorban, vérplazmában és bőrben felhalmozott hematoporfirin és feoforbid *a* szenzibilizátorok koncentrációjának becslésére alkalmas kalibrációs görbéket vettünk fel. Bőr vizsgálatokor 25 %-os homogenizátumban mért fluoreszcencia alapján készítettünk kalibrációt, mivel ebből a nehezen feldolgozható, tömör szervből nem tudtunk töményebb homogenizátumot készíteni. Egy adott bőrben *in situ* mért intenzitások szórása átlagosan 11,4%, míg azonos beadott szenzibilizátor koncentráció mellett az egyes állatok bőrében mért átlagintenzitás értékek szórása 14,3% volt. Vérplazma esetén az egy állatból levehető vér kis mennyisége miatt hígítottuk a mintát 1/3 rész desztillált vízzel. Egy állat plazmájából mért intenzitások átlaga 7,3%, míg az azonos beadott szenzibilizátor koncentráció mellett az állatok közötti szórás 13% volt. A tumor vizsgálatokor szintén az 50 %-os szervhomogenizátum alapján végeztük el a becslést. A tumor (kb. 1cm átmérőjű S180 szarkóma) három különböző részén mért intenzitások szórása egy állaton belül átlagosan 28,3%, míg a különböző állatokban mért átlagintenzitás értékek szórása 27,3% volt.

A becsült *in situ* kalibrációs görbék lineáris szakaszait a 20-26. ábrákon mutatjuk be.

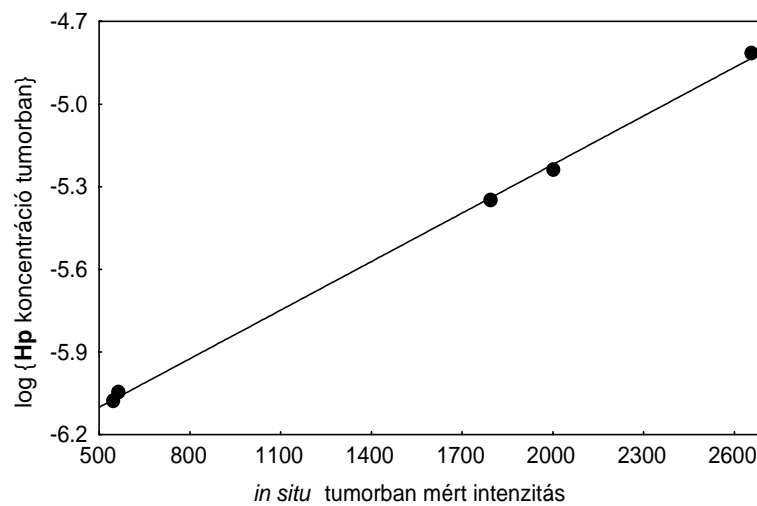
20. ábra. *In situ* felvett Hp kalibráció bőrben, 25 %-os szervhomogenizátum alapján



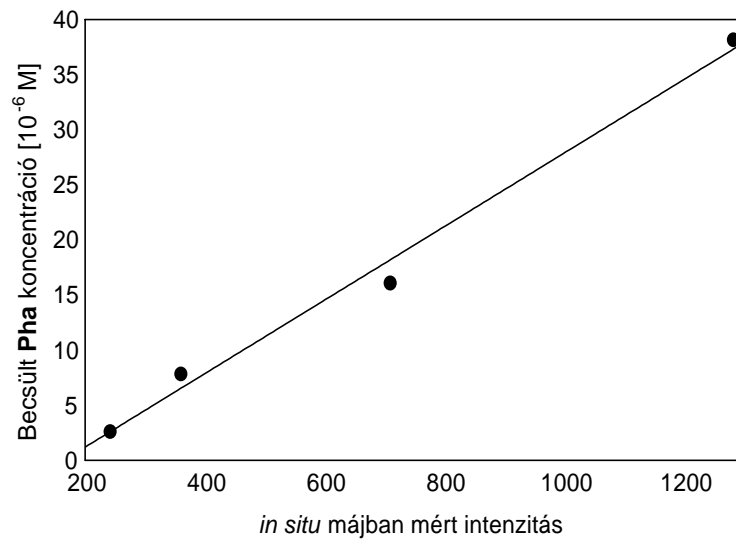
21. ábra. *In situ* felvett Hp kalibráció plazmában, 67 %-os hígítás alapján



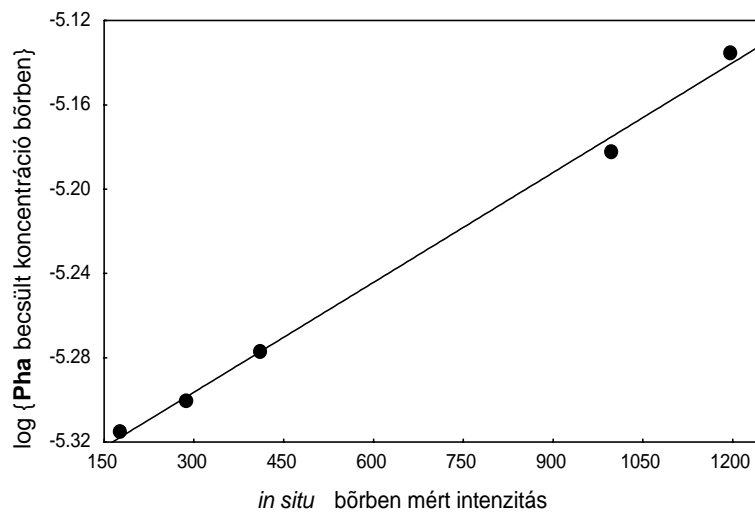
22. ábra. *In situ* felvett Hp kalibráció tumorban, 50 %-os szervhomogenizátum alapján



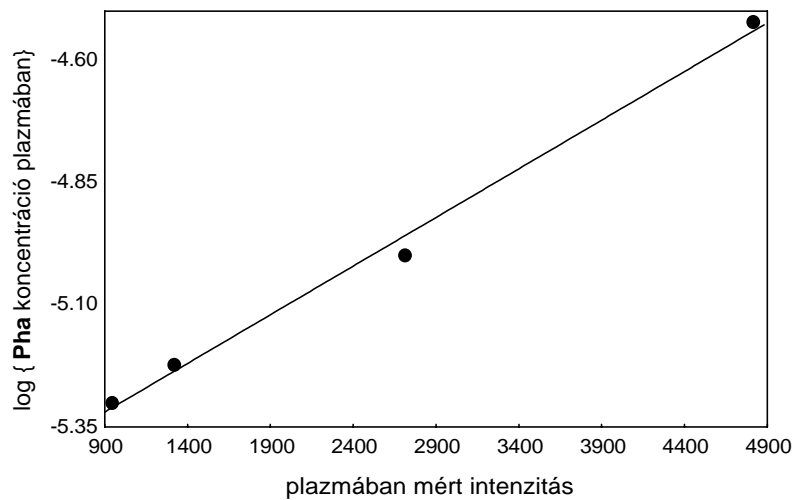
23. ábra. *In situ* felvett **Pha** kalibráció májban, 50 %-os szervhomogenizátum alapján



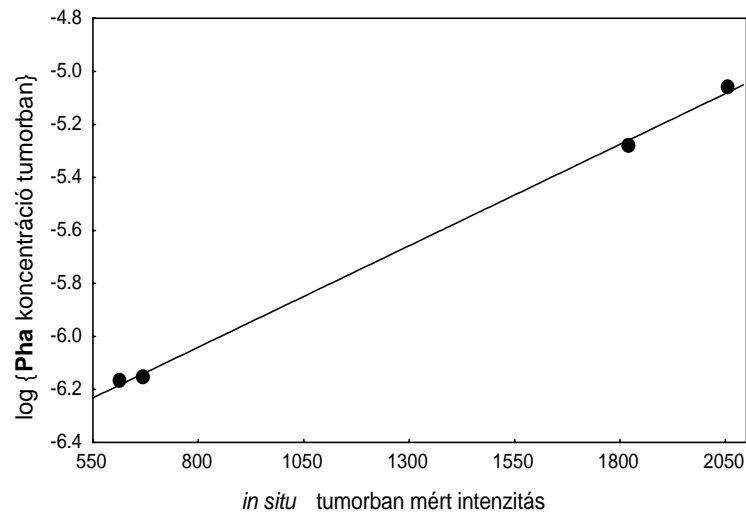
24. ábra. *In situ* felvett **Pha** kalibráció bőrben, 25 %-os szervhomogenizátum alapján



25. ábra. *in situ* felvett **Pha** kalibráció plazmában, 67 %-os hígítás alapján

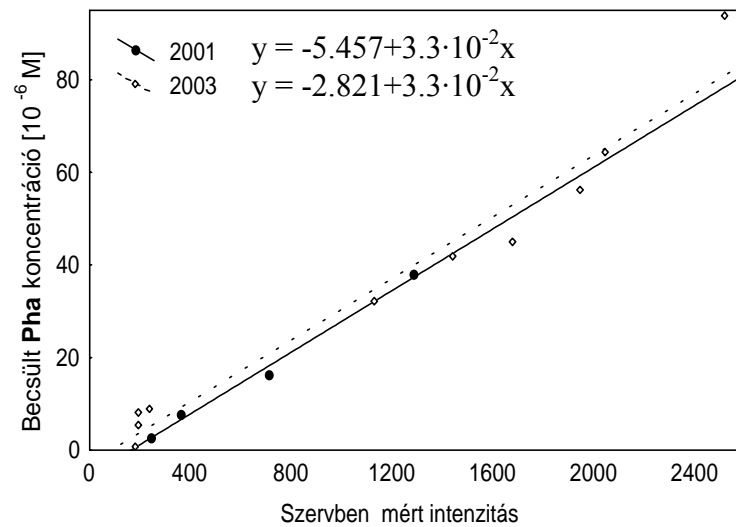


26. ábra. *In situ* felvett **Pha** kalibrációs tumorban, 50 %-os szervhomogenizátum alapján



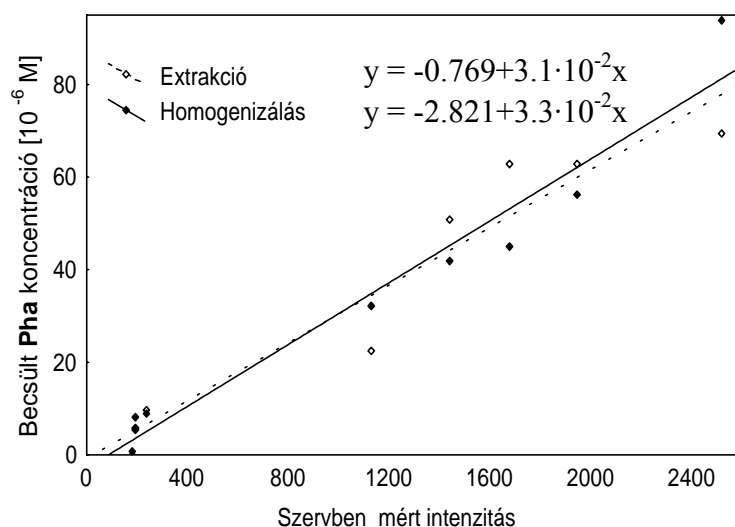
A jó reprodukálhatóságot a két különböző évben felvett, feoforbid *a* májban becsült intenzitás – koncentráció kalibráció összehasonlításával szemléltetjük (27. ábra). Az egyenesek egyenletei alapján a két egyenes meredeksége megegyezik.

27. ábra. *In situ* májban felvett **Pha** kalibráció ismétlése



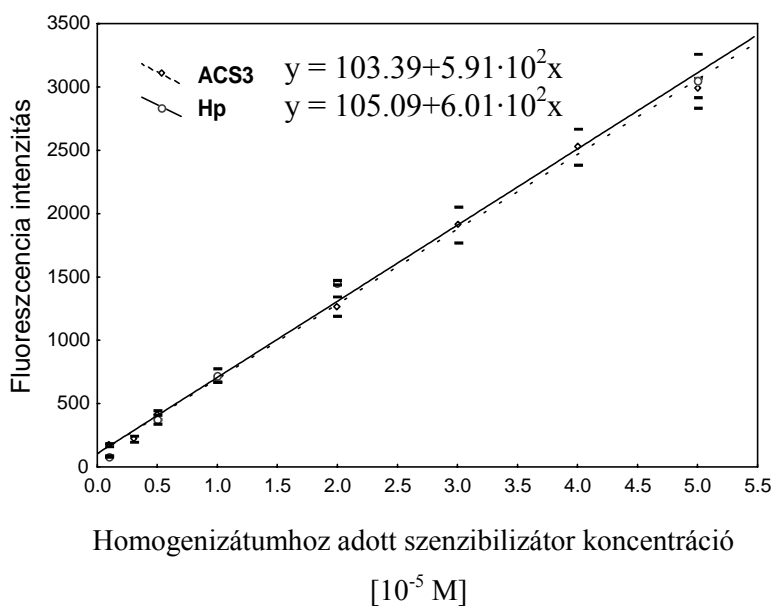
Az új kalibrációs görbéhez felhasznált minták szenzibilizátor tartalmát extrakciós módszerrel is meghatároztuk. Az alkalmazott metanolos extrakcióval [116] a **Pha** visszanyerése májból 90% felett volt. A 28. ábrán jól látható, hogy a két kalibrációs egyenes meredekségének eltérése 10% hibahatár alatt van.

28. ábra. *In situ* májban felvett **Pha** kalibráció összehasonlítása az extrakcióval



Vizsgáltuk, hogy a szenzibilizátor molekula alapvázát nem érintő, vagyis az oldalláncon történő szubsztitúció okoz-e változást a biológiai mintákban mérhető fluoreszcenciában. A vizsgált származék, egy csoportunkban kifejlesztett és az Eötvös Loránd Tudományegyetemen szintetizált fotoszenzibilizátor [117] (**ACS3**), ami a hematóporfirinnek egy, a két alkoholos OH csoportjából éter kötésekén keresztül képzett származéka.

29. ábra. Szubsztituens hatás vizsgálata májhomogenizátumban

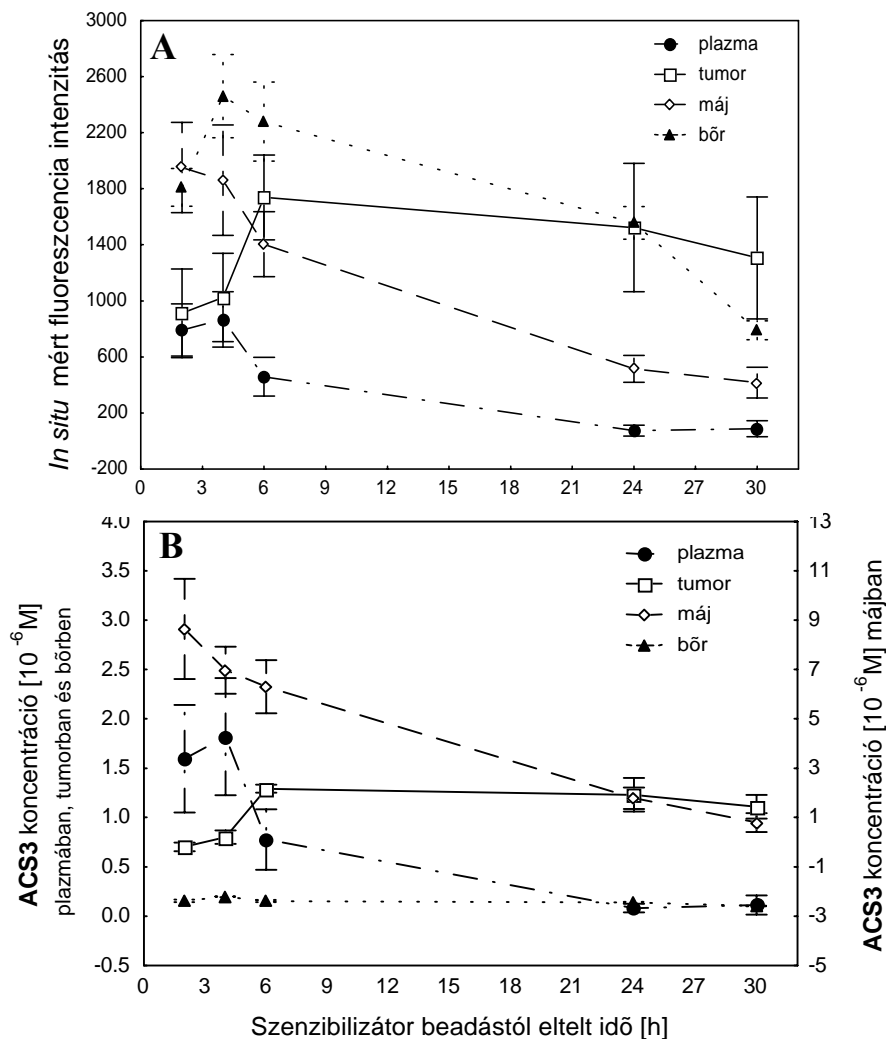


A 29. ábra alapján elmondható, hogy a vizsgált hematoporfirin származék esetében az oldalláncot érintő szubsztitúció nem volt hatással a májhomogenizátumban megállapított koncentráció - fluoreszcenciás intenzitás összefüggésre.

