



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

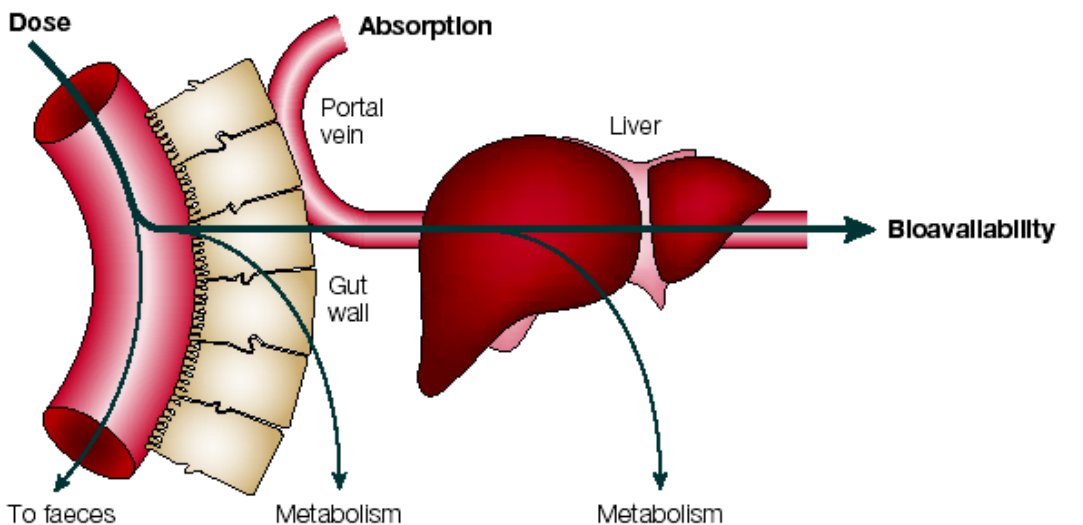
## **Modely pro odhad toxicity výpočtem (*in silico* testy):**

- modely vytvořené a analyzované technikami QSAR (vztah struktury a účinku)
- fyziologicky založené farmakokinetické (PBPK) modely (Physiologically based pharmacokinetic Models; PBSM Physiologically-Based Simulation 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

- 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
- ADME techniky pomáhají modelovat jak se látka bude chovat v organismu – co se s ní bude dít v organismu
- 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

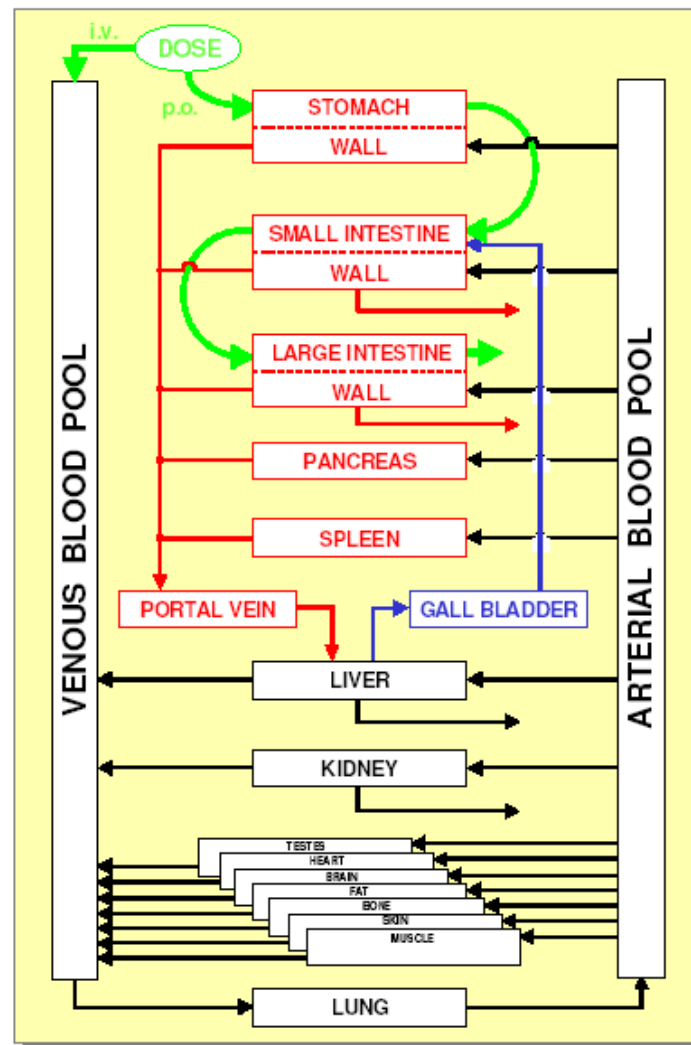
# Farmakokinetické modely

výpočtové metody mohou predikovat vlastnosti látek důležité pro ADME:

- LogP, parametr lipofility
- rozpustnost
- prostupnost přes tkáňové bariery
- cytochrom p450 metabolismus
- biologický poločas (plazmatický eliminační poločas  $t_{1/2}$ ) - čas po němž se koncentrace v plazmě sníží na polovinu

- 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.



