



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

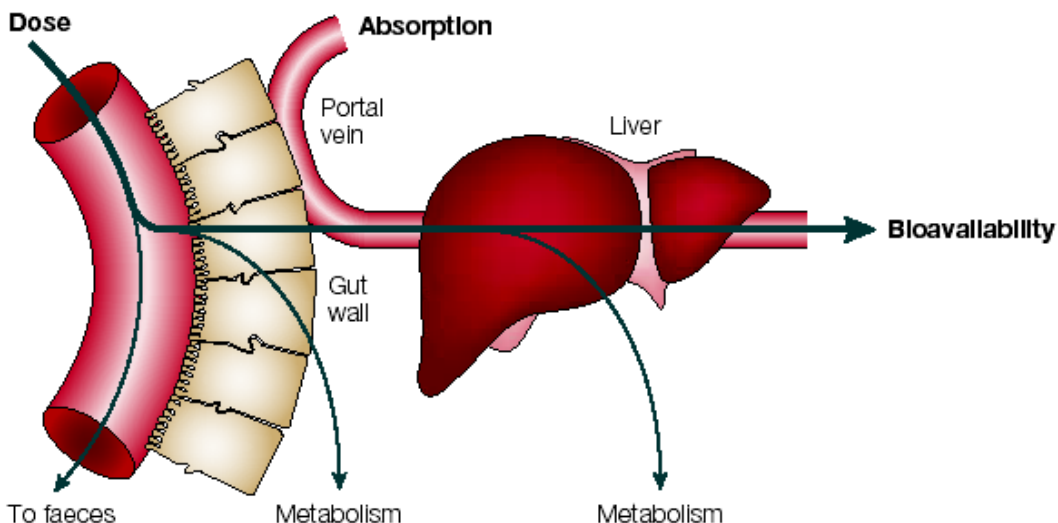
Modely pro odhad toxicity výpočtem (*in silico* testy):

- modely vytvořené a analyzované technikami QSAR (vztah struktury a účinku)
- kinetické fyziologické simulační modely (PBSM 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* (PBPK, PBSM) - využívající výpočtové modely
- Caco-2 = *in vitro* model pro hodnocení míry absorpce



Farmakokinetické parametry

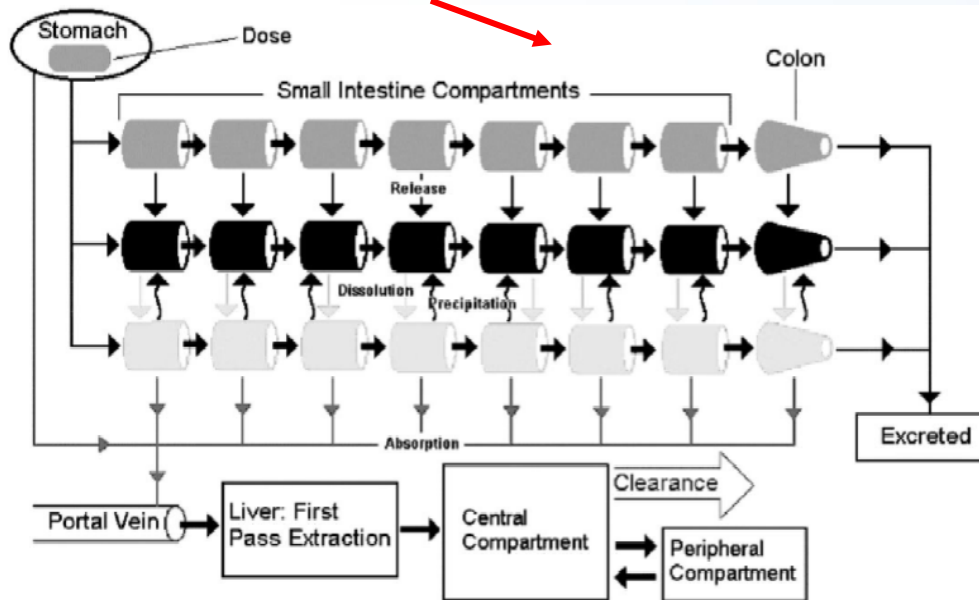
- **Orální biodostupnost** = frakce dávky, která se dostane do krevního oběhu (po 1. průchodu metabolizujícími játry)
- **Absorpce** = frakce dávky, která projde přes střevní stěnu

