

# Modeliranje odnosa strukture prioritetnih onečišćivala i njihove toksičnosti

---

**Barić, Lana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:669108>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-22**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lana Barić

MODELIRANJE ODNOSA STRUKTURE PRIORITETNIH  
ONEČIŠĆIVALA I NJIHOVE TOKSIČNOSTI

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Mirjana Novak Stankov

dr. sc. Suzana Sopčić

Zagreb, srpanj 2018.

*Veliku zahvalnost dugujem svojem mentoru izv. prof. dr. sc. Šimi Ukić koji mi je svojim stručnim savjetima pomogao pri izradi ovog diplomskog rada te je uvijek imao strpljenja i vremena za moje brojne upite.*

*Veliko hvala asistentu mag. ing. chem. Matiji Cvetnić na pruženoj pomoći, susretljivosti i trudu tijekom provedbe rada.*

*Hvala prijateljima i prijateljicama koji su mi studentski život učinili ljepšim. Također hvala dečku koji je uvijek bio uz mene.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na razumijevanju i podršci koju su mi pružili tijekom studiranja.*

*Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta „Modeliranje okolišnih aspekata napredne obrade voda za razgradnju prioriternih onečišćivala“ Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

# SAŽETAK

Upotreba kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR) jedna je od glavnih ekonomskih alternativa u eksperimentalnom testiranju toksičnosti. U ovom radu, modelirana je široka grupa od 146 spojeva i njihove vrijednosti toksičnosti prema *Vibrio fischeri* koristeći različite deskriptore. QSAR modeli su izrađeni primjenjujući napredne kemometrijske alate. Valjanost modela nastojala se potvrditi unutarnjom validacijom, te naposljetku testirati na vanjskom setu podataka. Nakon provedenih analiza, uspoređujući parametre  $R^2$  i  $Q^2$ , QSAR model sa 7 varijabli izabran je kao optimalnim ( $R^2 = 0,637$  i  $Q^2 = 0,579$ ).

Razvijeni model mogao bi poslužiti za predviđanje toksičnosti, sigurnosti i procjene rizika kemikalija zbog boljeg ekotoksikološkog upravljanja te sprječavanja štetnih posljedica po zdravlje.

**Ključne riječi:** toksičnost, *Vibrio fischeri*, QSAR modeliranje

## SUMMARY

One of the major economic alternatives to experimental toxicity testing is the use of quantitative–structure–activity–relationships (QSARs). In this work, a large and diverse group of 146 chemicals was used to model the toxicity according to *Vibrio fischeri*; using interpretable descriptors. The QSAR models were developed using advanced chemometrics tools. All the models were validated internally and externally. 7-variable model was selected as the most predictive for toxicity, by comparing statistical parameters  $R^2$  and  $Q^2$  ( $R^2 = 0.637$  and  $Q^2 = 0.579$ ).

The obtained results indicated that developed model can be applied for prediction of toxicity, safety and risk assessment of chemicals; this can help in achieving better ecotoxicological management as well as to prevent adverse health consequences.

**Key-words:** toxicity, *Vibrio fischeri*, QSAR modelling

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORETSKI DIO .....	2
2.1. FARMACEUTICI .....	2
2.2. FARMACEUTICI U VODAMA .....	5
2.2.1. Pravilno zbrinjavanje farmaceutika .....	7
2.3. ISPITIVANI FARMACEUTICI .....	7
2.3.1. Desloratadin .....	7
2.3.2. Desvenlafaksin .....	8
2.3.3. Enroflaksacin .....	8
2.3.4. Etodolak .....	9
2.3.5. Febuksostat .....	9
2.3.6. Hidroklortiazid .....	10
2.3.7. Hidrokortizon .....	11
2.3.8. Karfilzomib .....	11
2.3.9. Levamizol .....	12
2.3.10. Lidokain .....	12
2.3.11. Natrijev risedronat .....	12
2.3.12. Omeprazol .....	13
2.3.13. Prokain .....	13
2.3.14. Srebro sulfadiazin .....	14
2.3.15. Sulfadiazin .....	15
2.3.16. Sulfaguanidin .....	15
2.3.17. Sulfametazin .....	16
2.3.18. Tetramizol .....	16
2.3.19. Tobramicin .....	17
2.4. Ispitivanje toksičnosti farmaceutika .....	17
2.4.1. Bioluminiscentno određivanje toksičnosti .....	18
2.4.2. <i>Vibrio fischeri</i> bakterije .....	18
2.5. QSAR MODELIRANJE .....	19
2.5.1. Molekularni deskriptori .....	19

2.5.2. RM1 metoda optimiranja molekulske strukture .....	21
2.5.3. Procjena modela.....	21
2.5.4. Validacija modela .....	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	24
3.1. Kemikalije i oprema .....	24
3.2. Priprava otopina.....	25
3.2.1. Određivanje toksičnosti na <i>Vibrio fischeri</i> .....	25
4. MODELIRANJE.....	26
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	27
6. ZAKLJUČAK .....	40
7. LITERATURA .....	41
ŽIVOTOPIS .....	46

# 1. UVOD

Na globalnoj razini, veliki i negativni efekt opasnih kemikalija i onečišćujućih tvari, predstavlja problem za ekosustav s obzirom na to da je velik broj kemijskih spojeva u komercijalnoj uporabi te je relativno malo njih podvrgnuto adekvatnoj procjeni za upotrebu u okolišu [1]. Globalna proizvodnja kemikalija povećala se za više od 300 milijuna tona od 1930. godine do danas. Oko 100 000 različitih kemikalija registrirano je na Europskom tržištu od kojih je 10 000 prodano u količinama većim od 10 tona, a daljnjih 20 000 se prodaje na 1-10 tona godišnje [2]. Prema direktivi Europske komisije [3] potrebna je procjena i testiranje kemikalija za ljudsko zdravlje i okoliš prije njihove prodaje u količinama većim od 10 kg godišnje. Veće količine zahtijevaju složenije i dugotrajnije ispitivanje. Nasuprot tome, više od 99% od ukupnog volumena svih tvari na tržištu nisu bili podložni testiranju te neki od njih nisu bili nikada ispitani.

Prema tome, javlja se potreba za korištenjem (QSAR) modeliranja, odnosno kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti kako bi se pružile informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima kemikalija i njihovoj sudbini na okoliš te njihovog učinka na zdravlje ljudi [4]. Napredni modeli predviđanja projektirani su i testirani od strane regulatornih agencija za procjenu fizikalnih, kemijskih i bioloških svojstva pojedinih kemijskih entiteta. Upotreba QSAR modeliranja za toksikološka predviđanja pomaže pri određivanju potencijalnih štetnih učinaka kemijskih entiteta [5]. Osim toga, Europska unija *REACH* (Registracija, Procjena i Autorizacija kemikalija) zahtijeva zakonodavstvo toksikološke opasnosti i procjene rizika za sve nove i postojeće kemikalije te će QSAR igrati važnu ulogu u ovom nastojanju. [6] Cilj bilo kojeg ekotoksikološkog QSAR je odrediti učinkovitost razvijenog QSAR modela za toksičnost kemikalija koji pokrivaju veliku strukturnu raznolikost koja obuhvaća različite mehanizme toksičnih djelovanja. [7,8]

*Vibrio fischeri*, važna vrsta bakterija, u vodenim hranjivim mrežama, koristi se već niz godina širom svijeta kao reprezentativna ispitna vrsta za ekotoksikološku procjenu industrijskih kemikalija. [9]

Upravo se ovaj rad bavi razvojem kvantitativnog modela velike točnosti u predviđanju toksičnosti ispitivane na *Vibrio fischeri*. Odabrano je 146 različitih farmaceutika te je određena ili iz literature preuzeta njihova toksičnost. Dobivene vrijednosti koriste se kao odzivi u QSAR modeliranju. Valjanost razvijenih modela potvrđena je unutarnjom validacijom.



## 2. TEORETSKI DIO

### 2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici, odnosno lijekovi su grupa kemijskih spojeva koji obuhvaćaju sve terapijske lijekove namijenjene ljudima, veterinarske lijekove te dodatke prehrani. Dije se na: prirodne, polusintetske i sintetske. U određenim količinama i pod određenim uvjetima služe za dijagnosticiranje, liječenje, ublažavanje ili sprječavanje bolesti. [10] Farmaceutici su većinom organski spojevi male molekulske mase u iznosu od 200 do 500 daltona. Lipofilni su i umjereno topljivi kako bi bili biološki aktivni i bioraspoloživi. [11]

Aktivni farmaceutski sastojak (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) je definiran kao tvar korištena u završenom farmaceutskom proizvodu. On je odgovoran za njegovu farmakološku aktivnost i ostvarivanje direktnog učinka u dijagnozi, liječenju ili prevenciji bolesti, a isto tako utječe i na obnavljanje, ispravljanje i modificiranje fizioloških funkcija ljudi i životinja [12]. Danas je farmaceutska industrija usmjerena ka proizvodnji sve učinkovitijih, razgradnji otpornijih API-ja koji pokazuju i širok raspon otpornosti u vodenom okolišu. Povećanjem njihove koncentracije u prirodnim ekosustavima, raste i opasnost negativnog učinka na ljudsko zdravlje i narušavanje prirodne ravnoteže.

Farmaceutici spadaju u skupinu „novih onečišćujućih tvari“. Naime, posljednjih nekoliko desetljeća intenzivirala su se istraživanja okoliša koja su pomaknula pozornost sa konvencionalnih prioritetnih onečišćujućih tvari poput policikličkih aromatskih ugljikovodika i polikloriranih bifenila na tzv. „nove onečišćujuće tvari“ koje se sve više ispuštaju u okoliš i predstavljaju potencijalnu opasnost za ekosustav. Problem je u tome što za takve tvari još uvijek ne postoje zakonske regulative koje kontroliraju njihove maksimalno dopuštene koncentracije (MDK) u okolišu. Osim farmaceutika, tu se ubrajaju i sredstva za osobnu higijenu, kao i sredstva koje se upotrebljavaju u kućanstvima. [13]

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, farmaceutici lako prolaze kroz prirodne filtre i postrojenja za obradu otpadnih voda čime ugrožavaju sustav opskrbe pitkom vodom [14]. Iako su u vodi prisutni u niskim, mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama, njihov dugoročni i kontinuirani unos može rezultirati brojnim negativnim utjecajima na izložene kopnene ili vodene organizme u okolišu. [11,13]. Zahvaljujući brojnim analitičkim postupcima, moguće je detektirati takve spojeve u vodama, unatoč tome što su prisutni u niskim koncentracijama u njima. [15]

Farmaceutici se dijele na:

- Anestetike
- Antibiotike
- Antihelmintike
- Antihistaminike
- Antidepresive
- Antitumorske lijekove
- Glukokortikoide
- Inhibitore protonske pumpe
- Nesteroidne protuupalne lijekove
- Sulfonamide

Lokalni anestetici su tvari koje na mjestu primjene izazivaju neosjetljivost na podražaje, ponajprije na bol. Primjenjuju se u zubarstvu i manjim kirurškim zahtjevima. Opći anestetici su tvari koje uzrokuju opću anesteziju – gubitak svih vrsta osjeta uz gubitak svijesti. [16]

Od lokalnih anestetika su obrađeni lidokain i prokain.

Antibiotici su lijekovi koje koristimo za liječenje bolesti uzrokovanih bakterijama; produkti metabolizma nekih mikroorganizama koji nepovoljno djeluju na razvoj ili razmnožavanje drugih mikroorganizama. Djeluju isključivo na bakterije, Gram–pozitivne i Gram–negativne te nemaju nikakvog utjecaja na viruse. Prvotno su se kao antibiotici upotrebljavali prirodni antibiotski spojevi koje stvaraju gljive (prvenstveno plijesni), kao i drugi sićušni živi organizmi uglavnom za vlastitu obranu od bakterija. Danas je većina antibiotika sintetska, a koriste se i polusintetski antibiotici. [16]

U radu od antibiotika je obrađeni tobramicin i natrijev risedronat.

Antihelmintici su grupa farmaceutika koja se koristi u liječenju crijevnih nametnika u ljudi i životinja. Najveća su skupina veterinarskih farmaceutika po količini proizvodnje i po vrijednosti. U poljoprivredi se koriste kao insekticidi (protiv insekata) i akaricidi (protiv grinja). U novije vrijeme sve se više primjenjuju kao antitumorski lijekovi. [16]

U radu su obrađeni levamizol i tetramizol.

Antihistaminici su lijekovi koji blokiraju aktivaciju histamina na veznoj strani H1 receptora koji su odgovorni za trenutnu hiperosjetljivu reakciju. Kada imunološki sustav detektira alergen kao opasnu supstanciju (npr. udisanjem), stvara antitijela koja se vežu na masne stanice i otpušta se histamin—glavna komponenta mnogih otrova i ubodnih izlučevina kojeg proizvodi imunološki sustav i otpušta ga u odgovoru na oštećenje tkiva. Antihistaminici ne liječe alergije već reduciraju simptome alergija za 50%. [16]

Od antihistaminika u ovom radu obrađen je desloratadin.

Antidepresivi ublažuju depresivno raspoloženje, ali i osjećaj psihomotorne kočenosti, straha i anksioznosti depresivnih bolesnika. Triciklički antidepresivi pojačavaju učinak nekih biogenih amina (noradrenalina, serotonina, dopamina) u središnjem živčanom sustavu, inhibirajući njihov povrat iz sinaptičke pukotine u presinaptički živčani završetak blokadom presinaptičkih  $\alpha$ 2-adrenergičnih receptora, što omogućuje njihovo pojačano djelovanje na postsinaptičkim neuronima. Usto djeluju i antagonistički na muskarinske receptore, a taj učinak je odgovoran za brojne neželjene učinke antidepresiva. [18]

Desvenlafaksin je obrađeni u radu.

Kemoterapija odnosno antitumorski lijekovi služe za sistemsko liječenje zloćudnih bolesti kemijskim tvarima prirodnog ili sintetskog podrijetla. Naziv kemoterapija potječe od činjenice da se rast zloćudnih stanica kontrolira kemijskim putem.[17]

Od antitumorskih lijekova u radu su obrađeni: enroflaksacin i karfilzomib.

Glukokortikoidi su grupa hormona koji spadaju u adenokortikalne hormone. Adenokortikalni hormoni su hormoni koje luči kora nadbubrežne žlijezde. Njihova glavna uloga je djelovanje na metabolizam glukoze, proteina i masti, ali i dugoročno prilagođavanje organizma na stresne situacije. Glavno djelovanje leži u njihovom protuupalnom i imunosupresivskom učinku. Uglavnom provjeravaju i sprječavaju otpuštanje litičkih enzima domaćina koji uzrokuju oštećenje tkiva tijekom svih upala i koji na kraju mogu dovesti do povećanja broja leukocita; smanjuju fagocitozu koja se odvija pomoću makrofaga; smanjuju stvaranje lipida eikozanoida i prostaglandina pomoću inhibicije proizvodnje citokina koji specifično pobuđuju ciklooksigenazu-II u upalnim stanicama. Nakon što su dobili pristup preko prožimanja stanične membrane, ključno se kombiniraju s visoko specifičnim citosolnim

glukokortikoidnim receptorom koji je neaktivan i koji je vezan za određene proteine koji ih sprječavaju da dođu do jezgre ili da se odmah vežu za DNK. [16]

Hidrokortizon je obrađen u radu kao glukokortikoid.

