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 vlastnosti 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)

↓

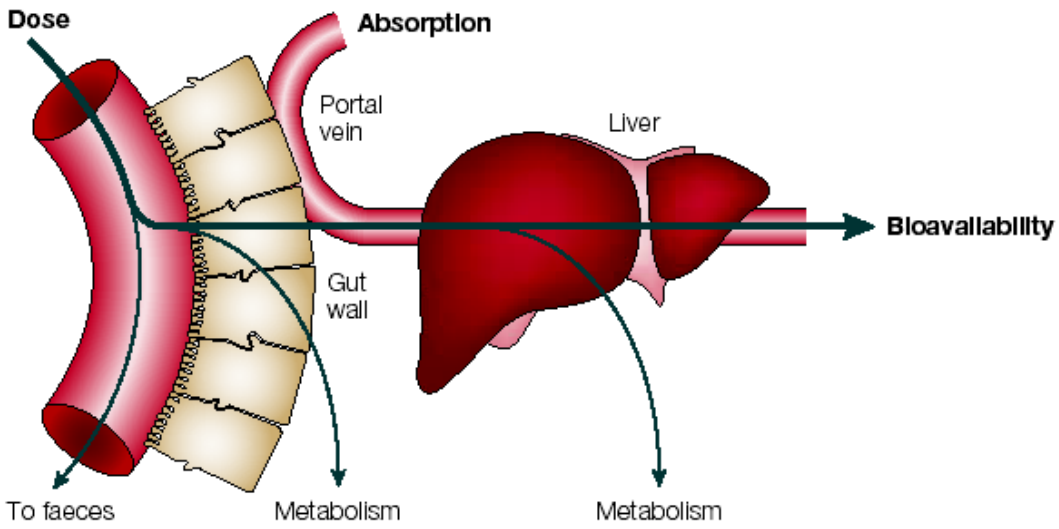
vývoj a validace predikčních toxikologických výpočetních modelů

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

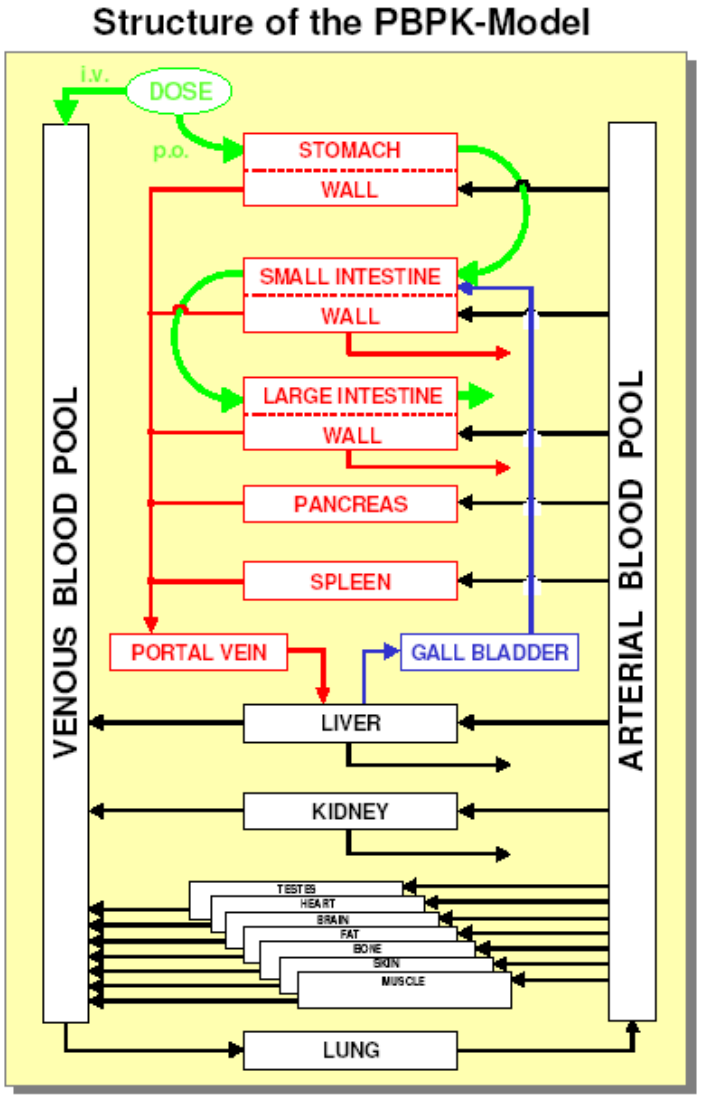
- **Orální biodostupnost** = frakce dávky, která se dostane do krevního oběhu (po 1. průchodu metabolizujícími játry)
- **Absorpce** = frakce dávky, která projde přes střevní stěnu

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 t1/2) - čas po němž se koncentrace v plazmě sníží na polovinu

- **PK-sim**
- **Cloe, PKexpress**
- **Gastroplus**



Key features are:
- Single compartment model of small intestine with plug flow wi 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

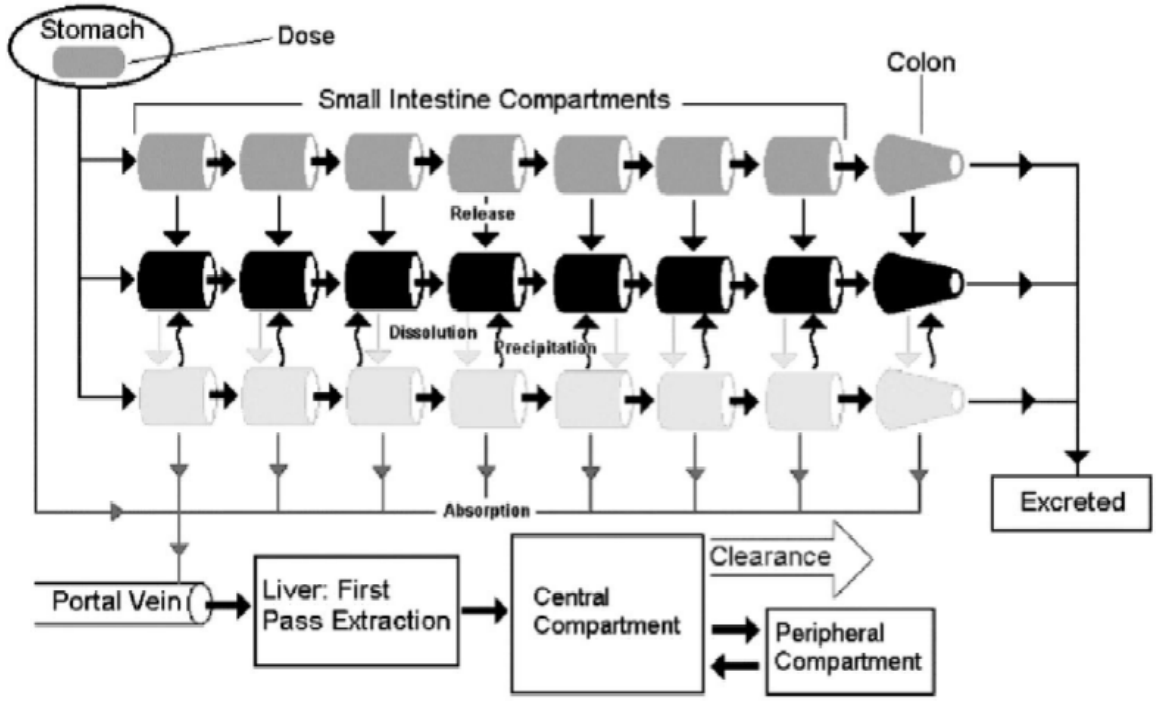
rozpustnost v tucích a ve vodě:

látky hydrofilní

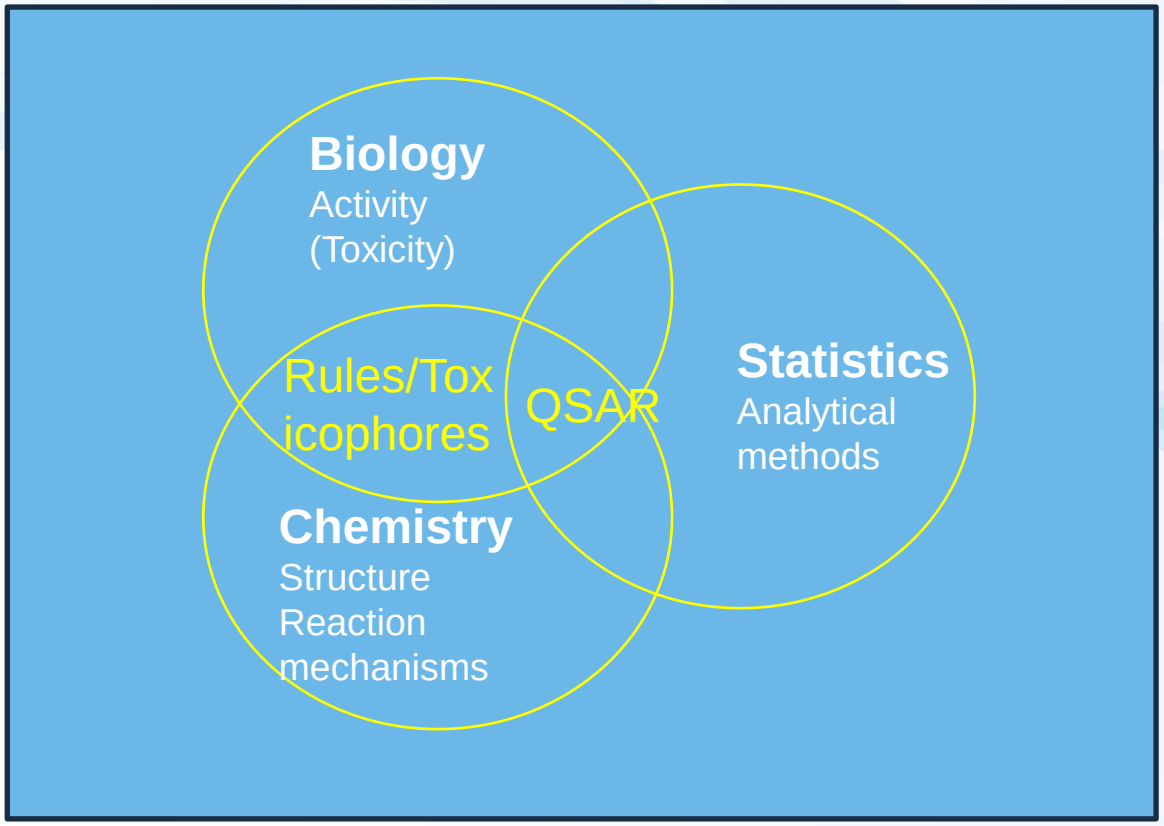
látky lipofilní

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

Vliv cesty vstupu – způsobu expozice



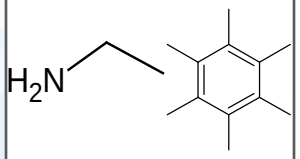
Predikce toxicity



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

Využití predikovaných dat pro hodnocení toxicity

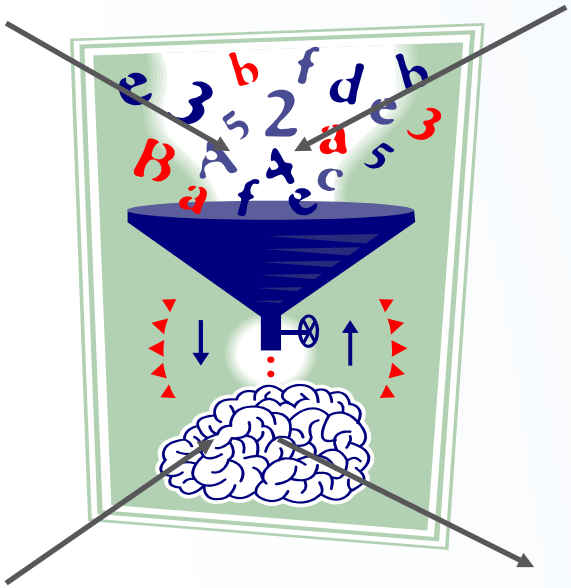
Toxikofory

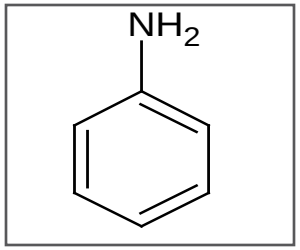


Znalosti

Rešerše…

Zkušenosti…

