

**ALTERNATIVNÍ METODY ODHADU TOXICITY
IN SILICO (nikoliv *in vitro* – samostatná oblast)
Hotel Populus, Praha, 30. září – 2. října 2008**

Úvod

Alternativní metody odhadu výpočtem – *in silico*

QSAR, QAAR, PBKSM

QSAR – adept na metody použitelné i pro legislativu

jejich validace a tvorba, ukázky užití

metoda READ ACROSS

legislativa programů chemické bezpečnosti

PROČ METODY ODHADU TOXICITY VÝPOČTEM – *IN SILICO*?

DNES: Důsledek programů a legislativy je tlak na hledání vhodných metod

- 1. pro nalezení indexů toxicity i jiných biologických účinků chemických látek a jejich fyzikálně chemických vlastností nutných při distribuci látek**
- 2. omezení až zrušení pokusů na obratlovcích (3R Russella a Burche)**
- 3. jen takové, jejichž výsledky jsou stejně informačně kvalitní jako pomocí klasických metod na zvířatech – alternativní metody, predikční modely.**

JIŽ DŘÍVE: nalézt způsob, jak se rychle dozvědět o vlastnostech nových látek, které ohrožují zdraví lidí.

Alternativní metody jsou takové, které jsou schopny poskytovat stejnou úroveň informací jako pokusy používající zvířata nebo lepší a které potřebují méně zvířat nebo raději žádná.

***In vitro* a *in silico* - na tkáních a nižších organismech a výpočtem, dnes tedy na počítačích. Každé mají svá specifická pravidla, charakter i „testovací“ objekty.**

ORGANIZUJE

dříve ECVAM – European Centre for Validation of Alternative Method, Joint Research Centre + European Chemical Bureau, European Committee, Ispra, Itálie a různé národní organizace a pracoviště (EPA US, EPA Denmark,...).

Dnes součástí IHCP – Institute for Health and Consumer Protection jako

součást JRC:

- chemické látky, REACH a biocidy**
- alternativní metody testování toxicity**
- kvalita potravinových produktů**
- GMO v potravinách**
- zdraví a nanotechnologie.**

Expertní skupina pro validaci modelů (Q)SAR pro legislativní účely při OECD (a ECVAM, ECB) – pracuje asi od 2004: principy validace modelů (Q)SAR, vytvořit pravidla a systém pro tvorbu validovaných QSAR modelů (QSAR Tool Box), vytvořit datovou bází validovaných modelů QSAR, apod.

Literatura, zdroje:

ATLA: Altern. Lab. Anim. (1,2)

Environ. Toxicol. Chem. (2,3)

Toxicology in vitro (2,2)

dokumenty IHCP/ECVAM – většinou publikované též v ATLA

kongresy Alternative methods of toxicity testing (15. kongres 19.-

21.zář 2008 v Linci, Rakousko

3. v Bologna 1999 – deklarace o 3R)

**pouze in silico: QSAR and Combined Sciences (QSAR and
Molecular Graphics, QSAR Journal)**

SAR and QSAR in Environmental Research

konference a symposia:

European QSAR Symposia (and Drug Design)

QSAR in (USA a Kanada)

Gordon QSAR Conferences

různé národní a „územní“ (asian, ...)

**ADME konference (Absorption, Distribution,
Metabolism, Excretion)**

a jiné.

Druhy modelů pro odhad toxicity výpočtem – *in silico*:

- **QSAR** z angl. Quantitative Structure – Activity Relationships, kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností
- **QAAR** z angl. Quantitative Activity – Activity Relationships, vlastně extrapolace mezi účinnostmi testovanými na různých testovacích objektech
- **expertní systémy**, pracující se souborem znalostí, souborem pravidel a fragmentů, často kombinované s modely QSAR
- **fyziologické kinetické simulační modely** (PBKM, Physiologically-Based Kinetic Models)
 - modely biologické podobnosti
 - allometrické rovnice – pravidla hydromechaniky na kardiovaskulární systém a následně i na toxické účinky
- ale i: modely pomocí molekulové grafiky
 - součást umělé neuronové sítě (ANN)
 - součást modelů AI (Artificial Intelligence)

QSAR

Proč?

Nejlépe vyvinutá technika, umožňující vypracovat metodu pro získání adekvátních, použitelných výsledků.

Vyhovuje požadavkům na „alternativní“ metodu:

- výsledky kvalitou souměřitelné s výsledky klasických metod**
- možnost validace**
- vysoká kapacita a slušná reprodukovatelnost**
- dostatečná robustnost**
- nahrazují používání obratlovců pro testování**
- možnost odhadnout i mechanismus účinku.**

**Ale: kvalita závislá na experimentálních údajích, na kterých je model/rovnice založena,
nesourodost experimentálních výsledků s výsledky modelu :
experimentální chyby
jiný mechanismus účinku (!)
toxické indexy látek ve směsi – zatím neumí.**

JAK?

Mechanismy účinku?

