



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Metody *in silico* stanovení výpočtem



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace a rozšíření výuky zaměřené na problematiku životního prostředí na PŘF MU (CZ.1.07/2.2.00/15.0213)
spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Predikční (eko)toxikologie

odhad účinku pomocí alternativních metod

- metody stanovení (eko)toxicity chemických látek, které dosud nebyly testovány experimentálně – k určení toxických vlastností látek bez použití pokusných zvířat
- metody pro modelování toxicity směsí
- využívají shromážděné pokusné údaje a detailní charakteristiky chemické struktury látek
- na jejich základě a zobecňováním poznatků vytváří expertní počítačové modely, pomocí nichž odhadují toxicitu
- **expertní programy** pro odhad toxického účinku výpočtem = soubory pravidel, znalostí, údajů o toxických indexech, statistického hodnocení, výpočetních programů molekulových deskriptorů a metod matematické statistiky
- !! K postavení dobrého modelu nutné široké soubory kvalitních dat !!



In silico modely

Tradiční i rychlé alternativní laboratorní testy



rozsáhlé soubory dat (dobré kvality)



vývoj a validace predikčních toxikologických výpočetních modelů

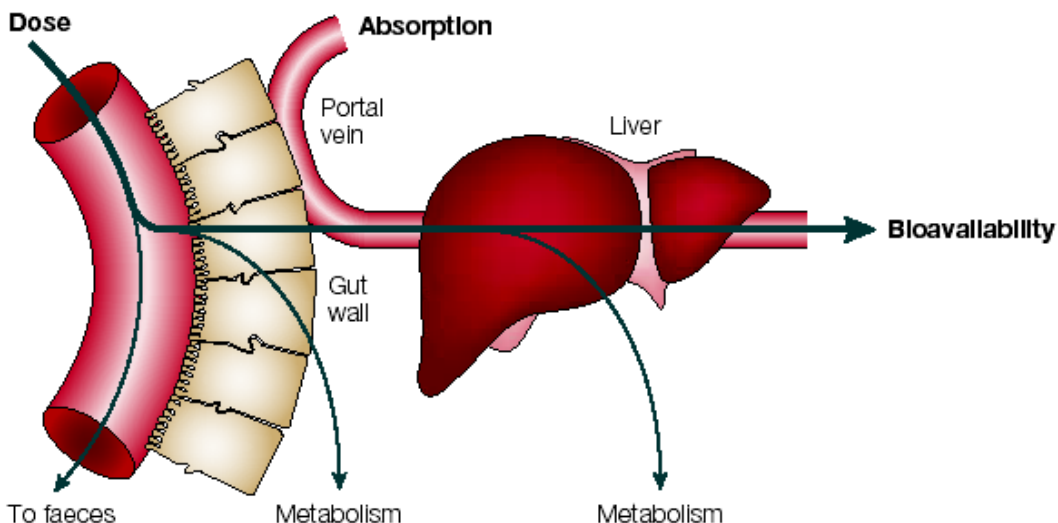
Modely pro odhad toxicity výpočtem (*in silico* testy):

- modely vytvořené a analyzované technikami QSAR
- kinetické fyziologické simulační modely (PBSP Physiologically-Based Simulation Models; PBPK Physiologically based pharmacokinetic Models)
- modely založené na biologické podobnosti (read-across)
- expertní systémy založené na souborech znalostí a pravidel
- modely vytvořené technikami molekulové grafiky
- kombinace různých modelů s umělou neuronovou sítí (Artificial Neural Network).