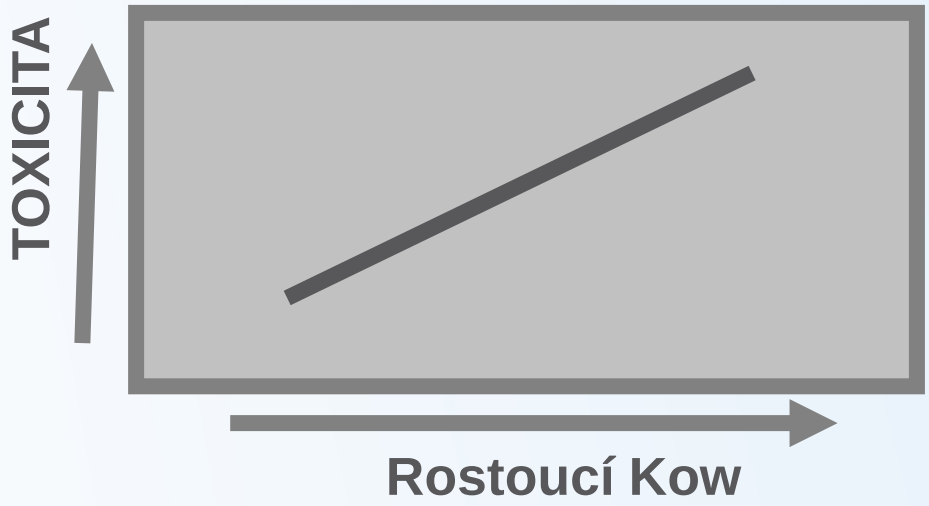




Látka pravděpodobně toxická pro …

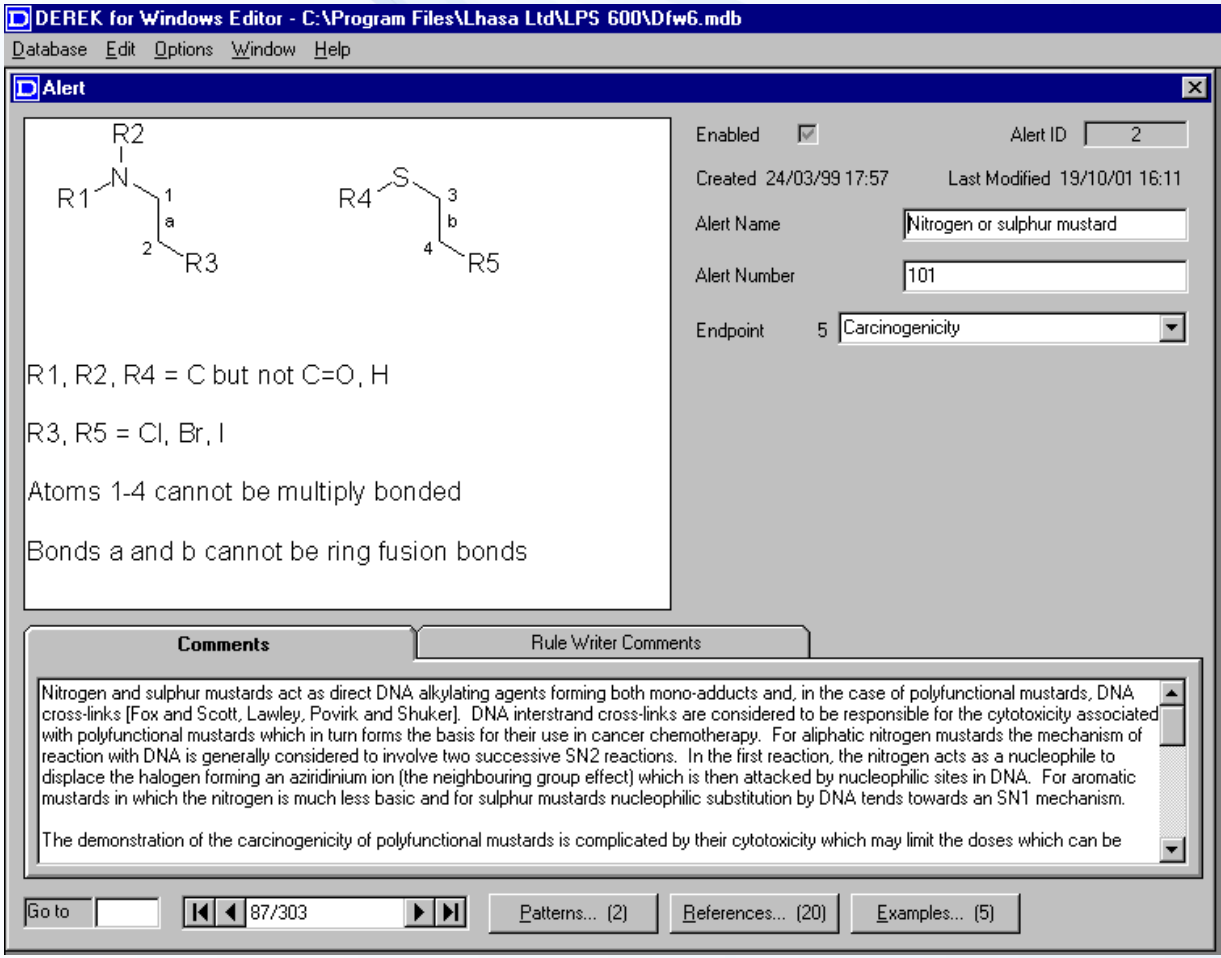
Predikovaná data

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

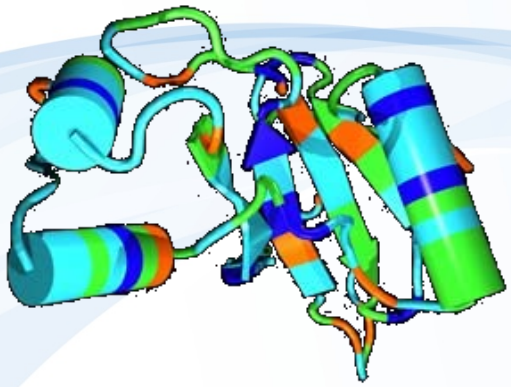


Příklad expertního systému: Derek

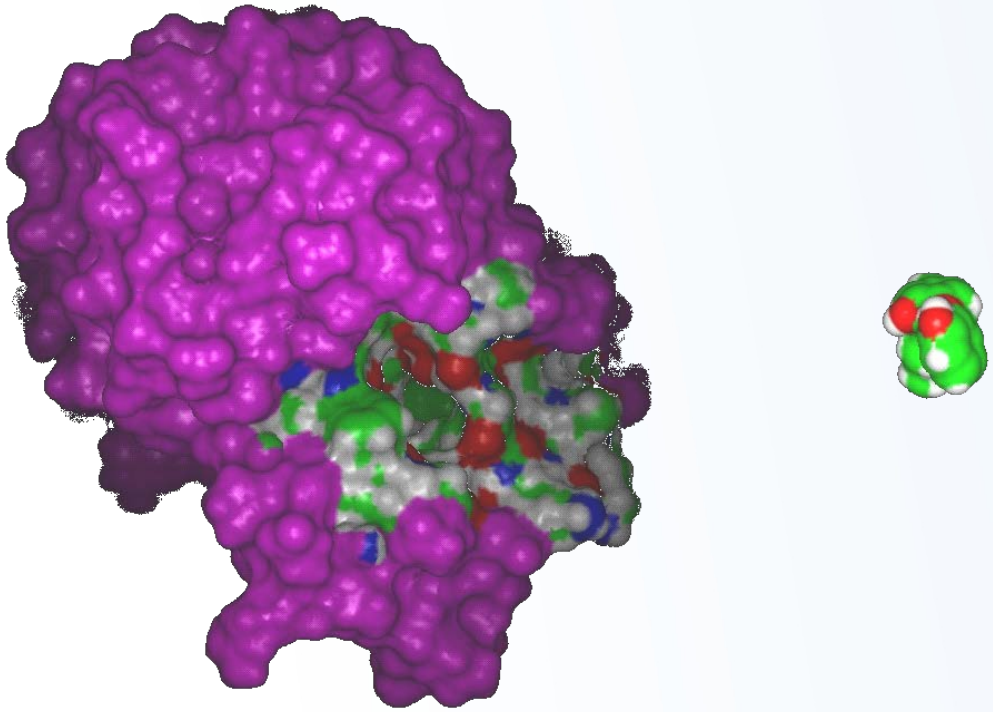
- 303 pravidel založených na strukturních parametrech nebo toxikophorech
- 35 tox. endpointů
- refs na literární zdroje
- funguje dobře např. pro mutagenitu