Farmakokinetické modely

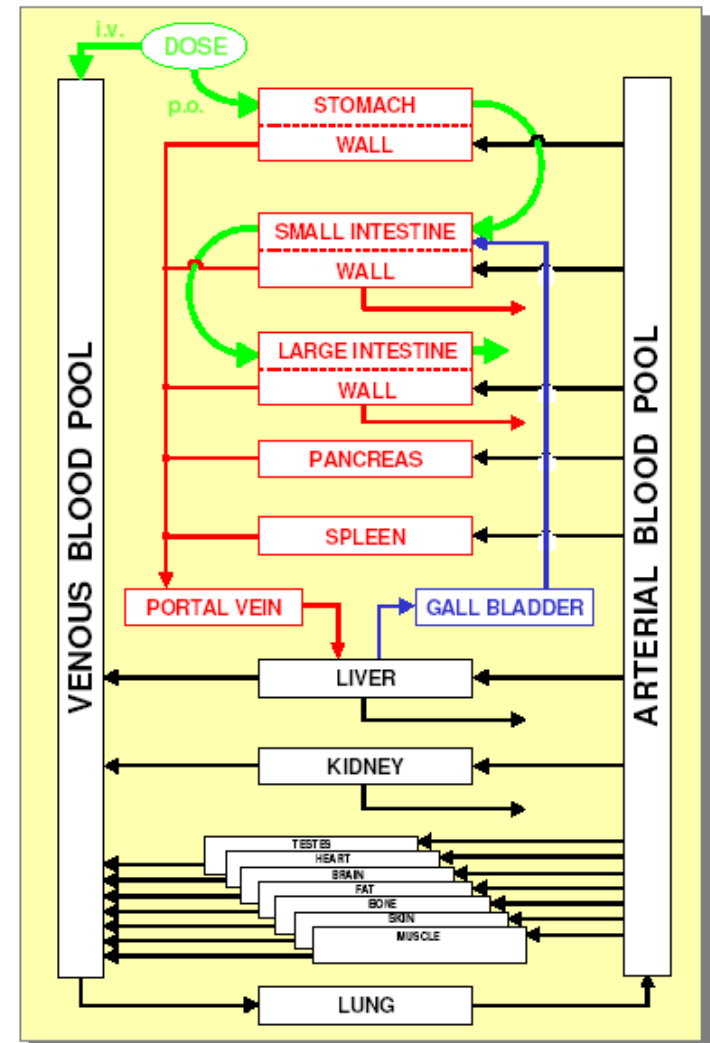
výpočtové metody mohou predikovat vlastnosti látek důležité pro ADME:

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

- PK-sim
- Cloe, PKexpress
- Gastroplus



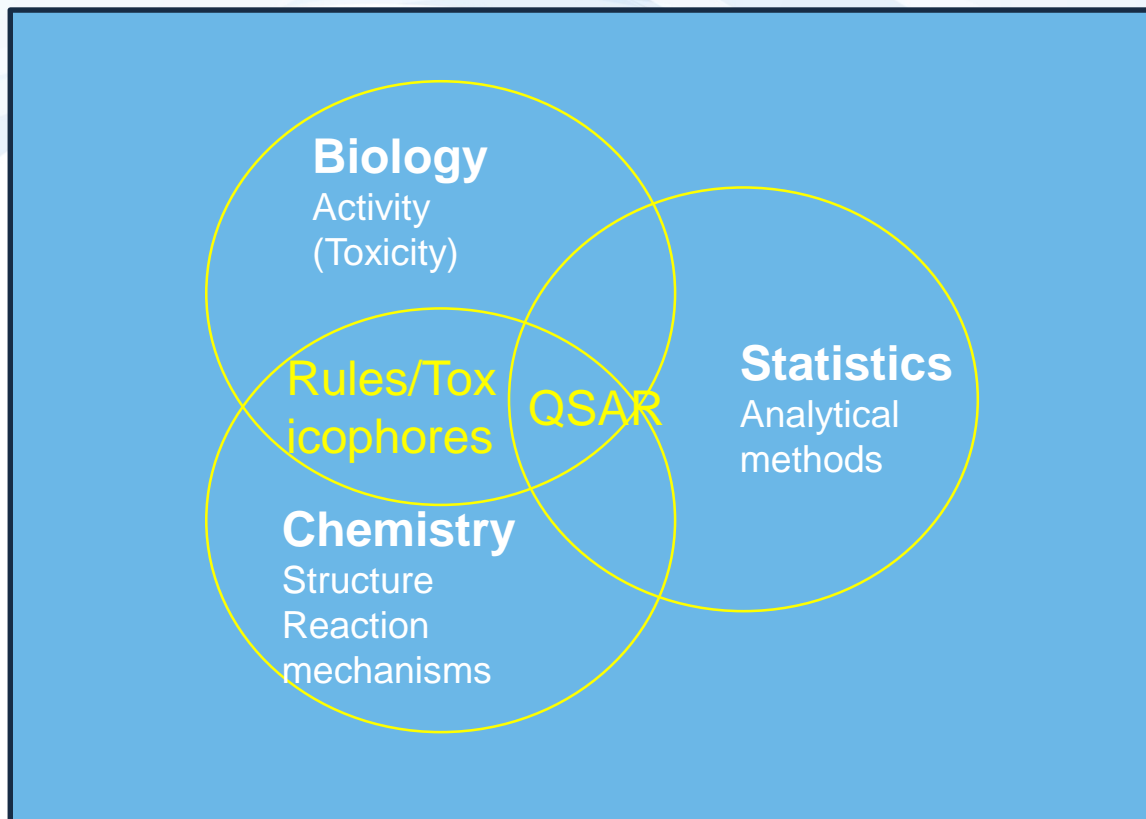
Structure of the PBPK-Model



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

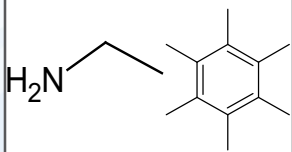


- Expertní systémy založené na rozsáhlých sadách pravidel
- QSAR nebo “korelativní” metody
- Molekulové modelování



Využití predikovaných dat pro hodnocení toxicity

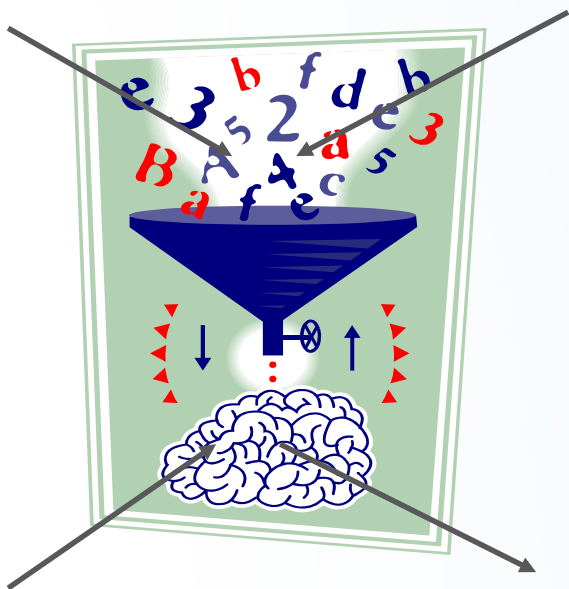
Toxikofory



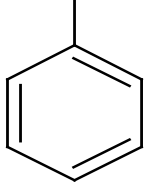
Znalosti

Rešerše...

Zkušenosti...