**Serie látek strukturně homogenní
 strukturně heterogenní**

sestrojí se tabulka pro jedno- nebo více parametrů (fyzikálně chemické vlastnosti)

$$- \log EC50 = k_1 \log P - k_2 \log V + k_3$$

Sloučenina	CAS	Biol. log EC50	Fyz.logP	Fyz. sterické V
Methanol	67-56-1	0,35	- 0,77	28,7
Ethanol	64-17-5	0,04	-0,31	56,3
n-Propanol	71-23-8	-0,48	Atd.	Atd.
Atd.				

Biologická účinnost – vždy v molární koncentraci

Účinnost v QSAR znamená vždy velikost účinku vyjádřenou:

číslem

ano – ne

vždy nějak kvantitativně

Termodynamický ustálený stav (angl. steady state

a = f.c

a – aktivita, c – koncentrace, f aktivitní koeficient

$$\ln a = (\Delta G - \Delta G^0) / RT$$

G Gibbsova volná energie, R plynová konstanta, T teplota v K

$$\mu_{\text{bio}} = \mu_{\text{ext}}$$

μ chemický potenciál

$$\mu = \mu^0 + RT \cdot \ln a$$

$$\mu = \mu^{\circ} + RT \cdot \ln a$$

**chemický potenciál látky v čistém stavu → fyz.chem.vlastnost
a aprox. poměr tlaku rozpouštědla nad jeho roztokem
ku tlaku nasycené páry rozpouštědla nebo koncentrace látky v
roztoku ku její rozpustnosti**

$$C_i = k \cdot X_i^m$$

C je koncentrace vyvolávající standardní účinnost (EC50)

X je vlastnost fyz. chem.

**k, m konstanty spojené se sledovaným účinkem a zkoumanou
serií látek**

$$\log C_i = m \cdot \log X_i + \log k$$

Fyzikálně chemické vlastnosti

Informace ve struktuře molekul - elektronových molekulových orbitálecha vazbách mezi atomy.

V zásadě tři skupiny vlastností: popisující hydrofobnost
 popisující reaktivitu
 popisující geometrii.
 Co se nevejde

Účinnost je určena kritickým procesem, jehož rovnovážná konstanta souvisí se změnou Gibbsovy energie



$$K = [SR]/([S].[R])$$

$$\Delta G = -2,303 RT. \log K$$

$$\Delta G_{\text{tot}} = \Delta G_{\text{hydrofob}} + \Delta g_{\text{elektr(polární)}} + \Delta G_{\text{geom}} + \Delta G_x$$

Hydrofobní vlastnosti: **log P (n-oktanol-voda, jiné)**
rozpustnost S
z chromatografických dat R_M
log K
Rekkerova subst. konstanta f
Hanschova subst. konstanta π

rozdělovací koeficienty vs. disociace molekul

Elektronové (polární) konstanty, reaktivita

Hammettova konstanta σ
různé konstanty σ (m, p, o, Taftova aj.)
dipolmoment
frekvence pásu substituentu v IR spektru
induktivní a rezonanční Swain-Lupton

Reaktivita (pokr.)

kvantově chemické indexy

elektronová hustota na atomu

E(HOMO)

E(LUMO)

indexy superdelokalizability

i další

Stérické konstanty:

Taftova sterická subst. konstanta E_s
 v (malé psací) Charton

MV molární objem

V objem molekuly

S plocha povrchu molekuly

MW relativní molekulová hmotnost

van der Waalsův poloměr subst.

STERIMOL konstanty

Skupina nezařazených:

topologické indexy (číslem vyjádřená topologie) χ^a

**molární refrakce (fce MW, indexu lomu, d)
parachor (fce 4. odmocniny povrchového napětí kapaliny, MW, hustota páry i kapaliny)**

„dummy“ parametr – indikátorová konstanta označující, že určitý parametr/fragment v molekule je nebo není – ano/ne

^a číslem je vyjádřena matice, která označuje čísla 1 a 0 vazbu nebo ne-vazbu mezi atomy molekuly (Hückel)

QSAR nejčastěji používaná zkratka
analýza QSAR = analýza dat o biologických, chemických,
fyzikálně-chemických atd. vlastnostech látek tělu cizích –
xenobiotik metodami matematické statistiky
model QSAR = matematická formule, rovnice i jejich systém i
balík programů operujících s analýzou QSAR
chemická struktura látek konstituce...vlastnosti, nejprve
fyzikálně chemické... kvantifikace - čísla
biologická účinnost –
 velikost biologického účinku...kvantifikace - čísla
kvantitativní vztahy = kvantitativní vyjádření vztahů mezi
změnami účinnosti a změnami fyzikálně chemických
vlastností matematickou rovnicí nebo formulí:
 $\Delta BA_i = f(\Delta X_i)$

Metody matematické statistiky:

regresní analýzy: jednparametrové

$$\log BA_i = k \log X_i + q$$

$$\log BA_i = \alpha\beta$$

 víceparametrové

Hanschova rovnice

různé parametry

$$\log BA_i = k_1 \log X_i + k_2 \log Y_i + k_3$$

rovnice z konstant *de novo* (Free-Wilson)

faktorová analýza – analýza hlavní komponenty

shluková analýza

metody rozpoznávání obrazců – angl. pattern recognition

strukturální analýza, technika nejbližšího

souseda, technika učícího se stroje, nelineárního mapování

neuronová umělá síť (ANN)

Metody analýzy QSAR slouží k nalezení této matematické funkce spolu se statistickým hodnocením shody experimentu s odhadem.