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

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

AlphaFold Protein Structure Database - over 200 million protein structure predictions

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

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

QSAR

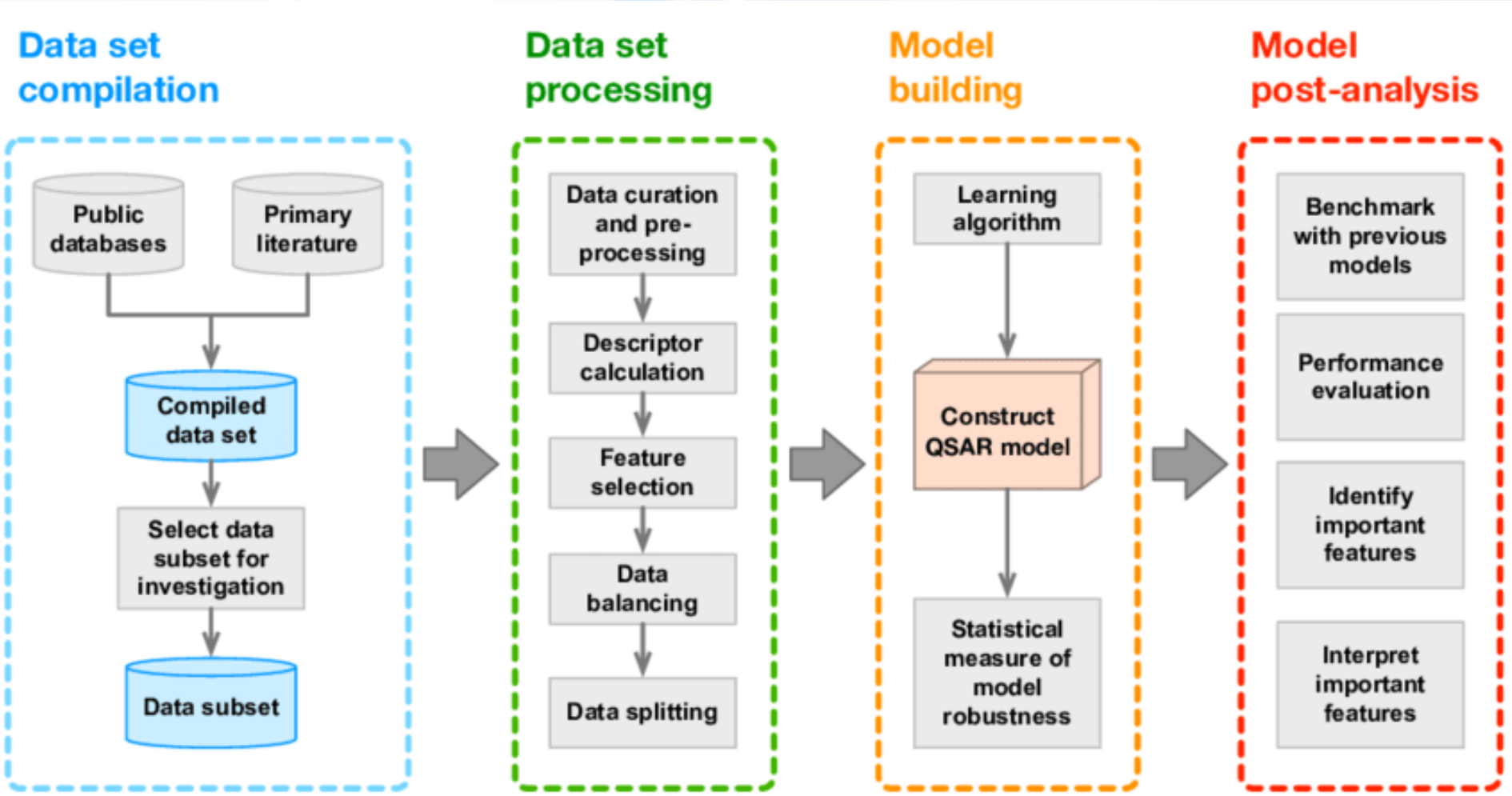
Quantitative Structure Activity Relationship

- 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.

$$BAi = f(Xi)$$

Budování QSAR



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

Biologická Aktivita = konst + (C_1 P_1) + (C_2 P_2) + (C_3 P_3) + ...

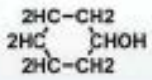
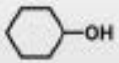
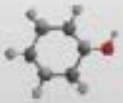
$$r^2 = \frac{regression\ variance}{original\ variance}$$

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

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

QSAR

Molecular structure

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

Molecular Descriptors

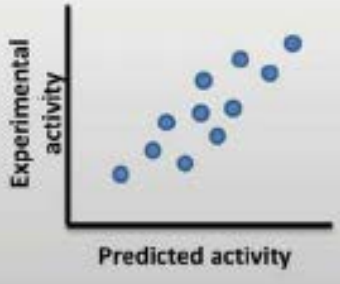
- Constitutional
- Electronic
- Geometrical
- Hydrophobic
- Lipophilicity
- Steric
- Quantum Chemical
- Topological

Multivariate Analysis

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

Correlation to Activity

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



Model Validation

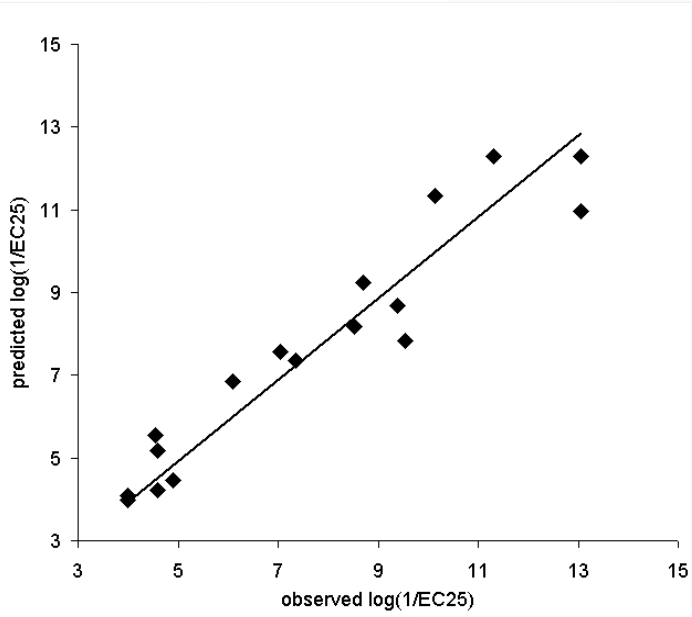
- Residual Analysis
- External validation
- Receiver operating characteristic
- Y-randomization testing