# PBPK modely

## Vliv fyzikálně – chemických vlastností

molekulární hmotnost

polarita molekul

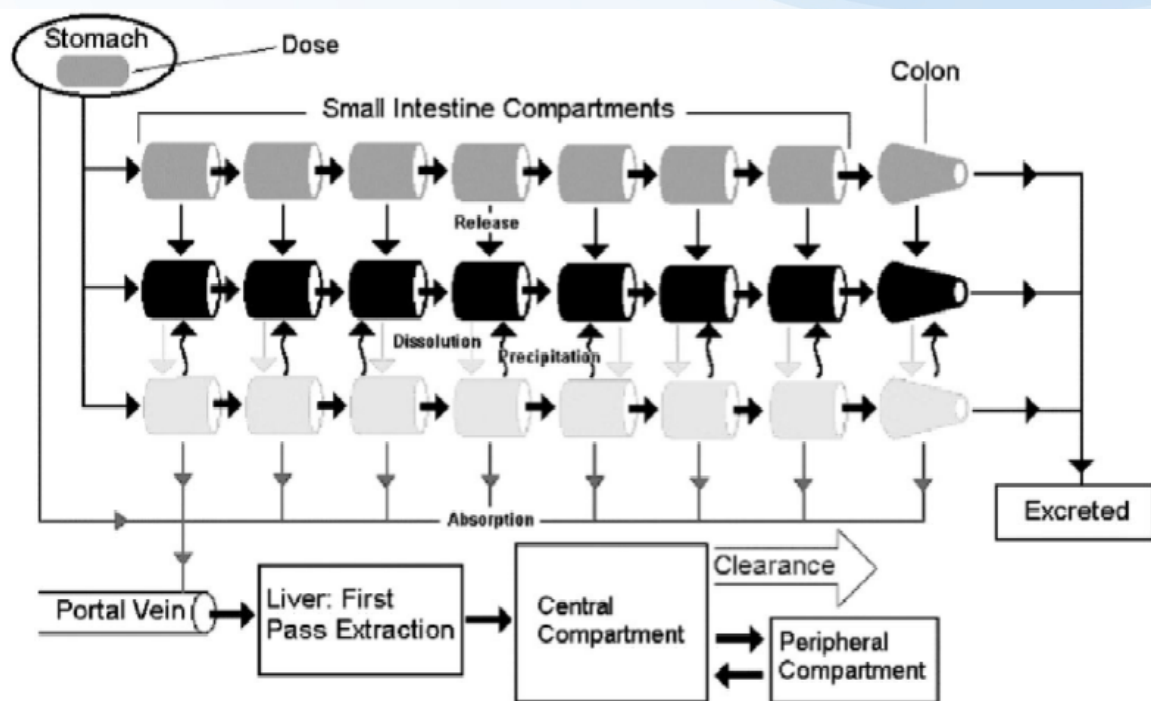
rozpustnost v tucích a ve vodě:

látky hydrofilní

látky lipofilní

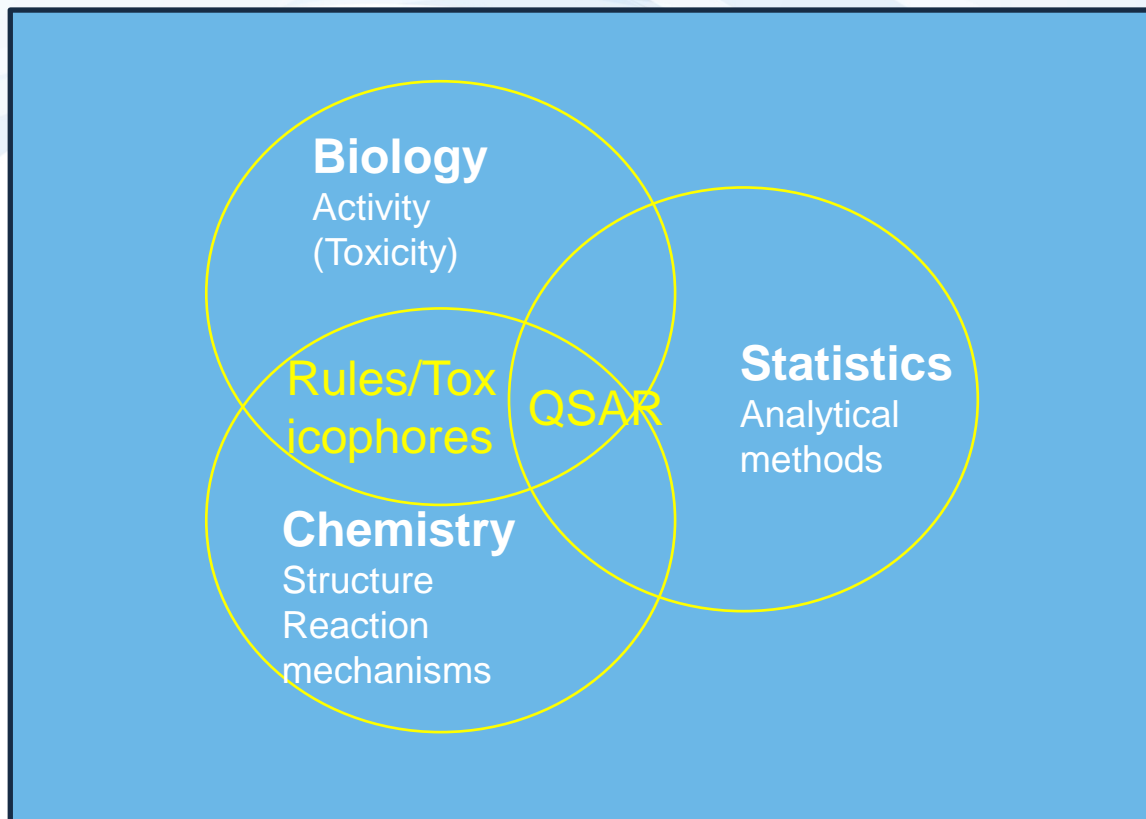
látky amfifilní – mají hydrofilní a lipofilní část molekuly, jejich rozpustnost se mění v závislosti na vlastnostech rozpouštědla.