Inhibitori protonske pumpe su široko dostupni i učestalo propisivani lijekovi za liječenje poremećaja povezanih s povećanim lučenjem želučane kiseline; gastroezofagealna refluksna bolest, ulkus želuca i duodenuma, gastritis i duodenitis, funkcionalna dispepsija, kronični laringitis itd. Pripadaju skupini lijekova koji smanjuju lučenje želučane kiseline. Svojučinak ostvaruju kočenjem enzima  $H^+, K^{\pm}ATP$ -aze koja je odgovorna za lučenje želučane kiseline, a nalazi se na apikalnoj sekrecijskoj membrani parijetalnih stanica želuca. [19]

Omeprazol je obrađen u radu kao inhibitor protonske pumpe.

Nesteroidni protuupalni lijekovi (engl. *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, NSAID) su vrsta lijekova koji imaju antiupalno, antireumatsko, antipiretsko (snižavaju povišenu tjelesnu temperaturu) i analgetsko (ublažavaju bol) djelovanje. Većinom su derivati slabih kiselina. Djelovanje nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) se temelji na blokadi ciklooksigenaze, ključnog enzima u sintezi prostaglandina, u ciklusu arahidonske kiseline. Postoje dvije ciklooksigenaze: ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2). [16]

U radu su obrađeni etodolak i febuksostat.

Sulfonamidi su sintetski spojevi antibakterijskog djelovanja. Po sastavu su aromatski spojevi sa sulfonskom i amino-skupinom. Nemaju baktericidno, već bakteriostatsko djelovanje. Poznati su kao sulfa-lijekovi. Zbog toksičnosti i razvoja otpornosti mnogih bakterija, danas su rjeđe u uporabi. [16]

Od sulfonamida su obrađeni hidrokloriazid, srebro sulfadiazin, sulfadiazin, sulfaguanidin i sulfametazin.

## **2.2. FARMACEUTICI U VODAMA**

Nakon primjene, farmaceutski aktivni spojevi (PhAC) se izlučuju kroz jetru ili bubrege u obliku smjese osnovnog spoja i metabolita koji su polarniji i hidrofilniji od izvornoga lijeka. Kao takvi ispuštaju se u otpadne vode ili u nepromijenjenom obliku ili u

obliku razgradnih produkata te se teško uklanjaju konvencionalnim postupcima obrade otpadnih voda.

Ovisno o učinkovitosti obrade i kemijskom sastavu spoja, farmaceutski aktivne tvari mogu dospjeti u površinske, podzemne vode, more i tlo. Kada farmaceutici dođu u okoliš dolazi do njihove razdiobe između različitih dijelova okoliša što podrazumijeva sorpciju i desorpciju te razgradnju koja može biti abiotička ili biotička. Biotički procesi podrazumijevaju biološku razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama dok abiotički procesi razgradnje uključuju fotolizu i hidrolizu. Razgradnja rezultira smanjenjem koncentracije farmaceutika i nastajanjem razgradnih i transformacijskih produkata.

Razgradnjom nastaju spojevi drugačije molekulske mase dok transformacijom se mijenja struktura početne molekule farmaceutika pri čemu se masa ne mijenja. Razgradni i transformacijski produkti mogu biti i toksičniji od početnih molekula zbog promjene fizikalno-kemijskih svojstava u odnosu na početne molekule farmaceutika. [10]

Povećana upotreba farmaceutika i njihovo kontinuirano ispuštanje u okoliš može ugroziti ponovnu upotrebu pročišćene otpadne vode. Tijekom prošlog desetljeća, uklanjanje farmaceutskih aktivnih spojeva (PhAC) tijekom procesa pročišćavanja otpadnih voda postala je glavna briga u istraživanju vode. Učinkovitost uklanjanja farmaceutika u postrojenjima za obradu otpadnih voda može biti jako niska, a ovisi o specifičnim svojstvima uklanjanih komponenti te o čimbenicima vezanim za samo postrojenje obrade otpadnih voda kao što su tip provođenog procesa, starost mulja itd. [20]

Biološka obrada predstavlja najčešću i ekonomski najisplativiju metodu za obradu otpadnih voda. Nedostatak bioloških metoda je nedovoljna učinkovitost za uklanjanjem svih potencijalno opasnih sastojaka iz otpadnih voda. U posljednje vrijeme, za obradu otpadnih voda onečišćenih farmaceuticima sve se više koriste metode poput MBR (membranski bioreaktori) tehnologija, ozonizacije i naprednih oksidacijskih procesa (engl. *Advanced Oxidation Processes*, AOPs) koje su pokazale različite stupnjeve učinkovitosti.

Za što bolju obradu otpadne vode, potrebna je integracija i kombinacija tehnologija budući da se jedino na taj način u budućnosti može osigurati učinkovita, iako skuplja obrada. [21]

### **2.2.1. Pravilno zbrinjavanje farmaceutika**

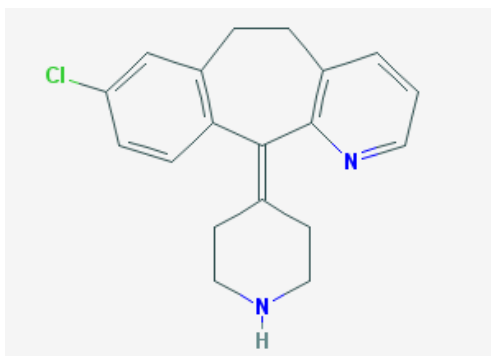
Spaljivanje se pokazalo kao izuzetno učinkovit i ekološki najprihvatljiviji način zbrinjavanja neiskorištenih farmaceutika. Ukoliko se otpad koji sadrži neiskorištene farmaceutike odlaže na odlagališta, postoji opasnost da će se farmaceutski aktivni spojevi naći nakon nekoliko godina u procjednim vodama odlagališta. Ukoliko na odlagalištima nije razvijen sustav prikupljanja procjednih voda, one vrlo lako mogu prodrijeti u površinske i podzemne vode te izravno ugroziti vodeni ekosustav.

Veliki problem predstavlja otpuštanje ostataka farmaceutika i onih kojima je istekao rok trajanja putem odvoda. Takva postupanja zahtijevaju obveznu edukaciju građana o načinima pravilnog odlaganja neiskorištenih farmaceutika. Onečišćenje okoliša farmaceuticima bi se u znatnoj mjeri smanjilo kad bi se oni samo prestali bacati u odvod. Naime, u nekim zemljama su uvedeni i jako dobro funkcioniraju tzv. „*take-back*“ sistemi gdje se neiskorišteni farmaceutici mogu vratiti u ljekarne koje se potom brinu o njihovom daljnjem zbrinjavanju. [12]

## **2.3. ISPITIVANI FARMACEUTICI**

### **2.3.1. Desloratadin [22,23]**

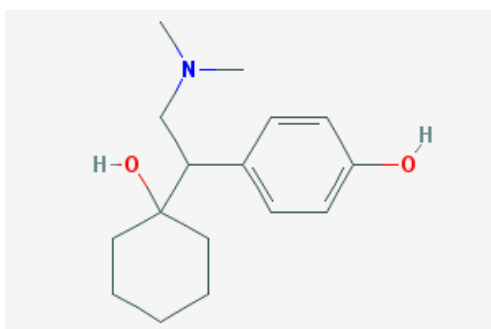
Desloratadin je piperidinski derivat sa selektivnim H<sub>1</sub> antihistaminergičnim svojstvima. Desloratadin smanjuje tipične histaminergične učinke na H<sub>1</sub>-receptore u glatkim mišićima bronha, kapilarama i glatkim mišićima gastrointestinalnog sustava, uključujući vazodilataciju, bronhokonstrikciju, povećanu vaskularnu propusnost, bol, svrbež i spazmatične kontrakcije glatkih mišića gastrointestinalnog sustava. Desloratadin pomaže u kontroli alergijske reakcije i njezinih simptoma. Spoj je topljiv u vodi, koncentracija topljivosti iznosi 21,6 mg/L.



**Slika 1.** Molekulska struktura desloratadina.

### 2.3.2. Desvenlafaksin [22,23]

Desvenlafaksin je sintetski biciklični derivat fenetilamina s antidepresivnim djelovanjem. Desvenlafaksin je selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina i norepinefrina zbog visokog afiniteta vezanja na presinaptičke serotoninske i norepinefrinske transportere. Blokiranjem oba transportera, ovo sredstvo produljuje neurotransmitske aktivnosti i serotonina i norepinefrina, čime se ublažava depresivno stanje. Spoj je topljiv u vodi. Koncentracija topljivosti iznosi 3700 mg/L pri 25 °C.

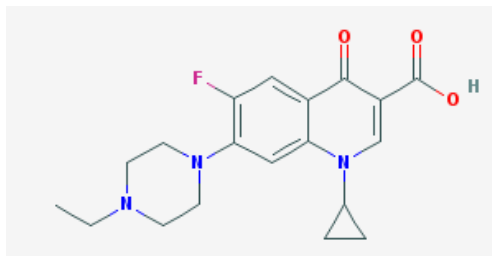


**Slika 2.** Molekulska struktura desvenlafaksina.

### 2.3.3. Enroflaksacin [22,23]

Enroflaksacin je veterinarski antibakterijski agens, sintetski derivat kinolona karboksilne kiseline, uvršten u skupinu fluorokinolona ili kinolona druge generacije. U osjetljivim mikroorganizmima koči aktivnost topoisomerase II (sintetička DNK-giraza) i topoisomerase IV, od kojih DNK-giraza u bakterijskoj jezgri katalizira početak replikacije DNK. Fluorokinoloni u vrlo malim koncentracijama djeluju baktericidno i mikoplazmacidno. Enroflaksacin ima antibakterijsko djelovanje protiv širokog spektra Gram–negativnih i Gram–

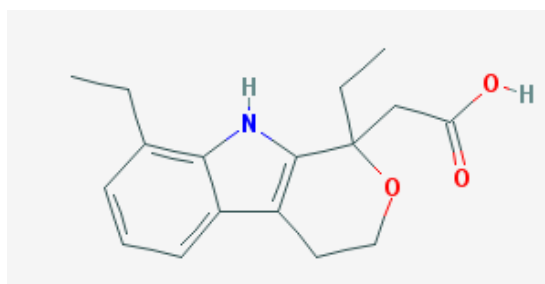
pozitivnih bakterija. Baktericidna aktivnost enrofloksacina ovisi o koncentraciji, pri čemu se smrt stanica osjetljiva na bakterije događa unutar 20-30 minuta izlaganja. Slabo je topljiv u vodi pri pH= 7.



**Slika 3.** Molekulska struktura enrofloksacina.

#### 2.3.4. Etodolak [22,23]

Etodolak je nesteroidni protuupalni lijek s protuupalnim, analgetičkim i antipiretskim svojstvima. Ima sposobnost inhibiranja sinteze prostaglandina, što je indicirano za ublažavanje znakova i simptoma reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Slično kao i drugi NSAID, protuupalni učinci etodolaka nastaju zbog inhibicije enzima ciklooksigenaze (COX). Na taj način se smanjuje sinteza perifernih prostaglandina uključenih u posredovanje upale. Etodolak se veže na gornji dio aktivnog mjesta COX enzima i sprečava njegov supstrat, arahidonsku kiselinu, da uđe u aktivno mjesto. Etodolak je bijeli kristalni spoj, netopljiv u vodi, ali topljiv u alkoholima, kloroformu, dimetil sulfoksidu (dimetil sulfoksid) i poletilen glikolu.



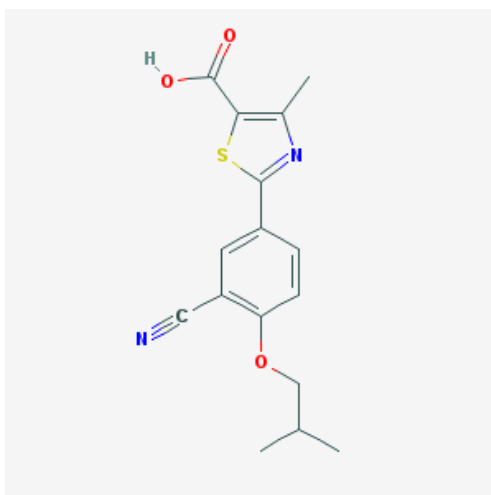
**Slika 4.** Molekulska struktura etodolaka.

#### 2.3.5. Febuksostat [22,23]

Febuksostat je relativno novi lijek – selektivan, nepurinski inhibitor ksantin oksidaze, enzima koji katalizira nastajanje mokraćne kiseline u organizmu. Nakon oralne primjene,



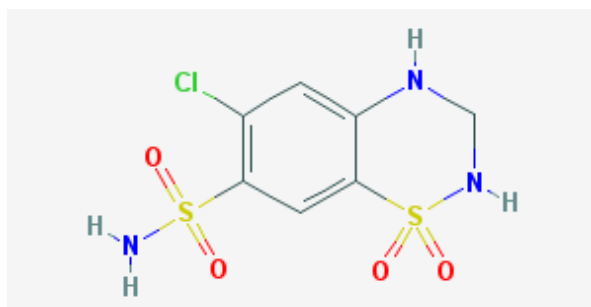
febuksostat selektivno i nekompetitivno inhibira aktivnost ksantin oksidaze, enzima koji pretvara oksipurine, uključujući hipoksantin i ksantin, u mokraćnu kiselinu. Kroz inhibiciju ksantin oksidaze, proizvodnja mokraćne kiseline se smanjuje i smanjuju se razine mokraćne kiseline u serumu. Učinkovit je u prevenciji i smanjenju učestalosti akutnih napada gihta. Gotovo je netopljiv u vodi, slabo topljiv u metanolu i etanolu te slobodno topiv u N,N-dimetilformamidu.



**Slika 5.** Molekulska struktura febeksostata.

### 2.3.6. Hidroklortiazid [22,23]

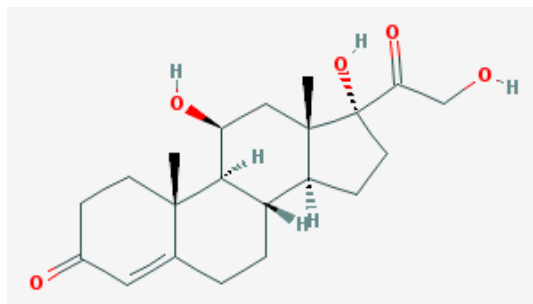
Hidroklortiazid je biciklički sulfonamidni diuretik koji se smatra prototipom tiazidskih diuretika. Smanjuje reapsorpciju elektrolita iz bubrežnih tubula. To rezultira povećanim izlučivanjem vode i elektrolita, uključujući natrij, kalij, klorid i magnezij. Koristi se za liječenje nekoliko poremećaja uključujući edem, hipertenziju, dijabetes insipidus i hipoparatiroidizam. Topljivost u vodi iznosi 722 mg/L pri 25 °C.



**Slika 6.** Molekulska struktura hidroklortiazida.

### 2.3.7. Hidrokortizon [22,23]

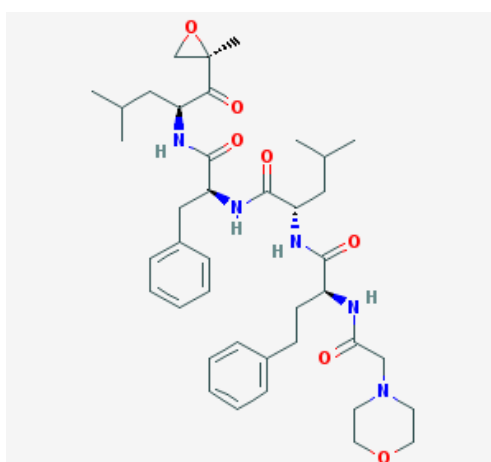
Hidrokortizon se može koristiti kao injekcija ili topikalno te se koristi za liječenje upala, alergija, bolesti kolagena, astme, adrenokortikalnog nedostatka, šoka i nekih neoplastičnih stanja. Topljivost u vodi iznosi 0,320 mg/L pri 25 °C.



Slika 7. Molekulska struktura hidrokortizona.

### 2.3.8. Karfilzomib [22,23]

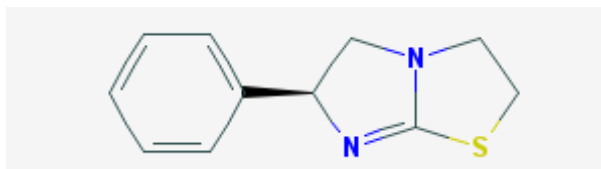
Karfilzomib je derivat epoksomicina s potencijalnim antineoplastičnim djelovanjem. Karfilzomib se ireverzibilno veže i inhibira aktivnost kimotripsina 20S katalitičke podjedinice proteasoma, kompleksa proteaze koja je odgovorna za degradiranje velikog broja staničnih proteina. Inhibicija proteasoma posredovane proteolizom rezultira akumulacijom ubikvitiniranih proteina, što može dovesti do zaustavljanja staničnog ciklusa, izazvati indukciju apoptoze i inhibiciju rasta tumora. Spoj je netopljiv u vodi, ali je topljiv u metanolu, etanolu i DMSO.



Slika 8. Molekulska struktura karfilzomiba.

### 2.3.9. Levamizol [22,23]

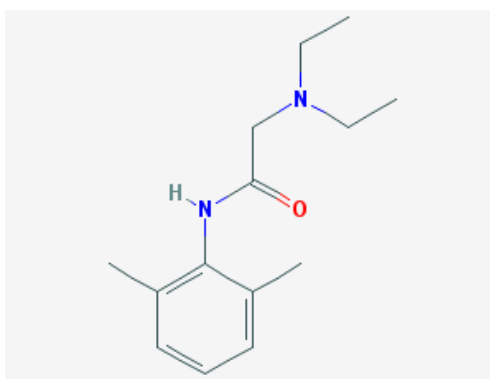
Levamizol je antihelmintik širokog spektra koji djeluje protiv najvažnijih želučano-crijevnih i plućnih nematoda. U osjetljivim nematodima, levamizol blokira neuromuskularni prijenos podražaja. Topljivost u vodi iznosi 0,210 mg/L.



Slika 9. Molekulska struktura levamizola.

### 2.3.10. Lidokain [22,23]

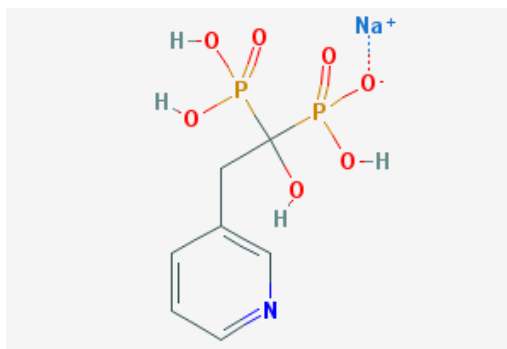
Lidokain je sintetički amino-etil-amid koji može djelovati kao lokalni anestetik ili antiaritmik. Lidokain stabilizira neuronsku membranu vezivanjem i inhibiranjem natrijevih kanala. Topljivost u vodi iznosi 0,410 mg/L pri 30 °C. Jako je topljiv u alkoholu i kloroformu, a slabo topljiv u eteru i benzenu.



Slika 10. Molekulska struktura lidokaina.

### 2.3.11. Natrijev risedronat [22,23]

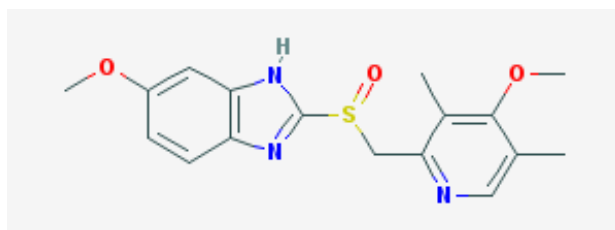
Natrijev risedronat je natrijeva sol risedroninske kiseline, skupina nehormonskih lijekova koji se zovu bisfosfonati te se primjenjuju za liječenje bolesti kostiju. Djeluje izravno na kosti čineći ih čvršćima te se tako umanjuje vjerojatnost prijeloma. Topljivost u vodi iznosi 0,0165 mg/L.



**Slika 11.** Molekulska struktura natrijevog risedronata.

### 2.3.12. Omeprazol [22,23]

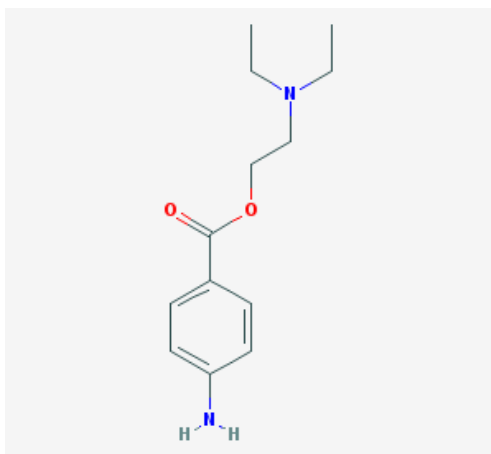
Omeprazol pripada skupini lijekova pod nazivom "inhibitori protonске pumpe", lijekova koji se koriste za liječenje peptičkih bolesti. Oni djeluju tako da smanjuju stvaranje kiseline u želucu. Spoj je jako slabo topljiv u vodi, slobodno topljiv u etanolu i metanolu te slabo topljiv u acetonu i izopropanolu.



**Slika 12.** Molekulska struktura omeprazola.

### 2.3.13. Prokain [22,23]

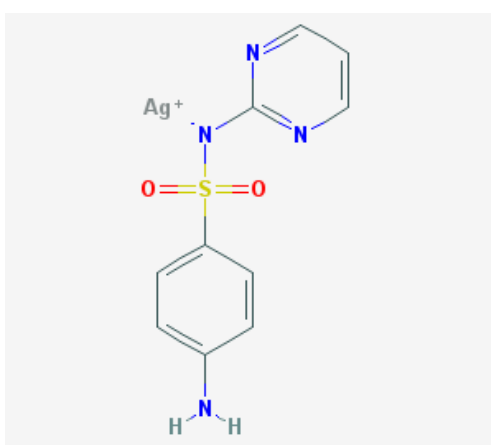
Prokain je derivat benzojeve kiseline koji djeluje kao lokalni anestetik ili antiaritmik. Veže i inhibira natrijeve kanale, čime se inhibiraju ioni potrebni za provođenje i pokretanje impulsa. Djelovanje mu je kraće od lidokaina. Topljivost u vodi iznosi 9450 mg/L pri 30 °C. Topljiv je u etanolu, etil eteru i benzenu.



**Slika 13.** Molekulska struktura prokaina.

### 2.3.14. Srebro sulfadiazin [22,23]

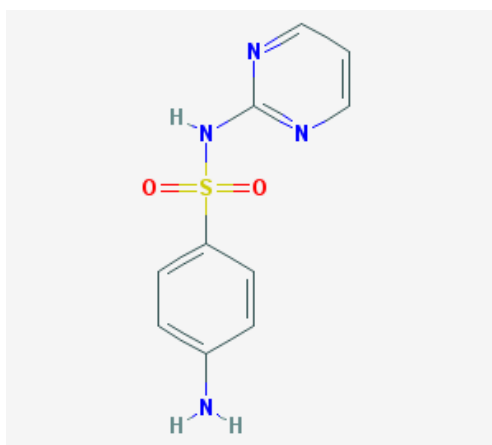
Srebro sulfadiazin je tvar bazirana na sulfonaminu s antibakterijskim i antifungalnim djelovanjem. Srebro sulfadiazin može djelovati kroz kombinaciju aktivnosti srebra i sulfadiazina. Kada ovo sredstvo djeluje s tjelesnim tekućinama koje sadrže natrijev klorid, ioni srebra se polako otpuštaju u ranjena područja. Ionizirani atomi srebra kataliziraju formiranje disulfidnih veza što dovodi do strukturnih promjena proteina i inaktivacije enzima koji sadrže tiol. Ioni srebra mogu također interkalirati DNK tako da interferiraju s replikacijom i transkripcijom bakterija. Maksimalna koncentracija topljivosti u vodi je  $7,87 \cdot 10^{-3}$  mg/L.



**Slika 14.** Molekulska struktura srebro sulfadiazina.

### 2.3.15. Sulfadiazin [22,23]

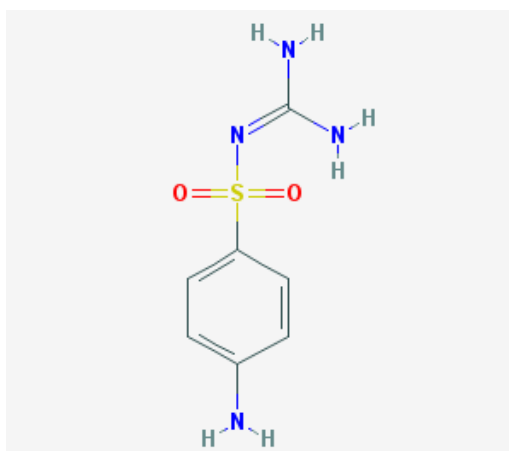
Sulfadiazin je sintetski derivat pirimidinil sulfonamida, kratkog bakterijskog djelovanja. Sulfadiazin inhibira sintezu bakterijske folne kiseline natječući se s para-amino benzojevom kiselinom. Koristi se u kombinaciji s pirimetaminom u liječenju toksoplazmoze u bolesnika sa sindromom stečene imunodeficijencije i kod novorođenčadi s kongenitalnim infekcijama. Topljivost u vodi iznosi 0,077 mg/L pri 25 °C.



Slika 15. Molekulska struktura sulfadiazina.

### 2.3.16. Sulfaguanidin [22,23]

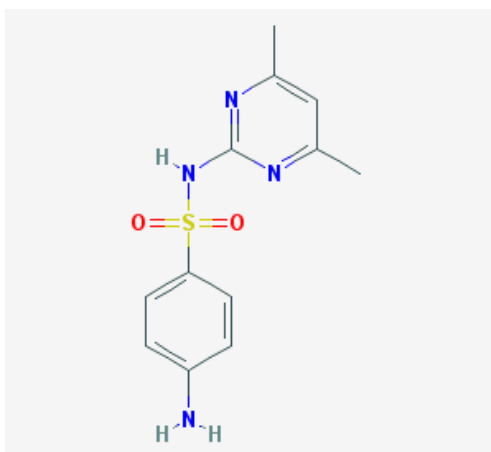
Sulfaguanidin je derivat guanidin sulfanilamida koji se koristi u veterinarskoj medicini. Antimikrobno sredstvo prikladno za liječenje bacilarne dizenterije i enteričkih infekcija. Topljivost u vodi iznosi <1 mg/ml pri 25 °C.



Slika 16. Molekulska struktura sulfaguanidina.

### 2.3.17. Sulfametazin [22,23]

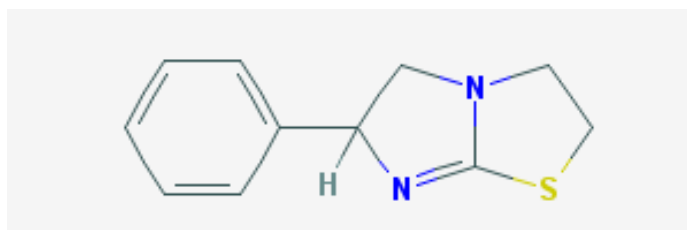
Sulfametazin je sulfanilamidno antiinfektivno sredstvo koje ima spektar antimikrobnih djelovanja slično kao ostali sulfonamidi. Učinak se temelji na kompetitivnoj inhibiciji ugradnje p-aminobenzojeve kiseline u molekulu folne kiseline, koja u protoplastu osjetljivih uzročnika sudjeluje u metabolizmu DNK, RNK i bjelančevina. Antimikrobni spektar tog sintetskog kemoterapeutika obuhvaća Gram–pozitivne koke, hemolitičke streptokoke i pojedine stafilokoke, a djeluje i na bacile, Gram–negativne pasterele i salmonelle, te na pojedine rikecije i kokcidije. U većine životinja dovoljna je jedna injekcija u 24 sata. Sulfametazin je danas najčešće rabljeni sulfonamid u veterinarskoj praksi, neznatno je toksičan, životinje ga izvrsno podnose, a ni u kiseloj mokraći ne stvara kristale. Topljivost u vodi iznosi 1,5 mg/L kod 29 °C. Topljiv je u acetonu, slabo topljiv u alkoholu i eteru.



Slika 17. Molekulska struktura sulfametazina.

### 2.3.18. Tetramizol [22,23]

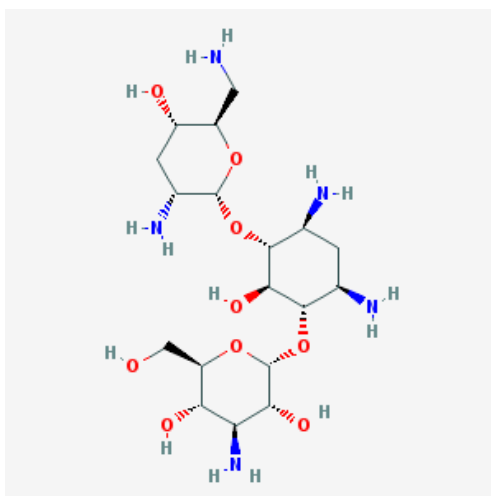
Tetramizol je širokospektralni antihelmintik koji djeluje protiv najvažnijih želučano-crijevnih i plućnih nematoda.



Slika 18. Molekulska struktura tetramizola.

### 2.3.19. Tobramicin [22,23]

Tobramicin je aminoglikozidni antibiotik izveden iz *Streptomyces tenebrarius* s bakteriostatskom aktivnošću. Nakon aktivnog prijenosa u stanicu, tobramicin se ireverzibilno veže na specifični aminoglikozidni receptor na bakterijskoj 30S ribosomskoj podjedinici i ometa kompleks inicijacije između mRNK i 30S podjedinice, čime se inhibira inicijacija sinteze proteina, što dovodi do smrti bakterijskih stanica. Topljivost u vodi iznosi 1 mg/L. Tobramicin je slabo topljiv u etanolu te gotovo netopljiv u kloroformu.



Slika 19. Molekulska struktura tobramicina.

## 2.4. Ispitivanje toksičnosti farmaceutika

Provođenje testova toksičnosti je neophodno kako bi se ocijenila onečišćenost vodenih medija, jer fizikalne i kemijske analize nisu dovoljne za definiciju svih štetnih učinaka onečišćujućih tvari na žive organizme. Naime, fizikalne i kemijske analize su ograničene i one samo ukazuju na prirodu štetnih tvari, ali ne daju nikakve informacije o biološkim utjecajima. Do danas je razvijeno mnogo metoda utvrđivanja biološke toksičnosti voda poput testova na algama, bakterijama, beskrležnjacima, biljkama i ribama. Razlikujemo akutne i kronične testove toksičnosti. Akutnim testom se određuje preživljavanje testiranih organizama unutar 24 do 96 sati dok se kroničnim testom određuje preživljavanje organizma koji je kontaminiran ispitivanim uzorkom, ali i utjecaj tog uzorka kao npr. smetnje ponašanja, rasta, reprodukcije i slično, a traje minimalno 7 dana. [24]



U posljednjih nekoliko godina razvijen je velik broj testova za određivanje akutne toksičnosti uz pomoć bioluminiscentnih test organizama kao što su bakterije *Vibrio fischeri*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi* i *Pseudomonas fluorescens*. Izlaganje luminescentnih bakterija toksičnim tvarima uzrokuje pad luminiscencije koji je proporcionalan s toksičnošću ispitivane tvari. Veliki je interes za provođenjem ovih testova budući da su jednostavni, daju brzi odgovor i relativno su povoljni. Također, usprkos činjenici da postoje različiti mehanizmi toksičnosti za različite organizme različitih vrsta, ona tvar koja je toksična za neki organizam pokazuje slične toksične učinke na drugom organizmu. Dakle, inhibicija luminiscencije kod bakterija može učinkovito pokazati toksične učinke na višim organizmima. [24]

#### **2.4.1. Bioluminiscentno određivanje toksičnosti**

Bioluminiscencija, pojava koja nastaje kada živi organizam emitira vidljivo svjetlo, rezultat je kemijske reakcije u kojoj se molekula luciferina oksidira (reagira s kisikom) u oksiluciferin pri čemu se oslobađa svjetlost, a brzinu reakcije određuje prisutnost enzima luciferaze. [25]

Kratkoročna analiza inhibicije bioluminiscencije je široko korišten, standardiziran biotest koji se koristi za određivanje akutne toksičnosti, kompleksnih eflueanata i smjese kemikalija u različitim okolišnim matriksima. [26,27]. Prednosti testa su lako korištenje, brzina te niski troškovi, dok je nedostatak ograničena ekotoksikološka relevantnost upotrijebljenog parametra.

#### **2.4.2. *Vibriofischeri* bakterije**

*Vibrio fischeri* su Gram-negativne štapičaste bakterije koje su isključivo prisutne u morskom ekosustavu. Imaju bioluminiscentna svojstva, heterotrofne su i pokreću se uz pomoć „bičeva“ (flagela). Slobodno su živuće jedinice koje žive kao saprofiti razlažući organsku tvar. Pretežno se nalaze u simbiozi s raznim ribama i glavonošcima. Zanimljiv primjer njihove simbioze pronalazimo u Tihom oceanu gdje bakterije žive unutar dvije različite životinje: noćnoj lignji vrste *Euprymna scolopes* i ribi vrste *Monocentris japonica* koja nastanjuje grebenska staništa. U lignji, koja se noću hrani blizu morske površine, jedan soj ove vrste bakterija sačinjava svjetlosni organ koji oponaša mjesečevu svjetlost i služi joj kao zaštita od

gladnih predatora u vodama ispod nje. U grebenske ribe, drugi soj bakterije formira svjetlosni organ unutar čeljusti i pomaže pri osvjetljavanju tamnih dijelova grebena kojima se riba noću kreće u potrazi za hranom. [25]

## 2.5. QSAR MODELIRANJE

QSAR je skraćenica koja dolazi od *Quantitative Structure-Activity Relationship* (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti). Sam naziv govori kako je QSAR metoda kojom se neko strukturno svojstvo želi dovesti u kvantitativnu vezu s biološkom aktivnošću. Ukoliko tražimo kvantitativnu povezanost strukture s nekim drugim fizikalno-kemijskim svojstvom tvari govorimo o QSPR modelima (engl. *Quantitative Structure-Property Relationship*). QSAR se danas u velikoj mjeri primjenjuje u širokom rasponu znanstvenih disciplina, uključujući kemiju, biologiju i toksikologiju. [28] Posljednjih desetak godina QSAR je postao neizostavan alat u farmaceutskoj industriji, a rastući trend je rana primjena QSAR-a kao sredstva provjere u postupku otkrivanja ljekovite supstancije te kao alata za eliminaciju molekula kojima nedostaju određena svojstva ili onih za koje se predviđa da će izazvati toksičan odgovor iz daljnjeg razvoja. Takav postupak razvoja QSAR-a omogućuje njegovo širenje izvan okvira farmaceutске industrije do ekoloških i ljudskih regulatornih tijela za upotrebu u toksikologiji. [29,30]

Prvi korak korištenja metode QSAR podrazumijeva pronalazak grupe kemijskih spojeva ili vodećeg spoja koji pokazuju željenu biološku aktivnost. Zatim se uspostavlja kvantitativni odnos između fizičko-kemijskih parametara i biološke aktivnosti nakon čega se, pomoću QSAR modela, provodi optimizacija aktivnih spojeva kako bi se povećala odgovarajuća biološka aktivnost. Odgovarajući se spojevi nakon uspostavljanja kvalitetnog matematičkog modela, eksperimentalno testiraju na željenu aktivnost. Eksperiment je nužan za potvrđivanje ispravnosti i točnosti dobivenog matematičkog modela. Na ovaj se način QSAR metoda može upotrijebiti kao vodeće sredstvo za određivanje odgovarajućih izmjena u vodećem spoju kojima bi se poboljšala njegova biološka aktivnost. [31]

### 2.5.1. Molekularni deskriptori

Molekularni deskriptori su rezultat logičkih i matematičkih transformacija kemijske informacije. Dijele se na eksperimentalne i teorijske. Eksperimentalni deskriptori

predstavljaju rezultat nekog standardiziranog pokusa, a opisuju fizička svojstva molekula, kao što su molekulska masa, topljivost, lipofilnost ( $\log P$ ), polarizabilnost, molekularna refraktivnost, dipolni moment i dr. Teorijski molekularni deskriptori, koji su obično dobivali nazive prema autoru koji ih je predložio (Wienerov, Randićev, Balabanov indeks itd.), pretvaraju strukturu u koristan broj te se temelje na simboličkom prikazu molekule, a prema dimenzionalnosti strukturne informacije dijele se na:

- 0D– opisuju svojstva molekula temeljem sažete molekulske formule, npr. broj atoma
- 1D– opisuju svojstva supstituenata, fragmenata, funkcionalnih skupina
- 2D – opisuju veze između atoma u molekuli – topološki indeksi
- 3D – opisuju konfiguraciju molekule – geometrijski, sterički i volumni deskriptori.

**Tablica 1.** Podjela deskriptora s obzirom na opisujuća svojstva [32].

Konstitucijski deskriptori	molekulska masa, broj atoma, broj veza, broj prstenova
Topološki deskriptori	Weinerov indeks, Randićev indeks, Kierove i Hallove značajke; informacijski sadržaj; indeks povezanosti; Balabanov indeks
Elektrostatski deskriptori	parcijalni naboji, indeks polarnosti; topološki elektronski indeks; multipolovi; djelomično elektronski nabijena molekulska površina; polarnost; anizotropija polarnosti
Geometrijski deskriptori	moment inercije; molekulski volumen, molekulska površina; indeksi zasjenjivanja; Taftova konstanta steričnosti; parametri duljine, širine i visine; faktor oblika
Kvantno-mehanički deskriptori	mreža atomskih naboja; red veze; HOMO i LUMO energije; FMO indeksi reaktivnosti; refrakcije; ukupna energija; ionizacijski potencijal; elektronski afinitet; energija protoniranja; orbitalna populacija; granica orbitalne gustoće; superdelokalizacije

Topološki indeksi čine najveću skupinu teorijskih molekularnih deskriptora. Osim jednostavnih deskriptora koji se temelje na prebrojavanju (npr. atoma u molekuli) koriste se i

sterički, hidrofobni, i elektronski parametri koji se najčešće dobivaju primjenom kvantno-kemijskih proračuna (npr.  $\log P$ , molarna refraktivnost, parcijalni naboji...).

Potrebno je napomenuti da se odabir određenog molekularnog deskriptora ili većeg broja deskriptora temelji na njihovoj mogućnosti, odnosno jednostavnosti interpretacije. Pri odabiru treba voditi računa da odabrani skup molekularnih deskriptora sadrži one koji ne nose istu informaciju i koji su međusobni slabo korelirani (tablica 1) [32].

## 2.5.2. RM1 metoda optimiranja molekulske strukture

Svaku molekulsku strukturu potrebno je optimirati s obzirom na postojeće interakcije. Postoji više matematičkih metoda optimiranja struktura, a RM1 (Recife Model 1) je jedna od najpopularnijih [33]. RM1 poluempirijski molekularni orbitalni modeli temeljeni su na monoatomskim parametrima, za sustave koji sadrže H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br i I. [34]. Sposoban je modelirati većinu molekularnih sustava koji imaju značaj za organsku kemiju, biokemiju i farmaceutska istraživanja. Uglavnom je identičan metodi AM1 (kvantna kemijska poluempirijska metoda) koja je također vrlo raširena među kemičarima zbog dosljedno dobrih rezultata te dostupna u mnogim komercijalnim i nekomercijalnim kvantnim programima kao što su MOPAC, Hyperchem, Spartan Amber... Međutim RM1 metoda ima poboljšanu izvedbu (noviji i poboljšani parametri). [35]

Najkritičniji dio poluempirijskog modela je upravo njegova parametrizacija. Preduvjet za dobivanje točnog modela je kvaliteta i količina upotrijebljenih eksperimentalnih vrijednosti. [35]

## 2.5.3. Procjena modela

Procjena QSAR modela vrlo je važan aspekt, odnosno koliko dobro model opisuje podatke (engl. *goodness of fit*). Kvaliteta modela može se vrednovati kroz koeficijent determinacije,  $R^2$ , prilagođenim koeficijent determinacije,  $R_{\text{adj}}^2$ , standardnu pogrešku regresije,  $s$ , te Fischerov omjer,  $F$ .

Koeficijent determinacije računa se prema izrazu:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (Y_{\text{obs}} - Y_{\text{calc}})^2}{\sum (Y_{\text{obs}} - \bar{Y}_{\text{obs}})^2} \quad (1)$$

U jednadžbi (1)  $Y_{\text{obs}}$  predstavlja opažene vrijednosti,  $Y_{\text{calc}}$  su očekivane vrijednosti (izračunate po modelu), a  $\overline{Y_{\text{obs}}}$  predstavlja prosjek opaženih vrijednosti.

Prilagođeni koeficijent determinacije računa se prema izrazu:

$$R_{\text{adj}}^2 = \frac{(N-1)R^2 - p}{N-1-p} \quad (2)$$

U gornjem izrazu  $p$  predstavlja broj prediktorskih varijabli u modelu, a  $N$  broj deskriptora.

$F$  vrijednost govori o značajnosti nezavisnih varijabli odabranih u model. Računa se kao omjer varijance objašnjene modelom,  $\sigma_{\text{REG}}^2$ , i modelom neobjašnjene varijance,  $\sigma_{\text{RES}}^2$ :

$$F = \frac{\sigma_{\text{REG}}^2}{\sigma_{\text{RES}}^2} \quad (3)$$

#### 2.5.4. Validacija modela

Validacijske tehnike koristimo za provjeru prediktivnosti modela, tj. da se dobije mjerilo njihove sposobnosti za obavljanje pouzdanih predviđanja modeliranog odziva za nove slučajeve za koje je odziv nepoznat. Glavni cilj tehnika validacije je odabir (pronalazak) modela s najboljom sposobnošću prediktivnosti.

U  $k$ -unakrsnoj validaciji primjeri iz skupa podataka, slučajno su razdijeljeni u  $k$  međusobno različitih segmenata, približno iste veličine. Tipično je da se u jednoj iteraciji  $k-1$  segment koristi za učenje modela, koji se potom testira na preostalom testnom segmentu. Postupak se ponavlja  $k$  puta, tako da je svaki od segmenata po jednom u ulozi testnog segmenta. Prosječna greška preko svih  $k$  segmenata naziva se greškom unakrsne validacije/provjere (engl. *cross-validated error rate*).

Unutarnja validacija se dobiva analizom svakog pojedinačnog objekta koji predstavlja konačnu jednadžbu. Takav postupak se naziva metodom unakrsne validacije izostavljanjem po jednog člana skupa (engl. *leave-one-out cross-validation*; LOO) [24]. Proces se izračuna u setu za treniranje te se dobiva  $Q_{\text{LOO}}^2$ , koeficijent LOO validacije.

$$Q_{\text{LOO}}^2 = \frac{1 - \text{PRESS}}{\text{TSS}} \quad (4)$$

pri čemu je  $\text{TSS}$  ukupna suma kvadrata, odnosno zbroj kvadratnih odstupanja od srednje vrijednosti, a  $\text{PRESS}$  je zbroj kvadrata pogreške predviđanja. Unutarnja validacija se po analognom principu može izvesti i *leave-many-out* (LMO) postupkom, pri čemu izostavljamo više članova skupa. LMO model koristi manji skup podataka nego LOO postupak i može biti

ponovljen više puta [36]. Da bi se pokazalo kako model nije rezultat slučajne korelacije, može se primijeniti postupak *Y-scramble* koji također pripada u unutarnju validaciju. U ovom postupku, odzivi se odabiru nasumično tako da ne postoji korelacija između njih i deskriptora.

U procesu validacije modela, potreba je i vanjska provjera valjanosti modela. Vanjska validacija se provjerava zbog sposobnosti predviđanja novih spojeva. To se postiže primjenom jednadžbe modela, dobivene na setu za treniranje, na jedan ili više predviđenih skupova podataka, koji uključuju spojeve koji nikada nisu bili korišteni u izračunu modela.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije i oprema

Tijekom provedbe eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije:

- natrijev hidroksid, NaOH, Kemika , 98%
- sumporna kiselina, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Kemika, 96%
- natrijev klorid, NaCl, Kemika, p.a.
- Bio Fix Lumi Reconstituion sol
- Bio Fix Lumi Medium for freeze-dried luminous bacteria

**Tablica 2.** Podaci o korištenim farmaceuticima.

Farmaceutik	Molekulska formula	CAS broj	M, g/mol
Desloratadin	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub>	100643-71-8	310,83
Desvenlafaksin	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	93413-62-8	263,38
Enroflaksacin	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	93106-60-6	359,40
Etodolak	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	41340-25-4	287,36
Febuksostat	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	144060-53-7	316,38
Hidroklortiazid	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	58-93-5	297,74
Hidrokortizon	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	50-23-7	362,46
Karfilzomib	C <sub>40</sub> H <sub>57</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	868540-17-4	719,92
Levamisol	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S	14769-73-4	204,29
Lidokain	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	137-58-6	234,34
Natrijev risedronat	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> NNaO <sub>7</sub> P <sub>2</sub>	115436-72-1	305,09
Omeprazol	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	73590-58-6	345,42
Prokain	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	59-46-1	236,31
Srebro sulfadiazin	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> AgN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	22199-08-2	357,14
Sulfadiazin	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	68-35-9	250,28
Sulfaguanidin	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	57-67-0	214,24
Sulfametazin	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	57-68-1	278,33
Tetramizol	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> S	5036-02-2	204,29
Tobramicin	C <sub>18</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub>	32986-56-4	467,52

Eksperimentalna mjerenja provedena su na 19 farmaceutika čije su karakteristike navedene u tablici 2.

Mjerenje bioluminiscencije provedeno je na BioFix Lumi-10 luminometru (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka).

## 3.2. Priprava otopina

Temeljna standardna otopina farmaceutika koncentracije 0,1 mM pripremljena je otapanjem odgovarajuće mase svakog farmaceutika u ultra-čistoj vodi u odmjernim tikvicama od 1000 mL.

### 3.2.1. Određivanje toksičnosti na *Vibrio fischeri*

Toksičnost uzorka određena je korištenjem bakterije *Vibrio fischeri* kao testnog organizma prema međunarodnom standardu ISO 11348-3. Bakterija *Vibrio fischeri* je odabrana zbog najveće osjetljivosti u širokom rasponu toksičnih tvari. Prije početka mjerenja toksičnosti potrebno je u uzorke dodati 2% NaCl te podesiti pH između 6-8. Priprema bakterija zahtijeva:

- 1 mL otopine „Bio Fix Lumi Reconstituion sol“koja se dodaje u bočicu s *Vibrio Fischeri* bakterijama
- 50 mL „Bio Fix Lumi Medium for freeze-dried luminous bacteria“
- Zatim se sve zajedno prenese u čašu od 100 mL te je potrebno da odstoji petnaest minuta.

Također je potrebno pripremiti referentnu kivetu koja se sastoji od 2% otopine NaCl i bakterijske suspenzije koja služi kao slijepa proba. Temperatura prostorije trebala bi biti 15 °C, ali zbog vanjskih uvjeta iznosila je  $t = 16-18$  °C.

Metoda određivanja se bazira na inhibiciji luminiscencije bakterije. U kivetu za ispitivanje stave se različita razrjeđenja ispitnog uzorka i mjeri se smanjenje luminiscencije nakon 15 minuta inkubacije. Učinak inhibicije izražava sa  $EC_{50}$  vrijednosti koja može biti preračunata u jedinice toksičnosti (engl. *toxicity unit*, TU) prema izrazu:

$$TU = \frac{100}{EC_{50} \%} \quad (5)$$



## 4. MODELIRANJE

Za modeliranje i testiranje razvijenih modela primijenjen je skup od 146 spojeva koji se sastoje od 19 ispitivanih farmaceutika te 127 spojeva za koje su literaturno preuzeti podaci o toksičnosti [9, 37-41] (tablica 3). Postotak spojeva korišten za razvoj i unutarnju validaciju modela iznosio je 80%, dok je preostalih 20% spojeva korišteno kao vanjski set podataka. Komponente za vanjski set odabrane su nasumično.

Molekulske strukture su optimizirane prema RM1 metodi koristeći sučelje MOPAC2012. Poluempirijski kvantno-kemijski deskriptori: moment dipola,  $E_{\text{HOMO}}$  (energija najviše popunjene molekulske orbitale),  $E_{\text{LUMO}}$  (energija najniže nepopunjene molekulske orbitale), HLG (energetska razlika između  $E_{\text{HOMO}}$  i  $E_{\text{LUMO}}$ ), entalpija stvaranja ( $\Delta H_f$ ), i ionizacijski potencijal izračunati su korištenjem gore navedene metode.

Molekularni deskriptori izračunati su pomoći Dragon 6.0. softvera (Milano chemometrics & QSAR istraživačka skupina, TALETE, Italija).

Korelacija između ciljanih QSAR odziva, odnosno toksičnosti i strukture povezanih deskriptora, dobiveni su korištenjem genetičkog algoritma (engl. *genetic algorithm*, GA) kao alata za selekciju varijabli i metode višestruke linearne regresije (engl. *multiple linear regression*, MLR). U programskom alatu QSARINS 2.2. (QSAR Group, Sveučilište u Insubriji, Italija) primijenjena je kombinacija GA i MLR tehnika za odabir deskriptora i konstrukciju QSAR modela s 3-, 4-, 5-, 6-, i 7- varijabli.

Prilikom izrade modela korištene su normalizirane vrijednosti deskriptora.

Prije odabira varijabli, procijenjeni su koeficijenti korelacije za sve parove deskriptora koji su korišteni u modelima kako bi se identificirali visoko korelirani deskriptori te otkrila redundancija u skupu podataka. Visoko korelirani deskriptori i deskriptori sličnih vrijednosti (mala devijacija) su eliminirani iz daljnjeg razmatranja što je rezultiralo redukcijom broja deskriptora na ukupno 3108.

Odabir i validacija modela izvršena je usporedbom vrijednosti dobivenih statističkih parametara modela:  $R$  (koeficijent korelacije);  $R^2$  (koeficijent determinacije);  $F$  ( $F$ -omjer između varijanci dobivenih i izračunanih vrijednosti);  $p$  (vjerojatnost izračuna parametra);  $Q^2$  (koeficijent LOO validacije);  $s$  (standardna pogreška); i  $S_{\text{PRESS}}$  (pogreška sume kvadratnih odstupanja predviđenih vrijednosti, engl. *predicted residual error sum of squares*). Validacija modela provedena je korištenjem LOO i LMO pristupa te  $Y$ -scramble testova.

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

U radu je analizirana povezanost toksičnosti 146 spojeva s njihovim strukturnim karakteristikama. Za 19 spojeva (navedenih u tablici 3 bez citata literature) toksičnost je određena eksperimentalno, dok je za preostalih 127 spojeva preuzeta iz literature. Podaci o toksičnosti navedeni su u tablici 3.

**Tablica 3.** Lista korištenih 146 spojeva i njihove logaritamske vrijednosti toksičnosti. Spojevi korišteni kao vanjski set podataka označeni su zvjezdicom (\*).

Naziv	M, g/mol	log(EC <sub>50</sub> )	Naziv	M, g/mol	log(EC <sub>50</sub> )
Benzil-paraben [39]	228,24	-24,202	2-klorbenzojeva kiselina [41]	156,57	10,253
Karbonil cijanid-p-fluoro-metoksi-fenil-hidrazon [38]	254,17	-0,839	2,3-dimetilfenol * [9]	122,17	10,414
Karbonil cijanid-m-chloro-fenil-hidrazon [38]	204,62	-0,781	Srebro sulfadiazin	357,14	10,488
Propil-paraben [39]	180,20	-0,585	Dinitro-o-krezol [38]	198,13	10,674
Omeprazol *	345,42	-0,419	3,4,5-trikloranilin [9]	196,45	10,682
2-hidroksi-bifenil [40]	170,21	-0,398	4-nitrofenol [37]	139,11	10,934
4-etilfenol [9]	122,17	-0,367	2,4-dinitroanilin * [37]	183,12	11,027
Pentaklorfenol [37]	266,32	-0,265	2,6-dikloranilin [9]	162,01	11,139
2,4,5-triklorfenol [9]	197,44	-0,252	2,3-diklorfenol [9]	162,98	11,271
Izo-propilparaben * [39]	180,20	-0,208	Desvenlafaksin	263,38	11,34
Difenilamin [40]	169,23	-0,202	2-aminobenzojeva kiselina [41]	137,14	11,367
Heksakloretan [37]	236,72	-0,146	4-aminobenzojeva kiselina * [41]	137,14	11,367
Natrijev risedronat	305,09	0,008	Trikloroctena kiselina [40]	163,38	11,399
Sulfametazin	278,33	0,021	3-klorbenzaldehyd [37]	140,56	11,479
Hidrokortizon *	362,46	0,047	2-klor-4-nitroanilin [37]	172,57	11,503
Butilparaben [39]	194,23	0,079	2,3-dikloranilin [9]	162,01	11,523
4-etilanilin [9]	121,18	0,171	2,4-dikloranilin * [9]	162,01	11,703
4-klorbenzilklorid [37]	161,03	0,197	2-klorfenol [40]	128,55	11,703
Oktanol [37]	130,23	0,215	2,6-dinitrofenol [38]	184,11	11,741
4(fenilazo)fenol * [38]	290,32	0,292	Desloratadin	310,83	11,744
2,3,5-triklorfenol [38]	197,44	0,303	4-fluorbenzojeva kiselina [41]	140,11	11,875
2,3,4-triklorfenol [38]	197,44	0,332	Fenilhidrazin * [40]	144,06	11,987
4-bromanilin [40]	172,03	0,375	3,4-dinitrofenol [38]	184,11	12,073
3,5-diklorfenol [9]	162,98	0,425	2,6-diklorfenol [9]	162,98	12,175
4-klorbenzilcijanid * [37]	151,59	0,451	4-metoksianilin [40]	123,15	12,201
Dinoterb [38]	240,22	0,467	2,5-dikloranilin [9]	162,01	12,227
4-brombenzojeva kiselina [41]	201,02	0,473	2,3,6-trimetilfenol * [9]	136,19	12,33
Levamisol	204,29	0,489	3-aminobenzojeva kiselina [41]	137,14	12,672
3,4-dimetilfenol [9]	122,17	0,494	2-metilfenol [37]	108,14	12,84
Pentafluorfenol * [40]	184,07	0,543	Tetrakloretan [37]	167,84	12,849
Izo-butyl-paraben [39]	194,23	0,544	2,3,5-trimetilfenol [9]	136,19	13,181
Sulfadiazin	250,28	0,554	3-nitroanilin * [37]	138,13	13,703
3,4-diklorfenol [9]	162,98	0,556	Benzidin [40]	629,49	14,232
2,4-dinitro-1-naftol [38]	234,17	0,558	2,5-dimetilfenol [9]	122,17	14,393
3,4-diklorbenzaldehyd [37]	175,01	0,563	3-klorfenol [9]	128,55	15,092

**Tablica 3. Nastavak.**

Naziv	M, g/mol	log(EC <sub>50</sub> )	Naziv	M, g/mol	log(EC <sub>50</sub> )
Dinoseb (butafen) [38]	240,22	0,595	2,4,6-trimetilfenol * [9]	136,19	15,514
Febuksostat	316,38	0,606	3,5-dikloranilin [9]	162,01	15,539
Karfilzomib	719,92	0,621	3-metilfenol [9]	108,14	15,575
2,4,6-triklorfenol * [38]	197,44	0,624	Octena kiselina [40]	60,05	15,888
4-klorfenol [37]	128,55	0,629	2-etilfenol [9]	122,17	15,988
3-brombenzojeva kiselina [41]	201,02	0,643	3-etilanilin * [9]	121,18	16,170
Etil-paraben [39]	166,17	0,663	4-metililanilin [9]	107,16	16,191
Lidokain	234,34	0,671	3,5-dimetilfenol [9]	122,17	16,243
4-metilfenol * [9]	108,14	0,675	2-kloranilin [9]	127,57	16,314
Prokain	236,31	0,676	Benzilamin [40]	107,16	16,325
2,4-dimetilfenol [9]	122,17	0,691	1,2-fenilendiamin * [40]	108,14	16,335
Hidroklortiazid	297,74	0,709	Heksan [37]	86,18	16,654
Etodolak	287,36	0,737	Etanolamin [40]	61,08	16,857
2,6-dietilanilin * [9]	149,24	0,743	Anilin [37]	93,13	16,891
4-kloranilin [40]	127,57	0,768	2,6-dimetilfenol [9]	122,17	17,364
2,6-dinitro-4-metilfenol [38]	198,13	0,771	2-etilanilin * [9]	121,18	17,589
Metil-paraben [39]	152,15	0,771	Cikloheksanon [37]	98,15	17,651
4-klorbenzojeva kiselina [41]	156,57	0,805	3-kloranilin [9]	127,57	18,082
3-etilfenol * [9]	122,17	0,843	2,5-dimetilanilin [9]	121,18	18,248
3,4-dimetilanilin [9]	121,18	0,844	3,5-dimetilanilin [9]	121,18	18,561
Fenol [40]	94,11	0,856	2,6-dimetilanilin [9]	121,18	18,910
3,4-dikloranilin [9]	162,01	0,857	2,4,6-trimetilanilin [9]	135,21	19,533
2,4-dinitrofenol * [38]	184,11	0,858	3-metililanilin [9]	107,16	19,595
3-klorbenzojeva kiselina [41]	156,57	0,875	Rezorcinol [37]	110,11	20,418
2,4,5-trikloranilin [9]	196,45	0,899	2,3-dimetilanilin * [9]	121,18	20,682
2-klorbenzilcijanid [37]	151,59	0,921	Tetramizol	204,29	21,304
Benzil-acetat [40]	150,18	0,929	2-metililanilin [9]	107,16	22,718
4-klorbenzoni-tril * [37]	137,56	0,939	Etil 5-(4-(4-(5-cijano-1H-indol-3-il)butil)piperazin-1-il)benzofuran-2-karboksilat [38]	470,56	24,800
Enroflaksacin	359,40	0,955	Trietanolamin [40]	149,19	25,416
Benzojeva kiselina [41]	122,12	0,997	1,2-dikloretan * [37]	98,95	25,654
Benzojeva kiselina [41]	122,12	0,997	1,2-dikloretan * [37]	98,95	25,654
4-klorbenzaldehyd [37]	140,57	0,998	Sulfaguanidin	214,24	25,856
2,5-diklorfenol [9]	162,98	10,128	Limunska kiselina [40]	192,12	27,110
3,4-diklorbenzoni-tril * [37]	172,01	10,155	Tetrahidrofuran [37]	72,11	29,580
2,3,4-trikloranilin [9]	196,45	10,212	Diklormetan [37]	85,93	29,69
2,3,6-triklorfenol [38]	197,44	10,212	Dietileter * [37]	74,12	31,900
2,4,6-trikloranilin [9]	196,45	10,226	Aceton [37]	58,08	38,64

Za svih 146 analiziranih spojeva optimirane su strukture RM1 metodom i izračunati molekularni deskriptori. Od spomenutog broja spojeva za razvoj i unutarnju validaciju nasumice je odabrano njih 80% dok je preostalih 20% uzeto kao vanjski set kojim smo dodatno provjerili mogućnosti predviđanja razvijenim QSAR modelima. Od 3108 deskriptora odabranih za modeliranje genetičkim algoritmom odabrani su od 3 do 7 deskriptora koji su MLR regresijom povezani u 3- do 7-parametarske QSAR modele.

## 5.1. QSAR modeliranje za predviđanje toksičnosti ispitanih farmaceutika

Primjenom genetičkih algoritama i MLR regresije razvijeni su 3- do 7-varijabilne QSAR modeli (jedn. 6-10).

$$\begin{aligned} \log EC_{50} = & 23,562(\pm 0,391) \\ & +0,000(\pm 0,000) \cdot \text{Wap} \\ & -0,603(\pm 0,146) \cdot \text{Eig02\_EA(bo)} \\ & +0,513(\pm 0,224) \cdot \text{NsNH2} \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \log EC_{50} = & 23,185(\pm 0,381) \\ & -0,000(\pm 0,000) \cdot \text{Wap} \\ & -0,577(\pm 0,144) \cdot \text{Eig02\_EA(bo)} \\ & -12,402(\pm 0,181) \cdot \text{nC=N-N<} \\ & +0,482(\pm 0,219) \cdot \text{NsNH2} \end{aligned} \quad (7)$$

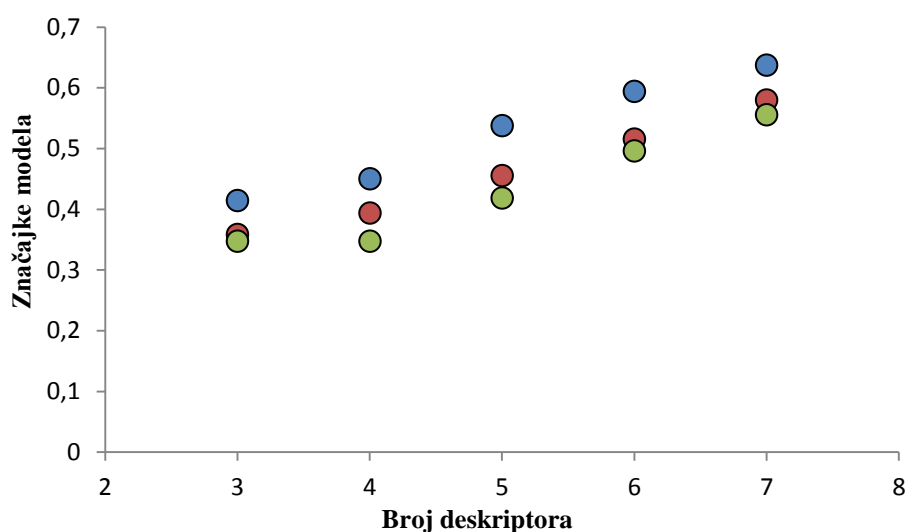
$$\begin{aligned} \log EC_{50} = & 32,660(\pm 0,541) \\ & -0,157(\pm 0,092) \cdot \text{nCL} \\ & -0,000(\pm 0,000) \cdot \text{Wap} \\ & -0,684(\pm 0,159) \cdot \text{Eig02\_EAE(bo)} \\ & +0,426(\pm 0,201) \cdot \text{NsNH2} \\ & -0,191(\pm 0,076) \cdot \text{CATS2D\_07\_LL} \end{aligned} \quad (8)$$

$$\begin{aligned} \log EC_{50} = & 29,114(\pm 0,340) \\ & -0,170(\pm 0,087) \cdot \text{nX} \\ & +0,000(\pm 0,000) \cdot \text{Wap} \\ & +0,523(\pm 0,123) \cdot \text{SM12\_AEA(ri)} \\ & -12,121(\pm 0,796) \cdot \text{NC=N-N<} \\ & +0,415(\pm 0,191) \cdot \text{CATS2D\_00\_DD} \\ & -0,201(\pm 0,073) \cdot \text{CATS2D\_07\_LL} \end{aligned} \quad (9)$$

$$\begin{aligned}
\log EC_{50} = & 29,392(\pm 0,352) \\
& -0,210(\pm 0,084) \cdot nX \\
& +0,000(\pm 0,000) \cdot Wap \\
& -0,398(\pm 0,123) \cdot TI2\_L \\
& +0,523(\pm 0,123) \cdot SM12\_AEA(ri) \\
& +0,455(\pm 0,181) \cdot NsNH2 \\
& +0,503(\pm 0,255) \cdot CATS2D\_04\_AN \\
& +0,291(\pm 0,537) \cdot B06[O-Cl]
\end{aligned}
\tag{10}$$

**Tablica 4.** Značajke razvijenih QSAR modela.

Broj deskriptora	$R^2$	$Q^2_{LOO}$	$Q^2_{LMO}$	$F$	$s$
3	0,414	0,358	0,348	26,646	0,653
4	0,450	0,394	0,348	22,926	0,635
5	0,537	0,456	0,418	25,787	0,585
6	0,594	0,516	0,496	26,832	0,551
7	0,637	0,579	0,556	27,377	0,523



**Slika 20.** Grafički prikaz značajki modela o broju deskriptora. Vrijednosti označene plavim točkama predstavljaju koeficijent determinacije,  $R^2$ , crvenim koeficijent LOO unakrsne validacije,  $Q^2_{LOO}$ , dok je zelenim označen koeficijent LMO unakrsne validacije,  $Q^2_{LMO}$ .

Značajke razvijenih modela dane su u tablici 4. Vidljivo je kako povećanjem broja deskriptora raste kvaliteta razvijenih QSAR modela (povećavaju se  $R^2$ ,  $Q^2_{LOO}$  i  $Q^2_{LMO}$ , a smanjuje vrijednost  $s$ ; tablica 4, slika 20). Samim time, kao najboljim pokazao se model sa 7

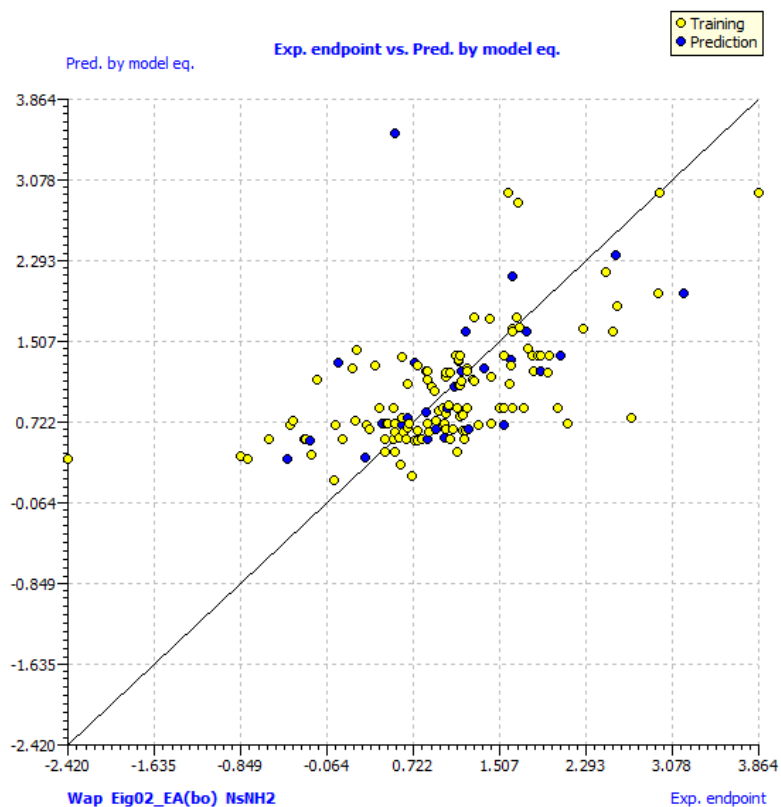
deskriptora, kod kojeg se 67,4 % varijacije podataka može pripisati samom modelu. Također, ovu tvrdnju potvrđuje i vrijednost faktora  $F$  koja govori o značajnosti odabranih deskriptora za opis varijabilnosti zavisne varijable, a što je u ovom slučaju toksičnost. Model sa 7 deskriptora ima najveću vrijednost faktora  $F$ .

U tablici 5 navedeni su kratki opisi za sve deskriptore odabrane za izradu 3-7 varijabilnih QSAR modele. Detaljan opis deskriptora može se pronaći u literaturi [43], a deskriptori iz najboljeg, 7-varijabilnog modela, biti će detaljnije objašnjeni tijekom daljnje rasprave.

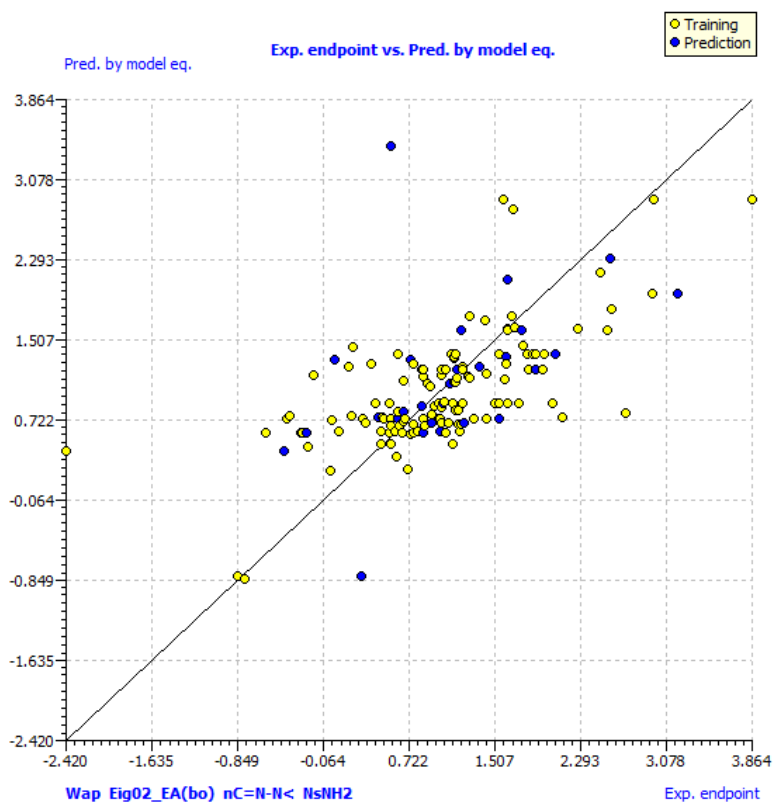
**Tablica 5.** Naziv i opis deskriptora odabranih u izradi 3-7varijabilnih QSAR modela.

Naziv deskriptora	Definicija deskriptora	Vrsta deskriptora
CATS2D_07_LL	Lipofilnost-lipofilnost na udaljenosti 07	CATS2D
CATS2D_00_DD	Donor-donor na udaljenosti 00	CATS2D
CATS2D_04_AN	Negativan akceptor na udaljenosti 04	CATS2D
Eig02_EA(bo)	Svojstvena vrijednost 2. reda iz matrice susjedstva dobivena iz reda veze	Deskriptori povezanosti ruba
Eig02_AEA(bo)	Svojstvena vrijednost 2. reda iz matrice povezanosti dobivena iz reda veze	Deskriptori povezanosti ruba
nC=N-N<	Broj hidrazona	Funkcionalne grupe
nCL	Broj atoma klora	Konstitucijski deskriptori
NsNH2	broj atoma za sve NH2 grupe s jednostrukom vezom te grupe	Vrsta atoma E-stanja
nX	Broj halogenih atoma	Konstitucijski deskriptori
SM12_AEA(ri)	Spektralni moment 12.reda iz proširene matrice povezanosti dobiven iz rezonancijskog integrala	Deskriptori povezanosti ruba
TI2_L	Drugi Moharov indeks iz Laplaceove matrice	Deskriptori na temelju 2D matrica
Wap	Sve duljine (engl. all-path) Wienerovog indeksa	Topološki deskriptori

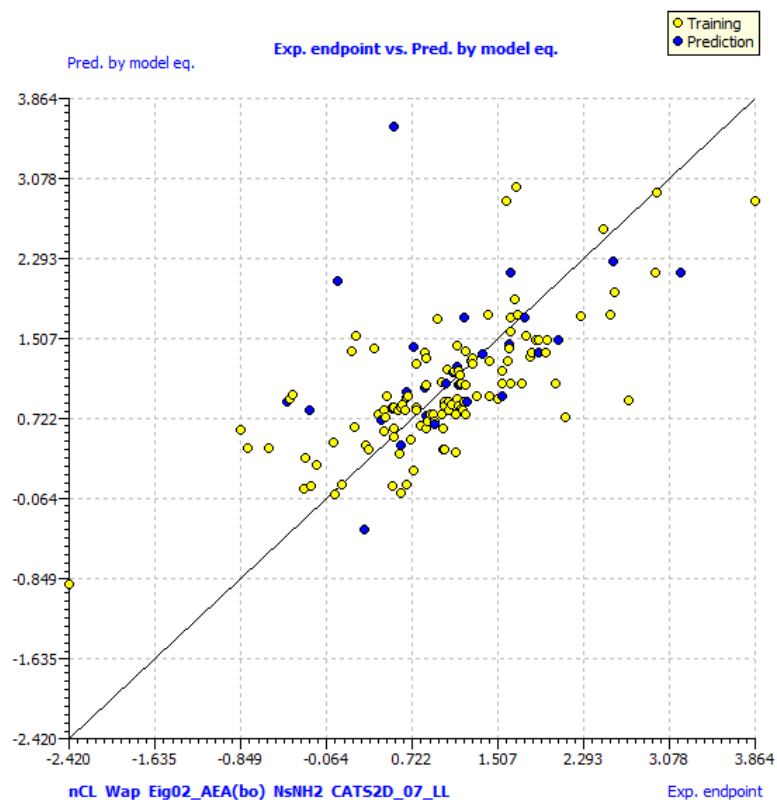
Valjanost odabranih modela provjerena je unutarnjim validacijama LOO i LMO te *Y-scramble* metodom. Grafički prikazi usporedbe predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti toksičnosti ( $\log EC_{50}$ ) za svih razvijenih 5 QSAR modela dani su na slikama 21-25.



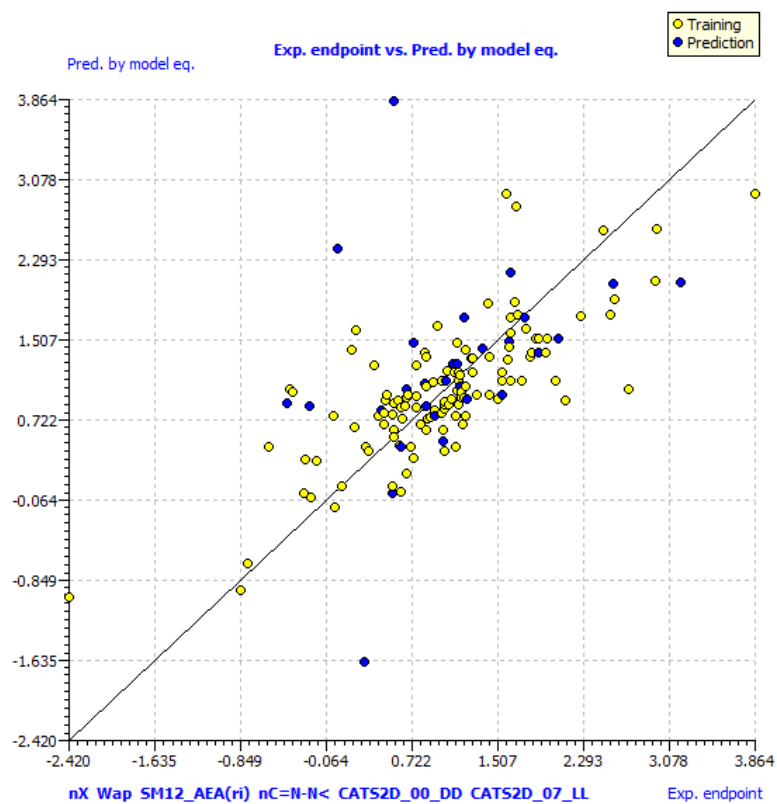
Slika 21. Eksperimentalne vs. predviđene vrijednosti  $\log(EC_{50})$  za 3-varijabilni QSAR.



Slika 22. Eksperimentalne vs. predviđene vrijednosti  $\log(EC_{50})$  za 4-varijabilni QSAR.

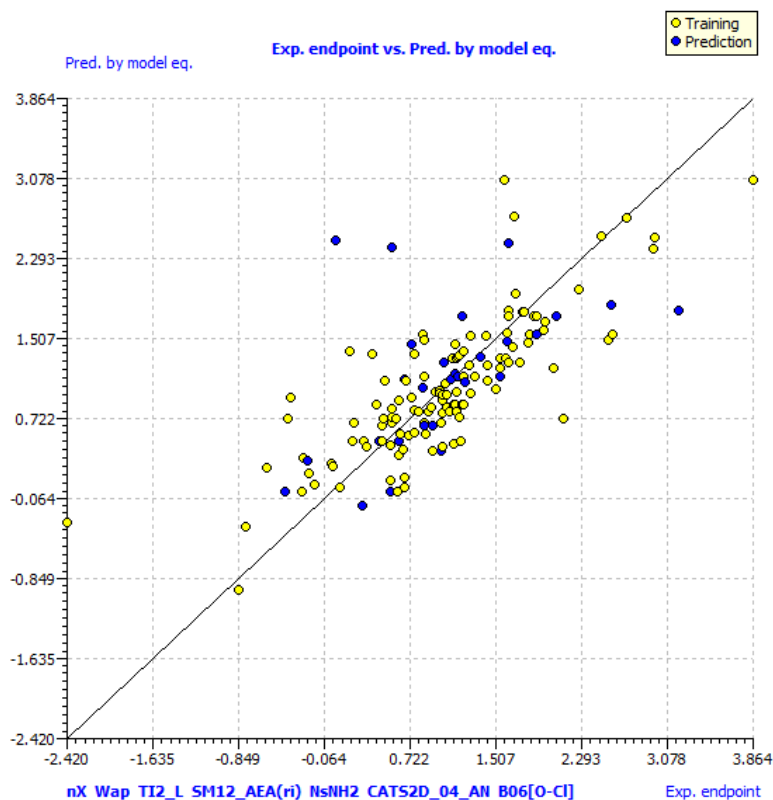


Slika 23. Eksperimentalne vs. predviđene vrijednosti  $\log(EC_{50})$  za 5-varijabilni QSAR.



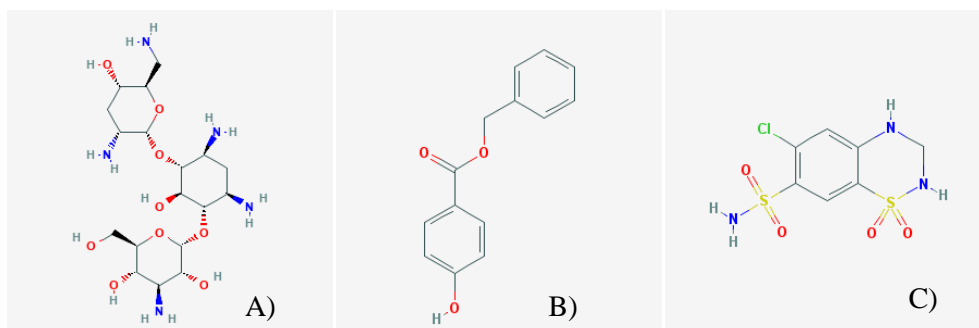
Slika 24. Eksperimentalne vs. predviđene vrijednosti  $\log(EC_{50})$  za 6-varijabilni QSAR.





**Slika 25.** Eksperimentalne vs. predviđene vrijednosti  $\log(EC_{50})$  za 7- varijabilni QSAR.

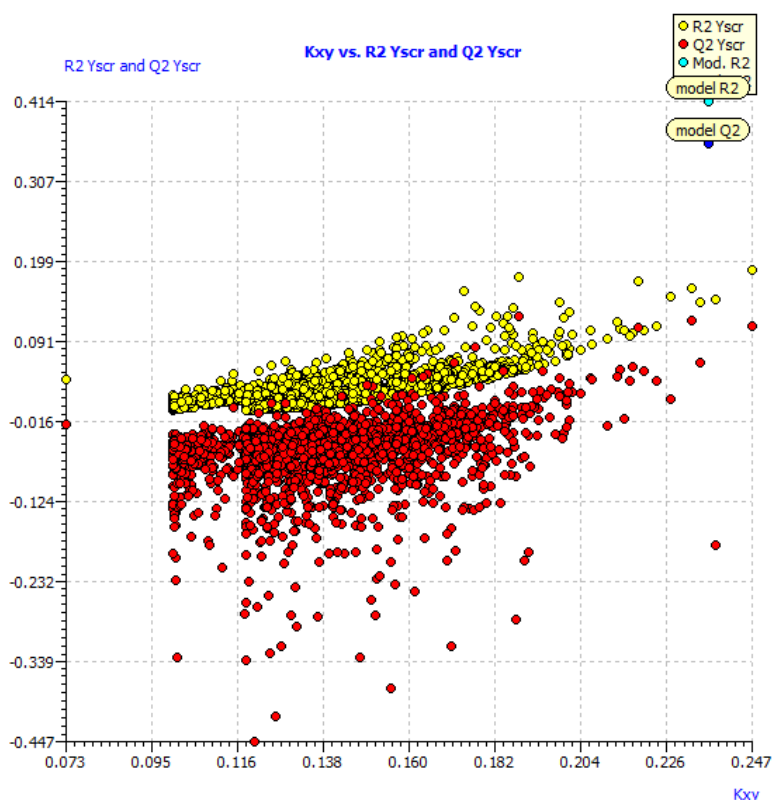
Svi modeli pokazuju određeno odstupanje predviđenih od eksperimentalnih vrijednost, ali generalno prate trend vladanja podataka (raspršenost oko pravca  $y=x$ ). Sukladno prethodnim zaključcima vidljivo je najbolje podudaranje eksperimentalnih i predviđenih vrijednosti kod 7-varijabilnog modela. Promatrajući vanjski set podataka, gotovo svi modeli, pa osobito 7-varijabilni, nude znatnija odstupanja kod predviđanja toksičnosti za benzil-paraben, tobramicin i hidrokloriazid.



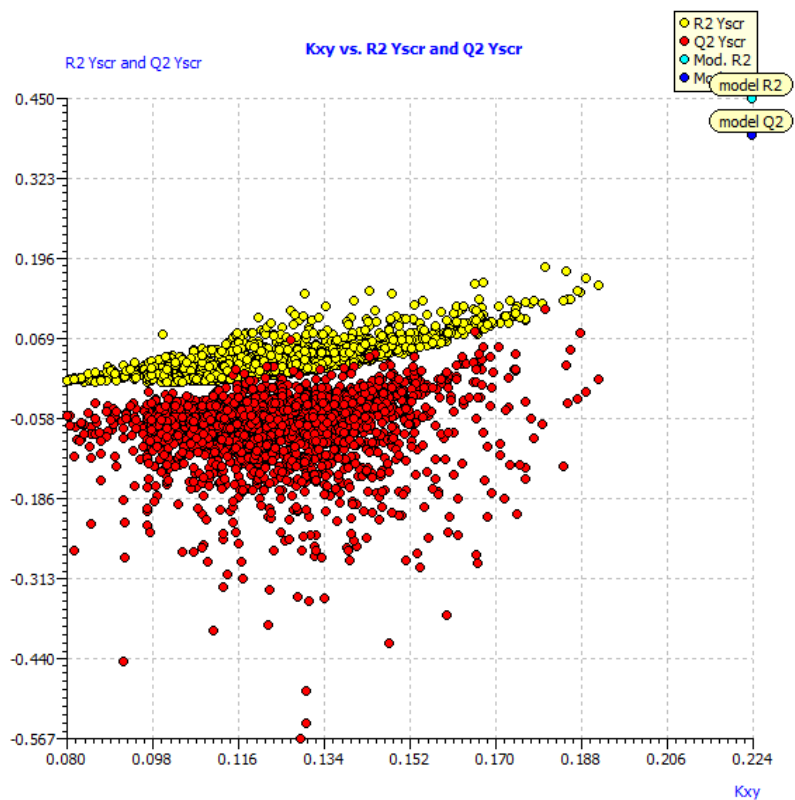
**Slika 26.** Molekulske strukture: A) tobramicina, B) benzil-parabena i C) hidrokloriazida.

Iako su ova tri spoja strukturno podosta različiti (slika 26), 7 varijabilni QSAR za njih predviđa slične vrijednosti toksičnosti. Naravno, QSAR model nije 100% točan i neminovno je da u određenim situacijama generira pogrešku. Štoviše, možemo vidjeti iz vrijednosti koeficijenta determinacije da čak 36,3% varijance ne proizlazi iz modela ( $R^2 = 0,637$ ), što je izgledno i uzrok ove anomalije.

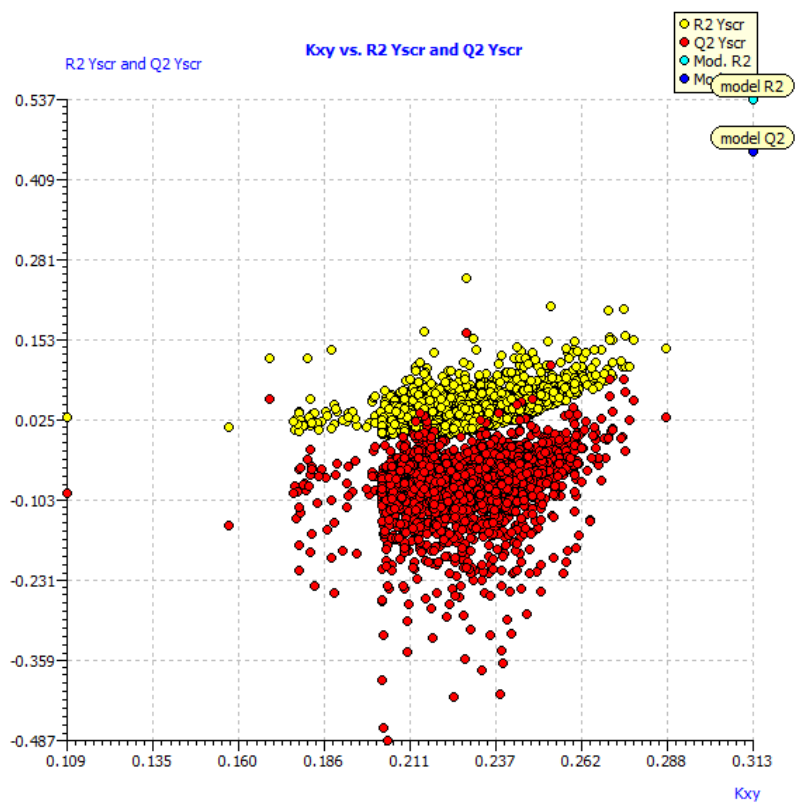
Kako bi se pokazalo da model ipak nije rezultat slučajne korelacije, može se primijeniti test *Y-scramble* test. *Y-scramble* grafovi prikazani su na slikama 27-31.



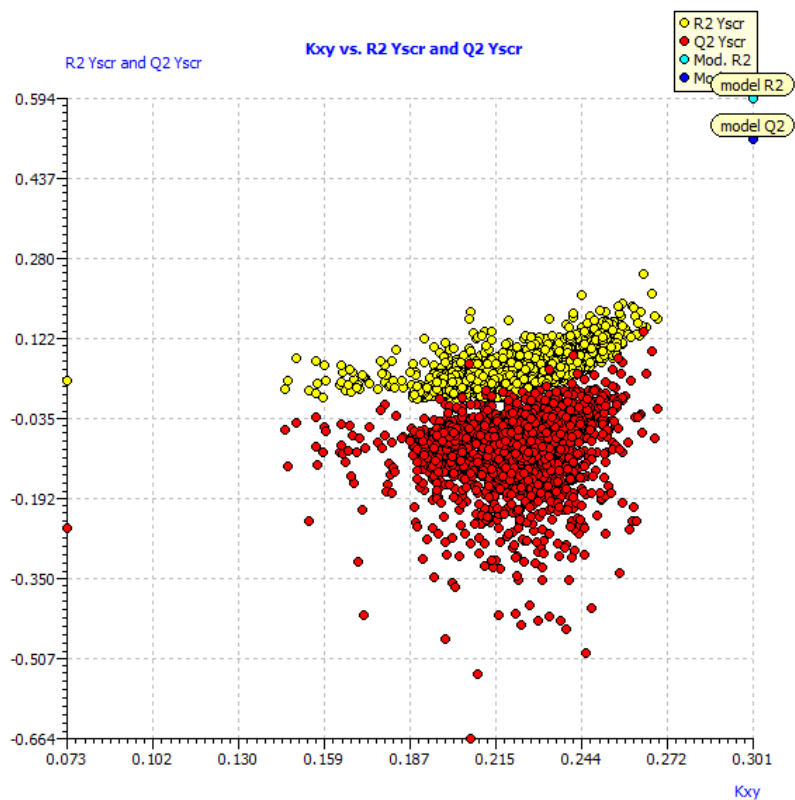
**Slika 27.** Usporedba *Y-scrambled* modela s 3-varijabilnim QSAR modelom.



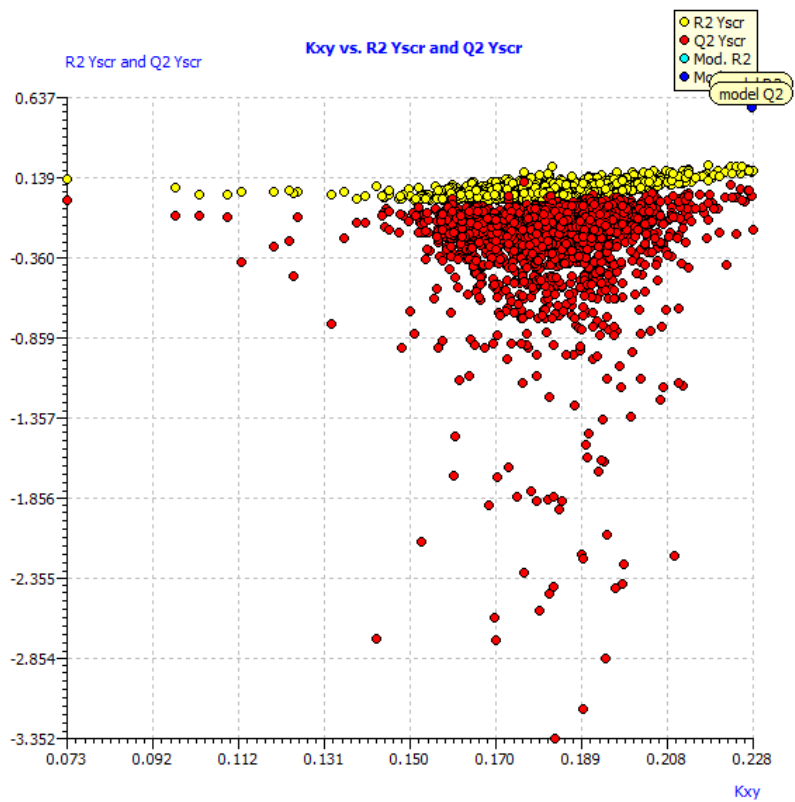
Slika 28. Usporedba *Y-scrambled* modela s 4-varijabilnim QSAR modelom.



Slika 29. Usporedba *Y-scrambled* modela s 5-varijabilnim QSAR modelom.



**Slika 30.** Usporedba *Y-scrambled* modela s 6-varijabilnim QSAR modelom.



**Slika 31.** Usporedba *Y-scrambled* modela s 7-varijabilnim QSAR modelom.

I ovdje se jasno vidi kako 7-varijabilni model ima najbolje karakteristike, tj.  $R^2_{Yscr}$  i  $Q^2_{Yscr}$  najbliži su  $R^2$  i  $Q^2_{LOO}$  vrijednostima modela. *Y-scramble* se provodi kako bi se osigurala robusnost QSAR modela, u ovom slučaju, validacija se provodi zamjenom vrijednosti Y, dok X vrijednosti ostaju nepromijenjene. S obzirom na grafičke prikaze, promijenjeni, nenamjerni parametri za 7-varijabilni model osigurali su najbolju robusnost što je vidljivo prema  $R^2_{Yscr}$  i  $Q^2_{Yscr}$  čije vrijednosti najmanje odstupaju jedna od drugih za razliku od ostalih modela.

U tablici 5 dana je lista deskriptora korištenih u QSAR modelima. Kao što je prethodno rečeno, ovdje ću se zadržati na deskriptorima koji su sastavni dio najboljeg QSAR modela, onog 7-varijabilnog.

Prvi deskriptor, nX, pripada skupini konstitucijskih deskriptora, najjednostavnijih i najčešće korištenih deskriptora koji prikazuju atomski sastav molekule (neovisan o molekularnoj geometriji te povezanosti atoma). [42] Konkretno nX označava broj halogenih atoma, što ukazuje na njihovu bitnu ulogu u toksičnosti. Halogeni atomi su jako elektronegativni, odnosno imaju tendenciju da privlače elektrone na sebe, pa zbog svoje reaktivnosti mogu biti jako toksični. Literaturno je dokazano da svi spojevi koji sadrže halogene elemente, pokazuju veću toksičnost u odnosu na ostale, a to je vidljivo i iz dobivenog QSAR modela. Sljedeći deskriptor, selektiran značajnim i uvršten u QSAR model jest Wap deskriptor. Ovaj deskriptor pripada topološkim deskriptorima i povezan je s topološkom udaljenošću dvaju atoma u molekuli. [43] Prema Wieneru [44], topološka udaljenost između dva atoma u molekuli jednaka je najmanjem broju veza između njih. Wienerov indeks ima veće vrijednosti za linearne molekule, a manje za one koje su razgranate ili ciklične. Wienerov indeks ne uvažava razlike u vrstama atoma tj. ne razlikuje C i H atome od heteroatoma, već je za njegov izračun, isključivo bitan broj veza u molekuli. Promatrajući dobiveni QSAR model vidljivo je kako negativnije vrijednosti Wap deskriptora doprinose toksičnosti (jedn 10). TI\_2L pripada deskriptorima vezanim uz dvodimenzionalni prikaz molekule: s matematičkog aspekta to je drugi Mohar-ov indeks Laplaceove matrice. Računa se kao inverzija najmanje vrijednosti Laplaceove matrice koja je određena brojem atoma u molekuli s izuzimanjem vodikovih atoma. [45]. TI2\_L može utjecati na topljivost, te je osjetljiv na veličinu, oblik, simetriju, grananje i cikličnost. [46]. S obzirom na negativnu vrijednost QSAR koeficijenta uz ovaj deskriptor, očito je kako na smanjenje toksičnosti utječu pozitivnije TI2\_L vrijednosti. SM12\_AEA(ri) pripada deskriptorima povezanosti ruba (engl. *Edge adjacency descriptors*). Prema dostupnim literaturnim izvorima, ovaj deskriptor

opisuje spektralni moment 12. reda iz proširene matrice povezanosti dobiven iz rezonancijskog integrala. Spektralni moment iz matrice povezanosti opisan je u smislu strukturnih fragmenata kao linearna kombinacija tih fragmenata molekule pri čemu se dobiva model koji opisuje biološka ili fizikalna svojstva kao funkcija za izračunavanje spektralnog momenta [47]. U ovom slučaju, spektralni moment je povezan s  $\pi$ - $\pi^*$  prijelazom elektrona, dakle karakterističan je za molekule s višestrukim ili aromatskim vezama. Sukladno izračunatom koeficijentu modela negativnije vrijednosti ovog deskriptora doprinose toksičnosti.  $N_sNH_2$  pripada skupini deskriptora E-stanja, odnosno elektrotopološkim deskriptorima koji uključuju i elektronska i topološka svojstva molekula. Elektronski faktor broji elektrone koji ne pripadaju  $\sigma$  orbitalama ( $\pi$  elektrone i slobodne elektronske parove). U izrazu  $N_sNH_2$ , N odgovara broju atoma E-stanja za sve  $-NH_2$  grupe, a s označava jednostruku vezu te grupe. [48] Vidljivo je kako spojevi koji imaju  $-NH_2$  skupinu u para položaju imaju veću toksičnost od onih u orto položaju. Negativnije vrijednosti indeksa koeficijenta deskriptora doprinose većoj toksičnosti.  $CATS2D\_04\_AN$  pripada CATS 2D deskriptorima, deskriptori koji uključuju brojanje udaljenosti atomskih parova. Udaljenost je izražena brojem veza najkraće udaljenosti koja povezuje dva atomska para u molekuli. [49] Prema dobivenoj pozitivnoj vrijednosti odgovarajućeg koeficijenta modela može se utvrditi kako negativnije vrijednosti deskriptora doprinose toksičnosti.  $B06[O-Cl]$  pripada deskriptorima koji broje parove atoma. [50] Konkretno, ovaj deskriptor označuje prisutnost/odsutnost O-Cl na topološkoj udaljenosti 6 te broji sve O-Cl veze. Kao i u prethodnom slučaju, manji broj O-Cl veza doprinijeti će većoj toksičnosti. Ovaj deskriptor čini se podudarnim s deskriptorom  $nX$  koji je povezivao toksičnost s prisutnošću halogenida, no njegovo djelovanje je suprotno, što govori u prilog činjenici da halogeni elementi imaju manji toksični efekt kada su vezani na kisikov atom.

## 6. ZAKLJUČAK

QSAR modeli koji predviđaju toksičnost različitih farmaceutika u vodi, izrađeni su prema eksperimentalnim podacima ispitivanih farmaceutika te literaturno pretraženih vrijednosti toksičnost.

U istraživanju testirane su prediktivne sposobnosti modela s različitim brojem deskriptora te je utvrđeno kako povećanje broja deskriptore doprinosi kvaliteti predviđanja modela.

Kao najbolji pokazao se model s 7 deskriptora. Iako vrijednosti koeficijenta korelacije MLR regresije i  $Q^2$  koeficijenta unakrsne validacije nisu iznimno visoke, pokazale su dostatno visok utjecaj razvijenog QSAR modela na varijabilnost predviđenih podataka toksičnosti.

Ovakav model, iako ne 100% pouzdano, može u određenoj mjeri poslužiti za predviđanje toksičnosti molekulskim strukturama sličnih spojeva, ali može pomoći i u razumijevanju strukturnih efekata koji utječu na toksičnost. Primjerice, kako su pri razvoju QSAR modela korištene normirane vrijednosti deskriptora, iznos koeficijenta ukazuje na deskriptor s najvažnijim utjecajem na toksičnost. U ovom slučaju to je deskriptor SM12\_AEA(ri) koji predstavlja  $\pi$ - $\pi^*$  prijelaze elektrona, tj. ukazuje na aromatske molekule i općenito molekule s višestrukim vezama.

Izgledno je da bi dodatno povećanje broja deskriptora u QSAR modelima unijelo dodatne značajne informacije i podiglo prediktivnu moć modela. Međutim, u tom slučaju, mora se paziti da ne dođe do pretreniranost modela uslijed velikog broja koeficijenata koje je regresijom potrebno odrediti.

## 7. LITERATURA

1. D. Mackay, J. Hubbarde, E. Webster, The role of QSARs and fate models in chemical hazard and risk assessment, *QSAR Comb. Sci.* **22** (2003) 106–112.
2. European Union (EU), White paper on the Strategy for a Future Chemicals Policy. Commission of the European Committees, Brussels, Belgija, 2001
3. European Commission, Directive 2006/121/EC of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 amending Council Directive 67/548/EEC on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances in order to adapt it to Regulation (EC) No 1907/2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) and establishing a European Chemicals Agency, *Off. J. Eur. Union* **L 396/850** (2006).
4. I. Lessigiarska, A.P. Worth, T.I. Netzeva, J.C. Dearden, M.T.D. Cronin, Quantitative structure–activity–activity and quantitative structure–activity investigations of human and rodent toxicity, *Chemosphere* **65** (2006) 1878–1887.
5. L.G. Valerio Jr., K.B. Arvidson, R.F. Chanderbhan, J.F. Contrera, Prediction of rodent carcinogenic potential of naturally occurring chemicals in the human diet using high-throughput QSAR predictive modelling, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **222** (2007) 1–16.
6. A.P. Worth, A. Bassan, J. DeBruijn, A. Gallegos-Saliner, G. Netzeva, G. Patlewicz, M. Pavan, I. Tsakovska, S. Eisenreich, The role of the European chemicals bureau in promoting the regulatory use of (Q)SAR methods, *SAR QSAR Environ. Res.* **18** (2007) 111–125.
7. V.E. Kuz'min, E.N. Muratov, A.G. Artemenko, L. Gorb, M. Qasim, J. Leszczynski, The effect of nitroaromatics' composition on their toxicity in vivo: novel, efficient non-additive 1D QSAR analysis, *Chemosphere* **72** (2008) 1373–1380.
8. R. Krieger, Handbook of Pesticide Toxicology, 2.izd., Academic Press, San Diego, CA, SAD, 2001.
9. V. Aruoja, M. Sihtmäe, H. C. Dubourguier, A. Kahru, Toxicity of 58 substituted anilines and phenols to algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and bacteria *Vibrio fischeri*: Comparison with published data and QSARs, *Chemosphere* **84** (2011) 1310–1320.
10. M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, HINUS & Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.



11. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, Hrvatske vode **24** (2016) 119–136.
12. K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the Environment, *Annu. Rev. Environ. Resour.* **35** (2010) 57–75.
13. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem.Ind.* **65** (9-10) (2016) 417–482.
14. A. Cesaro, V. Naddeo, V. Belgiorno, Wastewater Treatment by Combination of Advanced Oxidation Processes and Conventional Biological Systems, *J. Bioremediat. Biodegrad.* **4** (2013) 4–8.
15. S. Semrany, L. Favier, H. Djelal, S. Taha, A. Amrane, Bioaugmentation: Possible solution in the treatment of Bio-Refractory Organic Compounds (Bio-ROCs), *Biochem. Eng. J.* **69** (2012) 75–86.
16. M. Mintas, S. Raić-Malić, Medicinska kemija, Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
17. C. Avendano, J.C. Menendez, Medicinal chemistry of anticancer drugs, Elsevier, Amsterdam, 2008.
18. <https://www.medicalnewstoday.com/kc/antidepressants-work-248320> (pristup 15. svibnja 2018.)
19. I. Mikolašević, L. Orlić, V. Mavrinac, D. Štimac, D. Ostojić, V. Rački, Ivan Jakopčić, F. Carović, M. Prskalo, S. Milić, Sigurnost dugotrajne primjene inhibitora protonske pumpe, *Medicina Fluminensis* **52** (2016) 148–156.
20. S.K. Behera, H.W. Kim, J.E. Oh, H.S. Park, H. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea, *Sci. Total Environ.* **409** (2011) 4351–4360.
21. A.M. Deegan, B. Shaik, K. Nolan, K. Urell, M. Oelgemöller, J. Tobin, A. Morrissey, Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *Environ. Sci. Technol.* **8** (3)(2011) 649–666.
22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound> (pristup 20. svibnja 2018.)
23. <https://www.drugs.com/> (pristup 20. svibnja 2018.)
24. S. Parvez, S. Venkataraman, S. Mukherji, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environ Int* (2006) 265–268
25. <http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8363> (pristup 25. svibnja 2018.)

26. M. Devare, M. Bahadir, Biological monitoring of landfill leachate using plants and luminiscent bacteria, *Chemosphere* **28** (2) (1994) 261–271.
27. K.M. Gough, K. Belohorcova, K.L.E. Kaiser, Quantitive structure activity relationship (QSARs) of *Photobacterium phosphoreum* toxicity of nitrobenzene derivates, *Sci. Total Environ.* **42** (1994) 179–190.
28. A. Cherkasov, E.N. Muratov, D. Fourches, A. Varnek, I.I. Baskin, M. Cronin, J. Dearden, P.G.Yvonne, C. Martin, R. Todeschini, V. Consonni, V.E. Kuz'min, R. Cramer, R. Benigni, C. Yang, J. Rathman, L. Terfloth, J. Gasteiger, A. Richard, A. Tropsha, QSAR modeling: Where have you been? Where are you going to? *J. Med. Chem.* **57** (2014) 4977–5010.
29. C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Delivery Rev.* **46** (2001) 3–26.
30. C.L. Russom, S.P. Bradbury, A.R. Carlson, Use of Knowledge bases and QSARS to estimate the relative ecological risk of agrichemicals problem formulation exercise, *SAR QSAR Environ. Res.* **4**(1995) 83–95.
31. C. Acharya, A. Coop, E.J. Polli, A.D. MacKerell, Recent Advances in Ligand-Based Drug Design: Relevance and Utility of the Conformationally Sampled Pharmacophore Approach. *Curr. Comput. Aided Drug.Des.* **7** (2011) 10–22.
32. K.A.U. Danishuddin, Descriptors and their selection methods in QSAR analysis: paradigm for drug design, *Drug Dev. Res.* **21**(2016) 1291–1302.
33. <http://www.rm1.sparkle.pro.br/> (pristup 30.svibnja 2018.)
34. M.A.M. Filho, J.D.L. Dutra, G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, Sparkle/RM1 parameters for the semiempirical quantum chemical calculation of lanthanide complexes, *RSC Adv.* **37**(2013)16747–16755
35. G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, J.J.P. Stewart, RM1: A Reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, *J Comput Chem.* **27** (2006) 1101–1111.
36. P. Gramatica, *QSAR Comb. Sci.* **26** (2007) 694–701.
37. K.V. Agrawal, P.V. Khadikar, QSAR Study on Narcotic Mechanism of Action and Toxicity: a Molecular Connectivity Approach to *Vibrio fischeri* Toxicity Testing, *Bioorg. Med. Chem.* **10** (2002) 3517–3522.

38. R. Altenburger, T. Backhaus, W. Boedeker, M. Faust, M. Scholze, L.H. Grimme, Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* **19** (2000) 2341–2347.
39. M. Terasaki, M. Makino, N. Tatarazako, Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays, *J. Appl. Toxicol* **29** (2009) 242–247.
40. M. Vighi, S. Migliorati, G. S. Monti, Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). I: QSAR equation for narcotics and polar narcotics, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72** (2009) 154–161.
41. Y.H. Zhao, G.D. Ji, M.T.D. Cronin, J.C. Dearden, QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp, *Sci. Total Environ.* **216** (1998) 205–215.
42. [http://www.talete.mi.it/help/dproperties\\_help/index.html?constitutional\\_descriptors.htm](http://www.talete.mi.it/help/dproperties_help/index.html?constitutional_descriptors.htm) (pristup 19.lipnja 2018.)
43. [http://www.talete.mi.it/products/dragon\\_description.htm](http://www.talete.mi.it/products/dragon_description.htm) (pristup 5.srpnja 2017.)
44. Y. N. Yeh, S.L. Lee, Y.L. Luo, Some recent results in the theory of the Wiener number. *J. Chem. Educ. Gutman.* **69** (1992) 701–712
45. K. Mansouri, T. Ringsted, D. Ballabio, R. Todeschini, V. Consonni, Quantitative Structure–Activity Relationship Models for Ready Biodegradability of Chemicals, *J. Chem. Inf. Model* **53 (04)** 2013 867–878.
46. S. Sadeghian-Rizi, A. Sakhteman, F. Hassanzadeh, A quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of some diaryl urea derivatives of B-RAF inhibitors, *Res. Pharma. Sci.* **11** (2016) 445–453.
47. E. Estrada, Spectral Moments of the Edge Adjacency Matrix in Molecular Graphs. 3. Molecules Containing Cycles, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38** (1998), 23–27.
48. J. Huuskonen, Estimation of water solubility from atom-type electrotopological state indices, *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (2001) 491–497.
49. <https://books.google.hr/books?id=dtScBAAAQBAJ&pg=PA145&lpg=PA145&dq=descriptor%20CATS%20acceptor%20negative&source=bl&ots=DNLrWvLvc0&sig=5QThASoXly5WQFssTpnwSWVc7A&hl=hr&sa=X&ved=0ahUKEwjn397p4u7bAhVGkSwKHZvvDB8Q6AEIRzAF#v=onepage&q=descriptor%20CATS%20acceptor%20negative&f=false> (pristup 22.lipnja 2018.)

50. M. Kuroda, A novel descriptor based on atom-pair properties, *J. Cheminform.* **9** (2017) 2366–2386

# ŽIVOTOPIS

Lana Barić [REDACTED] Pohađala je Srednju školu Krapina, smjer jezična gimnazija, od 2008. do 2012. godine. Nakon završene srednje škole odlazi u Zagreb gdje upisuje Preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Tijekom studija odradila je praksu u tvornici stakla Vetropack Straža d.d. Hum na Sutli. Zvanje sveučilišne prvostupnice primijenjene kemija dobila je u rujnu 2016. godine, obranivši završni rad pod naslovom „Primjena višedimenzionalne kromatografije u analizi okoliša“ pod mentorstvom izv. prof.dr.sc. Šime Ukića. Iste godine, upisuje diplomski studij, smjer Primijenjena organska kemija na matičnom fakultetu.