QSAR: vztah-korelace aktivity/toxicity se strukturou

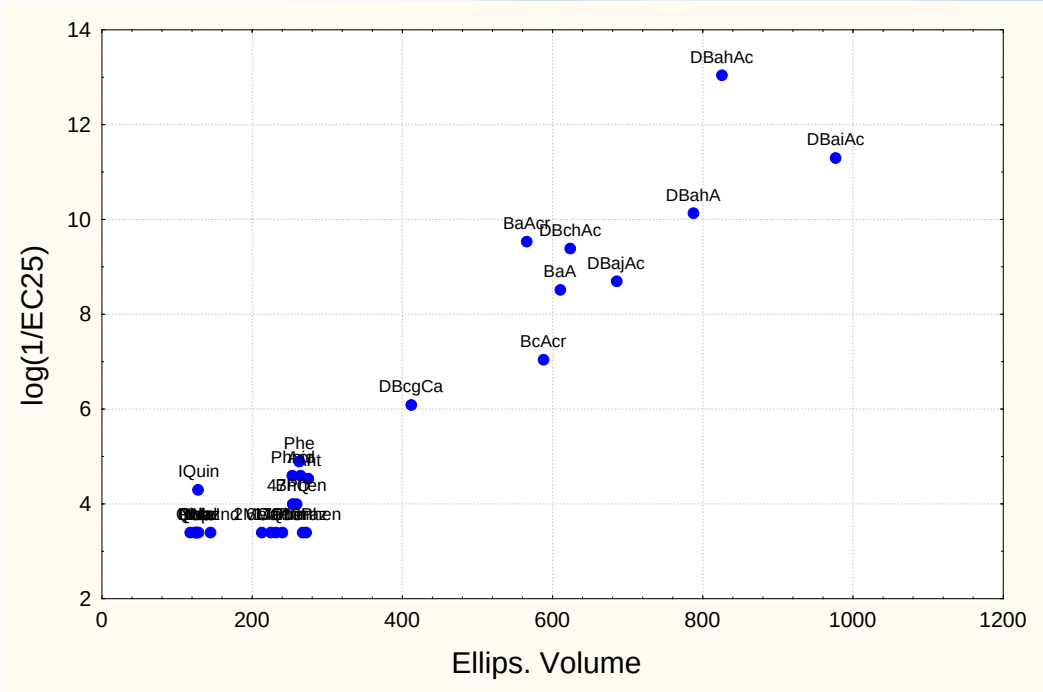
- Predikce toxicity (vlastnosti) pro netestované látky podobné struktury

Potence aza-PAHs k aktivaci AhR

log(1/EC25) = 1.14 délka – 2.12 planarita + 2.82
(R = .95)



log(1/EC25) = 0.011 EllipsVol + 1.544
(R = 0.95)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

QSAR

• nutná validace modelu, statistické testy významnosti modelu

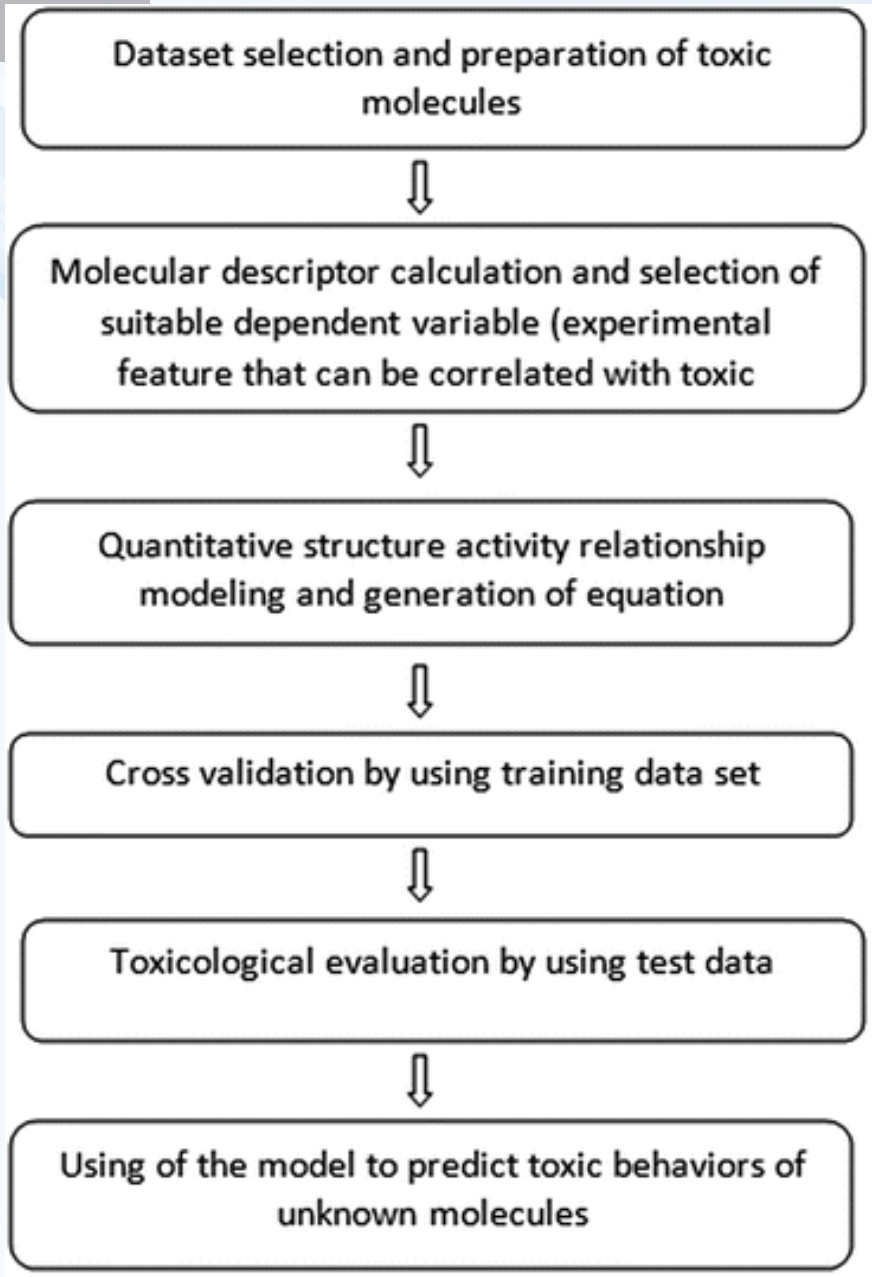
MODELOVACÍ DATA
TRENOVACÍ DATA
VALIDAČNÍ DATA

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

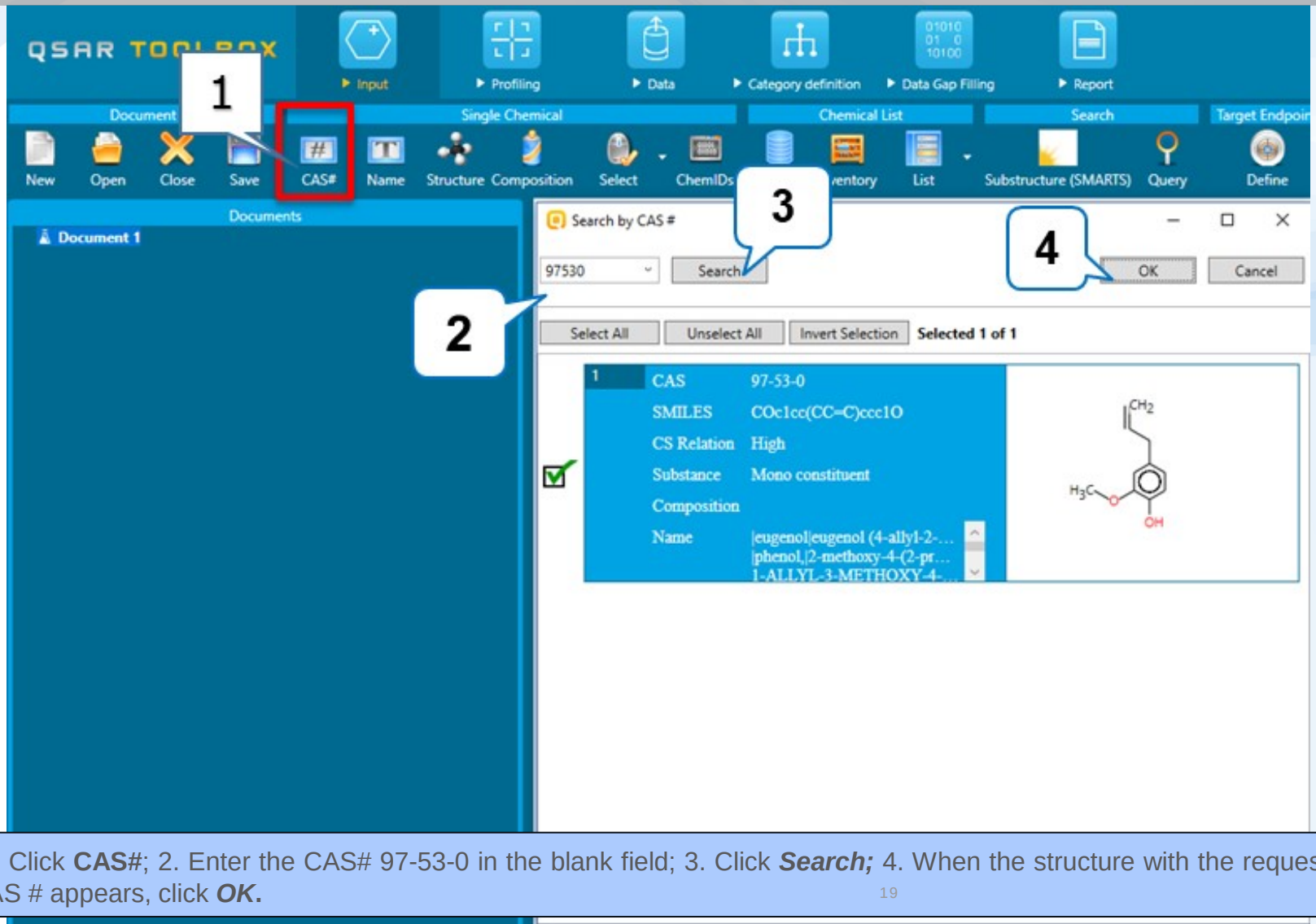
= Read-Across Assessment Framework (RAAF)
https://echa.europa.eu/documents/10162/13628/raaf_en.pdf

- různé scénáře pro read-across
- doložení důkazů o tom, proč lze údaje o jedné látce použít k doplnění chybějících údajů o látce jiné
- strukturně podobné látky
- látky biotransformované na stejné nebo strukturně podobné látky

The OECD QSAR Toolbox for Grouping Chemicals into Categories

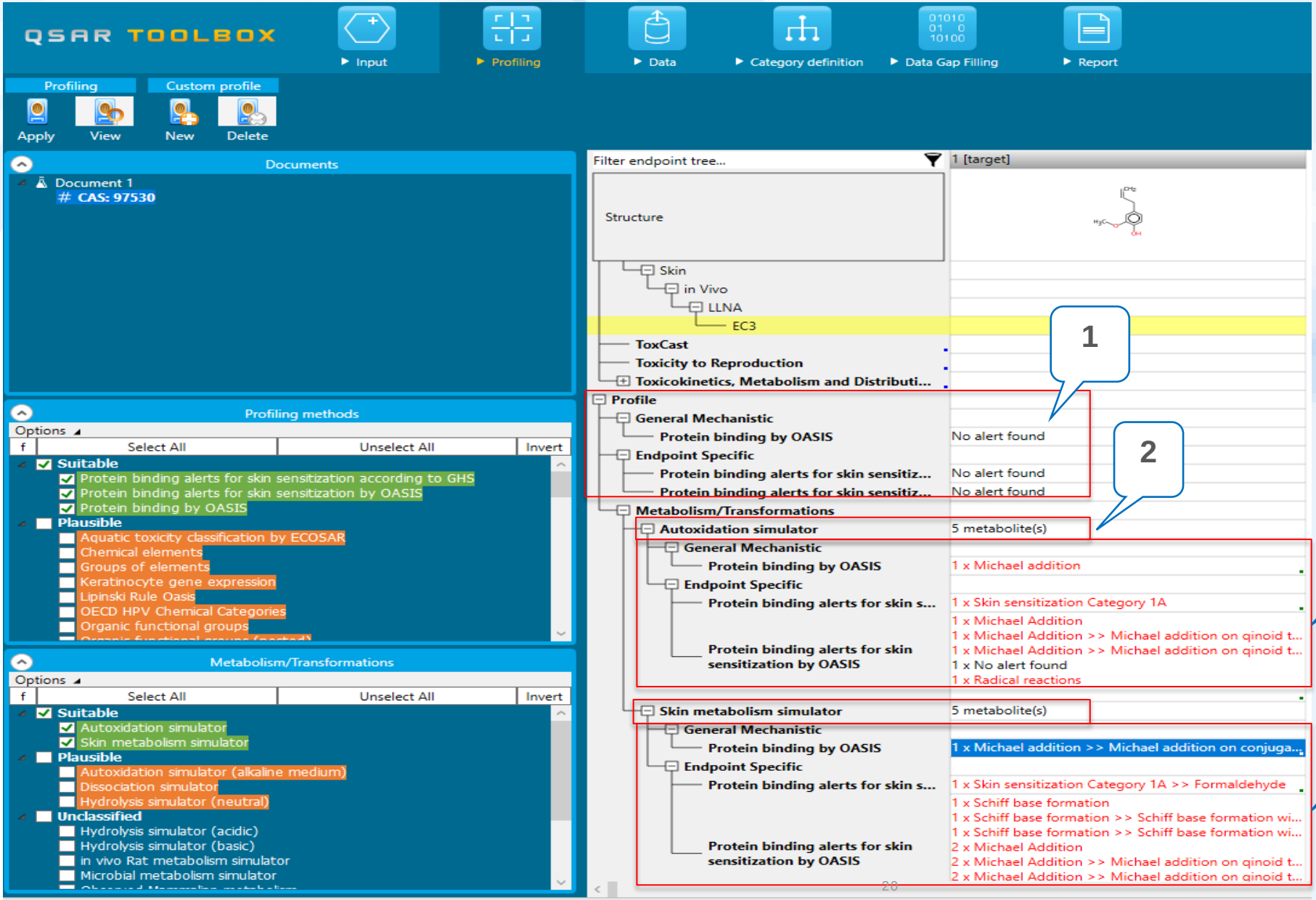
https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/oecd-qsar-toolbox.htm

Input target chemical by CAS#



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

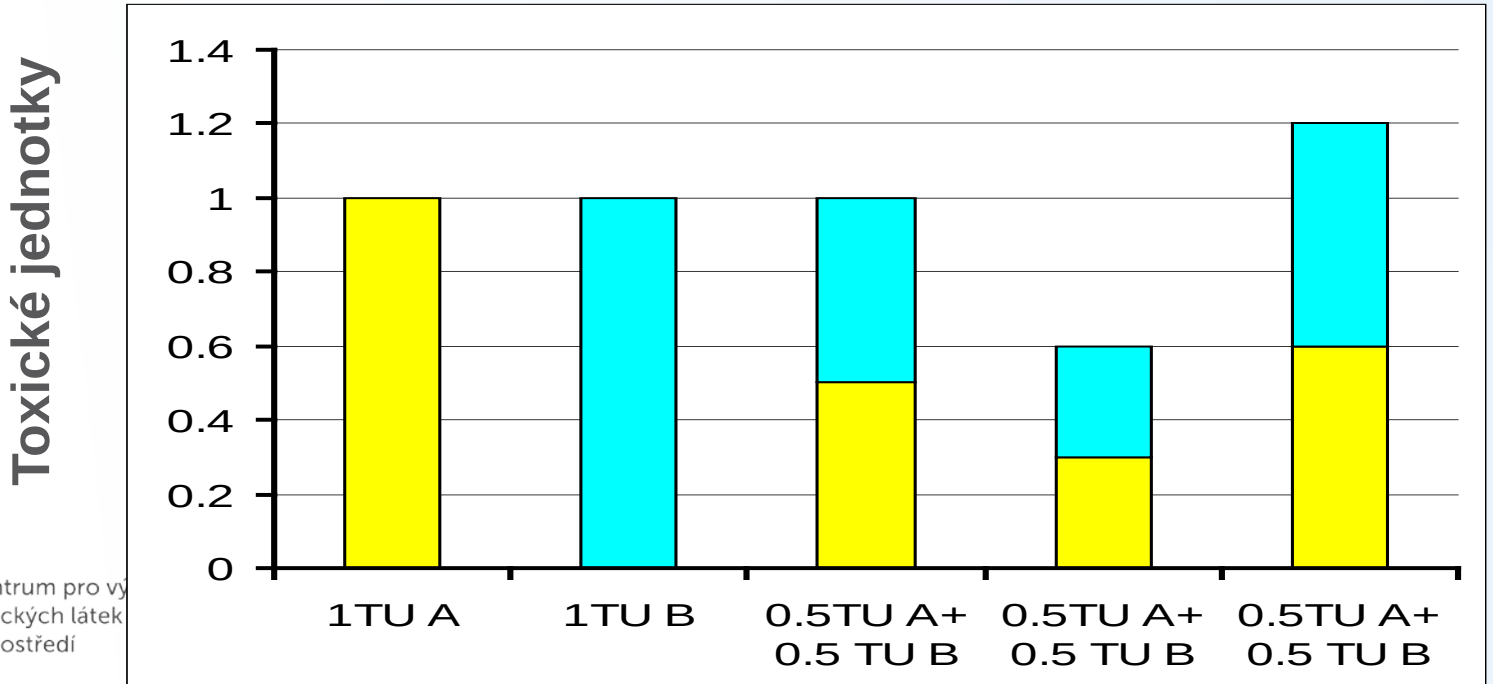


Působení látek ve směsích

Vzorky v prostředí = KOMPLEXNÍ SMĚSI

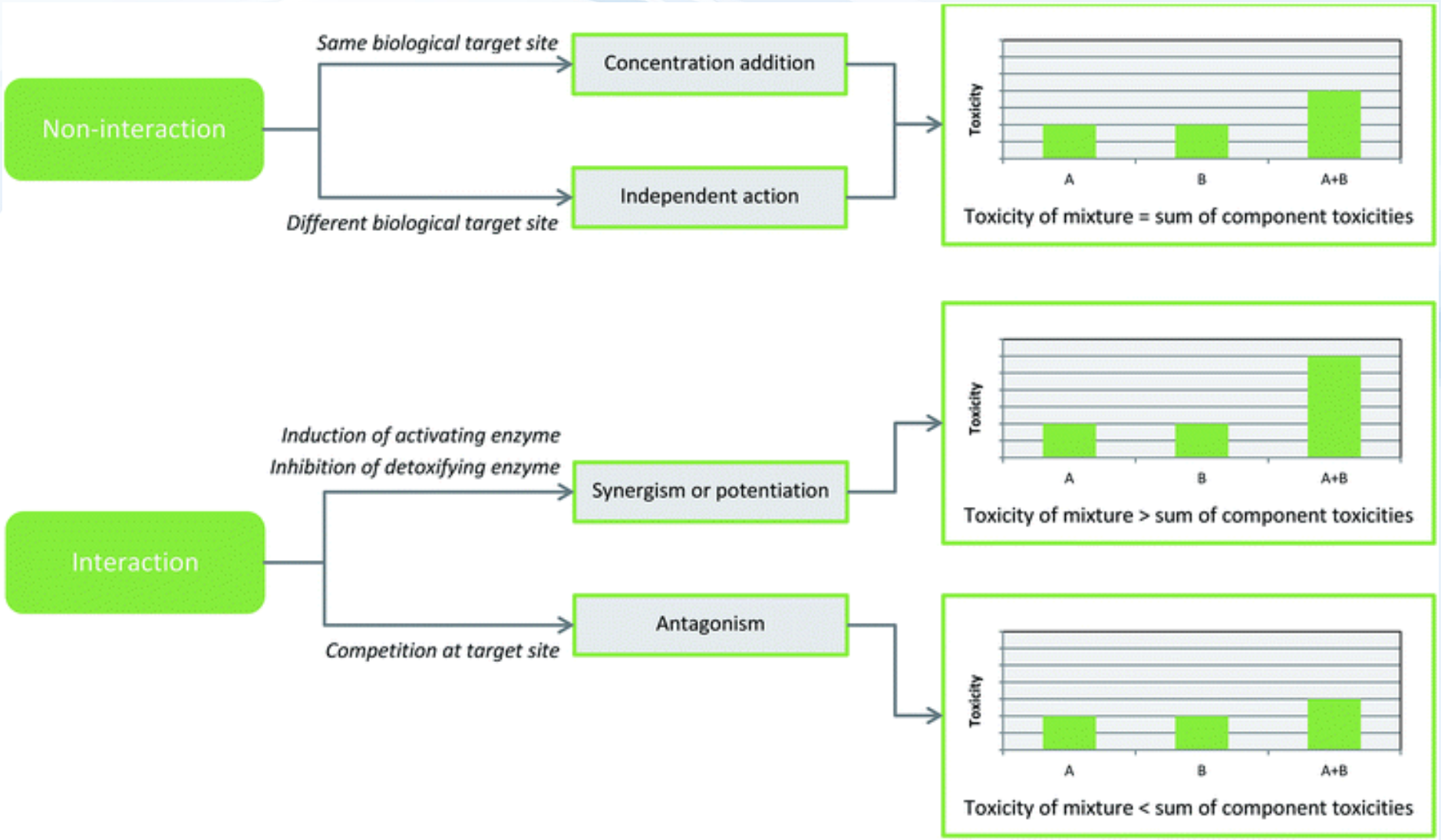
- Látky se mohou v efektech ovlivňovat

- 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



Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Působení látek ve směsích



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. estrogenity či androgenity, 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 potencí (REP), které určují, kolikrát je látka méně efektivní, než nejsilnější endogenní ligand 17β-estradiol/ testosteron

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

Další modely pro predikci účinků směsí

Model nezávislého působení

(Independent Action, IA)

– látky způsobují daný účinek nezávisle na sobě – jiným mechanismem

Model součtu účinků

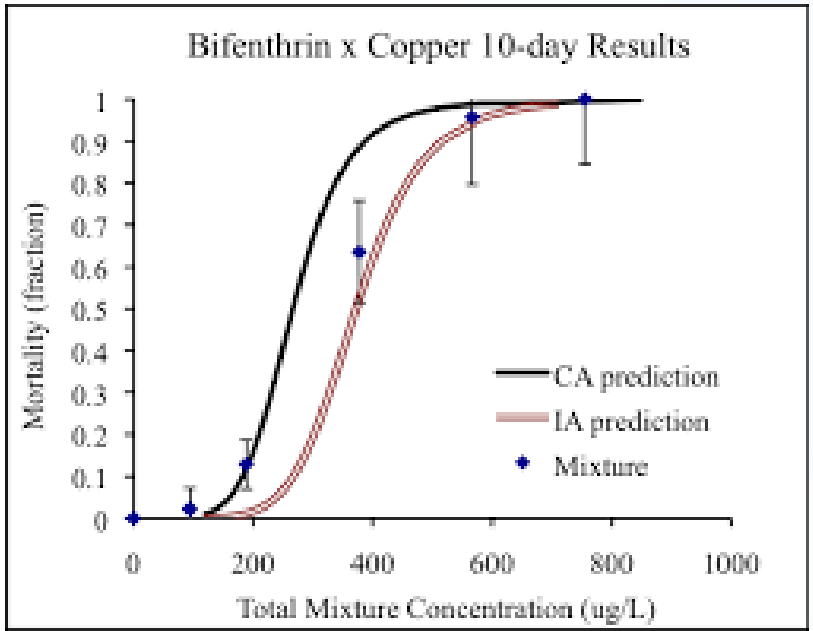
(Effect Summation, ES)

- 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



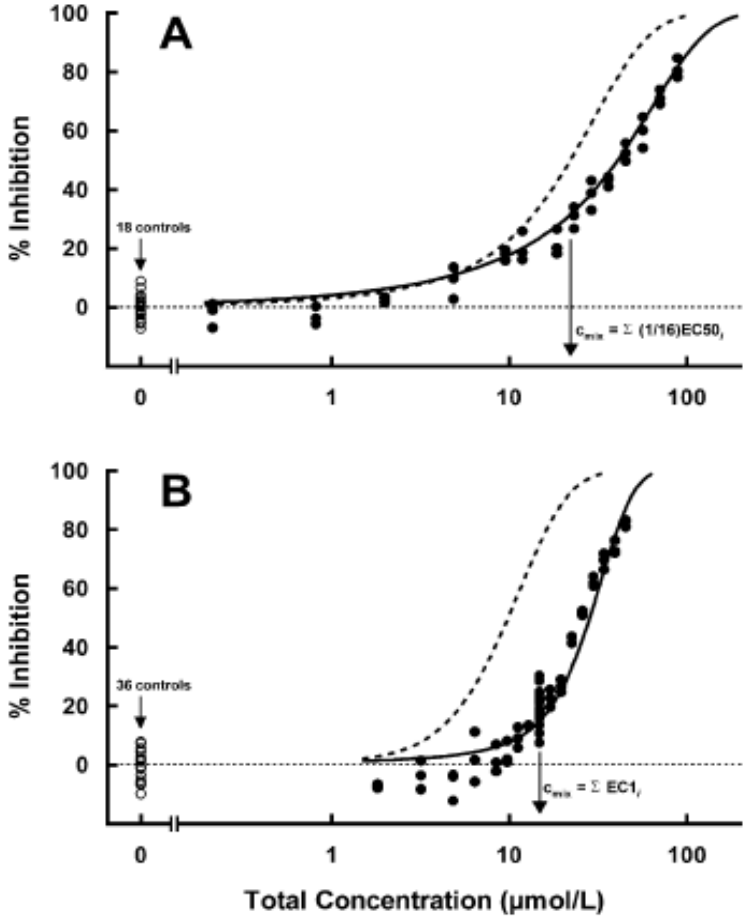


Fig. 3. Observed and predicted algal toxicity of mixtures of 16 dissimilarly acting substances. (A) Mixture 1: components mixed in the ratio of their individual EC50 values. (B) Mixture 2: components mixed in the ratio of their individual EC1 values. (●) experimentally observed toxicity; (○) controls;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

Faust et al. / Aquatic Toxicology 63 (2003) 43-63