Vliv cesty vstupu – způsobu expozice





# Predikce toxicity

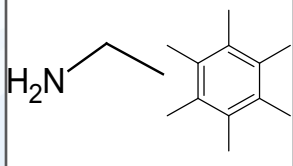


- Expertní systémy založené na rozsáhlých sadách pravidel
- QSAR nebo “korelativní” metody
- Molekulové modelování



# Využití predikovaných dat pro hodnocení toxicity

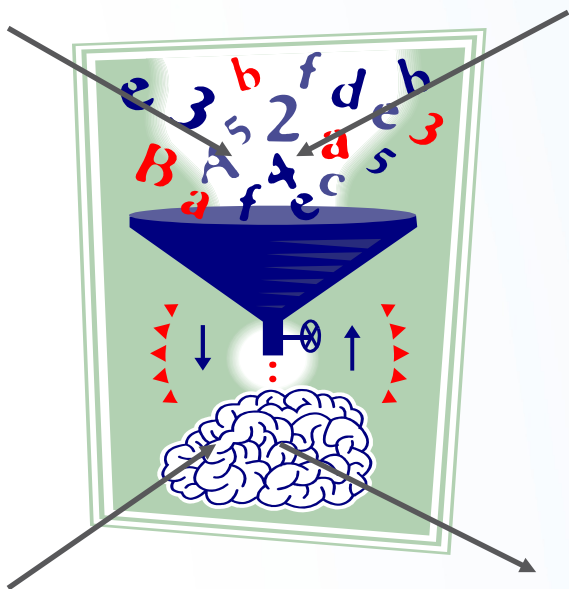
## Toxikofory



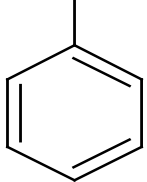
## Znalosti

Rešerše...

Zkušenosti...



NH<sub>2</sub>

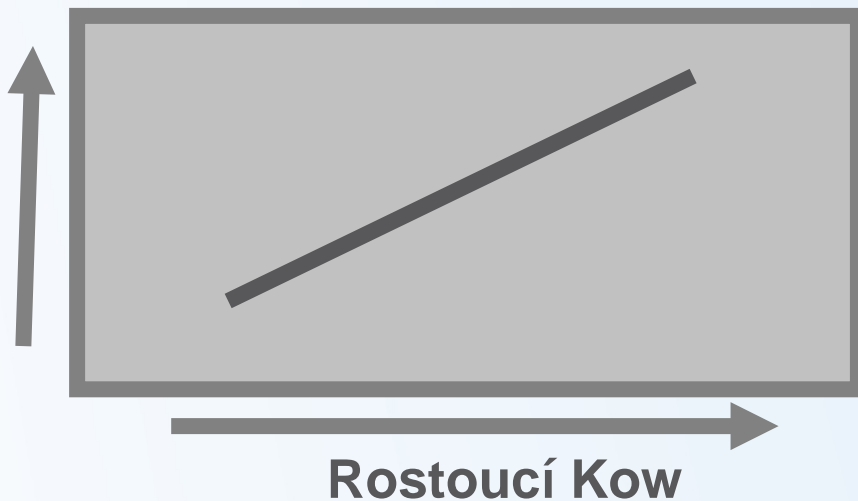


Látka  
pravděpodobně  
toxická pro ...

## 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**

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

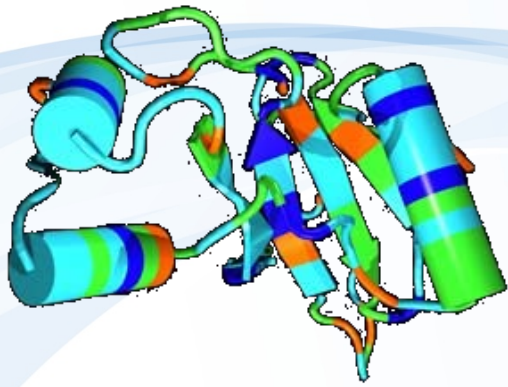
Nitrogen and sulphur mustards act as direct DNA alkylating agents forming both mono-adducts and, in the case of polyfunctional mustards, DNA cross-links [Fox and Scott, Lawley, Povirk and Shuker]. DNA interstrand cross-links are considered to be responsible for the cytotoxicity associated with polyfunctional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