NH₂

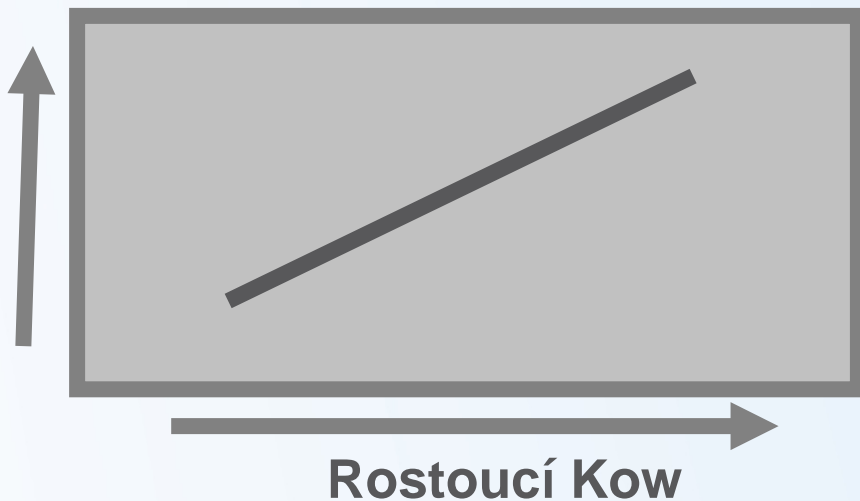


Látka
pravděpodobně
toxická pro ...

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. pro mutagenitu

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

Alert

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

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

Comments Rule Writer Comments

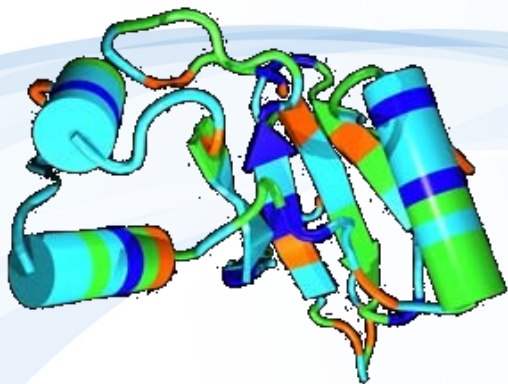
Nitrogen and sulphur mustards act as direct DNA alkylating agents forming both mono-adducts and, in the case of polyfunctional mustards, DNA cross-links [Fox and Scott, Lawley, Povirk and Shuker]. DNA interstrand cross-links are considered to be responsible for the cytotoxicity associated with polyfunctional 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

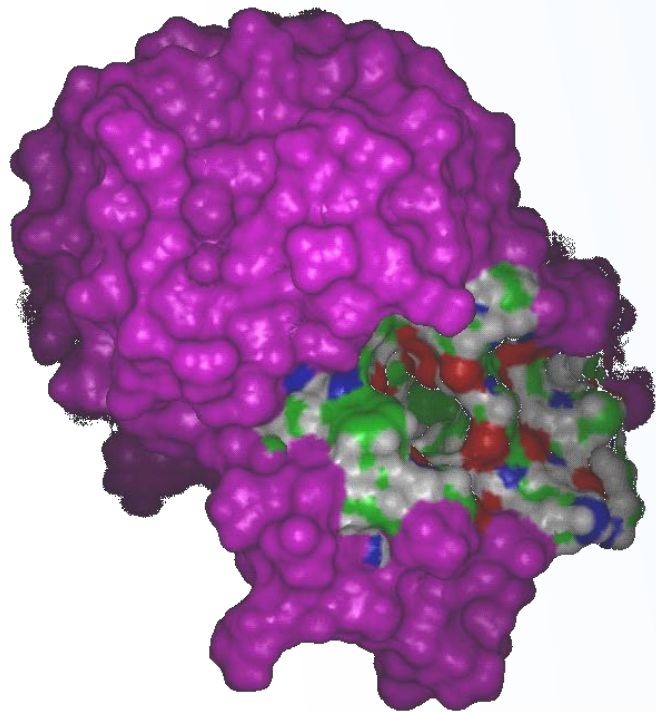
Go to 87/303



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

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



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.

$$BA_i = f(X_i)$$



Postup - Základní matematické vztahy

- 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

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

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

- 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



Read-across

– extrapolace informací směrem k dalším látkám

Sdružování látek do skupin a analogický přístup – častý alternativní postup k doplnění chybějících údajů v registracích předkládaných podle nařízení REACH

- informace o analogických (testovaných) látkách použity k předvídání vlastností „cílových“ (netestovaných) látek – omezení zkoušek
- Podrobnější info: <https://echa.europa.eu/cs/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/grouping-of-substances-and-read-across>

- ECHA - Rámec pro analogické posouzení

= Read-Across Assessment Framework (RAAF)

https://echa.europa.eu/documents/10162/13628/raaf_en.pdf

- různé scénáře pro read-across
- doložení důkazů o tom, proč lze údaje o jedné látce použít k doplnění chybějících údajů o látce jiné



The OECD QSAR Toolbox for Grouping Chemicals into Categories

<https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm>

Input target chemical by CAS#

The screenshot displays the OECD QSAR Toolbox software interface. The top menu bar includes options like 'Input', 'Profiling', 'Data', 'Category definition', 'Data Gap Filling', and 'Report'. Below this is a toolbar with icons for 'New', 'Open', 'Close', 'Save', 'CAS#', 'Name', 'Structure', 'Composition', 'Select', 'ChemIDs', 'Inventory', 'List', 'Substructure (SMARTS)', 'Query', and 'Define'. The 'CAS#' icon is highlighted with a red box and labeled '1'. A search dialog box is open, titled 'Search by CAS #', with the input field containing '97530' and a 'Search' button labeled '3'. The 'OK' button is labeled '4'. Below the search field, there are buttons for 'Select All', 'Unselect All', and 'Invert Selection', with 'Selected 1 of 1' indicated. The search results table shows one entry with a green checkmark in the first column:

1	CAS	97-53-0
	SMILES	COc1cc(CC=C)ccc1O
	CS Relation	High
	Substance	Mono constituent
	Composition	
	Name	eugenol eugenol (4-allyl-2-... phenol,2-methoxy-4-(2-pr... 1-ALLYL-3-METHOXY-4-...

To the right of the table is a chemical structure diagram of eugenol, showing a benzene ring with a methoxy group (H₃C-O), a hydroxyl group (OH), and an allyl group (CH₂).

1. Click **CAS#**; 2. Enter the CAS# 97-53-0 in the blank field; 3. Click **Search**; 4. When the structure with the requested CAS # appears, click **OK**.

Profiling

Profiling results

QSAR TOOLBOX

Input Profiling Data Category definition Data Gap Filling Report

Apply View New Delete

Documents

Document 1
CAS: 97530

Filter endpoint tree... 1 [target]

Structure

Skin
in Vivo
LLNA
EC3

ToxCast
Toxicity to Reproduction
Toxicokinetics, Metabolism and Distributi...

Profile

General Mechanistic
Protein binding by OASIS
Endpoint Specific
Protein binding alerts for skin sensitiz...
Protein binding alerts for skin sensitiz...

Metabolism/Transformations

Autoxidation simulator 5 metabolite(s)

General Mechanistic
Protein binding by OASIS
Endpoint Specific
Protein binding alerts for skin s...
Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS

Skin metabolism simulator 5 metabolite(s)

General Mechanistic
Protein binding by OASIS
Endpoint Specific
Protein binding alerts for skin s...
Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS

Options

Select All Unselect All Invert

Suitable

Protein binding alerts for skin sensitization according to GHS

Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS

Protein binding by OASIS

Plausible

Aquatic toxicity classification by ECOSAR

Chemical elements

Groups of elements

Keratinocyte gene expression

Lipinski Rule Oasis

OECD HPV Chemical Categories

Organic functional groups

Organic functional groups (COSYX)

Options

Select All Unselect All Invert

Suitable

Autoxidation simulator

Skin metabolism simulator

Plausible

Autoxidation simulator (alkaline medium)

Dissociation simulator

Hydrolysis simulator (neutral)

Unclassified

Hydrolysis simulator (acidic)

Hydrolysis simulator (basic)

in vivo Rat metabolism simulator

Microbial metabolism simulator

Chemical metabolism simulator

1

2

3

3



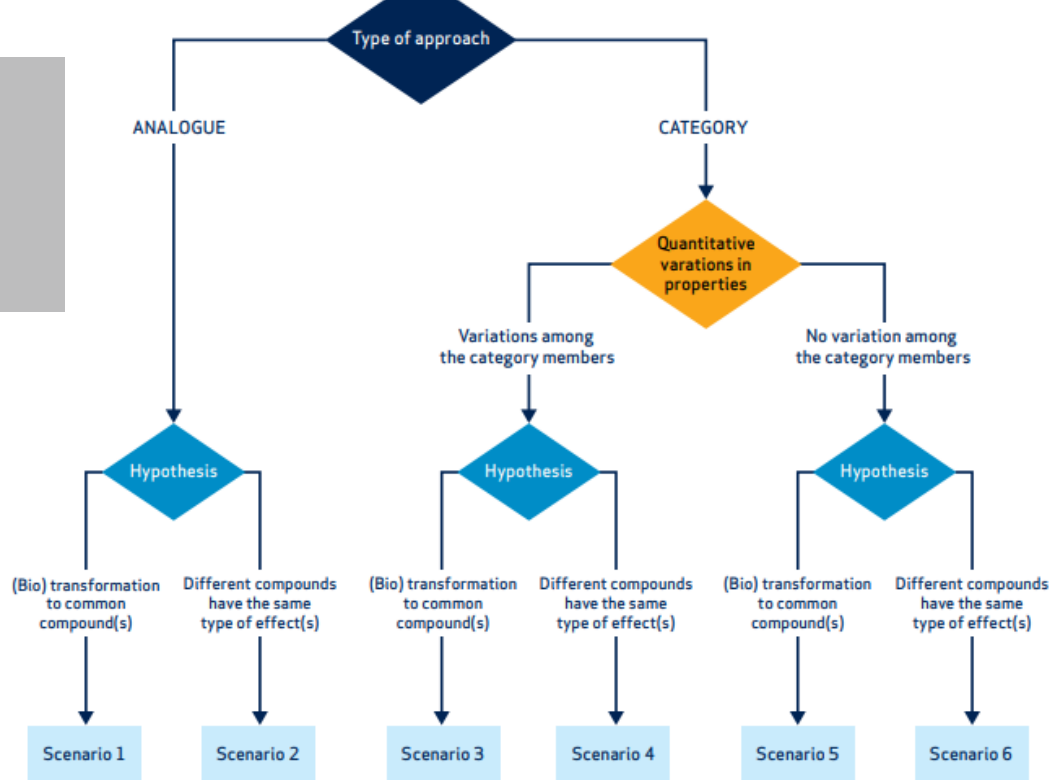
1

2

3

3

Read-Across Assessment Framework (RAAF)

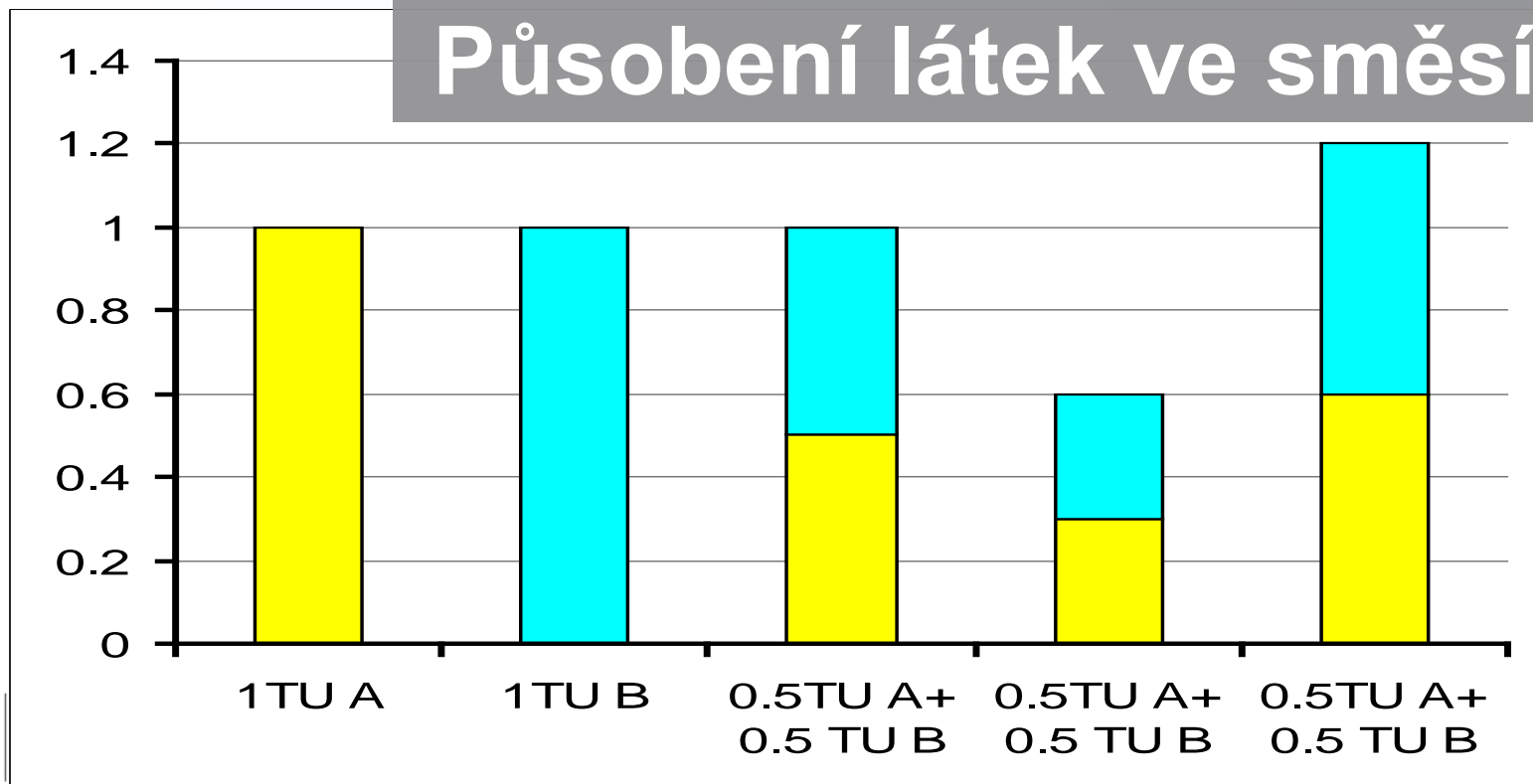


SCENARIO	APPROACH	READ-ACROSS HYPOTHESIS BASED ON	QUANTITATIVE VARIATIONS
1	Analogue	(Bio)transformation to common compound(s)	Property of the target substance predicted to be quantitatively equal to those of the source substance or prediction based on a worst-case approach.
2	Analogue	Different compounds have qualitatively similar properties	Properties of the target substance predicted to be quantitatively equal to those of the source substance or prediction based on a worst-case approach.
3	Category	(Bio)transformation to common compound(s)	Variations in the properties observed among source substances. Prediction based on a regular pattern or on a worst-case approach.
4	Category	Different compounds have qualitatively similar properties	Variations in the properties observed among source substances. Prediction based on a regular pattern or on a worst-case approach.
5	Category	(Bio)transformation to common compound(s)	No relevant variations in properties observed among source substances and the same strength predicted for the target substance.
6	Category	Different compounds have qualitatively similar properties	No relevant variations in properties observed among source substances and the same strength predicted for the target substance

- Aditivita - Toxicita směsi toxikantů A a B je stejná jako suma toxicit toxikantů A a B působících samostatně
- Antagonismus - Toxicita směsi toxikantů A a B je nižší než suma toxicit toxikantů A a B působících samostatně
- Synergismus - Toxicita směsi toxikantů A a B je vyšší než suma toxicit toxikantů A a B působících samostatně
- Potenciace - Jedna chemikálie, která samostatně není toxická, zvyšuje toxicitu další chemikálie ve směsi

Působení látek ve směsích

Toxické jednotky



Koncentračně-adiční model (Concentration Addition, CA)

- Předpokladem pro jeho použití je stejný mechanismus účinků jednotlivých látek ve směsi (např. vazba na receptor)
- Principem této metody je možnost nahrazení jedné látky ve směsi druhou látkou
- Každá jednotlivá látka tak přispívá k účinku směsi v poměru k její koncentraci, nikoli účinku!
- Stejný princip je i základem pro výpočet TEQ při posuzování účinků environmentálních směsí



Další modely pro predikci účinků směsí

Model nezávislého působení (Independent Action, IA)

- látky způsobují daný účinek nezávisle na sobě
- jiným mechanismem

Model součtu účinků (Effect Summation, ES)

- možno použít pouze v případě lineární odpovědi u křivek dávka-odpověď pro jednotlivé látky



Model nezávislého působení

- Naměřené a predikované účinky směsi 16 biocidů působících různými mechanismy v testu toxicity u řas
- Zatímco model CA (čárkovaně) nadhodnocuje účinky směsi, model IA (plná čára) odpovídá naměřeným hodnotám

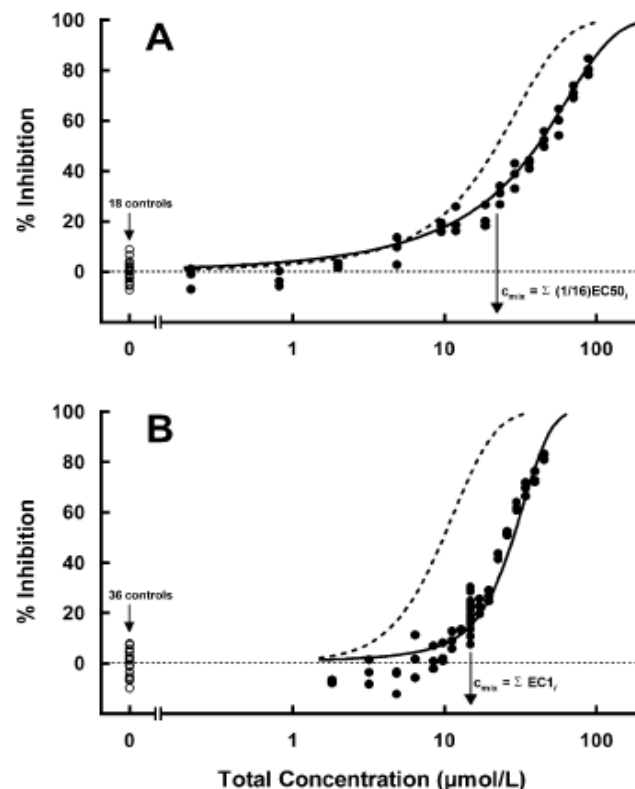


Fig. 3. Observed and predicted algal toxicity of mixtures of 16 dissimilarly acting substances. (A) Mixture 1: components mixed in the ratio of their individual EC₅₀ values. (B) Mixture 2: components mixed in the ratio of their individual EC₁ values. (●) experimentally observed toxicity; (○) controls; (---) prediction according to concentration addition; (—) prediction according to independent action.



Receptorově mediované mechanismy

- U mechanismů působících přes důležité jaderné receptory – např. estrogeny či androgeny, je často používán u environmentálních směsí koncept bioaktivních estrogenních/ androgenních ekvivalentů (BEQ/EEQ/TEQ), vypočítaných jako suma příspěvků jednotlivých látek z koncentrací jednotlivých polutantů a relativních potencí (REP), které určují, kolikrát je látka méně efektivní, než nejsilnější endogenní ligand 17β -estradiol/ testosteron

$$BEQ \text{ (vzorek) } [ng/g] = \sum c_{\text{látka}} [ng/g] * REP_{\text{látka}}$$

- Koncentračně adiční model – zahrnuje koncentraci i potenci látek