3.1.7. Az ACS3 felhalmozódási és kiürülési kinetikájának vizsgálata

A szervhigításon alapuló szenzibilizátor koncentráció meghatározás módszerét az ACS3 fotoszenzibilizátor felhalmozódási és kiürülési kinetikájának vizsgálatánál alkalmaztuk. A fluoreszcencia intenzitás méréseket a szenzibilizátor beadása után 2, 4, 6, 24 és 36 órával, 5-5 állaton végeztük. Megállapítottuk, hogy az *in situ* fluoreszcencia intenzitás méréssel nyomon követhető az egyes szervek szenzibilizátor-tartalmának változása, de nem kapunk információt a hatóanyag egyes szervek közötti megoszlásáról (30 A ábra).

30. ábra. ACS3 felhalmozódási és kiürülési kinetika vizsgálata egérben A) *in situ* fluoreszcencia intenzitás változás és B) becült koncentráció változás alapján.



Ennek oka, hogy az egyes szervek optikai tulajdonságai nagyban eltérnek egymástól, így ugyanazon intenzitás értékhez szervenként különböző koncentráció érték tartozik. Például, már kis szenzibilizátor tartalom esetén is jelentős fluoreszcenciás intenzitás mérhető bőrben, míg a sötét színű májban, mind a gerjesztő mind az emittált fény egy része elnyelődik, ezért több tízszer nagyobb szenzibilizátor tartalom mellett kapunk a bőrben mért intenzitáshoz hasonló értéket (30 ábra).

A szenzibilizátor koncentráció mennyiségi meghatározásával kapott kinetikai görbék szerint (30 B ábra) az első 24 órában a májnak, mint detoxikáló szervnek, a szenzibilizátor-tartalma a legnagyobb. A hatóanyag szállításáért felelős plazmában az első négy órát követően jelentősen csökken, míg tumorban fokozatosan nő az **ACS3** mennyisége. A fenti mérés szerint a vizsgált fotoszenzibilizátorral végzett PDT kezelés során a bevilágítás optimális ideje a szer beadása utáni 24-30 óra között van, amikor is a tumorban még magas, bőrben és plazmában már alacsony a szenzibilizátor mennyisége.

3.1.8. Eredmények

- a) Sikeresen összeállítottunk egy fotoszenzibilizátorok *in situ* kimutatására alkalmas fluoreszcenciás detektáló mérőberendezést, amit, az eddigiektől eltérően, nem lézeres fényforrásra alapoztunk.
- b) Az alkalmazott reflexiós elven működő szondával gyorsan és megbízhatóan mérhetjük a felhalmozott szenzibilizátor koncentrációjával arányos fluoreszcenciás intenzitást.
- c) A szervhígításos módszerrel nyert kalibrációs egyenesek segítségével a máj, a bőr, a tumor és a vérplazma szenzibilizátor tartalma azonnal becsülhető. Ezzel a pusztán intenzitásváltozás nyomonkövetéséhez képest megbízhatóbb értékelést kaphatunk az egyes szervekben mért szenzibilizátor koncentrációk arányairól.
- d) A fotoszenzibilizátorok felhalmozódásának nyomonkövetése rövid idő alatt, minimális állat felhasználásával elvégezhető.

3.2. Mennyiségi – Szerkezet – hatás összefüggés vizsgálatok

Célul tűztük ki, hogy irodalmi adatok felhasználásával porfirinek biológiai aktivitásait előrejelző modelleket építsünk illetve, hogy kiválasszuk azokat a kemometriai módszereket, amelyeket eredményesen alkalmazhatunk a tervezett saját kísérleteinkben mérendő biológiai aktivitás adatok feldolgozásával, tetrapirrol gyűrűs fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásainak előrejelzésére.

Ebben a fejezetben lineáris és nemlineáris, változószelektálásra és modellépítésre alkalmas kemometriai módszereket hasonlítunk össze aktivitást előrejelző tulajdonságaik alapján. Egy kisszámú, közel homológ pirofeoforbid sorozat fotodinamikus aktivitását, illetve tumorban való felhalmozódását, valamint nagyobb számú, négy nagyobb családba sorolható, fotoszenzibilizátorként megismert porfin-vázis vegyületcsoport (nem fotodinamikus) anti-HIV-1 aktivitását modellezzük.

A kemometriai közelítésmód sajátja, hogy az adatokból épít modellt, vagyis nem szükségképpen lehet fizikai értelmet rendelni a modellek konstansaihoz. Természetesen a fizikailag jól értelmezhető változók modellbe építéséről nem mondunk le, de nem tekintjük elsődleges feladatnak a fizikai értelemmel bíró modellek megalkotását.

3.2.1. Számítások menete

3.2.1.1. Geometria-optimalizálás és konformációanalízis

A porfirinek tulajdonságait magába sűrítő paramétereket a molekulák háromdimenziós (3D) szerkezetéből határoztuk meg. A geometria-optimalizálást és konformáció analízist a HyperChem® programmal, azon belül az MM⁺ nevű molekula mechanikai módszer felhasználásával végeztük. A szubsztituensek egyszeres kötési körüli lapszögeket véletlenszerűen változtatva állítottunk elő új szerkezeteket, majd energiájukat minimalizáltuk. Az adott molekulához tartozó legkisebb potenciális energiájú háromdimenziós szerkezetet

1024 konformer közül választottuk ki. A fenti 3D szerkezeteket, valamint a biológiai aktivitásadatokat adatbázisba rendeztük az IsisBase programmal.

3.2.1.2. Leíró változók (deszkriptorok)

Az elméleti 2D és 3D deszkriptorokat az MDL SDF (Molecular Design Limited, Structure Definition File) formátum alapján a 3DNET programmal számítottuk ki. A 87 szisztematikusan vizsgált leíró változót az 1. táblázatban ismertetjük.

1. Táblázat. A 3DNET programmal számított deszkriptorok.

Deszkriptorok neve és rövidítése	irodalom
Molekulatömeg (Mw)	[--]
Moláris térfogat (Vm)	[118]
Molekulafelület (S)	[118]
Globularitás (G)	[119]
49 különféle atomtömeg (MASS), atomi pozíció (POS), van der Waals felület (VDW), elektromegnegativitás (EN), lokális töltés, atomi polarizálhatósági hozzájárulás (POL), atomi elektrotopológiai index (ETPI), atomi lipofilicitási hozzájárulás (LIPO) súlyozással képzett WHIM deszkriptor.	[120]
<p>Az irányfüggő sajátértékek (λ_1 a legnagyobb, λ_2 a második legnagyobb és λ_3 a legkisebb kiterjedésében) arab számokkal kódoltak 1,2 és 3. (Pl. POL1 az atomi polarizálhatósággal súlyozott, a méretre jellemző irányfüggő WHIM index első komponense.) Irányfüggetlen teljes molekulaméret deszkriptorok: $T = \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3$, $A = \lambda_1\lambda_2 + \lambda_1\lambda_3 + \lambda_2\lambda_3$, $V = T + A + \lambda_1\lambda_2\lambda_3$ [pl. AMASS az atomtömeggel súlyozott „A” teljes molekulaméret deszkriptor] és molekulaalak deszkriptorok: $K = [\sum_m(\lambda_m / \sum_m \lambda_m) - 1/3] / (4/3)$, $m=1,2,3$.</p>	
Oldószer által bevonható felület (SAS)	[121]
Oldószer által megnövelt felület (SES)	[122]
Oldószer által megnövelt térfogat (SEV)	[122]
Számított polarizálhatóság (P)	[123,124]
Számított dipólusmomentum (μ)	[125]

Deszkriptorok neve és rövidítése	irodalom
Számított lipofilitás ($\log P$)	[126]
Számított Hildebrand oldhatósági paraméter (HILI)	[127]
Hidrogénkötés deszkriptorok (HDSA1, HDSA2, HASA1, HASA2)	[128]
Bodor féle $\log P$ deszkriptorok (QN, QO, QNO, QTOT)	[129]
Wiener index (WINI= Σ (a molekula minden két atomja közötti legkevesebb kötés száma))	[130]
Randič index (RANI)	[131]
Gravitációs index (GRAI= atomi tömegekből képzett index)	[128]
Topológiai index (TOPI)	[128]
Kémiai kötések forgási szabadsági foka (DF= a molekula szabadon forgatható kötéseinek száma a metil-csoportok rotációja nélkül)	[132]
Kettőskötés ekvivalens deszkriptor (DBE= $1 \times$ a gyűrűk száma + $1 \times$ a kettőskötések száma)	[123,124]
A van der Waals felület minimális (mESP) ^a , maximális (MESP) ^a és átlagos (AESP) ^a elektrosztatikus potenciálja valamint minimális (mMLP), maximális (MMLP) és átlagos (AMLP) lipofilitási potenciálja	[133]
A legmagasabb betöltött molekulapálya energiája (HOMO, HyperChem programmal, az AM1 szemiempirikus módszerrel számítva) ^a	
A legalacsonyabb betöltetlen molekulapálya energiája (LUMO, HyperChem programmal, az AM1 szemiempirikus módszerrel számítva) ^a	
A fenti HOMO és LUMO pályae energiák közötti energiakülönbség (DE) ^a	
Elektrosztatikus hidrogénkötés bázicitás (ESB= maximum negatív töltés abszolútértéke egy atomon)	[134]
Elektrosztatikus teljes hidrogénkötés bázicitás (ESTB= összegzett atomi ESB értékek)	[134]
Elektrosztatikus hidrogénkötés savasság (ESA= maximum pozitív töltés egy H atomon)	[134]
Elektrosztatikus teljes hidrogénkötés savasság (ESTA= az atomi ESA értékek összege)	[134]

^a: csak az anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésénél vizsgált deszkriptor

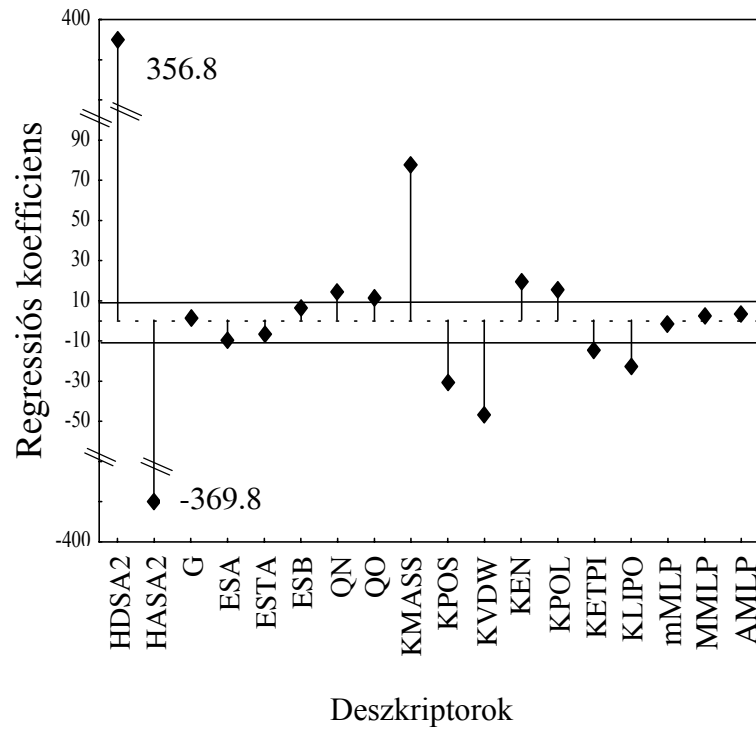
3.2.1.3. Többszörös lineáris regressziós számítások

A lineáris módszerek közül a többszörös lineáris regresszióval (MLR) kaptuk a legjobb eredményeket. Az MLR számításokhoz a StatisticaTM programcsomagot használtuk. Mivel az előzetesen kiszámított deskriptorok száma jóval meghaladta a vegyületek számát, előre irányuló változóbevonással (forward selection, FS), illetve egy főkomponens-elemzést (principal component analysis, PCA) követő előreirányuló változóbevonással választottuk ki azokat a deskriptorokat, amelyek 5%-os szinten még szignifikánsnak bizonyultak. Az utóbbi esetben az eredeti 87 deskriptor közül azokat a változókat alkalmaztuk a modellépítési eljárásban, amelyekre vonatkozó pontok a kétdimenziós főkomponens-együttható térben a vizuális értékelés szerint közel esnek a tanulmányozott aktivitásra vonatkozó ponthoz.

3.2.1.4. Részleges legkisebb négyzetek módszere

Részleges legkisebb négyzetek módszerének (PLS) alkalmazásakor (az anti-HIV-1 aktivitás tanulmányozásánál) az eredeti deskriptorok lineáris kombinációjával létrehozott új változókkal építettünk modelleket. A módszer előnye, hogy jól alkalmazható nagyszámú független változó és kevesebb vegyület esetén, valamint erősen korreláló változók vagy zajos adatok esetén is. A változó kiválasztás első lépésében nyert modellnél 3 PLS komponens képeztünk az eredeti 87 változó kombinációiból. A következő modellépítési eljárásban résztvevő 18 eredeti deskriptort a regressziós koefficiensek abszolút értéke alapján ($> 0,1$) választottuk ki. A második PLS modellünk 9 PLS komponenset tartalmazott. A harmadik lépésben a változók számát tovább csökkentettük 11-re (regressziós koefficiens abszolút értéke > 10 a második modellben, 30. ábra). Az új modellben a 11 deskriptor kombinációjából képzett 9 komponens vett részt. A modelloptimalizálást a 3DNET program auto-QSAR egységével folytattuk. Az így kapott 3 komponensű modell 3 deskriptort használt fel a rendelkezésre álló 11 változóból (ezzel valójában egy MLR modellnek felel meg).

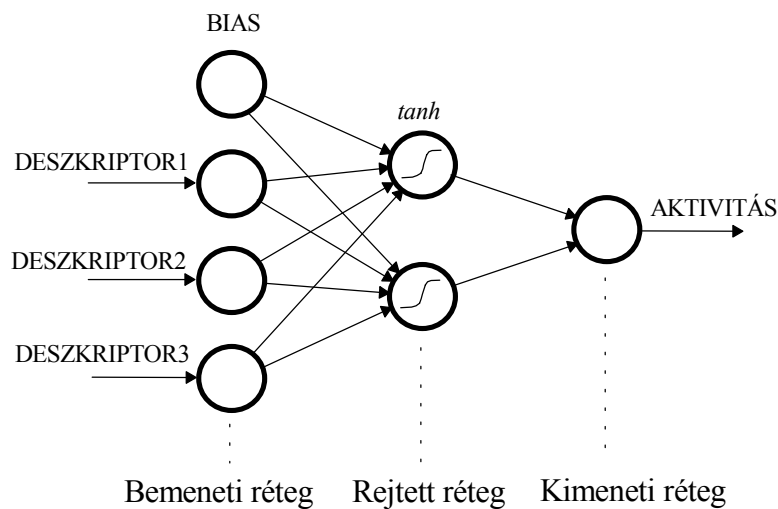
30. ábra A 18 változós, 9 komponensű PLS modell deskriptorainak regressziós koefficiensei (deskriptorok jelölését ld. 1. táblázatban)



3.2.1.5. Mesterséges ideghálózat alkalmazása

A nemlineáris illesztéseket és a hozzá kapcsolódó változókiválasztást a 3DNET programmal (ViChem Kft., Magyarország, 1998.), egy háromrétegű, visszafuttatásos algoritmussal tanuló, mesterséges ideghálózattal végeztük.

31. ábra. Az alkalmazott háromrétegű mesterséges ideghálózat



A bemeneti és kimeneti réteg lineáris, a rejtett réteg átviteli függvénye tangens hiperbolikus

A 87 elméleti leíró változó kiszámítását követően az ideghálózat idegsejtjei közötti kapcsolatokat kezdetben véletlenszerűen súlyoztuk. A visszafuttatásos algoritmus a fenti súlyokat abban az irányban változtatta, amely a számított és a tanulási folyamat elején betáplált kísérleti biológiai aktivitások közötti különbséget csökkenti.

A fontos változók kiválasztásához egy további bemeneti réteggel a deskriptorok abszolút értékeit lépésenként csökkentettük. Az új réteg minden egyes idegsejtje csak egy független változón keresztül kapcsolódik a hálózathoz. A kimeneti aktivitás szempontjából lényeges deskriptorok értékeit az ideghálózat visszaállítja úgy, hogy az új réteg és a bemeneti réteg közötti súlyfaktorokat változtatja, s a kevésbé fontos változókhoz tartozó súlyokat fokozatosan a 0 felé tolja. Az így kapott hálózati súlyokat egy lineáris skálán nagyság szerint sorba rendezve a legnagyobb súlyhoz tartozó deskriptorhoz 100%, míg a legkisebb súlyhoz tartozó deskriptorhoz 0% relatív fontosságot rendeltünk. A változókiválasztás következő lépéseként a leíró változókat alulról felfelé elhagyva a modellépítési eljárást többször megismételtük. Az utolsó 6 paraméter összes kombinációját teszteltük olyan modelleket építve, melyek 1 – 6 deskriptort tartalmaztak. A modellek aktivitás leíró képességét az R^2 -tel, a többszörös determinációs együtthatóval jellemezzük.