In Vitro & In Silico ADME modely

- ADME techniky pomáhají modelovat jak se látka bude chovat v organismu – co se s ní bude dít v organismu
- = Modely ADME - simulují kinetiku procesů v organismu, které zodpovídají za koncentraci účinné látky na místě účinku, tedy absorpci (A), distribuci (D), metabolismus (M) a exkreci (E). Modely pro různé organismy a různé způsoby expozice jsou rozlišeny fyziologickými parametry organismů
- Tyto metody mohou být experimentální (*in vitro*) využívající buněčné modely tkání, nebo *in silico*, využívající výpočtové modely
- Caco-2 = in vitro model pro hodnocení míry absorpce



Farmakokinetické parametry

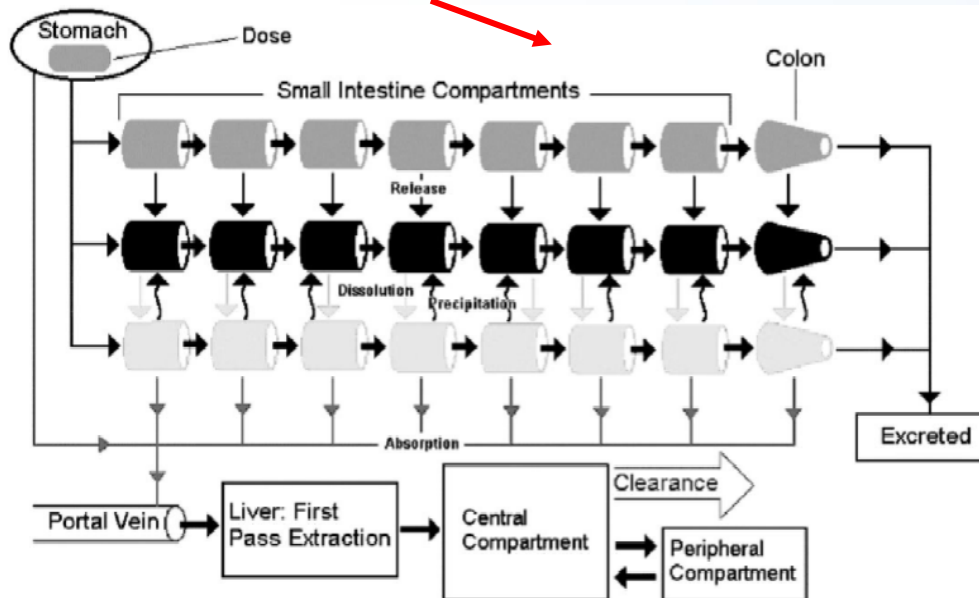
- **Orální biodostupnost** = frakce dávky, která se dostane do krevního oběhu (po 1. průchodu metabolizujícími játry)
- **Absorpce** = frakce dávky, která projde přes střevní stěnu

Farmakokinetické modely

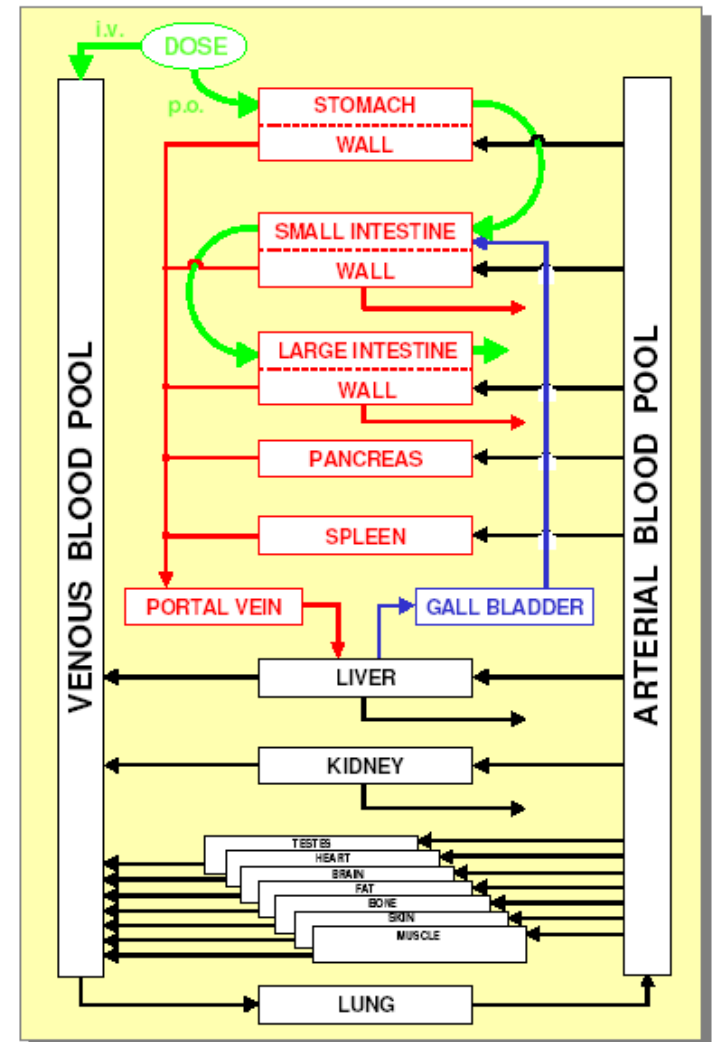
výpočtové metody mohou predikovat vlastnosti látek důležité pro ADME:

- LogP, parametr lipofilyty
- rozpustnost
- prostupnost přes tkáňové bariery
- cytochrome p450 metabolismus

- PK-sim
- Cloe, PKexpress
- Gastroplus



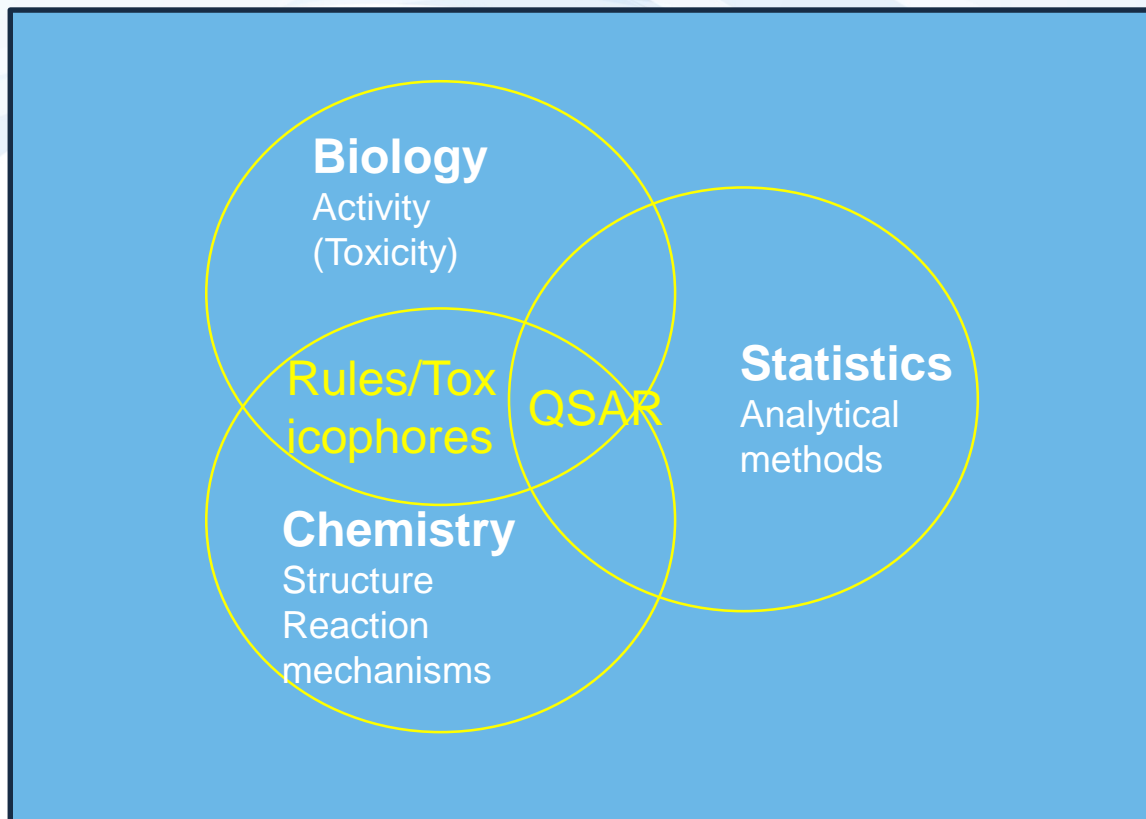
Structure of the PBPK-Model



Key features are:

- Single compartment model of small intestine with plug flow with dispersion of administered dose.
- Description of biliary tract - Simulation of EHC possible.
- Permeation barrier for uptake into organs.
- Inclusion of active transporters in each organ.