Nejznámější modely analýzy QSAR (vždy v molárních koncentracích)

Hanschova rovnice

$$\text{- log C} = k_1 \cdot \text{log P} + \rho \sigma + k_2$$

$$\text{- log C} = k_1 \cdot (\text{log P})^2 + k_2 \cdot \text{log P} + \rho \sigma + k_3$$

$$\text{- log C} = k_1 \cdot \pi^2 + k_2 \cdot \pi + k_3 \cdot \sigma + k_4 \cdot E_s + k_5$$

$$\pi_x = \text{log P}_{Mx} - \text{log P}_{MH}, \text{ P n-oktanol/voda}$$

$$\delta \text{ log C} / \delta \pi \text{ (nebo log P)}$$

Bilineární model (Kubinyi) – podobnost s adsorpční isothermou

Free – Wilsonův model – konstanty *de novo*

$$BA = \sum a_n + \mu \quad (n = 1, 2, 3, \dots)$$

počet fragmentů)

a_n jsou příspěvky n -tých fragmentů molekuly (substituentů) k biologické účinnosti BA, μ je příspěvek základní části molekuly, která strukturu nemění

Biologické rovnice typu Hammettovy rovnice reaktivity:

$$\log (\tau_i/\tau_{Et}) = \alpha\beta \quad (\text{Zahradník})$$

α konstanta závislá na měřené účinnosti, testovacím objektu a serii testovaných látek (analogie ρ)

β konstanty související pouze se substituentem (analogie σ).

Mezi β a π existuje korelace!

Principy pro tvorbu validovaných modelů QSAR podle OECD (upravené Setubalské principy):

- definovaný měřený účinek
- definovaný algoritmus vzniku modelu
- definovaná oblast použitelnosti
- vnitřní kontrola spolehlivosti modelu a hodnocení schopnosti předvídat
- mechanistická interpretace modelu (pokud je známa)

VYUŽITELNOST : pro účely toxikologie zejména

- pro odhad rizika expozice chemickým látkám (identifikace nebezpečnosti/hazardu, odhad expozice, odhad závislosti účinnosti na dávce/koncentraci, charakterizace populace)
- hledání optimální chemické struktury sloučeniny, aby měla minimální toxický účinek(ale maximální požadovaný)
- omezení až vyloučení potřeby zvířat k testování

Tvorba validovaných modelů QSAR i pro legislativní účely– komise expertů při OECD

Komerční predikční systémy:

PALLAS : HAZARDEXPERT SYSTEM (karcenogenita, mutagenita, dráždivost, teratogenita, neurotoxicita), METABOLEXP, logP (CompuDrug International, Inc.)

TOPKAT (TOxicity Prediction by Computer-Assisted Technology, Accelrys Inc., Cambridge, UK) Rodent Carcinogenicity, Ames Mutagenicity, Rat Oral LD50, Rat Chronic LOAEL, Developmental Toxicity Potential, Skin Sensitization, Fathead Minnow LC50, Daphnia Magna EC50, Weight of Evidence Rodent Carcinogenicity, Rat Maximum Tolerated Dose, Aerobic Biodegradability Eye Irritancy, Log P, Rabbit Skin Irritancy, Rat Inhalation Toxicity LC50 Rat Maximum Tolerated Dose

MultiCASE Expert System (MultiCASE Inc., Beachwood, Ohio, USA)

DEREK (UK)

STATISTIKA

Statistické testy významnosti modelů QSAR: r , n , SD , SR , T , F , ...

R^2 násobný korelační koeficient korelace mezi pozorovanými hodnotami a hodnotami odhadnutými výpočtem, koeficient determinace, kvalita shody (goodness of fit).

Křížová validace.

Leave-one-out

Leave-many-out

Leave-a series-out

Q^2 křížově validovaný R^2 , $Q^2Y > 0,9$ model je vynikající, $> 0,5$ velmi dobrý

STATISTIKA

Statistické testy významnosti modelů QSAR: r , n , SD , SR , T , F , ...

R^2 násobný korelační koeficient korelace mezi pozorovanými hodnotami a hodnotami odhadnutými výpočtem, koeficient determinace, kvalita shody (goodness of fit).

Křížová validace.

Leave-one-out

Leave-many-out

Leave-a series-out

Q^2 křížově validovaný R^2 , $Q^2Y > 0,9$ model je vynikající, $> 0,5$ velmi dobrý

- **Standardní odchylka výpočtu , Standard DEviation of Calculation**

$$\text{SDEC} = (\text{RSS}/n)^{1/2}$$

$$\text{RSS} = \sum(y_i - py_i)^2$$

- **Standard DEviation of Calculation**

standardní odchylka predikce Standard Deviation of Prediction

$$\text{SDEP} = (\text{PRESS}/n)^{1/2}$$

$$\text{PRESS} = \sum(y_i - py_{i/i})^2$$

- **Predictive Residual Sum of Squares**

y_i experimentální hodnota, py_i hodnoty odhadnuté pomocí korelační rovnice z celého souboru, $py_{i/i}$ odhadnuté z rovnic křížové validace

- **bez statistického hodnocení, rovnice jako by nabyly.**

QAAR quantitative activity – activity relationships
(kvantitativní vztahy mezi indexy biologických účinků,
měřených na různých druzích)

**1. různé – vztah mezi toxickými indexy a indexy
velikosti těla:**

$$\log Y = a + b \cdot \log (M/W^h)$$

Y míra přežití bource morušového po aplikaci dávky M
arseničnanu sodného larvám různé velikost W, h exponent
souvisící se stavem vývoje jednotlivých larev

$$\log c = \log a + b \cdot \log W$$

je vidět, že je to obecná forma vztahů mezi vlastnostmi
(allometrické rovnice, QSAR, QAAR,...?)