3.2.1.6. Modellek ellenőrzése

3.2.1.6.1. Bemenő adatok véletlenszerű összekeverése

A modellek előrejelző-képességét a bemenő adatok véletlenszerű összekeverésével is ellenőriztük. A biológiai aktivitás értékeket egyenként külön lapra felírtuk, megkevertük, a molekulák között kisorsoltuk, majd a modellépítést újból elvégeztük. Amennyiben a statisztikai jellemzők nem változtak meg szignifikánsan, az eredeti modellünk nem lett jobb annál, mintha véletlen számokat alkalmaztunk volna deskriptorként.

A dolgozatban bemutatott modellek vizsgálatokor a bemenő adatok véletlenszerű keverésével kapott aktivitás adatokat minden deszkriptorkombináció rosszul írta le és az előrejelzések is rosszak voltak (negatív Q^2 értékek).

3.2.1.6.2. Egy-elem-kihagyásos (leave-one-out, LOO) keresztellenőrzés

Az egy-elem-kihagyásos (leave-one-out) keresztellenőrzés során, amely automatikus a 3DNET programban, a modell kimenőjel-előrejelzési képességét vizsgáltuk. A keresztellenőrzést minden egyes molekulára elvégeztük úgy, hogy kihagytuk azt a modellépítési eljárásból, majd a nélküle megépített modellel a hozzátartozó aktivitásértéket becsültük. A becsült aktivitást összehasonlítottuk a kísérleti biológiai aktivitással. Az előrejelzés jósága a Q^2 értékével adható meg (3.1 egyenlet):

$$Q^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^m (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^m (Y_i - \bar{Y}_i)^2} \quad (3.1)$$

ahol m = tesztelt molekulák száma, Y_i = kísérleti aktivitás, \hat{Y}_i = számított aktivitás a kihagyott molekula nélkül épített modellel és \bar{Y}_i = a kísérleti aktivitások kihagyott molekula nélküli átlaga.

A Q^2 azt mutatja meg, hogy a modellel becsült aktivitás érték mennyivel jobban közelíti a kísérleti értékeket, mint a tanítóhalmaz alapján számított átlagos érték. A $Q^2 = 1$ esetben a kísérletileg mért aktivitás értékeket az előre becsült értékek függvényében ábrázolva egy origóból induló, 45°-os egyenest kapunk. Amennyiben a Q^2 negatív, a valódi és a becsült aktivitás közötti különbség nagyobb, mint a valódi aktivitás és az átlag közötti különbség. Ebben az esetben modellünk előrejelzésre nem alkalmas.

3.2.1.6.3. Több-elem-kihagyásos (leave-n-out, LNO) keresztellenőrzés

A modellek előrejelző-képességét több-elem-kihagyásos keresztellenőrzéssel is ellenőriztük. A pirofeoforbidok PDT aktivitásának valamint a tumorban való felhalmozódásának

tanulmányozásakor 10 molekula aktivitásértékei alapján épített modellel becsültük a kihagyott 3 molekula aktivitásait.

Az anti-HIV-1 aktivitás becslésekor a változókiválasztásban résztvevő 17 vegyület közül számításokként 4 molekulát hagytunk ki a modellépítési eljárásból (az adott deskriptor kombináció változtatása nélkül), majd becsültük az aktivitás értékeket. Az eljárást nyolcszor ismételtük meg úgy, hogy minden egyes molekula legalább egyszer a teszt-csoportba kerüljön. Az előrejelzés jóságát számításokként meghatároztuk, majd a nyolc Q^2 érték átlagával jellemeztük az adott deskriptor kombinációt.

3.2.1.6.4. Ellenőrzés külső mintákon

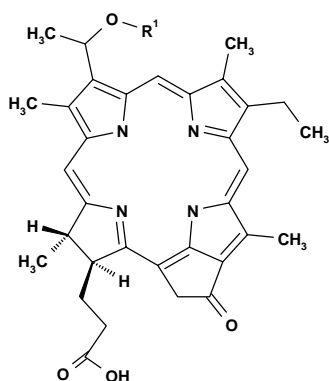
A pirofeoforbid család vizsgálatánál, a vizsgált vegyületek alacsony száma miatt, ezt a módszert nem állt módunkban alkalmazni.

Az anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésének legutolsó ellenőrző lépéseként, mindegyik (17 molekulával betanított) modellel becsültük három, a változózószelektálási és modellépítési eljárásból kihagyott vegyület aktivitás értékét. Természetesen, minden modell vizsgálatánál mindig ugyanannak a három molekulának az aktivitását jeleztük előre.

3.2.2. Pirofeoforbidok (PF) QSAR vizsgálata

3.2.2.1. Molekulák szerkezete

32. ábra. Molekulák szerkezete



PF1	R ¹ =metil
PF2	R ¹ =1-propil
PF3	R ¹ =1-pentil
PF4	R ¹ =1-hexil
PF5	R ¹ =cisz-3-hexenil
PF6	R ¹ =transz-3-hexenil
PF7	R ¹ =ciklohexil
PF8	R ¹ =2-hexil
PF9	R ¹ =1-heptil
PF10	R ¹ =1-octil
PF11	R ¹ =1-nonil
PF12	R ¹ =1-decil
PF13	R ¹ =1-dodecil

3.2.2.2. Mért PDT aktivitás és felhalmozódás

A 13 különböző pirofeoforbid származék PDT-aktivitását és tumorban való felhalmozódását Barbara Henderson és munkatársai publikálták 1997-ben [86].

Felhalmozódás: a tumorban felhalmozódott, ng/(g tumorszövet) egységben kifejezett szenzibilizátor-koncentráció reciprokának logaritmususa.

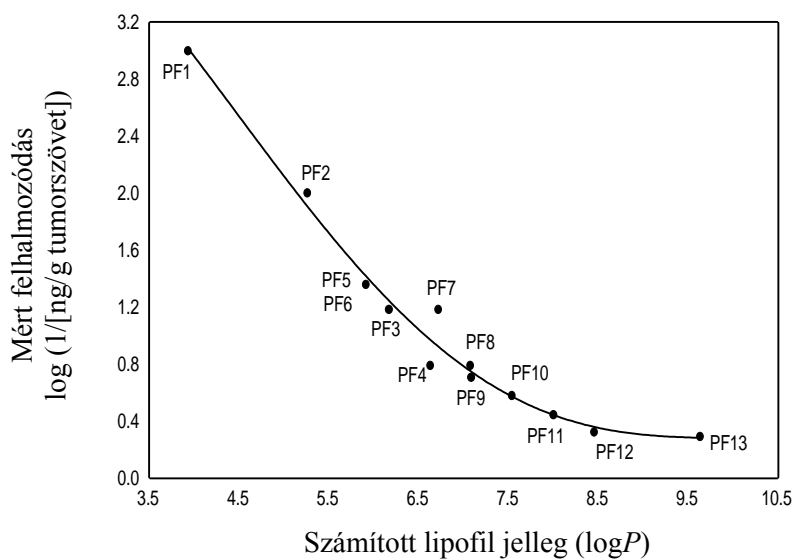
PDT-aktivitás: azon időtartam mediánjának a logaritmususa, amely alatt a tumor térfogata a kiindulási 50 mm³-es méretről 400 mm³-esre nő.

Mindkét tulajdonságot sugárzással indukált egér fibroszarkóma (RIF1) tumoron vizsgálták.

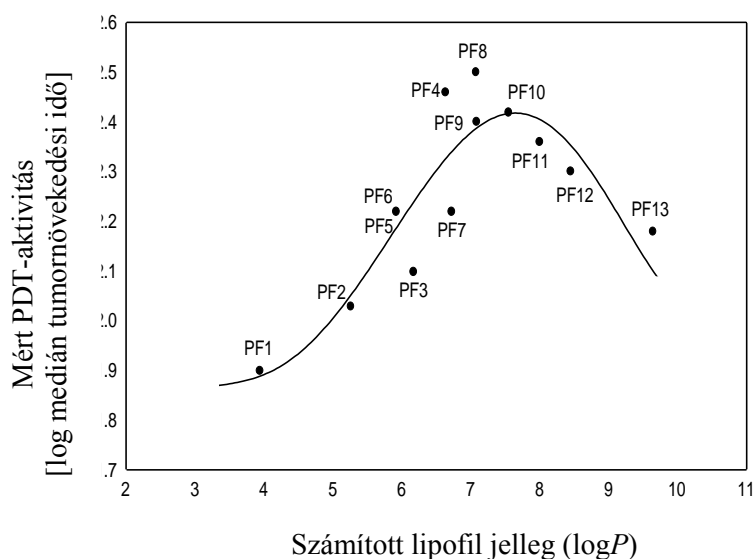
3.2.2.3. Biológiai aktivitás - lipofil jelleg összefüggések

A biológiai aktivitások egyik legfontosabb feltétele, hogy a hatóanyag a sejtekbe, illetve a szövetekbe bejusson. A meghatározó transzportfolyamatok nagymértékben függenek az illető vegyület lipofil jellegétől. Az oktanol/víz megoszlási hányados logaritmusával leírt ($\log P$) lipofil jelleg mérhető paraméter vagy közvetlenül számítható a kémiai szerkezetből, ezért fontos a kémiai szerkezet és a biológiai aktivitások közötti kapcsolat leírásában.

33. ábra. Tumorban való felhalmozódás - $\log P$ összefüggés



34. ábra. PDT aktivitás - $\log P$ összefüggés



A vizsgált biológiai aktivitásokat a $\log P$ -ben kifejezett lipofil jelleg függvényében ábrázoltuk. A felhalmozódás monoton változik a $\log P$ -vel, (33. ábra), míg a PDT-aktivitás – lipofil jelleg összefüggés nem lineáris (34. ábra). Így a fenti két biológiai aktivitás vizsgálata lehetőséget nyújt arra, hogy a lineáris (MLR) és a nemlineáris (ANN) matematikai módszereket összehasonlítsuk lineárishoz közel álló felhalmozódás) és határozottan nemlineáris (PDT aktivitás) kapcsolatok analízisével.

3.2.2.4. A modellépítés eredményei

3.2.2.4.1. Felhalmozódás

A tumorban szelektíven felhalmozódó szenzibilizátor koncentrációjának előrejelzésére szolgáló, ígéretes modellek deskriptorait és a szerkezet – aktivitás összefüggést leíró és előrejelző tulajdonságokat a 2. táblázatban foglaltuk össze.

A legjobb előrejelző képességű lineáris modell (MLR II) főkomponens-elemzéssel kiválogatott változókból épül fel. Két főkomponens változóiból vizuális értékelés alapján választottunk ki 11 változót (HILI, μ ,QN, KMASS, KPOS, KVDW, KETPI, KLIPO, KEN, KPOL és HDSA1), majd a deskriptorok számát előre irányuló változóbevonással tovább csökkentettük. A kapott négy deskriptoros modell nagyon jól írja le és jelzi előre a

pirofeoforbidok tumorszövetben való felhalmozódását, míg a legjobb két deskriptoros MLR modell determinációs együtthatójának értéke nagy (modell I), előrejelzésre mégsem alkalmas az alacsony Q^2 érték miatt.

2. Táblázat A felhalmozódás előrejelzésére szolgáló legjobb modellek

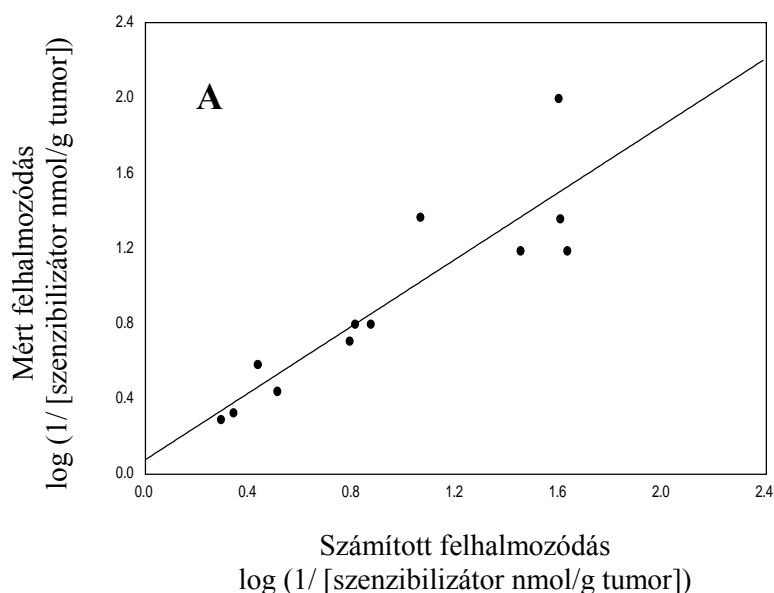
Modell szám	Modell típusa	Deskriptor kombinációk*	R^2	(SD)	LOO Q^2
I	MLR	log P , VLPO	0.9662	(0.1520)	0.257
II	MLR	HILI, KMASS, QN, μ	0.9850	(0.1157)	0.836
III	ANN	log P , AVDW, mMLP	0.9985	(0.0293)	0.903
IV	ANN	log P , mMLP	0.9421	(0.1819)	0.850
V	ANN	Log P	0.9469	(0.1743)	0.781

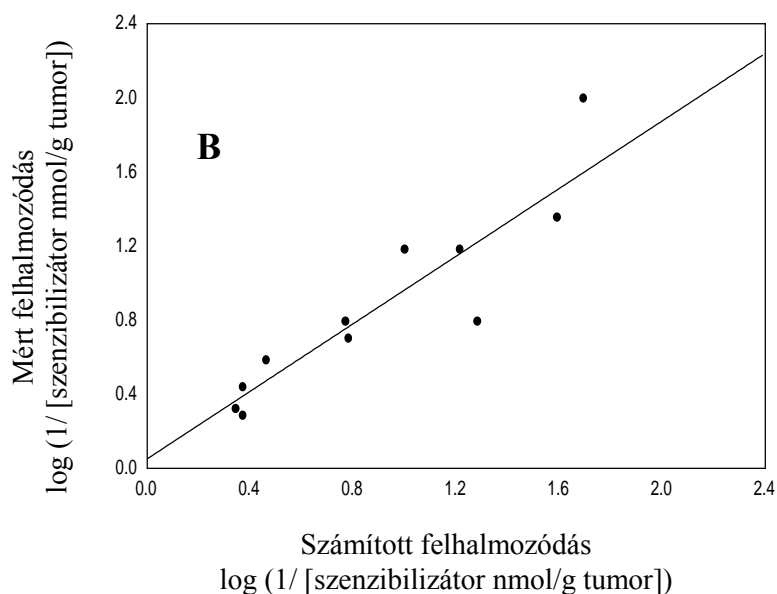
*A deskriptor rövidítése magyarázatát az 1. táblázat tartalmazza.

R^2 : a mért és számított aktivitás közötti többszörös determinációs együttható, SD: a számított aktivitáshoz tartozó reziduális szórás, LOO: egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzés, Q^2 : az előrejelzés jóságát jellemző szám (3.1 egyenlet).

A nemlineáris módszerrel épített legjobb modelleket szintén a 2. táblázat tartalmazza. A mesterséges ideghálózat rejtett rétegében mindhárom esetben két idegsejt van. Az ANN modellek előrejelző képessége jó, már egy deskriptor esetén is (modell V). A Q^2 érték további változók bevonásával (modell IV és III) tovább javul.

35. ábra. A felhalmozódás előrejelzése az ANN III (A) és ANN V (B) modellekkel.





A legfontosabb leíró változó a lineáris és a nemlineáris modelleknél is a $\log P$, ami a felhalmozódás – lipofil jelleg görbe illeszkedése alapján várható volt (33. ábra). Mesterséges ideghálózat segítségével egyedül a lipofilitási adatokból is képesek vagyunk a szenzibilizátorok tumorban való felhalmozódását elfogadhatóan előrejelezni (35 B ábra).

A változókiválasztási módszerek összehasonlításához a legjobb MLR modell deskriptorkombinációjából mesterséges ideghálózattal, míg a III-as ANN modell változóiból MLR-rel is építettünk modellt. A 3. táblázatban összefoglalt eredmények szerint a modellépítési eljárás megváltoztatásával kapott új modellek előrejelzési képességei rosszabbak, mint az eredeti modelleké, vagyis nem érdemes a változószelektálásban alkalmazott módszert a modellépítésben megváltoztatni.

3. Táblázat. A lineáris és nemlineáris modellek összehasonlítása (felhalmozódás)

Deskriptor kombinációk*	Modellépítő eljárás	R^2	(SD)	LOO Q^2
HILI, KMASS, QN, μ	MLR (Model II)	0.9850	(0.1157)	0.836
	ANN-nel építve	0.9759	(0.1174)	0.263
$\log P$, AVDW, mMLP	ANN (Model III)	0.9985	(0.0293)	0.903
	MLR-rel építve	0.9158	(0.2531)	0.014

*A rövidítések magyarázatát az 2. táblázat tartalmazza.