- Metabolization terms in each organ.

Predikce toxicity

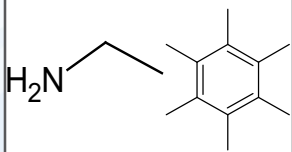


- Expertní systémy založené na rozsáhlých sadách pravidel
- QSAR nebo “korelativní” metody
- Molekulové modelování



Využití predikovaných dat pro hodnocení toxicity

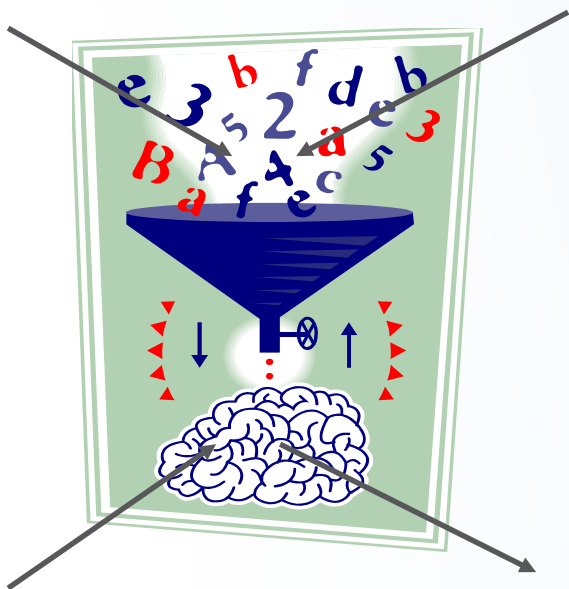
Toxikofory



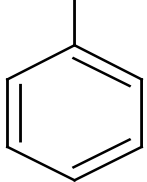
Znalosti

Rešerše...

Zkušenosti...



NH₂

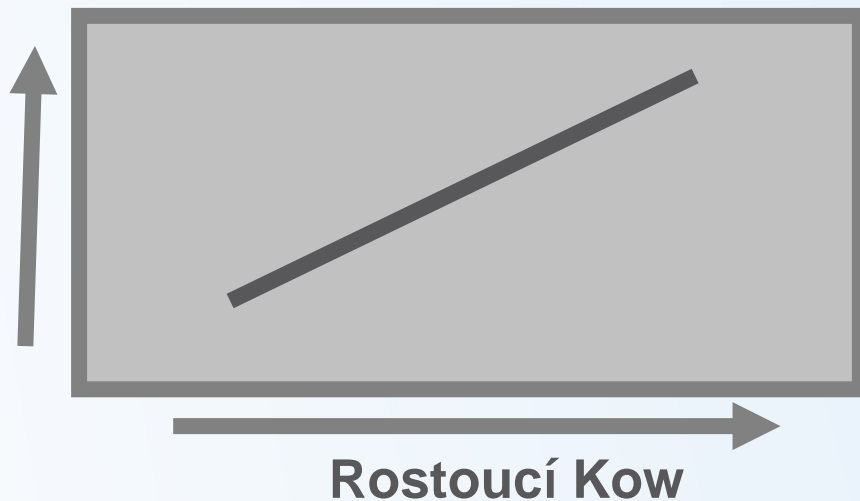


Látka
pravděpodobně
toxická pro ...