2. QSAR: $\log BA = f \log (\text{fyz.chem.})$

$$\log EC50 = f(\log P_{o/w}) \quad \text{z 80\% určitě}$$

$$\log EC50(1) = f_1(\log P_{o/w})$$

$$\log EC50(2) = f_2(\log P_{o/w})$$

$$A_1 = f_1(X) \quad A_2 = f_2(X) \quad A_1 = f_3(A_2)$$

**prokázáno u toxicit mezi vodními organismy
u savců korelace horší, ale je (vodní – savci)
možná vylepší vedle A_2 další parametr**

vše v molárních koncentracích

$$\log EC50(\text{Tubifex}) = -0,809 \log P - 0,495$$

n 82; r 0,931; RSD 0,315

$$\log IGC(\text{Tetrahymena}) = -0,86 \log P - 1,32$$

n 77; r 0,862; SD 0,54

$$\log IGC(\text{Tetrahymena}) = 1,092 \log EC50(\text{Tubifex}) - 0,723$$

n 81; r 0,924; RSD 0,162

$$\log LD50(\text{rat, or}) = 0,338 \log EC50(\text{Tubifex}) - 1,175$$

n 60; r 0,635; RSD 0,240

Tubifex tubifex nitěnky

Tetrahymena pyriformis prvoci

FYZIOLOGICKÉ KINETICKÉ SIMULAČNÍ MODELY

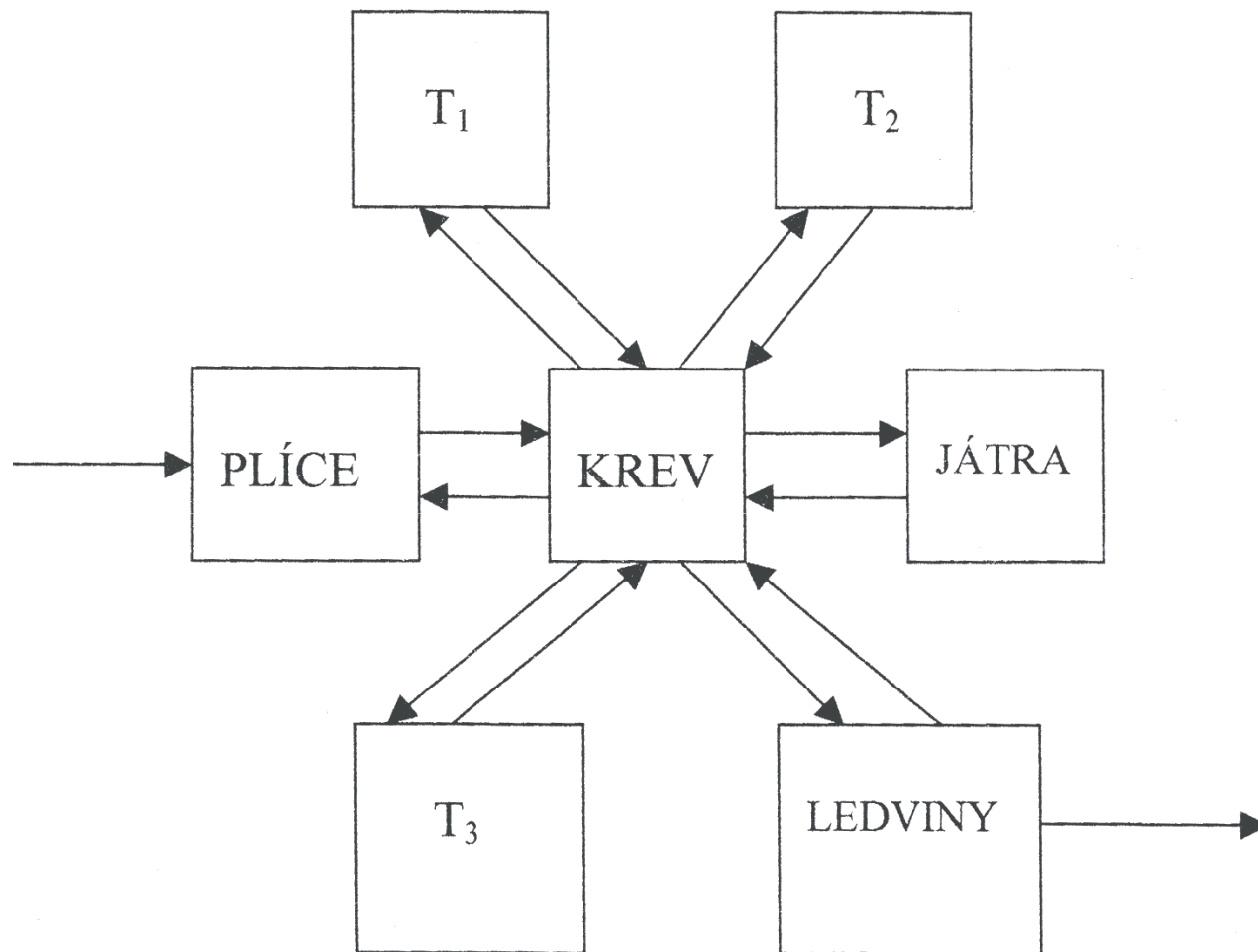
PBKM Physiologically-Based Kinetic Models