3.2.2.4.2. PDT aktivitás

A fotodinamikus effektust követő tumornövekedés-késleltetés és a lipofil jelleg közötti összefüggés nem lineáris (34. ábra), ezért a kapcsolat leírására várhatóan a nemlineáris módszerek a legalkalmasabbak. A vizsgált biológiai aktivitás és más paraméterek közötti függvények lefutását nem ismerjük, ezért a modellépítést lineáris módszereket alkalmazva is elvégeztük. Az ígéretes modellek statisztikai jellemzőit a 4. táblázatban foglaltuk össze.

A főkomponens-elemzést követő előre irányuló változóbevonás módszerét alkalmazva a PDT aktivitást jól leíró, két-deszkriptoros MLR modell előrejelző képességét vizsgáltuk (modell VI).

A változókiválasztást, majd a modellépítést a mesterséges ideghálózattal történő számításoknál úgy végeztük el, hogy a rejtett réteg idegsejtjeinek számát egytől háromig változtattuk. A legjobb, két és három deszkriptort tartalmazó, modelleket két rejtett neuron alkalmazásával kaptuk.

4. Táblázat A PDT-aktivitás előrejelzésére szolgáló legjobb modellek

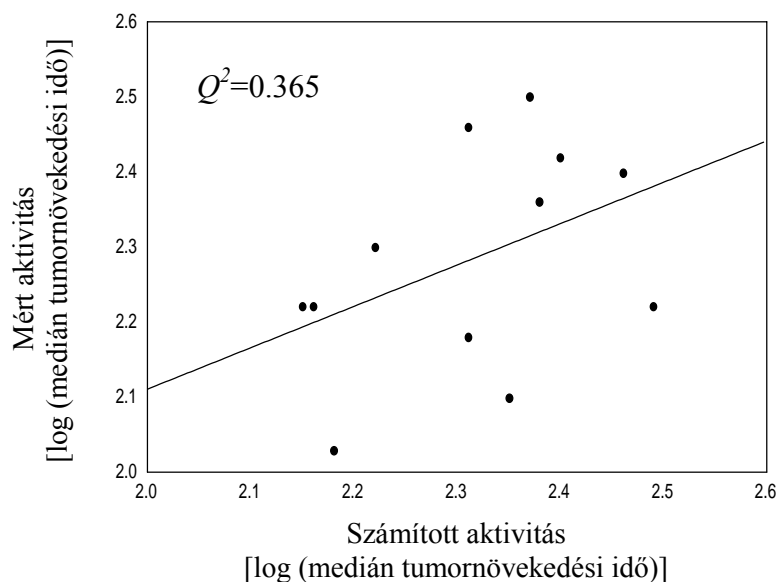
Modell száma	Modell típusa	Deszkriptor kombinációk*	R^2	(SD)	LOO Q^2
VI	MLR	MMLP, ESTB	0.9978**	(0.1148)	0.465
VII	ANN	AMASS, AVDW, logP	0.9973	(0.0088)	0.879
VIII	ANN	AEN, AMASS, logP	0.9930	(0.0142)	0.813
IX	ANN	logP, WINI	0.9880	(0.0186)	0.747
X	ANN	Számított logP	0.8479	(0.0661)	0.365

*A rövidítések magyarázatát a 2. táblázat tartalmazza.

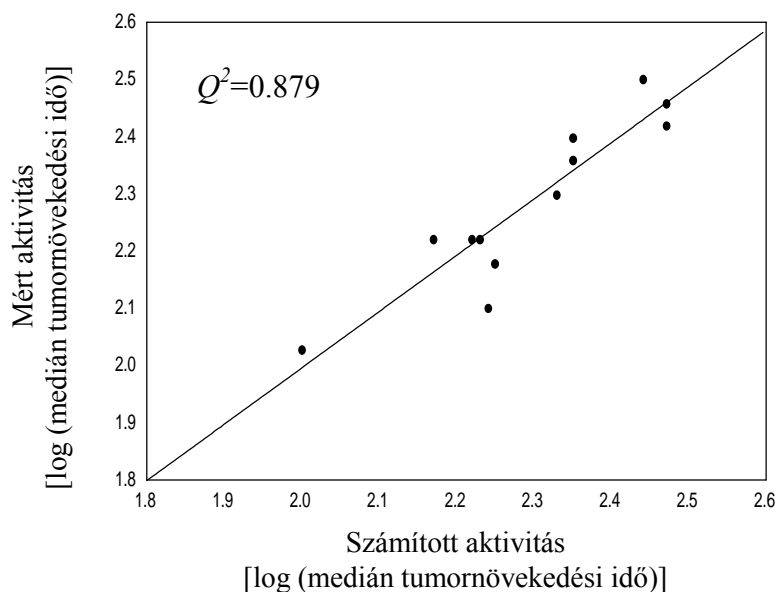
A táblázat tartalmaz egy olyan egy-deszkriptoros modellt (modell X), amely az eredeti közleményben alkalmazott tulajdonság, a lipofil jelleg aktivitást leíró illetve előrejelző tulajdonságait szemlélteti. A modellhez tartozó Q^2 adatból és a hozzá tartozó egyenesnek (36.

ábra) az origóból induló, 45°-os egyenestől való eltéréséből jól látszik, hogy a $\log P$ önmagában nem alkalmas a tumornövekedés gátlás, mint PDT aktivitás, előrejelzésére

36. ábra. A PDT aktivitás előrejelzése a X. jelű ANN modellel



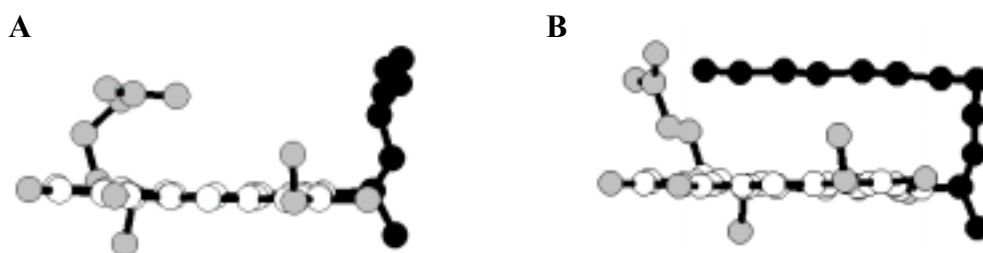
37. ábra. A PDT aktivitás előrejelzése a VII-es jelű ANN modellel



Olyan további változók bevonásával, mint a Wiener index illetve a molekulaméretet jellemzői, úgymint az atomi tömegekkel, atomi van der Waals térfogatokkal vagy atomi elektronegativitásokkal súlyozott WHIM deskriptorok (AMASS, AVDW, AEN), az előrejelző-képesség nagymértékben javítható (37. ábra).

Az irányfüggetlen, molekulaméretet leíró deskriptorok fontossága nem meglepő, mivel a vizsgált vegyületek kémiai szerkezete csak abban az alkil-éter-oldalláncban különbözik, ami a konformáció-analízis szerint az alapváz fölé hajlik (38. ábra).

38. ábra. Példák a vegyületek 3D szerkezetére (A: PF3 és B: PF11)



A fekete golyók az alkil-éter-oldalláncot, a fehérek az alapvázat, míg a szürkék az egyéb szubsztituenseket jelzik.

A lineáris és nemlineáris változókiválasztási módszerek összehasonlítását a PDT aktivitás tanulmányozásánál is elvégeztük a felhalmozódásnál ismertetett módon. A számítások eredményeit 5. táblázat tartalmazza. Ebben az esetben is az új, kevert építésű modellek statisztikai jellemzői jelentősen rosszabbak, mint az eredeti modellekében, vagyis nem érdemes változószelektálásban alkalmazott módszert a modellépítésben megváltoztatni.

5. Táblázat. A lineáris és nemlineáris modellek összehasonlítása (PDT aktivitás)

Deskriptor kombinációk*	Modellépítő eljárás	R^2	(SD)	LOO Q^2
MMLP, ESTB	MLR (Model VI)	0.9978	(0.1148)	0.465
	ANN-nel építve	0.7836	(0.0805)	0.179
AMASS, AVDW, logP	ANN (Model VII)	0.9973	(0.0088)	0.879
	MLR-rel építve	0.8285	(0.1141)	0.158

*A rövidítések magyarázatát a 2. táblázat tartalmazza.

A vegyületek kis száma miatt valódi külső mintás ellenőrzést nem végezhetünk, ezért az egy - elem - kihagyásos keresztellenőrzés során legjobbnak bizonyult VII-es jelű modell esetében 8 molekula aktivitásával betanított mesterséges ideghálózat segítségével becsültük a többi öt szenzibilizátor PDT aktivitását. Az előrejelzés minőségét mérő Q^2 érték 0.834 volt 0.08 reziduális szórás mellett. Modellünk a **PF1** molekula aktivitását (Y_{pred}) 2.042-es értékre becsülte, míg a kísérleti értékét (Y_{exp}) a szerzők nem adták meg (csak $\log P \approx 3$). A többi vizsgált molekula és a hozzájuk tartozó aktivitás értékek: **PF4** ($Y_{pred}=2.524$, $Y_{exp}=2.46$), **PF5** ($Y_{pred}=2.144$, $Y_{exp}=2.22$), **PF11** ($Y_{pred}=2.355$, $Y_{exp}=2.36$) és **PF13** ($Y_{pred}=2.227$, $Y_{exp}=2.18$). Ebben a vizsgálatban a **PF1** és **PF13** molekulákhoz tartozó becsült értékeket extrapolációval számítottuk ki.

3.2.2.5. Következtetések

Célunk volt, hogy mennyiségi szerkezet – hatás – összefüggést mutassunk ki fotoszenzibilizátor-molekulák háromdimenziós szerkezete és fotodinamikus aktivitása, valamint a tumorban való felhalmozódása között.

A mesterséges ideghálózat alkalmazásával nagyon jó modelleket építettünk a PDT-aktivitás leírására és előrejelzésére. A felhalmozódás mértéke mind a lineáris (MLR), mind a nemlineáris (ANN) módszerrel épített modelljeinkkel jól leírható és előrejelezhető.

A felhalmozódás előrejelzésének legfontosabb paramétere a $\log P$, ami mesterséges ideghálózatot alkalmazva egyedül is elégséges leíró változó.

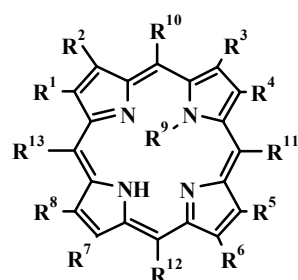
A PDT-aktivitás előrejelzésére a $\log P$ egyedül nem alkalmas, a Wiener indexszel illetve a molekulaméretre jellemző WHIM deskriptorokkal (AMASS, AVDW, AEN) kiegészített modellek sokkal megbízhatóbb előrejelzést szolgáltatnak.

Végül, az általunk épített legjobb nemlineáris modell jobban leírja a PDT-aktivitást, mint az a kvázi-mechanisztikus nemlineáris modell, amit az irodalomban közöltek.

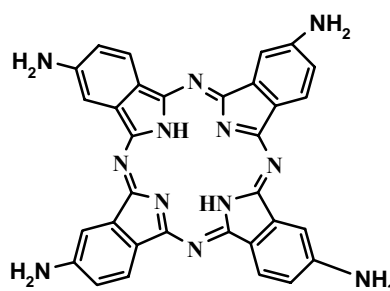
Mindent összevetve elmondhatjuk, hogy a mesterséges ideghálózat alkalmazásával igen jól jelezhető előremind a felhalmozódás, mind a PDT aktivitás még ilyen kis számú molekula esetén is. A molekulaszervezetek közötti csekély eltérés miatt az épített modellek más vegyületcsaládok biológiai aktivitásának előrejelzésére nem használhatók, de a modellépítés eredményessége alapján feltételezhető, hogy a mesterséges ideghálózat alkalmas eszköz egy nagyobb mintaszámú, szerkezetében jobban eltérő porfirinvázas csoport mennyiségi szerkezet-hatás – összefüggés vizsgálatára is.

3.2.3. Porfirin és rokon vegyületek QSAR vizsgálata

3.2.3.1. Molekulák szerkezete (39. ábra)



Porfirin-váz



2,9,16,23-tetraamino-ftalocianin (M13)

6. Táblázat Vegyületek és funkciós csoportjaik

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹	R ¹²
M1	Me	V	Me	V	Me	P	P	Me	H	H
M2	Me	V	Me	V	Me	P	P	Me	Me	H
M3	Me	Et	Me	Et	Me	P	P	Me	H	H
M4	Me	HO-Et	Me	V	Me	P	P	Me	H	H
M5	Me	V	Me	HO-Me	Me	P	P	Me	H	H
M6	Me	G	Me	G	Me	P	P	Me	H	H
M7	A	P	A	P	A	P	P	A	H	H
M8	A	P	A	P	A	P	A	P	H	H
M9	Me	P	Me	P	Me	P	A	P	H	H
M10	Me	P	A	P	Me	P	A	P	H	H
M11	A	P	Me	P	A	P	A	P	H	H
M12	Me	V	Me	Et	Me	C	P	Me	H	A

	R ⁹	R ¹⁰	R ¹¹	R ¹²	R ¹³
M14	H	Ar	Ar	Ar	Ar
M15	H	ΦCOOH	ΦCOOH	ΦCOOH	ΦCOOH
M16	CH ₃	ΦCOOH	ΦCOOH	ΦCOOH	ΦCOOH
M17	H	ΦCOOH	ΦCOOH	ΦH	ΦCOOH
M18	H	ΦCOOH	ΦCOOH	ΦCl	ΦCOOH
M19	H	ΦCH ₃	ΦCH ₃	ΦCOOH	ΦCH ₃
M20	H	ΦCONH ₂	ΦCONH ₂	ΦCONH ₂	ΦCONH ₂

A: -CH₂CO₂H, C: -CO₂H, Et: -CH₂CH₃, HO-Et: -CHOHCH₃, Me: -CH₃, HO-Me: -CH₂OH, G: -CHOHCH₂OH, P: -CH₂CH₂CO₂H, V: -CHCH₂, Ar: -C₆H₅, Φ: -C₆H₄-; **M1**: protoporfirin IX; **M2**: N-metil-protoporfirin IX; **M3**: mezoporfirin IX; **M4**: 3-hidroxi-etil-8-vinil-deuteroporfirin IX; **M5**: 3-vinil-8-hidroxi-metil-deuteroporfirin IX; **M6**: 2,4-bisglikol-deuteroporfirin IX; **M7**: uroporfirin III; **M8**: uroporfirin I; **M9**: pentakarboxil-porfirin I; **M10**: hexakarboxil-porfirin I; **M11**: heptakarboxil-porfirin I; **M12**: Klorin e₆; **M14**: tetrafenil-porfirin; **M15**: tetra(4-karboxi-fenil)-porfirin; **M16**: N-metil-tetra(4-karboxi-fenil)-porfirin; **M17**: 5-fenil-10,15,20-tri(karboxi-fenil)-porfirin; **M18**: 5-(p-klorofenil-10,15,20-tri(karboxi-fenil)-porfirin; **M19**: 5-(p-karboxi-fenil)-10,15,20-tri(tolil)-porfirin; **M20**: tetra(4-karboxi-amido-fenil)-porfirin.

3.2.3.2. Biológiai adatok

Az számításainkba bevont 20 különböző tetrapirrol-vázás vegyület HIV-1 vírus inaktiválási képességét Debnath és munkatársai publikálták 1994-ben [88]. A szerzők által megadott anti-HIV-1 aktivitás ($\log 1/EC_{50}$): azon porfirin koncentráció (mM) reciprokanak logaritmus, amely mellett a P24-es HIV-1 magfehérje termelése 50%-ra csökken vírussal fertőzött MT-2 humán T limfocita sejtekben. A vírusfehérje mennyiségi meghatározását ELISA (enzymelinked immunoabsorbent assay) teszttel végezték.

3.2.3.3. A modellépítés eredményei

Az eredeti 20 molekula közül hármat (**M3**, **M7** és **M17**; lásd 6. táblázat) félretettünk külső ellenőrzésre, majd a maradék 17 molekula felhasználásával a kémiai szerkezet - anti-HIV-1 aktivitás - összefüggést jól leíró modelleket építettünk lineáris és nemlineáris módszerekkel. A legjobb modellek leíró és előrejelző tulajdonságait a 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. Táblázat Az anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésére szolgáló legjobb modellek

Modell száma	Modell típusa	Deszkriptor kombinációk*	R^2	(SD)	LOO Q^2
I	MLR	AMASS, MASS1, ESTA	0.8275	(0.4440)	0.715
II	MLR	μ , POL1, APOL	0.7898	(0.4901)	0.650
III	PLS_9C	HDSA2, HASA2, QN, QO, KMASS, KPOS, KVDW, KEN, KPOL, KETPI, KLIPO	0.9040	(0.2280)	0.416
IV	PLS_3C	QO, KVDW, KPOL	0.6766	(0.4183)	0.417
V	ANN_3N	KMASS, DF, DBE	0.9541	(0.1576)	0.770
VI	ANN_4N	HOMO, DF, DBE	0.9982	(0.0281)	0.846
VII	ANN_3N	DF, DBE	0.9654	(0.1242)	0.673
VIII	ANN_4N	DF, DBE	0.9877	(0.0787)	0.475
IX	ANN_4N	DF, ESTA	0.9654	(0.1368)	0.567

*A rövidítések magyarázatát a 2. táblázat tartalmazza.