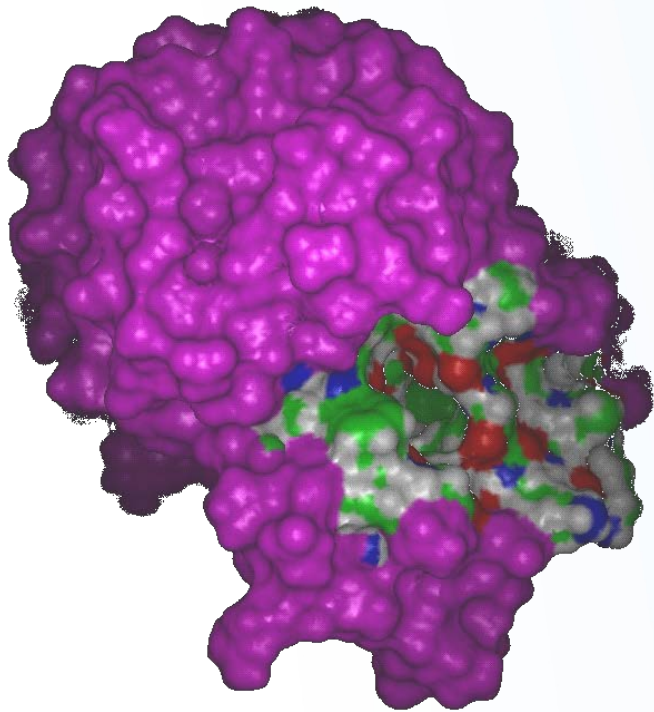
Go to  87/303



# 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, nebo i rozdělovacího koeficientu, bioakumulaci 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

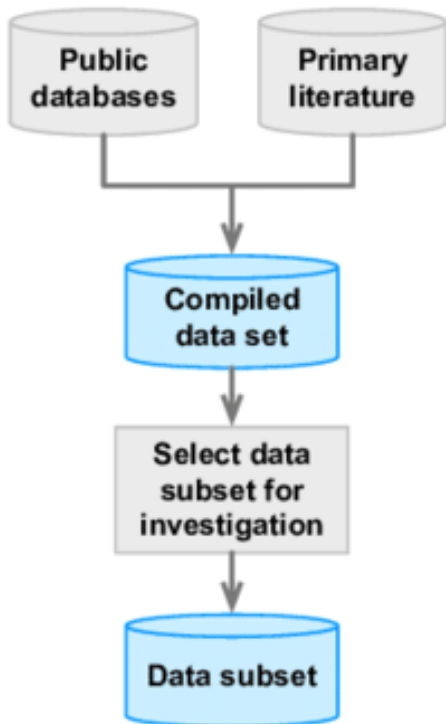
- Metoda odhadu biologického účinku na základě struktury látky – postavení QSAR modelu
- Účinek (aktivita) vs. set adekvátních deskriptorů
- Srovnání podobných skupin látek
- Studium založeno na různých strukturních parametrech
- Počítačová simulace/predikce toxických, genotoxických a dalších účinků
  
- Aplikace korelací mezi vlastnostmi látky spojenými s molekulární stavbou a vlastnostmi spojenými s biologickým systémem
- Tyto vztahy je možno popsat matematickými vzorci nebo statisticky.

$$BA_i = f(X_i)$$

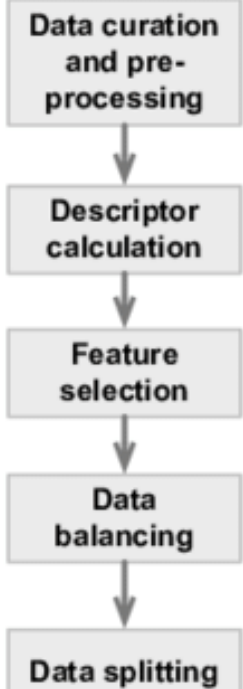


# Budování QSAR

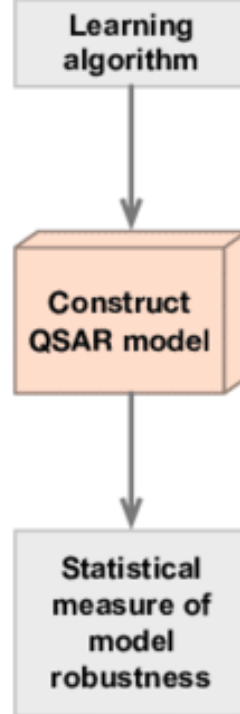
## Data set compilation



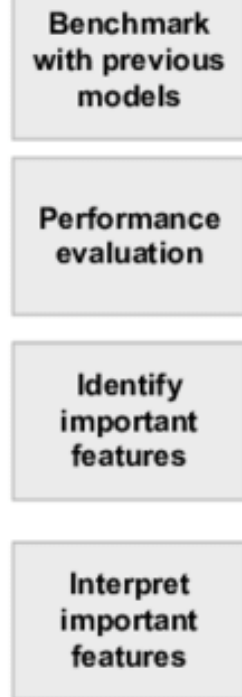
## Data set processing



## Model building



## Model post-analysis





# Postup - Základní matematické vztahy

**Biologická Aktivita** = Velikost (kvantita) biologického účinku

- Parametry toxicity z testu ( $LD_{50}$ ,  $IC_{50}$ ,  $EC_{50}$ , stupeň kancerogenity, dráždivosti, rozložitelnosti... )
- Struktura namodelována v softwaru, získány deskriptory molekuly (velikost, tvar, polarita...)

**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
- Vícerozměrnými statistickými metodami hledány vztahy a nalezen nejlepší model
- Možná predikce toxicity (vlastnosti) pro netestované látky podobné struktury

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

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

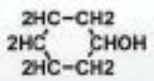
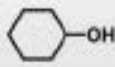
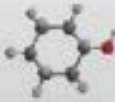

**r - Korelační koeficient** –  $r^2$  nabývá hodnot 0 až 1.





# QSAR

## Molecular structure

- 0D  $C_6H_{12}O$
- 1D 
- 2D 
- 3D 
- 4D 

## Molecular Descriptors

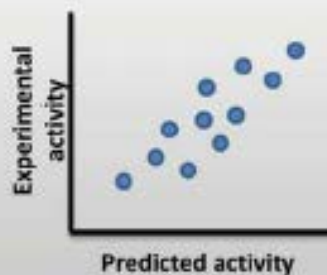
- Constitutional
- Electronic
- Geometrical
- Hydrophobic
- Lipophilicity
- Steric
- Quantum Chemical
- Topological

## Model Validation

- Residual Analysis
- External validation
- Receiver operating characteristic
- Y-randomization testing

## Correlation to Activity

- R
- $R^2$
- $Q^2$
- $R^2_{Press}$



## Multivariate Analysis

- Multiple Linear Regression
- Principal Component Analysis
- Neural Network
- Support Vector Machine
- K-nearest neighbor
- Self-Organizing Maps

# QSAR: vztah-korelace aktivity/toxicity se strukturou

- Predikce toxicity (vlastnosti) pro netestované látky podobné struktury

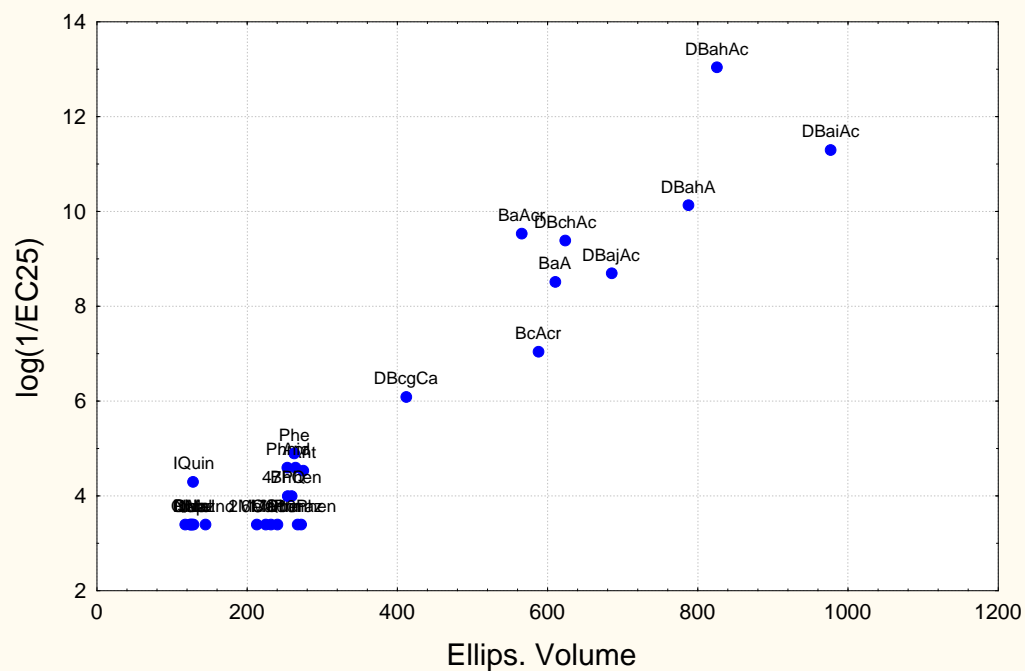
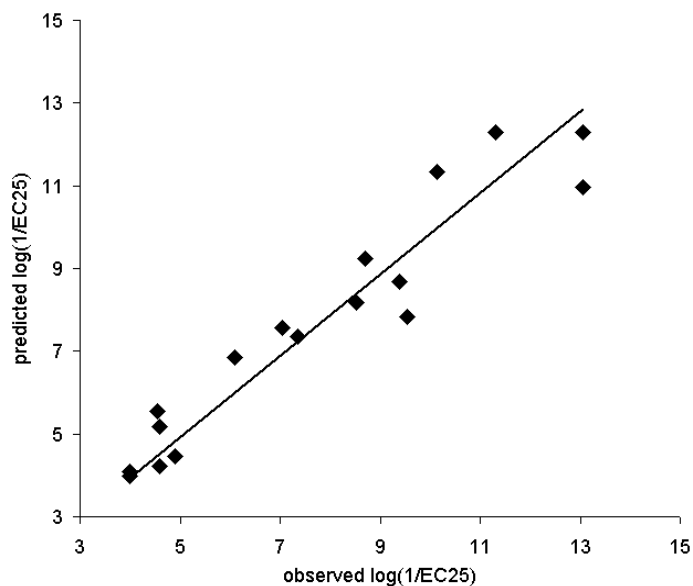
## Potence aza-PAHs k aktivaci AhR

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

(R = .95)

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

(R = 0.95)



# QSAR

- nutná validace modelu, statistické testy významnosti modelu

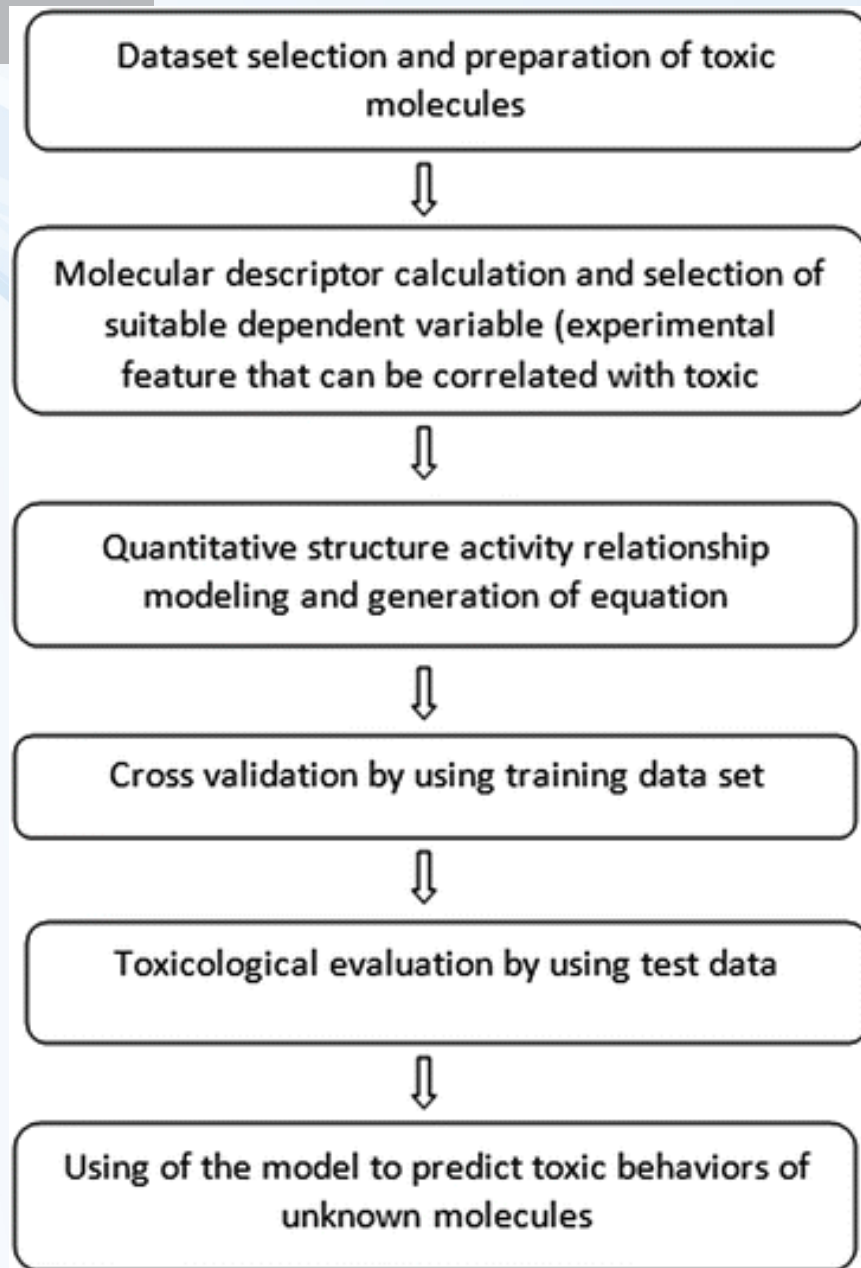
MODELOVACÍ DATA  
TRENOVACÍ DATA  
VALIDAČNÍ DATA

## 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



# 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](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
- strukturně podobné látky
- látky biotransformované na stejné nebo strukturně podobné látky



# 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 ribbon with various tool icons. A red box highlights the 'CAS#' icon, labeled with a '1'. A search dialog box is open, showing 'Search by CAS #' with the input field containing '97530' and a 'Search' button, labeled with a '3'. The 'OK' button is labeled with a '4'. The search results table shows one entry for CAS 97-53-0, with a checkmark in the first column, labeled with a '2'. The chemical structure of eugenol is displayed to the right of the table.

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

COc1cc(CC=C)ccc1O

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

20



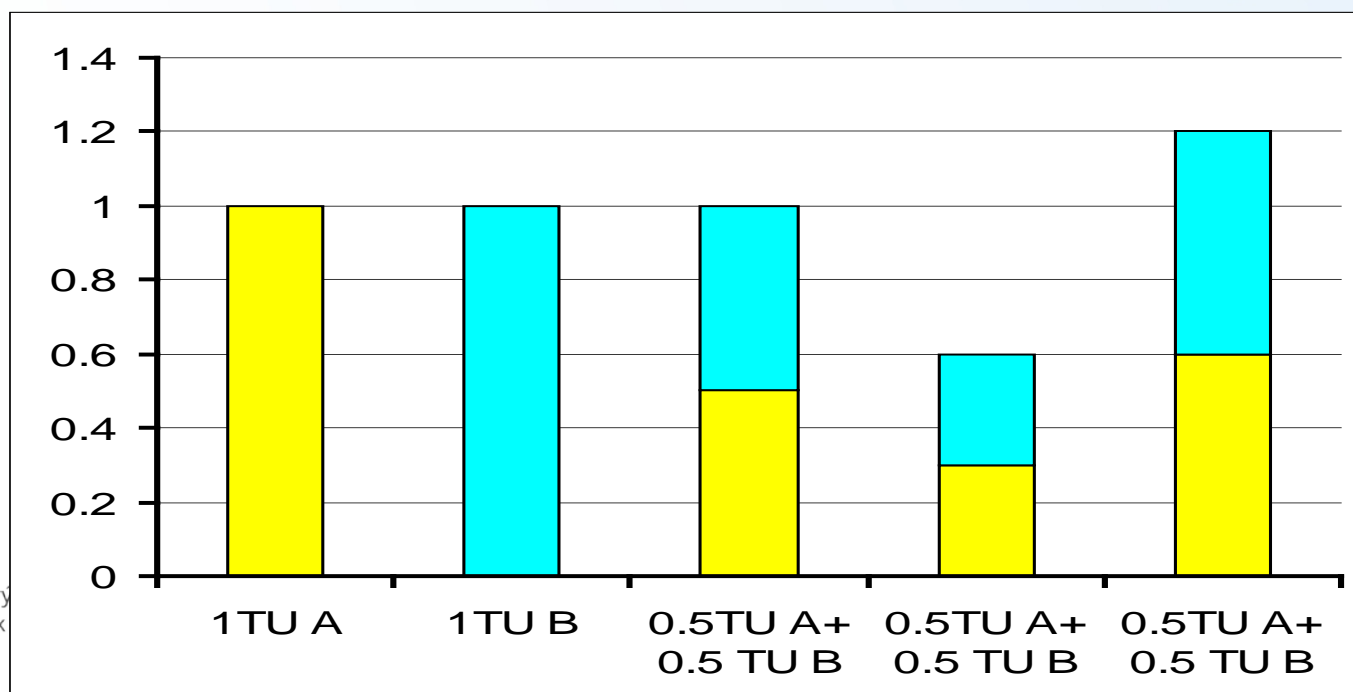
# Působení látek ve směsích

## Vzorky v prostředí = KOMPLEXNÍ SMĚSI

### - Látky se mohou v efektech ovlivňovat

- 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

Toxické jednotky



# Působení látek ve směsích

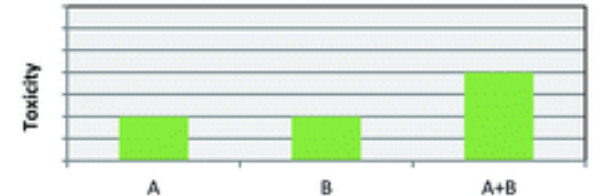
Non-interaction

Same biological target site

Concentration addition

Different biological target site

Independent action



Toxicity of mixture = sum of component toxicities

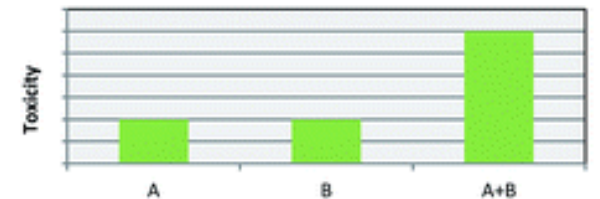
Interaction

Induction of activating enzyme  
Inhibition of detoxifying enzyme

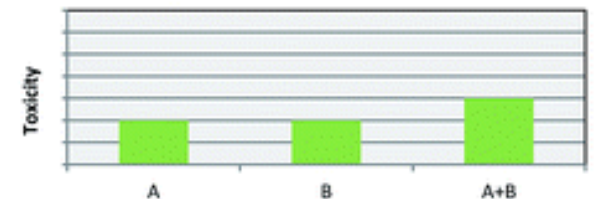
Synergism or potentiation

Competition at target site

Antagonism



Toxicity of mixture > sum of component toxicities



Toxicity of mixture < sum of component toxicities



# Typy antagonismu

- Funkční
  - opačný vliv na tu samou fyziologickou funkci, na stejné struktury, ovlivnění stejného pochodu, receptoru atd. – využívá se při symptomatické léčbě otrav
- Chemický
  - jedna látka chemicky interaguje s druhou a inaktivuje ji
  - chelatace kovů, neutralizační reakce, interakce kation + anion
- Dispoziční
  - změny v příjmu, distribuci nebo vylučování
- Receptorový
  - Zablokování receptoru - kompetitivní a ireverzibilní (nekompetitivní) antagonismus - antagonisté se váží na receptor, ale neaktivují je, brání agonistům ve vazbě na ně a jejich aktivaci



# Koncentračně-adiční model (Concentration (Dose) 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
- Koncentračně adiční model – zahrnuje **koncentraci** i **potenci** látek
- Každá jednotlivá látka tak přispívá k účinku směsi v poměru k její koncentraci, nikoli účinku!



# Receptorově mediované mechanismy

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

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



# 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

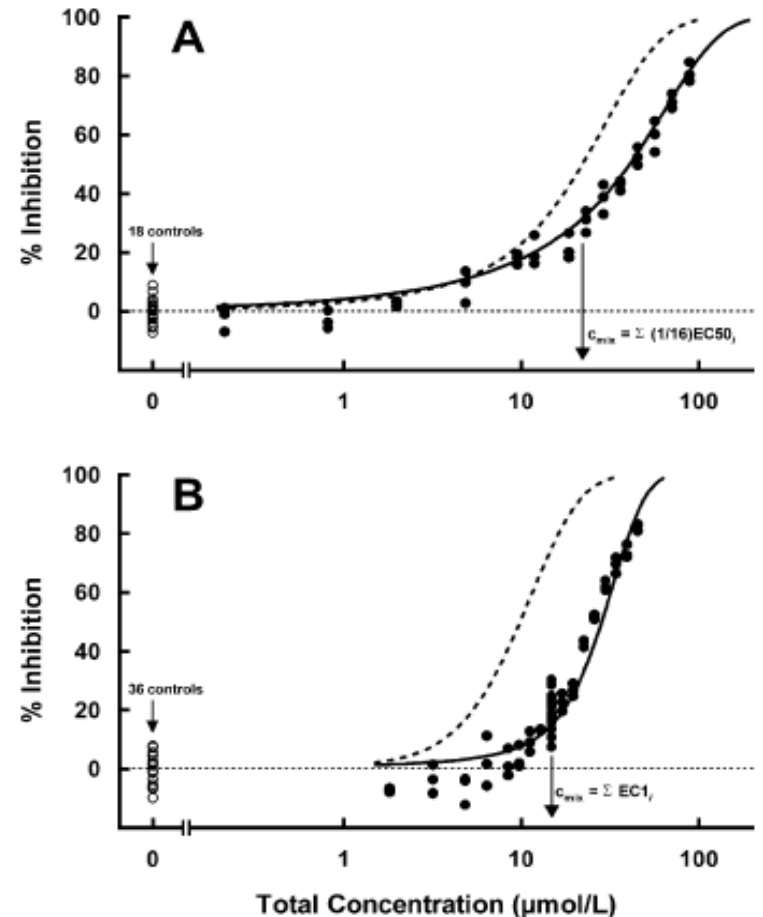
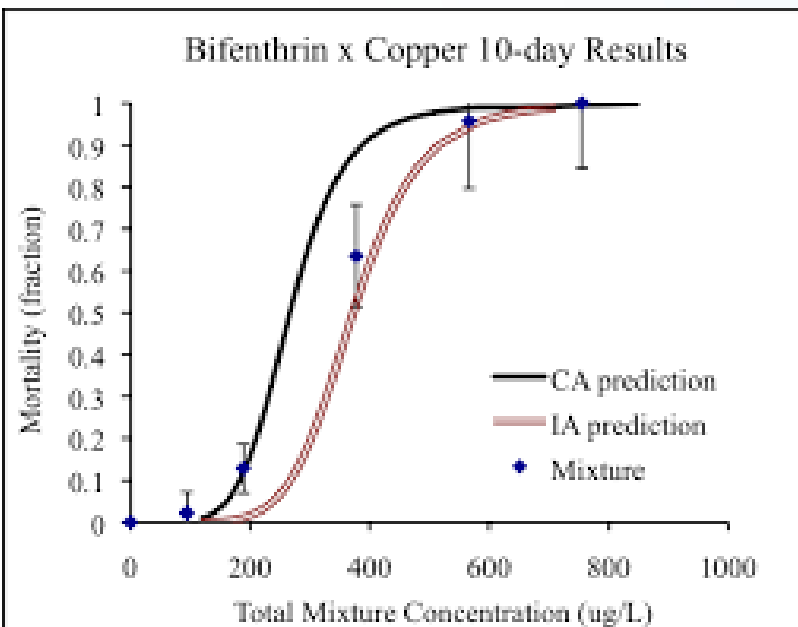


Fig. 3. Observed and predicted algal toxicity of mixtures of 16 dissimilarly acting substances. (A) Mixture 1: components mixed in the ratio of their individual EC<sub>50</sub> values. (B) Mixture 2: components mixed in the ratio of their individual EC<sub>1</sub> values. (●) experimentally observed toxicity; (○) controls; (···) prediction according to concentration addition; (—) prediction according to independent action.