**Kompartmentové modely s fyziologickými parametry
rychlostních konstant (rychlost dýchání, ventilační
objemy, perfuze orgánů krví),
kopíruje hlavní rysy anatomického uspořádání
organismu(ů) (oddělení venosní a arteriální krve)**

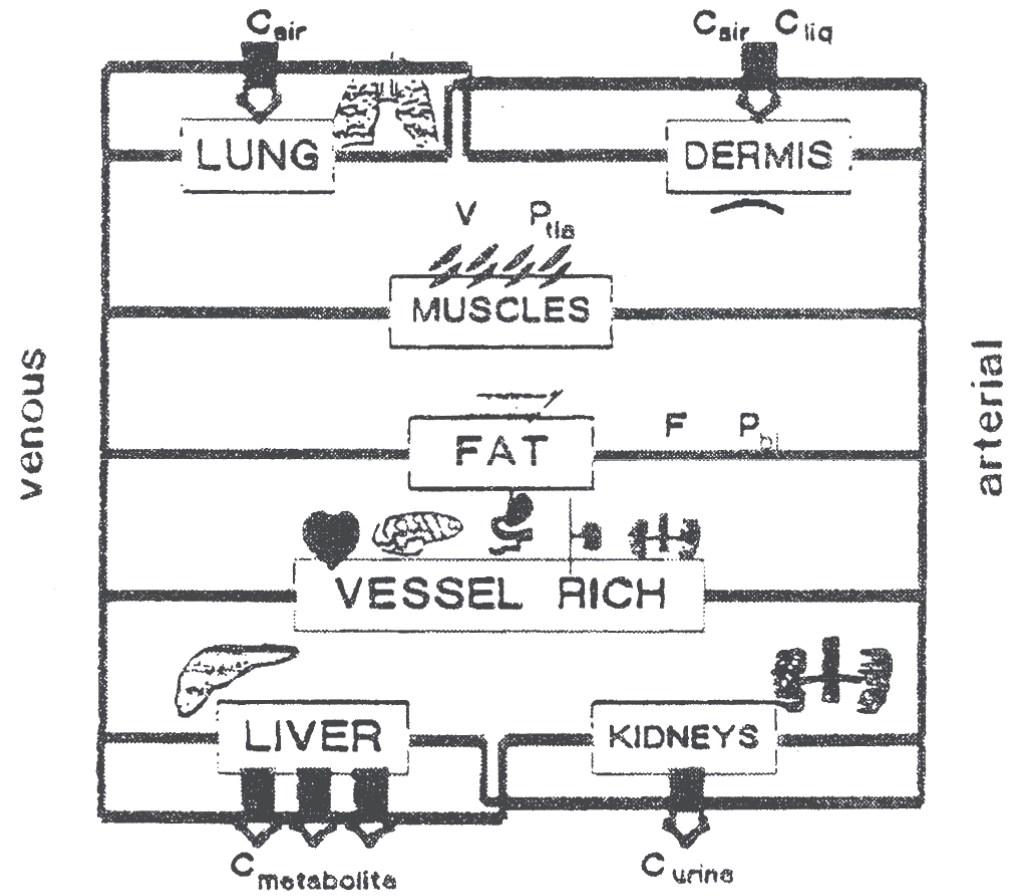
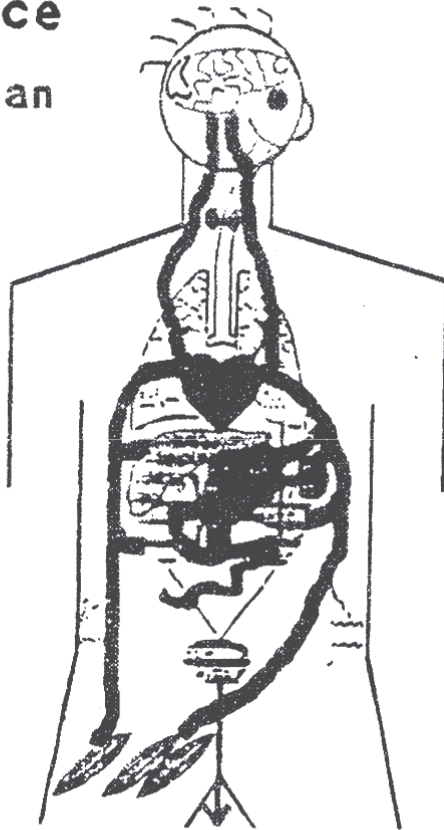
Procesy (adsorpce, distribuce metabolismus, vylučování – ADME) jsou rychlostní procesy 1. řádu

$$\begin{array}{l} \text{pro } n = 1 \\ \frac{dc}{dt} = -k \cdot c^n \\ \frac{dc}{dt} = -k \cdot c \\ \frac{dc}{c} = -k \cdot dt \end{array}$$

$$\begin{array}{l} c_t = c_o \cdot e^{-kt} \\ \ln(c_t/c_o) = -k \cdot t \\ k = -1/t \cdot \ln(c_t/c_o) \end{array}$$