Predikovaná data

- Structure Activity Relationships (SARs)
- Cílem SAR je predikovat aktivitu/toxicitu látky – výsledky ověřitelné provedením experimentálních studií
 - Příklad: Toxicita obecně roste se vzrůstem K_{ow} pokud není příliš nízká rozpustnost
- Použití SAR je umožněno kompletací a revizí dat

TOXICITA



Příklad expertního systému: Derek

- 303 pravidel založených na strukturních parametrech nebo toxikophorech
- 35 tox. endpointů
- refs na literární zdroje
- funguje dobře např. e.g. pro mutagenitu

DEREK for Windows Editor - C:\Program Files\Lhasa Ltd\LPS 600\Dfw6.mdb
Database Edit Options Window Help

Alert

R1, R2, R4 = C but not C=O, H
R3, R5 = Cl, Br, I
Atoms 1-4 cannot be multiply bonded
Bonds a and b cannot be ring fusion bonds

Enabled Alert ID 2
Created 24/03/99 17:57 Last Modified 19/10/01 16:11
Alert Name Nitrogen or sulphur mustard
Alert Number 101
Endpoint 5 Carcinogenicity

Comments Rule Writer Comments

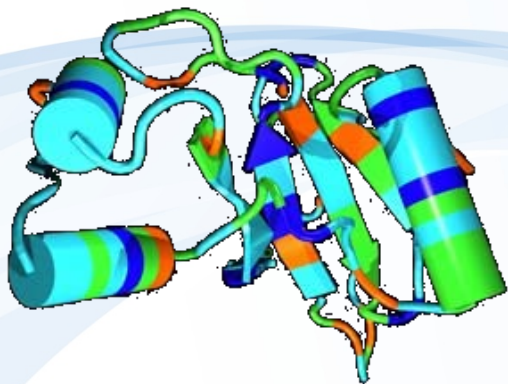
Nitrogen and sulphur mustards act as direct DNA alkylating agents forming both mono-adducts and, in the case of polyfunctional mustards, DNA cross-links [Fox and Scott, Lawley, Povirk and Shuker]. DNA interstrand cross-links are considered to be responsible for the cytotoxicity associated with polyfunctional mustards which in turn forms the basis for their use in cancer chemotherapy. For aliphatic nitrogen mustards the mechanism of reaction with DNA is generally considered to involve two successive SN2 reactions. In the first reaction, the nitrogen acts as a nucleophile to displace the halogen forming an aziridinium ion (the neighbouring group effect) which is then attacked by nucleophilic sites in DNA. For aromatic mustards in which the nitrogen is much less basic and for sulphur mustards nucleophilic substitution by DNA tends towards an SN1 mechanism.

The demonstration of the carcinogenicity of polyfunctional mustards is complicated by their cytotoxicity which may limit the doses which can be