Az első két modellt (I és II) többszörös lineáris regresszióval, a következő két modellt (III és IV) részleges legkisebb négyzetek módszerével, míg az utolsó öt modellt (V, VI, VII, VIII és IX) mesterséges ideghálózattal építettük.

Mindkét MLR modell aktivitást leíró képessége (R^2) elmarad az egyéb módszerekkel épített modellek hasonló tulajdonságaitól. Az egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzés szerint, a Q^2 értékek még így is meghaladják az irodalomban közölt, CoMFA módszerrel épített modell előrejelző képességét (0.59).

A PLS modellek aktivitást leíró képességei nagyon jók, de előrejelző képességeik (Q^2) nem érik el a 0.6 körüli értéket.

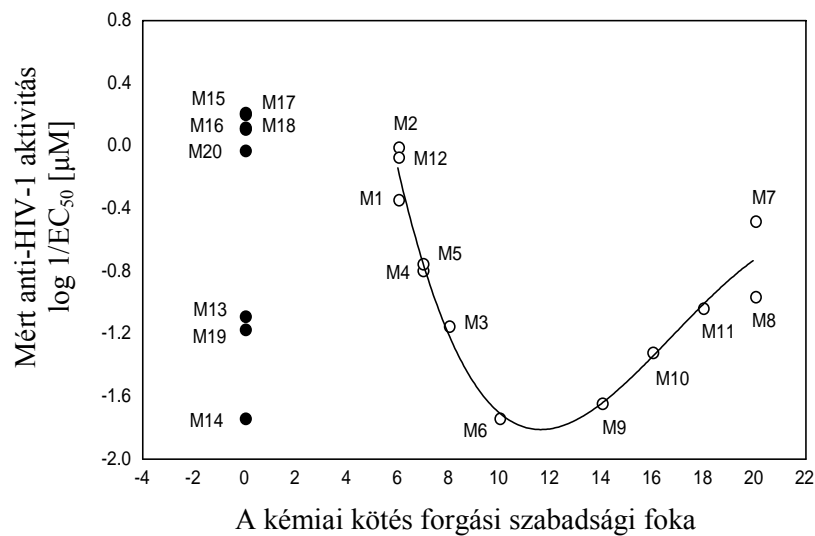
A legjobb modellt (modell VI) egy 4 rejtett neuront tartalmazó mesterséges ideghálózattal építettük. Ebben a deskriptor kombinációban található a kémiai kötés forgási szabadsági foka (DF), a kettőskötés ekvivalens (DBE) deskriptor, valamint a legmagasabb betöltött molekulapálya (HOMO) energiája. A legjobb, 3 rejtett neuron alkalmazásával megépített modellben (modell V) a HOMO energia helyett az atomi tömegekkel súlyozott, molekula-alak deskriptor szerepel (KMASS). Az egy-elem-kihagyásos ellenőrzés alapján ez a modell azonban nem alkalmas az uroporfirin I (**M8**) aktivitásának becslésére. E deskriptor kombináció előrejelző képessége ($Q^2 = 0.549$ -ről) nagymértékben javult ($Q^2 = 0.77$ -re), amikor a vegyület szerepelt a tanító halmazban, de aktivitás értékét nem becsültük meg a keresztellenőrzéskor.

Mivel mindkét három deskriptoros ANN modellben szerepelnek a DE és DBE változók, ezért 3 és 4 rejtett idegsejt szám mellett is teszteltük kombinációjukat. A 3 idegsejtet tartalmazó modellnél (modell VII) ugyancsak akkor kaptunk elfogadható Q^2 értéket, ha az uroporfirin I (**M8**) vegyületet kihagytuk a tesztcsoportból, de a tanító csoportból nem (a Q^2 érték 0.345-ről 0.673-ra javult).

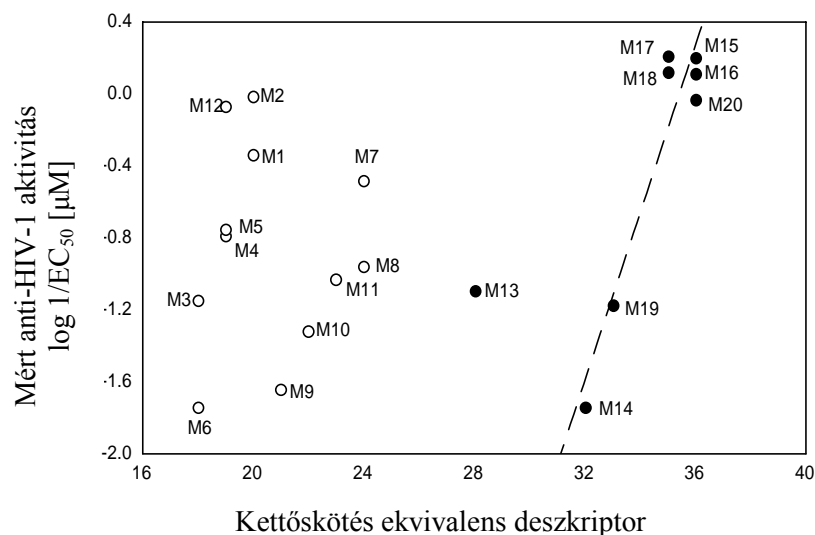
3.2.3.4. Az egyes deszkriptorok és az anti-HIV-1 aktivitás közötti összefüggések

Az egyes deszkriptorok és a vizsgált biológiai aktivitás közötti összefüggést ábrázolva jól látható, hogy a kémiai kötés forgási szabadsági fokával nagyon jól leírható a hematoporfirin származékok és a klorin anti-HIV-1 aktivitása, de nem képes megkülönböztetni egymástól az egyes tetrafenilporfirineket és a ftalocianint (40. ábra).

40. ábra. DF - anti-HIV-1 aktivitás összefüggés



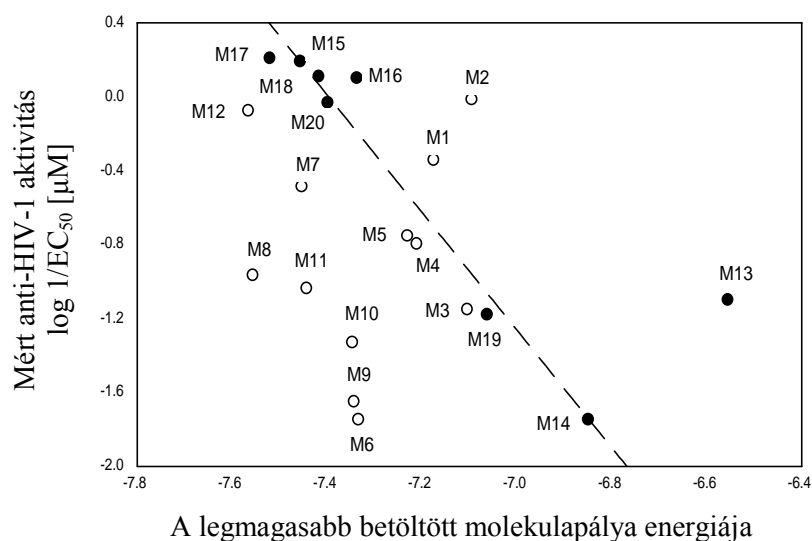
41. ábra. DF - anti-HIV-1 aktivitás összefüggés



A kettőskötés ekvivalens deszkriptor szerint a tetrafenil-porfirin származékok, a ftalocianin és a hematoporfirin típusú molekulák is külön-külön csoportot alkotnak, de ez a változó már képes valamelyest különbséget tenni az egyes tetrafenil-porfirinek között is (41. ábra).

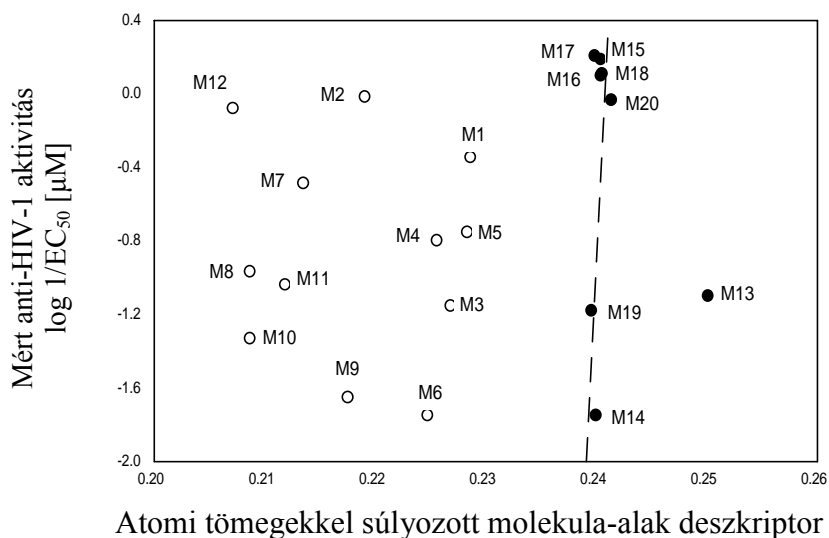
A legmagasabb betöltött molekulapálya (HOMO) energiája szintén az egyes tetrafenil-porfirinek elkülönítéséhez járul hozzá (42. ábra).

42. ábra. HOMO - anti-HIV-1 aktivitás összefüggés



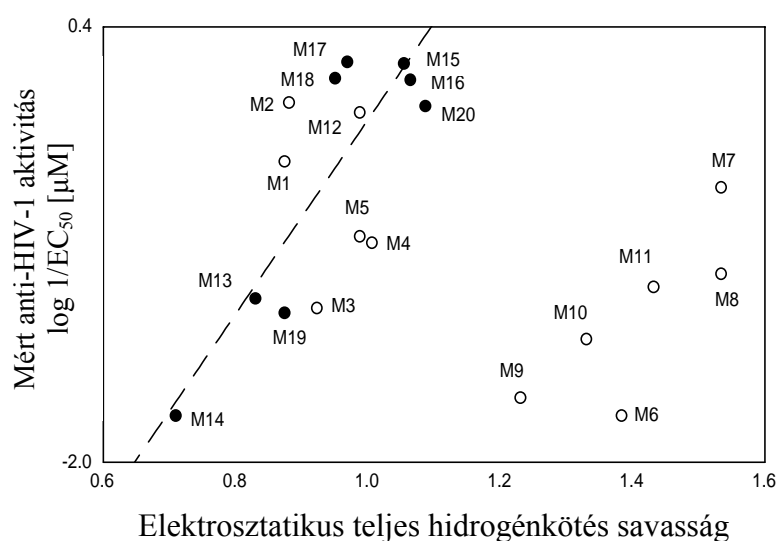
A molekula-alak deszkriptor (KMASS) az egyes tetrafenil-porfirinek megkülönböztetésére nem alkalmas, de a ftalocianint (**M13**) már elkülöníti ettől a vegyület-csoporttól (43. ábra).

43. ábra. KMASS – anti-HIV-1 aktivitás összefüggés



A IX jelű ANN modellben a kémiai kötés forgási szabadsági foka mellett az elektrosztatikus teljes hidrogénkötés savasság szerepel deskriptorként (44. ábra). Az ESTA deskriptor és az anti-HIV-1 aktivitás közötti összefüggés nemlineáris. A függvény, bár jól megkülönbözteti a porfirineket, a tetemes reziduális szórások miatt előrejelzésre önmagában nem alkalmas. A grafikus ábrázolás szerint a 0.9 és 1.1 hidrogénkötés savasság értékek közötti intervallumba eső molekulák között nagyobb a nagy anti-HIV-1 aktivitású vegyületek valószínűsége.

44. ábra. ESTA - anti-HIV-1 aktivitás összefüggés



3.2.3.5. Modellek ellenőrzése

Az n-elem-kihagyásos keresztellenőrzés, valamint a három nem vizsgált porfirin aktivitásának előrejelzésére kapott eredményeket a 8. táblázatban foglaltuk össze.

Az előrefele történő változóbevonás módszerével épített I modell (MLR) az n-elem-kihagyásos ellenőrzéskor nagyon jó eredményt adott, de a külső minták aktivitásértékét rosszul jelezte előre. A két három-deszkriptoros ANN modell (modell V és VI) több mint 70 %-os előrejelzési képességet mutatott az n-elem-kihagyásos ellenőrzés szerint.

A kétváltozós deskriptor kombinációk közül a VII-es és IX-es modellek Q^2 értéke is meghaladta a 0.55-öt.

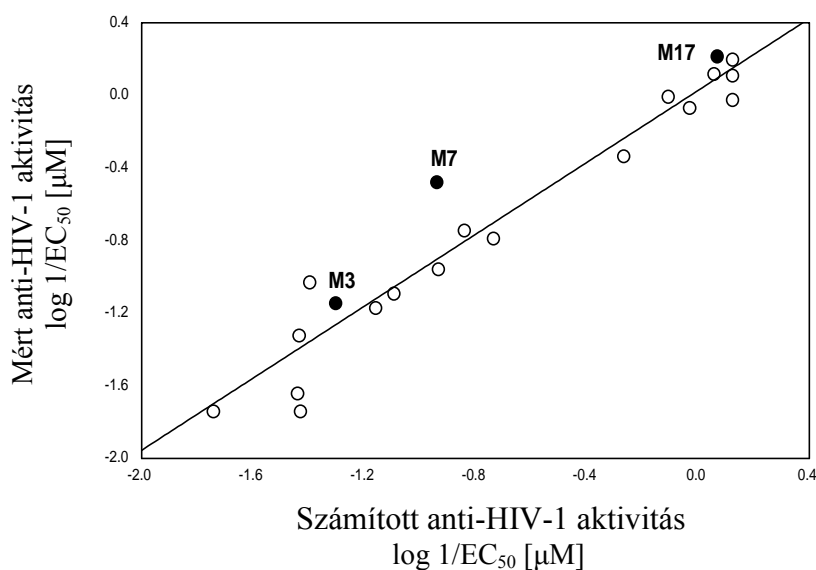
8. Táblázat. Az aktivitást leíró modellek ellenőrzése

Modell száma	Modell típusa	Deszkriptor kombinációk	N-elemes Q^2 *	(SD)	LOO Q^2
I	MLR	AMASS, MASS1, ESTA	0.730	(0.094)	-1.253
II	MLR	μ , POL1, APOL	0.390	(0.368)	-4.234
III	PLS_9C	HDSA2, HASA2, QN, QO, KMASS, KPOS, KVDW, KEN, KPOL, KETPI, KLIPO	-0.479	(0.471)	0.759
IV	PLS_3C	QO, KVDW, KPOL	0.339	(0.298)	0.563
V	ANN_3N	KMASS, DF, DBE	0.747	(0.122)	0.788
VI	ANN_4N	HOMO, DF, DBE	0.879	(0.136)	0.616
VII	ANN_3N	DF, DBE	0.584	(0.766)	0.773
VIII	ANN_4N	DF, DBE	0.342	(1.124)	0.700
IX	ANN_4N	DF, ESTA	0.619	(0.279)	0.742

*= nyolcszor, különböző vegyület kombinációval [(**M1**, **M2**, **M5**, **M20**), (**M2**, **M5**, **M8**, **M18**), (**M2**, **M5**, **M13**, **M20**), (**M2**, **M6**, **M10**, **M16**), (**M4**, **M9**, **M14**, **M20**), (**M10**, **M12**, **M15**, **M20**), (**M4**, **M9**, **M15**, **M19**) és (**M2**, **M5**, **M11**, **M18**)] megismételt négy-elem-kihagyásos ellenőrzéskor kapott értékek átlaga, s a hozzá tartozó reziduális szórás.

A belső ellenőrzések alapján ígéretesnek ítélt modellek közül három modell Q^2 értéke is nagyobb, mint 0.7 (ANN modell V, VII és IX). Az eddigi legmegbízhatóbb VI jelű modell kevésbé pontosan jelezte előre a három tesztvegyület vizsgált aktivitását. Ennek ellenére nagyon jól becsülte meg annak a molekulának az anti-HIV-1 aktivitását, amelyet Debnath és munkatársai az eredeti CoMFA vizsgálatból kihagytak (protoporfirin IX dimetilészter, az **M1** vegyület R⁶-os és R⁷-es helyzetű propionsav oldalláncainak metil-észtere: mért aktivitás = -1.83, számított aktivitás = -1.33). Indoklásuk szerint, a mért adat a molekula nagy lipofilitása miatt valószínűleg nem pontos. Modellünk a négy molekula aktivitását 0.714-es Q^2 értékkel jelzi előre. A 45. ábrán bemutatjuk a három külső tesztvegyület aktivitását legjobban előrejelző modellel (V model) készült becslést.

45. ábra. Külső ellenőrzés a V jelű ANN modellel



3.2.3.6. Modellépítési eljárások összehasonlítása

Négy módszerrel (MLR, PLS, ANN és a CoMFA) épített modellek anti-HIV-1 aktivitást leíró és előrejelző képességét hasonlítottuk össze. Az MLR módszerrel épített modellekkel a külső validálási lépés molekuláinak biológiai aktivitását nem lehetett előrejelezni, míg a PLS módszerrel épített modellek a belső (LOO, LNO) ellenőrzések alapján megbízhatatlannak bizonyultak. A legígéretesebb általunk vizsgált eljárás a mesterséges ideghálózat alkalmazása. Több modellt építettünk ezzel a módszerrel, amelyek statisztikai jellemzői meghaladják az irodalmi CoMFA modell hasonló tulajdonságait. Bár a CoMFA modellek jól alkalmazhatóak az anti-HIV-1 aktivitás leírására, esteleg értelmezésére is az előrejelző képességükről nem kaptunk valódi képet, mivel az egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzésen kívül a szerzők a modelleket nem validálták

A CoMFA modell szerinti, az anti-HIV-1 aktivitásra hatással lévő fontos fiziko-kémiai jellemzők, úgymint az elektrosztatikus tulajdonságok, a molekulán belüli töltéeloszlás, valamint a szterikus faktorok, az általunk hatékonyan talált deszkriptor kombinációkban is megjelennek. Pl. az ESTA deszkriptor az elektrosztatikus állapotot és a töltéeloszlást jellemzi, a HOMO energia az elektronállapotokat írja le, míg a DF és DBE deszkriptorok a

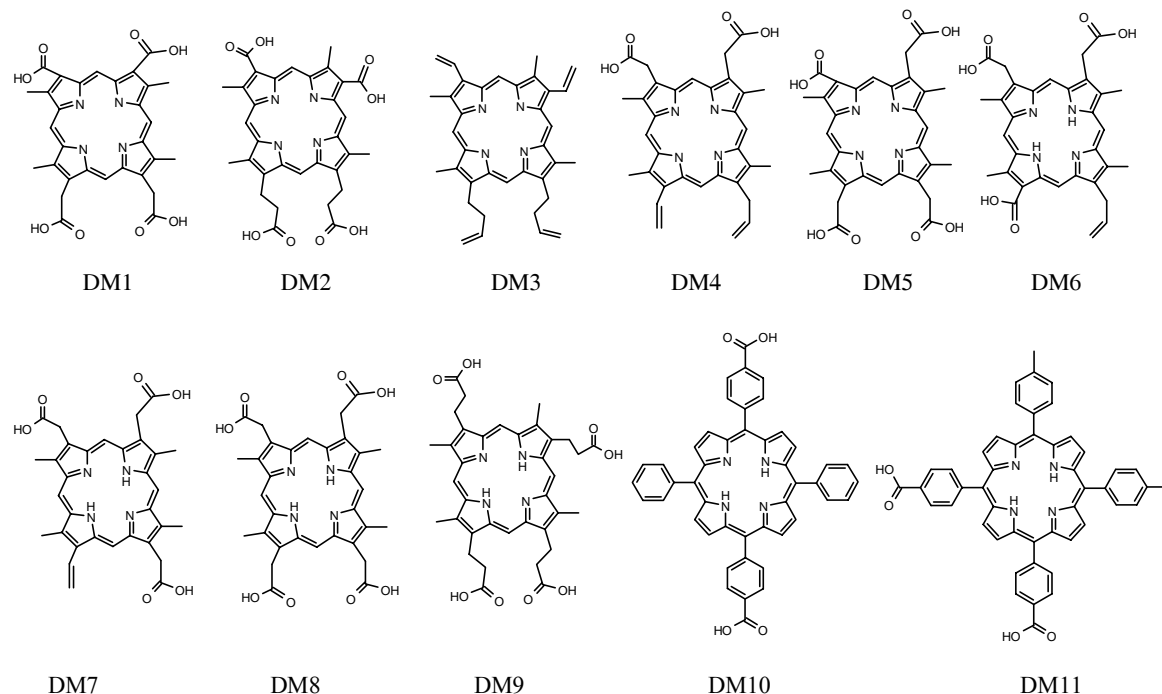
szterikus faktorok sűrített formái. A vizsgált molekulák biológiai aktivitása közötti eltérés főleg a karboxil csoportjaik számában és hosszában jelentkező eltérésre vezethető vissza, ami a fent említett három tulajdonságban okoz jelentős változásokat.

3.2.3.7. A „tervezett” molekulák anti-HIV-1 aktivitásának becslése

Az ANN módszer nem alkalmas extrapolálása, vagyis a nagy aktivitású új vegyületekhez a legnagyobb, míg a hatástalan vegyületekhez a legkisebb betanított aktivitásértéket rendeli. Ebben a fejezetben azt mutatjuk be, hogy ennek ismeretében, a modellépítés eredményeit hogyan hasznosíthatjuk az új, hatékony molekulák tervezésében.

Az ANN modellek szerint várhatóan azoknak a hematoporfirineknek magas az anti-HIV-1 aktivitása, amikre a $DF \leq 6$ és $DBE \approx 20$ feltételek teljesülnek. Ennek alapján kilenc hematoporfirin és két tetrafenilporfirin vegyületet terveztünk.

46. ábra. Tervezett porfirinek

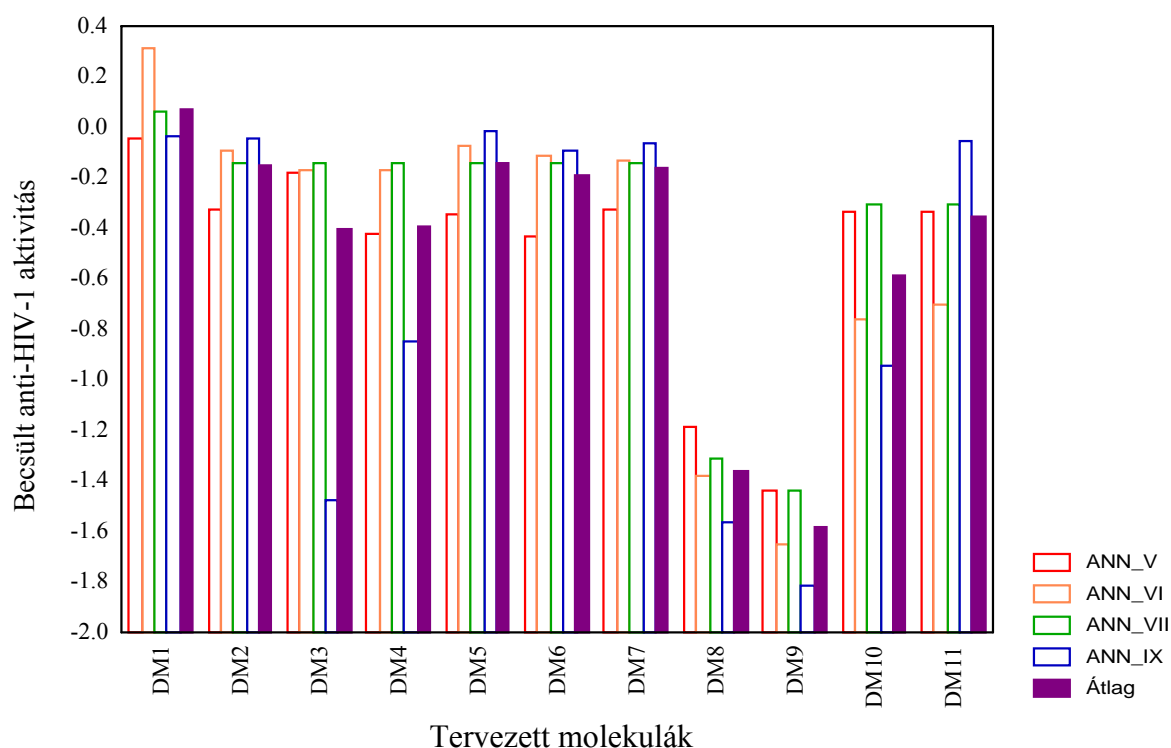


Két 6-nál nagyobb DF értékű hematoporfírint (**DM8** és **DM9**) úgy terveztünk, hogy aktivitásuk alacsony legyen és egy molekula (**DM1**) esetében a kémiai kötés forgási

szabadsági foka 4 volt. Az utóbbi porfirinnél vártuk a legmagasabb aktivitás értéket. Az eredeti vegyületek között 0, 1, 3 és 4 karboxil-csoportot tartalmazó tetrafenilporfirin származék található, ezért két, ehhez a vegyület családhhoz tartozó, két karboxil-csoportos molekulát is terveztünk (**DM10** és **DM11**).

A legjobb ANN modellekkkel (V, VI, VII és IX) számított aktivitás értékeket a 47. ábrán mutatjuk be.

47. Ábra. A tervezett porfirinek becsült aktivitása



Modelljeink a tervezett két karboxil csoportos tetrafenil-porfirin biológiai aktivitását az egy (MP6) és a három (MP7 és MP8) karboxil csoportot tartalmazó molekulák aktivitása közé becsülte. Ez összhangban van Debnath és munkatársai azon megjegyzésével, hogy legalább három karboxil csoport szükséges ahhoz, hogy a tervezett vegyület aktivitás értéke magas legyen. Ugyanezt tapasztaltuk a hematoporfirinek vizsgálatakor is. A nulla (DM3) és két (DM4) karboxil csoportot tartalmazó molekulák aktivitás értéke a legalacsonyabb a hatékonyan tervezett 6 vegyület közül. A másik négy ígéretes molekula (DM2, DM5, DM6

és DM7) becsült aktivitása magasabb a tervezés kiindulási alapjául szolgáló protoporfirin IX ($\log_1/EC_{50}=-0.34$) anti-HIV-1 aktivitásánál. Bár a természetes porfirinekénél (hematoporfirin család) a DF értéke minden esetben 6 vagy nagyobb, a legjobb becsült aktivitást a DF = 4 értékre tervezett DM1 molekulára kaptuk (0.073).

3.2.3.8. Következtetések

Célunk volt, hogy mennyiségi szerkezet – hatás összefüggést mutassunk ki fotoszenzibilizátorként megismert tetrapirrol-vázás molekulák háromdimenziós szerkezete és nem fotodinamikus anti-HIV-1 aktivitása között.

A modellépítési eljárások összehasonlításával megállapítottuk, hogy mindhárom módszer (MLR, PLS és ANN) alkalmas a porfirinek kémiai szerkezete és HIV-1 vírus inaktiváló hatása közötti kapcsolat leírására.

Az egy-elem-kihagyásos keresztellenőrzés önmagában nem ad megbízható képet egy modell aktivitást előrejelző képességéről. Sokkal megbízhatóbb eredményt kapunk, ha egy több-elem-kihagyásos ellenőrzésen alapuló modell-kiválasztás után külső mintákon is elvégezzük az ellenőrzést.

A belső és külső ellenőrzések szerint megbízható előrejelzést csak a mesterséges ideghálózattal épített modellekkel kaptunk. A legfontosabb paraméter mindegyik ANN modell szerint a kémiai kötés forgási szabadsági foka (DF). Ez a változó önmagában nem alkalmas a vizsgált aktivitás becsülésére, legalább még egy, a kettőskötés ekvivalens deszkriptor (DBE) vagy az elektrosztatikus teljes hidrogénkötés savasság deszkriptor (ESTA) hozzájárulása szükséges. A belső ellenőrzési mutatók még jobban javíthatók egy harmadik változó alkalmazásával (HOMO vagy KMASS).

Az anti-HIV-1 aktivitást befolyásoló molekuláris tulajdonságok figyelembevételével új vírusellenes vegyületek tervezhetők.

Mindent összevetve elmondhatjuk, hogy a mesterséges ideghálózattal épített modelljeink alkalmasak arra, hogy egy nagyobb mintaszámú, ebben a vizsgálatban nem szereplő, porfirin-vázis csoport anti-HIV-1 aktivitását előrejelezzük. A külső ellenőrzési eljárásba bevont molekulák kis száma miatt ajánljuk, hogy a négy legjobb ANN modellel becsült $\log(1/EC_{50})$ értékek átlagát fogadjuk el várható aktivitás-értéknek.

4. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA TÉZISPONTOKBAN

Munkánkban a fotodinamikus aktivitással rendelkező vegyületek biológiai hatásának teszteléséhez és elemzéséhez elengedhetetlen metodikák beállítását és optimalizálását írtuk le:

1. Egy, a porfirin-vázis és rokon vegyületek fluoreszcenciájának *in situ* detektálására alkalmas készüléket állítottunk össze. Megfelelő optikai elemek (szűrők, lencsék, optikai szálak) segítségével elértük, hogy a szervekben az általunk fejlesztett, reflexiós elven működő szondával kapott spektrumok minősége megközelíti az oldószerben felvett spektrumok minőségét. Alkalmazásával gyorsan és megbízhatóan mérhetjük az *in situ* felhalmozódott szenzibilizátor koncentrációjával arányos fluoreszcenciás intenzitást.
2. Kidolgoztunk egy új módszert az *in situ* mért fluoreszcencia intenzitás és az adott szervben felhalmozott szenzibilizátor mennyisége közötti összefüggés kalibrálására, amivel az általánosan alkalmazott extrakciós eljárásoknál könnyebben és gyorsabban határozható meg az egyes szövetek szenzibilizátor tartalma. Az eljárás során, szenzibilizátorral nem kezelt állatok szerveiből különböző szövettartalmú szervhomogenizátumokat készítettünk s ismert mennyiségű porfirin hozzáadásával, kalibrációs görbéket vettünk fel. A kezelt állatok szerveiből készített homogenizátumok szenzibilizátor-tartalmát a fenti görbék alapján határoztuk meg. Máj- és tumormintákon

bizonyítottuk, hogy a teljes szervere vonatkoztatott szenzibilizátor-tartalom az 50% szervtartalmú homogenizátumból legalább olyan jól becsülhető, mint a bonyolultabb, különböző koncentrációjú homogenizátumból lineáris extrapolációval kapott mérésekből.

3. A kezelt állat szervében *in situ* mért fluoreszcenciás intenzitás és a szervből készített mintákban meghatározott szenzibilizátor koncentráció alapján *in situ* kalibrációs görbét készítettünk. A kapott kalibrációval, az *in situ* mért fluoreszcenciás intenzitásból azonnal becsülhetjük a felhalmozott porfirin mennyiségét. A módszerrel máj, bőr, tumor és vérplazma szenzibilizátor-tartalmát kalibráltuk. Mivel az azonos családba tartozó tetrapirrol-vázás vegyületek fotofizikai tulajdonságai közötti eltérés (szubsztituens hatás) elenyésző, az adott család egy tagjára elkészített *in situ* kalibráció várhatóan a család többi tagjára is alkalmazható. PDT aktivitás mérésnél rövid időn belül, minimális állat felhasználásával meghatározható a szenzibilizátor gerjesztés optimális ideje, valamint az abszolút koncentrációk meghatározása lehetővé teszi az egyes vegyületek felhalmozódásának összehasonlítását.
4. Egy egynemű pirofeoforbid sorozat háromdimenziós szerkezete és a tumorban való felhalmozódása, valamint fotodinamikus aktivitása közötti kapcsolat mennyiségi szerkezet – hatás összefüggés vizsgálata során épített modellek aktivitást leíró, valamint előrejelző képességeit összehasonlítotva kimutattuk, hogy a vizsgált szenzibilizátor sorozat felhalmozódásának mértéke mind a többszörös lineáris regresszióval, mind a mesterséges ideghálózattal épített modelljeinkkel jól leírható és előrejelezhető. A felhalmozódás előrejelzésének legfontosabb paramétere a $\log P$, ami mesterséges ideghálózatot alkalmazva egy egyedül is elégséges leíró változó.
5. Számításaink szerint lineáris módszerrel nem építhető a PDT-aktivitás leírására és előrejelzésére alkalmas modell, míg a mesterséges ideghálózattal nagyon jó modelleket

építettünk a tumornövekedés késleltetés előrejelzésére. Ebben az esetben az aktivitás előrejelzésére a $\log P$ egyedül nem alkalmas. A Wiener indexszel illetve a molekulaméretre jellemző WHIM deskriptorokkal (AMASS, AVDW, AEN) kiegészített modellek sokkal megbízhatóbb előrejelzést szolgáltatnak.

6. Egy nagyobb számú, egymástól szerkezetileg jobban eltérő porfin-vázás fotoszenzibilizátorokból álló vegyületcsoport nem fotodinamikus anti-HIV-1 aktivitását három módszerrel (többszörös lineáris regresszióval, parciális legkisebb négyzetek módszerével és mesterséges ideghálózattal) modellezve megállapítottuk, hogy a lineáris módszerekkel (MLR, PLS) épített modellek is jól leírják a vizsgált aktivitást, de az n -elem-kihagyásos vagy a külső mintás ellenőrzés alapján, előrejelzésre nem alkalmasak. A belső és külső ellenőrzések szerint megbízható előrejelzést csak a mesterséges ideghálózattal épített modellekkel kaptunk.
7. Az anti-HIV-1 aktivitás előrejelzésének legfontosabb paramétere mindegyik ANN modell szerint a kémiai kötés forgási szabadság foka (DF). Ez a változó önmagában nem alkalmas a vizsgált aktivitás becslésére, legalább még egy, a kettőskötés ekvivalens deskriptor (DBE) vagy az elektrosztatikus teljes hidrogénkötés savasság deskriptor (ESTA) hozzájárulása szükséges. A belső ellenőrzési mutatók még jobban javíthatók egy harmadik változó alkalmazásával (HOMO vagy KMASS).
8. Bemutattuk, hogy az anti-HIV-1 aktivitást befolyásoló molekuláris tulajdonságok figyelembevételével új vírusellenes vegyületek tervezhetők. Modelljeink alapján alacsony és magas aktivitású vegyületeket terveztünk, illetve elemeztünk. A számítások megfeleltek a várakozásnak, a tervezett magas aktivitású molekulák aktivitását a modellek magasra becsülték, míg az alacsonyabbra tervezett aktivitású molekulákét alacsonyabbra. A módszerrel hiányos vegyületsor hiányzó tagjainak aktivitását is

becsültük. Megállapítottuk, hogy a karboxilált tetrafenilporfirinek esetében valóban legalább három karboxil csoport szükséges a megfelelő aktivitás eléréséhez, amit irodalmi ismeretek is megerősítenek [88].

9. Az általunk végzett számítások alapján elmondhatjuk, hogy az MLR és a PLS nem, míg mesterséges ideghálózat alkalmas módszer kisebb és nagyobb számú tetrapirrol-vázás molekulák mennyiségi – szerkezet hatás összefüggés vizsgálatára egynemű és nem egynemű vegyületek, és a szerkezeti paramétereiktől lineárisan és nem lineárisan függő biológiai aktivitások esetén is.

5. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm az MTA Kémiai Kutatóközpont vezetésének, hogy lehetővé tették munkámat, valamint konferenciákon való részvételeimet.

Köszönetem fejezem ki a Varga József Alapítványnak, hogy doktori szigorlatom letételét anyagilag támogatta.

Köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Jakus Juditnak és Dr. Héberger Károlynak, akik által a tudomány két számomra új, izgalmas területét, a fotobiológiát és a kemometriát megismerhettem. Köszönöm szakértő támogatásukat, amivel az elmúlt öt évben segítettek.

Köszönetemet szeretném kifejezni a MTA KKKI Oxidációs Folyamatok osztály minden egykor velem dolgozó munkatársának, néhai Prof. Gál Dezsőnek, Dr. Vasvári Gábornak, Dr. Németh Andrásnak, Dr. Keszler Ágnesnek és Dr. Kriska Tamásnak, akik a fotoszenzibilizátorok kémiai rendszerekben való vizsgálatában, valamint Dr. Vidóczy Tamásnak és Dr. Baranyai Péternek, akik a fluorométer összeállításában nyújtottak nagy segítséget.

Továbbá köszönöm a MTA KKKI Bio-oxidációs csoportjában dolgozó minden jelenlegi munkatársamnak azt a baráti légkört, ami sokszor adott erőt munkám folytatásához, valamint Szabó Bernadettnek, hogy tapasztalataimat átadhattam neki.

Hálával tartozom Dr. Kövesdi Istvánnak, aki a 3DNET programot rendelkezésemre bocsátotta és betanította, s akihez bármikor fordulhattam szakmai tanácsért.

Szeretném megköszönni családomnak a türelmet, amivel lehetővé tették dolgozatom létrejöttét.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Katona Z., Grofcsik A., Baranyai P., Bitter I., Grahner G., Kubinyi M., Vidóczy T. Triplet state spectroscopic studies on some 5,10,15,20-tetrakis(methoxyphenyl) porphyrins. *J. Mol. Struct.*, **450**: 41-45, 1998.
2. Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on Gram-positive and -negative bacteria. Ashkenazi H., Nitzan Y., Gál D. *Photochem. Photobiol.*, **77**(2): 186-191, 2003.
3. Macdonald I. J., Dougherty T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyan.*, **5**: 105-129, 2001.
4. Ackroyd R., Kelty C., Brown N., Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **74**(5): 656-669, 2001.
5. Bonnett R. Photodynamic therapy in historical perspective, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **10**: 1-17, 1999.
6. Kogan Y. B. Nonlinear photodynamic therapy. Saturation of a photochemical dose by photosensitizer bleaching. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**: 673-676, 2003.
7. Gál D. Effect of photosensitizers in chemical and biological processes: the MTO mechanism in photodynamic therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**(2): 1032-1036, 1992.
8. Kohen E., Santus R., Hirschberg J. G. *Photobiology*, Chapter 5: *Photochemistry of biological molecules*, 98-116, Academic Press. Inc. 1995.

9. Allen C. M., Sharman W. M., van Lier J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocyan.*, **5**: 161-169, 2001.
10. Dolphin D., *Nomenclature*, Chapter 1, 1-27, Vol.1 of: *The porphyrins*, Academic press. New York, 1978.
11. Porra R. J. Recent progress in porphyrin and chlorophyll biosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, **65**(3): 492-516, 1997.
12. Batlle A. M. del C. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy – a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **20**: 5-22, 1993.
13. Kennedy J. C., Pottier R. H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **14**: 275-292, 1992.
14. Oleinick N. L., Evans H. H. The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiation Research*, **150**: S146-S156, 1998.
15. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W. Jori G., Kessel D., Korblik M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy. *J. Nat. Cancer Inst.*, **90**(12): 889-905, 1998.
16. Pandey R. K. recent advances in photodynamic therapy. *J. Porphyr. Phthalocian.*, **4**: 368-373, 2000.
17. Moor A .C. E. Photodynamic sterilisation of cellular blood products- Proefschrift-, Den Haag, 1987.
18. North J., Neyndorff H., Levy J. G. Photosensitizers as virucidal agents. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **17**: 99-108, 1993.
19. Moor A. C. E., Wagenaars van Gompel A.E., Brand A., Dubbelman T. M. A. R., VanSteveninck J. Primary targets for photoinactivation of vesicular stomatitis virus by ALPcS₄ or Pc4 and red light. *Photochem. Photobiol.*, **65**(3): 465-470, 1997.
20. Schimpf K., Mannucci P., Kreutz W., Brackmann H. H., Auerswald G., Ciavarella N. Mosseler J., DeRosa V., Kraus B., Brueckmann C. Absence of hepatitis after treatment with a pasteurized factor VIII concentrate in patients with hemophilia and no previous transfusions. *N. Engl. J. Med.*, **316**: 918-922, 1987.
21. Horowitz B., Prince A. M., Hamman J., Watklevicz C. Viral safety of solvent/detergent-treated blood products. *Blood Coagulat. Fibrinol.*, **5**: S21-S30, 1994.
22. Chin S., Jin R., Wang X. L., Hamman J., Marx G., Mou X., Andersson I., Lindquist L. O., Horowitz B. Virucidal treatment of blood protein products with UVC radiation. *Photochem. Photobiol.*, **65**(3): 432-435, 1997.

23. Zeiler T., Riess H., Wittmann G., Hintz G., Zimmermann R., Muller C., Heuft H. G., Huhn D. The effect of methylene blue phototreatment on plasma proteins and in vitro coagulation capability of single-donor fresh-frozen plasma. *Transfusion*, **34**: 685-689, 1994.
24. Ben-Hur E., Horowitz B. Virus inactivation in blood. *AIDS*, **10**: 1183-1190, 1996.
25. Matthews, J. L., Sogandares-Bernal F., Judy M., Gulliya K., Newman J., Chanh T., Marengo-Rowe A. Inactivation of viruses with photoactive compounds. *Blood Cells*, **18**: 75-89, 1992.
26. Lewin A. A., Schnipper L. E., Crumpacker C. R. photodynamic inactivation of herpes simplex virus by hematoporphyrin derivative and light. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **163**: 181-190, 1980.
27. North J., Coombs R., Levy J. Photodynamic inactivation of free and cell-associated HIV-1 using the photosensitizer, benzoporphyrin derivative. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **7**: 891-898, 1994.
28. Dixon D. W., Kim M. S., Kumar V., Obara G., Marzili L. G., Schinazi R. F. Amino- and hydroxy tetraphenylporphyrins with activity against the human immunodeficiency virus. *Antivir. Chem. Chemother.*, **3**: 279-282, 1992.
29. Grandadam M., Ingrand D., Huraux J. M., Aveline B., Delgado O., Veverbizet C., Brault D. Photodynamic inactivation of cell-free HIV strains by a red-absorbing chlorin-type photosensitizer. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **31**: 171-177, 1995.
30. Horowitz B., Williams B., Rywkin S., Prince A. M., Pascual D., Geacintov N., Valinsky J. Inactivation of viruses in blood with aluminium phthalocyanine derivatives. *Transfusion*, **31**: 102-108, 1991.
31. Horowitz B., Rywkin S., Margolis-Nunno H., Williams B., Geacintov N., Prince A. M., Pascual D., Ragno G., Valeri C. R., Huima-Byron T. Inactivation of viruses in red cell and platelet concentrates with aluminium phthalocyanine (AlPc) sulfonates. *Blood cells*, **18**: 141-150, 1992.
32. Zhao X. J., Lustigman Y. S., Kenney M. E., Ben-Hur E. Structure-activity and mechanism studies on silicon phthalocyanines with Plasmodium falciparum in the dark and under red light. *Photochem. Photobiol.*, **66**: 282-287, 1997.
33. Neurath A. R., Strick N., Haberfield P., Jiang S. Rapid prescreening for antiviral agents against HIV-1 based on their inhibitory activity in site-directed immunoassays. 2. Porphyrins reacting with the V3 loop of gp120. *Antiviral Chem. Chemother.*, **3**(1): 55-63, 1992.

34. Pollard S.R., Meier W., Chow P., Rosa J. J., Wiley D. C. CD4-binding regions of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 defined by proteolytic digestion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**: 11320-11324, 1991.
35. Neurath A. R., Strick N., Debnath A. K. Structural requirements for and consequences of an antiviral porphyrin binding to the V3 loop of the human immunodeficiency virus (HIV-1) envelope glycoprotein gp120. *J. Mol. Recogn.*, **8**: 345-357, 1995.
36. Song R., Witvrouw M., Schols D., Robert A., Balzarini J., De Clercq E., Bernadou J., Meunier B. Anti-HIV-1 activities of anionic metalloporphyrins and related compounds. *Antiviral Chem. Chemother.*, **8**(2): 85-97, 1997.
37. Biolo R., Jori G., Kennedy P., Nadeau P., Pottier R., Reddi E., Weagle G. A comparison of fluorescence methods used in the pharmacokinetic studies of Zn(II)phthalocyanine in mice. *Photochem. Photobiol.*, **53**: 113-118, 1991.
38. Kohen E., Santus R., Hirschberg J. G. *Photobiology*, Chapter 19: *Photodynamic Therapy*, 471-489, Academic Press.Inc. 1995.
39. Kessel D. Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localisation, *Cancer Lett.*, **33**: 183-188, 1986.
40. Kongshaugh M., Moan J., Brown S. B. The distribution of porphyrins with different tumour localizing ability among human plasma proteins. *Br. J. Cancer*, **59**: 184-188, 1989.
41. Kessel D. Proposed structure of the tumour-localizing fraction of HPD (hematoporphyrin derivative), *Photochem. Photobiol.*, **44**: 193-196, 1986.
42. Nelson J. S., Berns M. W. Biological studies on the main fractions of hematoporphyrin derivative, *Cancer Res.*, **47**: 1027-1030, 1987.
43. Patterson M. S., Wilson B. C., Feather J. W., Burns D. M., Pushka W. The measurement of dihaematoporphyrin ether concentration in tissue by reflectance spectrophotometry. *Photochem. Photobiol.*, **46**: 337-343, 1987.
44. Rosencwaig A. Photoacoustic and photoacoustic spectroscopy. *Chem. Anal.*, **57**: 207-244, 1980.
45. Ho Y. K., Pandey R. K., Missert J. R., Bellnier D. A., Dougherty T. J. Carbon-14-labelling and biological activity of the tumour localizing derivative of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, **48**: 445-449, 1988.
46. Bellnier D. A., Ho Y. K., Pandey R. K., Missert J. R., Dougherty T. J. Distribution and elimination of aphotofrin II in mice. *Photochem. Photobiol.*, **50**: 221-228, 1989.

47. Vernon D. I., Holroyd J. A., Stribbling S. M., Brown S. B. The quantitative determination of Photofrin and polyhaematoporphyrin in plasma: pitfalls and inaccuracies. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **27**: 209-217, 1995.
48. Morlet L., Vonax-Coinsmann V., Lenz P., Foultier M. T., de Brito L. X., Stewart C., Patrice T. Correlation between *meta*(tetrahydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **28**: 25-32, 1995.
49. Ho J., Guthrie R. Quantitative determination of porphyrins, their precursors and zinc protoporphyrin in whole blood and dried blood by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Chromatography*, **417**: 269-276, 1987.
50. Pottier R. In vitro and in vivo fluorescence monitoring of photosensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6**: 103-109, 1990.
51. Bellnier D. A., Potter W. R., Vaughan L. A., Sitnik T. M., Parsons J. C., Greco W. R., Whitaker J., Johnson P., Henderson B. W. The validation of a new vascular damage assays for photodynamic therapy agents. *Photochem. Photobiol.*, **62**: 896-905, 1995.
52. Finlay J. C., Conover D. L., Hull E. L., Foster T. H. Porphyrin bleaching and PDT-induced spectral changes are irradiance dependent in ALA-sensitized normal rat skin in vivo. *Photochem. Photobiol.*, **73**: 54-63, 2001.
53. Van Leengoed E., Versteeg J., Van der Veen N., Van der Berg-Lock A., Marijnissen H., Star W. Tissue-localizing properties of some photosensitizers studied by in vivo fluorescence imaging. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6**: 111-119, 1990.
54. Orenstein A., Kostenich G., Roitman L., Shechtman Y., Kopolovic Y., Ehrenberg B., Malik Z. A comparative study of tissue distribution and photodynamic therapy selectivity of chlorin e6, Photofrin II and ALA-induced protoporphyrin IX in a colon carcinoma model. *Br. J. Cancer*, **73**: 937-944, 1996.
55. Livingstone D. *Data analysis for chemists: applications to QSAR and chemical product design*. Oxford University Press Inc., New York, 1995.
56. Kubinyi H. *QSAR: Hansch analysis and related approaches*, Volume 1 of: Mannhold R., Krogsgaard-Larsen P., Timmermann H. (Eds.) *Methods and principles in medicinal chemistry*, VCH Publishers, New York, USA, 1993.
57. Kubinyi H. From narcosis to hyperspace: the history of QSAR. *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **21**: 348-356, 2002.

58. Schultz T. W., Cronin T. D. M., Walker J. D., Aptula A. O. Quantitative structure – activity relationships (QSARs) in toxicology: a historical perspective. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **622**: 1-22, 2003.
59. Hansch C., Fujita T. ρ - σ - π analysis. A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**: 1616-1626, 1964.
60. Schultz T. W., Cronin T. D. M., Netzeva T. I. The present status of QSAR in toxicology. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **622**: 23-38, 2003.
61. Mackay D., Hubbarde J., Webster E. The role of QSARs and fate models in chemical hazard and risk assessment. *QSAR Comb. Sci.*, **22**: 106-112, 2003.
62. Holloway M. K., Wai J. M., Halgren T. A., Fitzgerald P. M. D., Vacca J. P., Dorsey B. D., Levin R. B., Thompson W. J., Chen L. J., deSolms S. J., Gaffin N., Ghosh A. K., Guiliani E. A., Graham S. L., Guare J. P., Huntage R. W., Lyle T. A., Sanders W. M., Tucker T. J., Wiggings M., Wiscount C. M., Woltersdorf O. W., Young S. D., Darke P. L., Zugay J. A. A priori prediction of activity for HIV-1 protease inhibitors employing energy minimalization in the active site. *J. Med. Chem.*, **38**: 305-317, 1995.
63. Gayathri P., Pande V., Sivakumar R., Gupta S. P. A quantitative structure – activity relationship study on some HIV-1 protease inhibitors using molecular connectivity index. *Bioorg. Med. Chem.*, **9**: 3059-3063, 2001.
64. Katritzky A. R., Oliferenko A., Lomaka A., Karelson M. Six-membered cyclic urease as HIV-1 protease inhibitors: a QSAR study based on CODESSA PRO approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**: 3453-3457, 2002.
65. Makhija M. T., Kulkarni V. M. QSAR of HIV-1 integrase inhibitors by genetic function approximation method. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**: 1483-1497, 2002.
66. Yuan H., Parrill A. L. QSAR studies of integrase inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**: 4169-4183, 2002.
67. Douali L., Villemin D., Cherqaoui D. neural networks: Accurate nonlinear QSAR model for HEPT derivatives. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **43**(4): 1200-1207, 2003.
68. Garg R., Gupta S. P., Gao H., Babu M. S., Debnath A. K., Hansch C. Comparative quantitative – structure activity relationship studies on anti-HIV drugs. *Chem. Rev.*, **99**: 3525-3601, 1999.
69. Mekenyan O., Nikolova N., Schmieder P. Dynamic 3D QSAR techniques: applications in toxicology. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **622**: 147-165, 2003.

70. Cha M. Y., Lee I. Y., Cha J. H., Choi K. I., Cho Y. S., Koh H. Y., Pae A. N. QSAR studies on piperazinylalkylisoxazole analogues selectively acting on dopamine D3 receptor by HQSAR and CoMFA. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**: 1293-1298, 2003.
71. Tong W., Lowis D. R., Perkins R., Chen Y., Welsh W. J., Goddette D. W., Heritage T. W., Sheehan D. M. Evaluation of quantitative structure – activity relationship methods for large-scale prediction of chemicals binding to the estrogen receptor. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.*, **38**: 669-677, 1998.
72. Rodrigues C. R., Flaherty T., Springer C, McKerrow J. H., Cohen F. E. CoMFA and HQSAR of acylhydrazide cruzain inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**: 1537-1541, 2002.
73. Borosy A. P., Keserű K., Péntzes I., Mátyus P. 3D QSAR study of class I antiarrhythmics. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **503**: 113-129, 2000.
74. Roeder B., Naether D., Lewald T., Braune M., Nowak C., Freyer W. Photophysical properties and photodynamic activity *in vivo* of some tetrapyrroles. *Biophys. Chem.*, **35**: 303-312, 1990.
75. He J., Larkin H. E., Li Y., Rihter B. D, Zaidi S. I. A., Rodgers M. A. J., Mukhtar H., E. Kenney M., Oleinick N. L. The synthesis, photophysical and photobiological properties and *in vitro* structure – activity relationships of a set of silicon phthalocyanine PDT photosensitizers. *Photochem. Photobiol.*, **65**: 581-586, 1997.
76. Margaron P., Grégoire M. J., Ščasnar V.; Ali H., van Lier J. E. Structure – photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, **63**: 217-223, 1996.
77. Anderson C. Y., Freye K., Tubesing K. A., Li Y. S., Kenney M. E., Mukhtar H., Elmetts C. A. A comparative analysis of silicon phthalocyanine photosensitizers for *in vivo* photodynamic therapy of RIF-1 tumors in C3H mice. *Photochem. Photobiol.*, **67**: 332-336, 1998.
78. Graham A, Li G., Chen Y., Morgan J., Oseroff A., Dougherty T. J., Pandey R.K. Structure – activity relationship of new octaethylporphyrin-based benzochlorins as photosensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **77**: 561-566, 2003.
79. MacDonald I.J., Morgan J., Bellnier D.A., Paszkiewicz G. M., Whitaker J.E., Litchfield, Dougherty T. J. Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-*a* derivatives. *Photochem. Photobiol.*, **70**: 789-797, 1999.

80. Quian P., Evensen J. F., Rimington C., Moan J. Comparison of different photosensitizing dyes with respect to uptake C3H-tumors and tissues of mice. *Cancer Letters*, **36**: 1-10, 1987.
81. Nakajima S., Hayashi H., Omote Y., Yamazaki Y., Hirata S., Maeda T., Kubo Y., Takemura T., Kakiuchi Y., Shindo Y., Koshimizu K., Sakata I. The tumour-localizing properties of porphyrin derivatives. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **7**: 189-198, 1990.
82. Richter A. M., Waterfield E., Jain A. K. et al. In vitro evaluation of phototoxic properties of four structurally related benzoporphyrin derivatives. *Photochem. Photobiol.*, **52**: 495-500, 1990.
83. Boyle R. W., Dolphyn D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.*, **64**: 469-485, 1996.
84. De Paolis A., Chandra S., Charalambides A. A., Bonnett R., Magnus A. The effect on photohaemolysis of variation in the structure of the porphyrin photosensitizer. *Biochem. J.*, **226**: 757-766, 1985.
85. Nitzan Y., Dror R., Ladan H., Malik Z., Kimel S., Gottfried V. Structure – activity relationship of porphines for photoinactivation of bacteria. *Photochem. Photobiol.*, **62**: 342–347, 1995.
86. Henderson B. W., Bellnier D. A., Greco W. R., Sharma A., Pandey R. K., Vaughan L. A., Weishaupt K. R., Dougherty T. J. An *in vivo* quantitative structure-activity relationship for a congeneric series of pyropheophorbide derivatives as photosensitizers for photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **57**: 4000-4007, 1997.
87. Potter W. R., Henderson B. W., Bellnier D. A., Pandey R. K., Vaughan L.A., Weishaupt K. R., Dougherty T. J. Parabolic quantitative structure – activity relationships and photodynamic therapy: application of a three – compartment model with clearance to the *in vivo* quantitative structure – activity relationships of a congeneric series of pyropheophorbide derivatives used as photosensitizers for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, **70**: 781-788, 1999.
88. Debnath A. K., Jiang S., Lin K., Haberfield P., Neurath A. R. Three-dimensional structure-activity analysis of a series of porphyrin derivatives with anti-HIV-1 activity targeted to the V3 loop of the gp120 envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Chem.*, **37**: 1099-1108, 1994.
89. Lü Q., Yu R., Shen G. The structure, catalytic activity and reaction mechanism modeling for halogenated iron-tetraphenylporphyrin complexes. *J. Mol. Cat. A: Chemical*, **198**: 9-22, 2003.

90. Todeschini R., Consonni V. *Handbook of molecular descriptors*, Volume 11 of: Mannhold R., Kubinyi H., Timmermann H. (Eds.) *Methods and principles in medicinal chemistry*, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2000.
91. Livingstone D. J. The characterisation of chemical structures using molecular properties. A survey. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **40**: 195-209, 2000.
92. Borosy A. P., Héberger K., Horvai Gy., Kolossváry I., Lengyel A., Paksy L., Rajkó R., Szepesváry P. *Sokváltozós adatelemzés (Kemometria)*. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 2001, Változó kiválasztási módszerek, pp. 181-184.
93. Draper N. R., Smith H. S. *Applied Regression*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1981.
94. Krzanowski W. J. Selection of variables to preserve multivariate data structure, using principal components. *Appl. Statist.*, **36**: 22-33, 1987.
95. Borosy A. P., Héberger K., Horvai Gy., Kolossváry I., Lengyel A., Paksy L., Rajkó R., Szepesváry P. *Sokváltozós adatelemzés (Kemometria)*. Nemzeti Tankönyvkiadó Rt., Budapest, 2001, PLS regresszió, pp. 191-195.
96. Lingren F., Geladi P., Ränner S., Wold S. Interactive variables selection (IVS) for PLS. Part I. Theory and algorithms. *J. Chemometrics*, **8**: 349-363, 1994.
97. Lingren F., Geladi P., Berglund A., Sjöström M., Wold S. Interactive variables selection (IVS) for PLS. Part II. Chemical application. *J. Chemometrics*, **9**: 331-342, 1995.
98. Waterbeemd van de H. (Ed.) in *Chemometric methods in molecular design*, of Mannhold R., Krogsgaard-Larsen P., Timmermann H. (Eds.) *Methods and principles in medicinal chemistry*, Wold S. PLS for multivariate linear modeling, 195-218, VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 1995.
99. Höskuldsson A. Variable and subset selection in PLS regression. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, **55**: 23-38, 2001.
100. Pap T., Szilágyi A. A parciális legkisebb négyzetek (PLS) módszerének alkalmazása szerves savak keverékeiből álló minták összetételének becslésére infravörös spektrumaik alapján. *Magyar Kémiai Folyóirat*, **107**: 60-70, 2001.
101. Geladi P., Kowalski B. R. Partial least-squares regression: A tutorial. *Anal. Chim. Acta*, **185**: 1-17, 1986.
102. Héberger K., Rajkó R. Generalization of pair correlation method (PCM) for nonparametric variable selection. *J. Chemometrics*, **16**: 436-443, 2002.
103. Héberger K., Rajkó R. Discrimination of statistically equivalent variables in quantitative structure - activity relationships. *Quantitative Structure - Activity*

- Relationships in Environmental Sciences VII*, Fei Chen F., Schüürmann G. (Eds.) SETAC Special Publication Series, SETAC Press, 1997, Chapter 29 pp. 425-433.
104. Rajkó R., Héberger K. Conditional Fisher's exact test as a selection criterion for pair-correlation method. Type I and Type II Errors. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **57**: 1-14 2001.
 105. Héberger K., Rajkó R. Variable selection using pair-correlation method. Environmental applications. *SAR and QSAR in Environmental Research*, **13**: 541-554, 2002.
 106. Héberger K., Andrade J. M. Procrustes rotation and pair-wise correlation: a parametric and a non-parametric method for variable selection, *Croatica Chemica Acta* (accepted), 2003.
 107. Zupan J., Gasteiger J. *Neural networks for chemist*. VCH, Weinheim, Germany, 1993
 108. Masters T. *Practical neural network recipes in C++*, Academic Press, Inc., San Diego, USA, 1993.
 109. Borosy A.P. Mesterséges ideghálózatok alkalmazása az adatelemzésben. *Magyar Kémikusok Lapja*, **53**(8-9): 397-403: 1998.
 110. Goldberg D. E. *Genetic algorithms in search, optimisation and machine learning*, Addison-Wesley, New York, 1989.
 111. Jouan-Rimbaud D., Massart D. L., Leardi R., De Nood O. E. Genetic algorithms as a tool for wavelength selection in multivariate calibration. *Anal. Chem.*, **67**: 4295-4301, 1995.
 112. Leardi R., Gonzalez A. L. Genetic algorithms applied to feature selection in PLS regression: how and when to use them. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **41**, 195-207, 1998.
 113. Roeder B., Naether D., Leward T., Braune M., Nowak C., Freyer W. Photophysical properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles. *Biophys. Chem.*, **35**: 303-312, 1990.
 114. DeRosa M. C., Crutchley R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem Rev.*, **233-234**: 351-371, 2002.
 115. Eichwurz I., Stiel H., Röder B. Photophysical studies of the pheophorbide a dimer. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **54**: 194-200, 2000.
 116. Hajri A., Wack S., Meyer C., Smith M. K., Leberquier C., Keding M., Aprahamian M. In vitro and in vivo efficacy of Photofrin and pheophorbide a, a bacteriochlorin, in photodynamic therapy of colon cancer cells. *Photochem. Photobiol.*, **75**: 140-148, 2002.
 117. Ashkenazi H., Nitzan Y., Gál D. Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on Gram-positive and -negative bacteria. *Photochem. Photobiol.*, **77**: 186-, 2003.

118. Connolly, M. L. Computation of molecular volume. *J. Am. Chem. Soc.* **107**: 1118-1124, 1985.
119. Meyer, A. Y. The size of molecules. *J. Chem. Soc. Rev.*, **15**: 449-474, 1986.
120. Todeschini, R.; Gramatica, P. New 3D molecular descriptors: The WHIM theory and QSAR applications. *Perspect. Drug Discov. Des.*, **9/10/11**: 355-380, 1998.
121. Iwase, K., Komatsu K., Hirono S., Nakagawa S., Moriguchi I. Estimation of hydrophobicity based on the solvent accessible surface-area of molecules. *Chem. Pharm. Bull.*, **33**: 2114-2121, 1985.
122. De Bruijn, J., Hermens J. Relationships between octanol/water partition-coefficients and total molecular-surface area and total molecular volume of hydrophobic organic-chemicals. *J. Quant. Struct.-Act. Relat.*, **9**: 11-21, 1990.
123. Breindl, A., Beck B., Clark T., Glen R. C. Prediction of the n-octanol/water partition coefficient. LogP, using a combination of semiempirical MO-calculations and a neural network. *J. Mol. Model.*, **3**: 142-155, 1997.
124. Miller, K. J. Additivity methods in molecular polarizability. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**: 8533-8542, 1990.
125. Mortier, W. J., van Genechten, K.; Gasteiger, J. Electronegativity equalization-application and parametrization. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**: 829-835, 1985.
126. Broto, P., Moreau G., Vandycke C. Molecular-structures – Perception, auto-correlation descriptor and SAR studies – system of atomic contributions for the calculation of the normal-octanol water partition-coefficients. *Eur. J. Med. Chem.* **19**: 71-78, 1984.
127. Barton, A.F.M. In *CRC Handbook of Solubility Parameters and Other Cohesion Parameters.*, Chapt. 2, pp. 7-19. CRC Press, Boca Raton., 1983.
128. Katritzky, A. R., Lobanov, V. S., Karelson, M. Normal boiling points for organic compounds: correlation and prediction by a quantitative structure-property relationship. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38**: 28-41, 1998.
129. Bodor, N., Huang, M. J., Harget, A. Neural network studies. Part3. Prediction of partition coefficients. *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **309**: 259-266, 1994.
130. Wiener, H. Correlation of heats of isomerisation, and differences in heats of vaporization of isomers, among the paraffin hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.*, **69**: 2636-2638, 1947.
131. Randić, M. On characterization of molecular branching. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**: 6609-6615, 1975.

132. Andrews, P. R., Craik, D. J., Martin, J. L. Functional-group contributions to drug receptor interactions. *J. Med. Chem.*, **27**: 1648-1657, 1984.
133. Gaillard, P., Carrupt, P. A., Testa, B., Boudon, A. Molecular lipophilicity potential, a tool in 3D QSAR-method and applications. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, **8**: 83-86, 1994.
134. Cronce, D. T., Famini, G. R., De Soto, J. A., Wilson, L. Y. Using theoretical descriptors in quantitative structure-property relationships – some distribution equilibria. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **6**: 1293-1301, 1998.

7. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezéshez kapcsolódó publikációk

1. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Prediction of Photosensitizers Activity in Photodynamic Therapy Using Artificial Neural Networks: A 3D-QSAR Study
Konferencia kiadvány, ANNIMAB-1 Conferencia, Göteborg, Svédország, 2000 Május 13-16
If.: 0
2. Jakus J. és Vanyúr R.:
A fotodinamikus aktivitás mérése
Anyagvizsgálók lapja, **1**: 14-15, 2001. If.: 0
3. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásának és felhalmozódásának előrejelzése mennyiségi szerkezet-hatás összefüggések segítségével
Magyar Kémiai Folyóirat, **107** (4): 167-172, 2001. If.: 0,215
4. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Prediction of Tumoricidal Activity and Accumulation of Photosensitizers in Photodynamic Therapy Using Multiple Linear Regression and Artificial Neural Networks.
Photochem. Photobiol., **75** (5): 471-478, 2002. If.: 2,278
5. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Prediction of anti-HIV-1 Activity of a Series of Tetrapyrrole Molecules
J. Chem. Inf. Comput. Sci., **43**: 1829-1836, 2003. If.: 2,900
6. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Különböző szerkezetű porfirin származékok anti-HIV-1 aktivitásának modellezése
Magyar Kémiai Folyóirat, 2004, elfogadva
If.: 0,207
6. Vanyúr R., Szabó B., Jakus J.:
Kinetics of photosensitizer clearance in murine organs
Reaction Kinetics and Catalysis Letters, 2004, elfogadva
If.: 0,340

Az értekezéshez kapcsolódó saját előadások

1. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus, J.:
Prediction of Photosensitizers Activity in Photodynamic Therapy Using Artificial Neural Networks: A 3D-QSAR Study
First international conference on Artificial Neural Networks in Medicine and Biology, Göteborg, Sweden, 13-16 May, 2000.
Angol nyelvű előadás
2. Vanyúr R., Héberger K., Kövesdi I., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásának és felhalmozódásának előrejelzése mennyiségi szerkezet-hatás összefüggések segítségével
MTA SZAB Kemometria és Molekulamodellzés Munkabizottsága és MKE QSAR és Modellezési Szakcsoport közös tudományos ülése, Szeged, 2000. november 15-16.
3. Vanyúr R., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok koncentrációjának *in vivo* meghatározása
Avantes felhasználói klub, TESTOR Kft., Budapest, 2002. március 26.
4. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Porfirin származékok anti-HIV aktivitásának előrejelzése mennyiségi szerkezet - hatás összefüggések alkalmazásával
MTA Kémiai Kutatóközpont, V. Doktori Kémiai Iskola, Szokolya - Királyrét, 2002. május 21-22.
5. Vanyúr R., Héberger K., Jakus J.:
Fotoszenzibilizátorok fotodinamikus aktivitásának és felhalmozódásának előrejelzése mennyiségi szerkezet - hatás összefüggések segítségével
MTA Kémiai Kutatóközpont, Kutatóközponti Tudományos Napok, Budapest, 2002. május 27-28.

Az értekezés témájában született egyéb közlemények

1. Kriska T., Jakus J., Keszler Á., Vanyúr R., Németh A., Gál D.:
Type III photosensitization: attempt for quantification and a way to new sensitizers.
Proc. SPIE **3563**: 11-17, 1999.
If.: 0
2. Németh A., Jakus J., Kriska T., Keszler Á., Vanyúr R., Gál D.:
Physico chemical modeling of the role of free radicals in photodynamic therapy. IV. Quantitative aspects of photodynamic effects on free radicals generated in cell cultures.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **255**: 360-366, 1999.
If.: 2,780
3. Németh A., Jakus J., Kriska T., Keszler Á., Vanyúr R., Gál D.:
Szabad gyökök kimutatásának és mennyiségi elemzésének lehetősége *in vitro* rendszerben.
Magyar Kémiai Folyóirat, 105 évf. 2. sz. 71-77, 1999.
If.: 0,215

Az értekezéshez nem közvetlenül kapcsolódó közlemények

1. Jakus J., Kriska T., Vanyúr R.:
Effect of multivitamins in an effervescent preparation on the respiratory burst of peritoneal macrophages in mice.
British Journal of Nutrition **87**: 501-508, 2002. If.: 1,937