Reference
man/woman



Simulace fyziologických parametrů:

- objem kompartmentů (krev, játra, ...)**
- rychlost perfuze kompartmentů
krví (L/min)**
- objem alveolárního vzduchu a rychlost
jeho výměny**

Simulace anatomických parametrů:

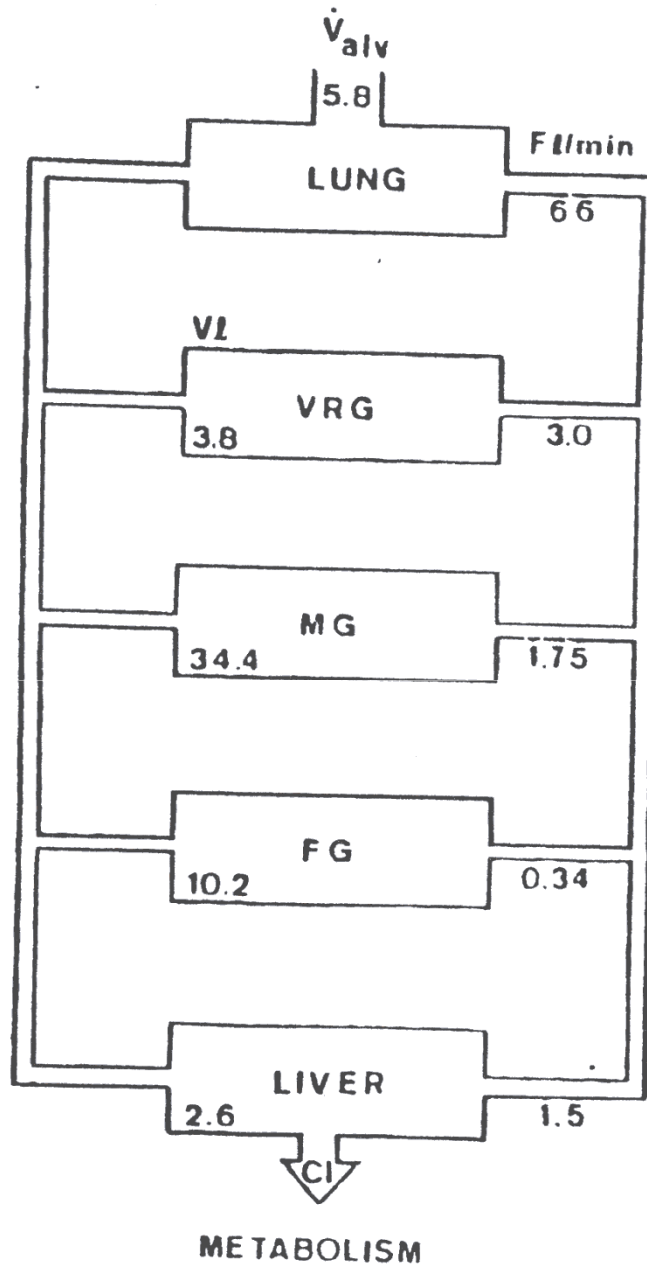
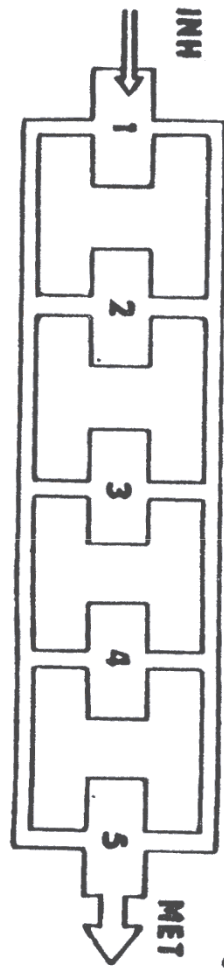
- uspořádání kompartmentů a jejich vztahů
(bloky, šipky),**
- seskupení s podobnými
vlastnostmi**
- arteriální a venosní krev**

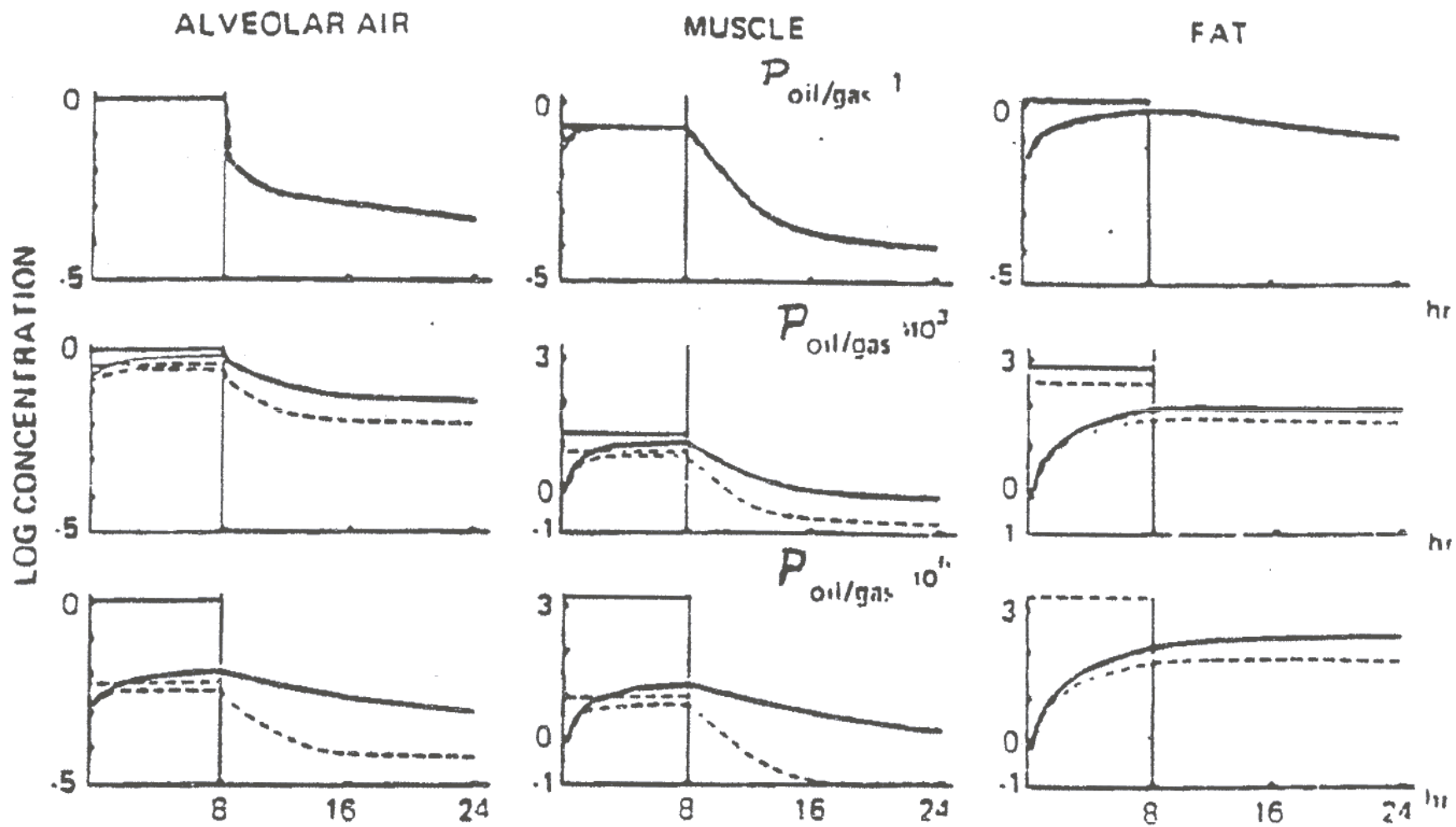
**Simulace vlastností chemických látek
rozdělovací koeficient mezi dvě
nemísitelné fáze: vodnou a tukovou**

koncentrace v tkáních

**$c(\text{tkáň}) = c(\text{okolí}) \cdot P(\text{tkáň/okolí})$ (Henryho zákon)
P (tkáň/plyn) biorozpustnost (biosolubility)
úměrný rozdělovacímu koeficientu mezi olej a
plyn P(o/g)**

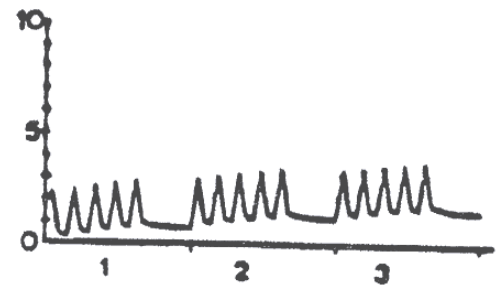
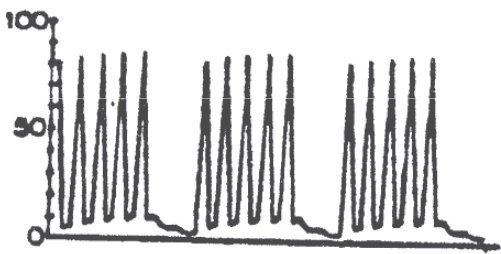
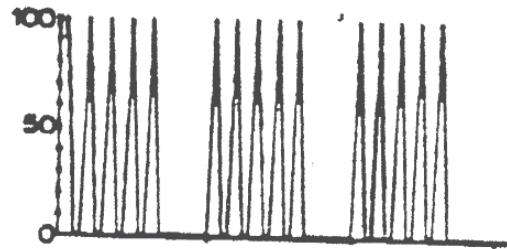
$$P(\text{tk/g}) = k_1 \cdot \log P(\text{o/g}) + k_2$$



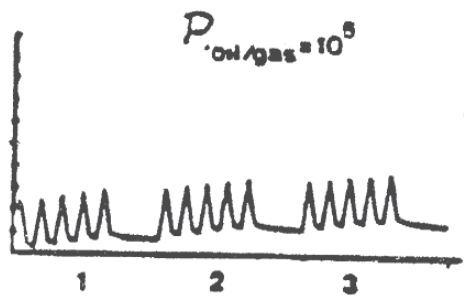
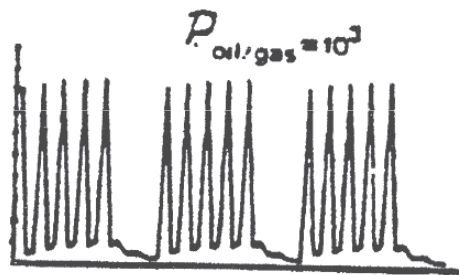
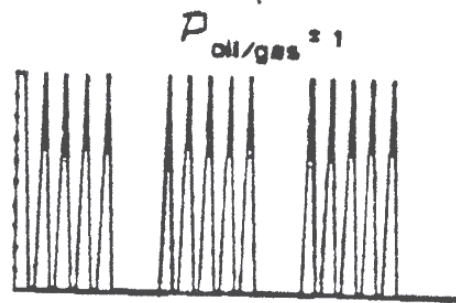


% OF SATURATION $\cdot \lambda_0 p_{tis} / p_{exp} = 100 c_{tis} / (c_{exp} \lambda_{tis/gas})$

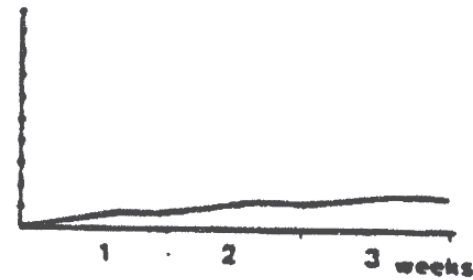
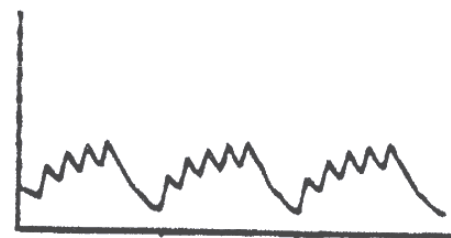
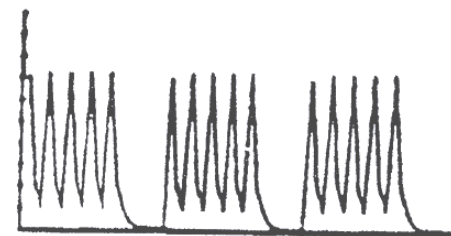
LIVER



MUSCLE



FAT



Příklady modelů QSAR, které byly validovány podle QECD principů:

QSAR pro akutní toxicitu na rybách (Mark Cronin, Liverpool Polytechnic)

QSAR pro degradaci látek v atmosféře (Paola Gramatica, University of Insubria, Varese)

QSAR pro mutagenitu a karcinogenitu (Romualdo Benigni, Istituti Superiore di Sanita, Roma)

ECOSAR (Etje Hulzebos, RIVM, Utrecht)

DEREK pro kožní dráždivost (Grace Patlewicz, Unilever, Bedford, UK)

METI model pro biodegradaci (Yuki Sakuratani, Ministry of conomy, Trade and Industry, Tokyo)

TOPKAT, model pro chronickou toxicitu na potkanech (Roger Breton, Ottawa)

MULTI-CASE , model pro index NOEL pro člověka (Edwin Mathews, US FDA, Washington DC)

Používání modelů QSAR

Dánská EPA, Copenhagen: MULTI-CASE, TOPKAT, datová base údajů odhadnutých výpočtem má asi 170 000 sloučenin, přesnost 70-85%.

US EPA: pro podklady pro odhad účinků látek na zdraví lidí i životního prostředí použity modely QSAR

US FDA: prosazuje využívání modelů QSAR pro legislativní účely

REACH: QSAR modely jsou přímo jmenovány mezi metodami pro hodnocení chemických látek

EPA-AIM (Analog Identification Methodology): pro charakterizaci nebezpečnosti a odhad rizika.

Účel alternativních metod testování toxicity výpočtem, *in silico*, je v zamýšleném konkrétním použití

–

**bod OECD principů - rozpis:
musí být definovaný měřený účinek
jednoznačná definice vědeckého smyslu modelu
schopnost modelu oslovit (alespoň
částečně) definovanou část legislativy
popsány experimentální podmínky, ovlivňující
měření, tedy i model
školácké: musí být uvedena jednotka, ve které je
měřený účinek
omezení metody a porovnání se stávající**

popis kontroly kvality
informace o reprodukovatelnost
vyhodnocení mezilaboratorního porovnávání
zkoušek (nutná pravidla, manuál)
kontrola PC, na kterých se model provozuje,
softwaru,...
vysvětlení potřeby testu
předpis protokolu včetně Standardního
Operačního Postupu