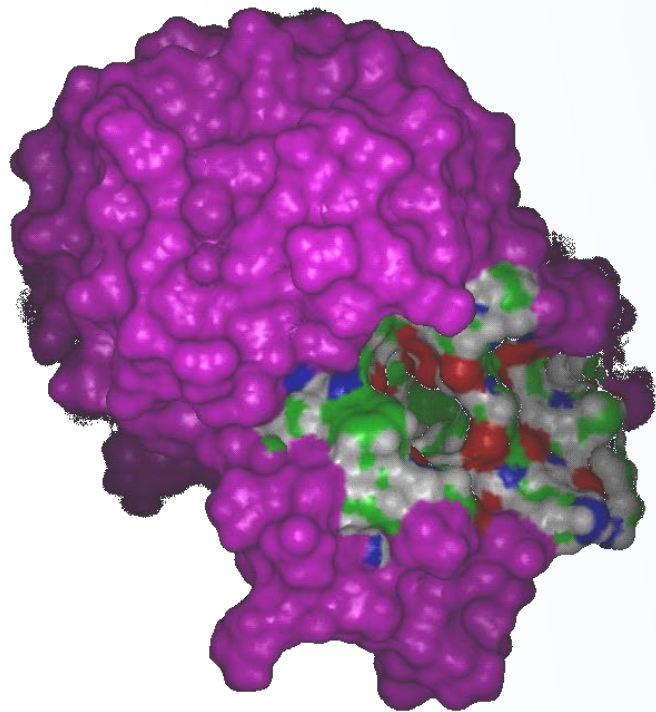
Go to 87/303



Molekulové Modelování



- **3D Vizualizace interakcí mezi látkami a proteiny**
- **počítačové vizuální modelování interakcí**
- **“Molecular Docking” látek do proteinů**



- Rentgenová krystalografie a NMR spektroskopie mohou odhalit 3D strukturu proteinu a vázaných látek
- Vizualizace těchto komplexů proteinů a látek pomáhá charakterizovat mechanismy působení látek



QSAR (Quantitative structure-activity relationship)

- kvantitativní modely vztahu struktury a aktivity látky
- předvídají vlastnosti chemických látek jako jejich toxický efekt či schopnost interakce s receptorem na základě jejich molekulárních struktur
- založeny na prostudování daného parametru (jako např. LC50, EC50, NOEC, log Kow, BCF nebo koncentrace způsobující subletální vliv) na skupině podobných látek (in vitro či in vivo), určení výsledných parametrů a postavení modelu vztahu strukturních charakteristik látky a sledovaného parametru
- mohou být použity k predikci toxicity (biologické aktivity, či jiných vlastností) např. u existujících látek, kde nejsou známy, i u látek, které dosud nebyly syntetizovány.

QSARs představuje přístup, který poskytuje možnost podstatného snížení počtu potřebných toxikologických experimentů



QSAR

Quantitative Structure Activity Relationship

- Metoda odhadu biologického účinku na základě struktury látky – postavení QSAR modelu
- Účinek (aktivita) vs. set adekvátních deskriptorů
- Srovnání podobných skupin látek
- Studium založeno na různých strukturních parametrech
- Počítačová simulace/predikce toxických, genotoxických a dalších účinků

- Aplikace korelací mezi vlastnostmi látky spojenými s molekulární stavbou a vlastnostmi spojenými s biologickým systémem
- Tyto vztahy je možno popsat matematickými vzorci nebo statisticky.

$$BA_i = f(X_i)$$



Základní matematické vztahy

$$\text{Biologická Aktivita} = \text{konst} + (C_1 P_1) + (C_2 P_2) + (C_3 P_3) + \dots$$

Biologická Aktivita = Velikost (kvantita) biologického účinku

- Parametry z testu (LD50, stupeň kancerogenity, dráždivosti, rozložitelnosti...)

$$r^2 = \frac{\text{regression variance}}{\text{original variance}}$$

r - Korelační koeficient – r^2 nabývá hodnot 0 až 1.

Molekulové deskriptory (P)

popisují strukturu molekuly látky či její vlastnosti

- teoretické vs. experimentální: velikost molekuly, molekulová hmotnost, počet a typ funkčních skupin, náboj molekuly, 3D struktura atd.
- fyzikálně-chemické vlastnosti: lipofilita, polarizovatelnost, bod varu, log P
- existuje několik tisíc deskriptorů



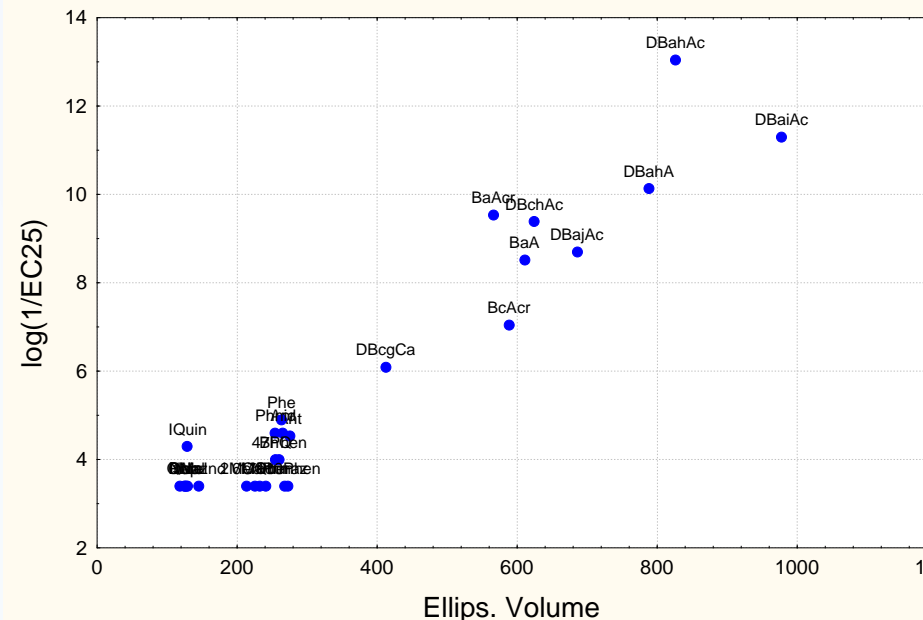
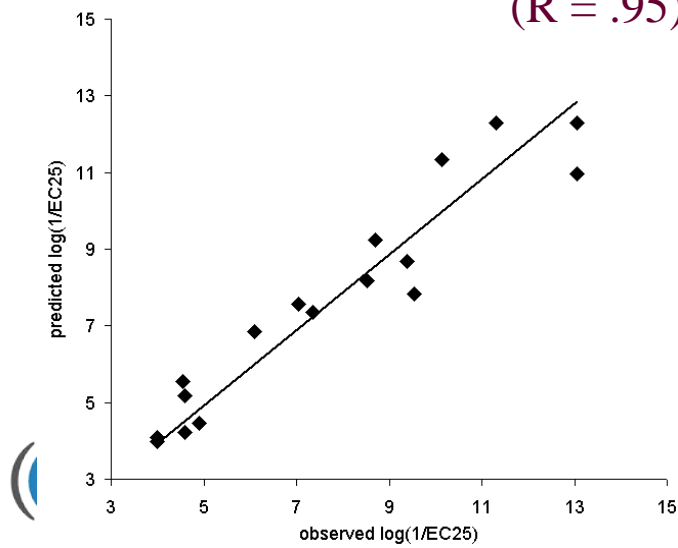
QSAR: vztah-korelace aktivity/toxicity se strukturou

- Parametry toxicity z testu IC_{50} , EC_{50}
- Struktura namodelována v softwaru, získány deskriptory molekuly (velikost, tvar, polarita...)
- Vícerozměrnými statistickými metodami hledány vztahy a nalezen nejlepší model
- Možná predikce toxicity (vlastnosti) pro netestované látky podobné struktury

Potence aza-PAHs k aktivaci AhR

$$\log(1/EC25) = 0.011 \text{ EllipsVol} + 1.544 \quad (R = 0.95)$$

$$\log(1/EC25) = 1.14 \text{ délka} - 2.12 \text{ planarita} + 2.82 \quad (R = .95)$$



QSAR

- nutná validace modelu, statistické testy významnosti modelu

MODELOVACÍ DATA
TRENOVACÍ DATA
VALIDAČNÍ DATA

QSAR – omezení využitelnosti

- Předpoklad působení shodným mechanismem
- Větší spolehlivost při interpolaci než extrapolaci

Nespecifická toxicita – především funkcí 3 hlavních vlastností látek

- Hydrofobicita
- Reaktivita
- Sterické faktory





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí