



## Predikční toxikologie

Predikční toxikologie se zabývá metodami stanovení toxicity a toxických indexů chemických látek, které dosud nebyly testovány experimentálně. Jsou to metody typu *in vitro* (buňky, tkáně, nízké organismy) a *in silico* (stanovení/odhad výpočtem), patřící pod dnes používaný termín alternativní metody testování. Záměrem těchto metod je získat informaci o nebezpečnosti chemických látek pro zdraví rychle, levně a s co nejmenším utrpením pokusných zvířat. Laboratoř predikční toxikologie se zabývá zejména výpočtovými metodami typu QSAR (z ang. Quantitative Structure-Activity Relationships, analýza kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou účinností) a jednoduchými rychlými laboratorními metodami jako je stanovení akutní toxicity pomocí oligochaeta *Tubifex tubifex* (nitěnky) nebo primárních hepatocytů z jater potkana ve spolupráci s jinými.

Termín "alternativní" je v oblasti toxikologického testování užíván pro označení testů, které nahrazují klasické testy na pokusných zvířatech a poskytují minimálně stejně cennou informaci jako klasické, jsou rychlejší a pokud možno ekonomicky výhodnější. S tím spojovaný termín "integrováný" znamená sdružení více metod, většinou zcela odlišných (výpočtové, fyzikálně chemické, biologické). Takové vlastnosti mají metody analýzy QSAR.

Analýza QSAR se v moderní formě objevuje na rozhraní 50. a 60. let minulého století. Nejprve se jí chopili farmakologové a farmaceuti ve snaze ji využít pro nalezení co nejúčinnějšího léčiva, což povaha analýzy QSAR umožňuje. V 80. letech začala v jejím využívání dominovat toxikologie<sup>1</sup> se snahou využít predikčních vlastností modelů QSAR pro odhad velikosti toxických a nežádoucích účinků chemických látek dosud netestovaných před jejich používáním a distribucí mezi lidmi a do přírody a k odhadu rizika při expozici chemickým látkám. Tak jsme se dostali k možnosti vyhovět programům chemické bezpečnosti "bez myší" a k "analytické chemii bez zkumavek" - k predikční toxikologii.

Stanovení pomocí oligochaeta *Tubifex tubifex*<sup>2</sup> umožňuje získat velmi rychle (3 minutový test) a levně (koupí se cestou do laboratoře v prodejně akvaristiky stále za pár korun) spolehlivé údaje o EC50 pro inhibici pohybu nitěnek. Tyto údaje korelují s údaji, které se naměří v dlouhodobějších pokusech např. s prvoky, ale i na rybách. A údajů se získá velké množství, což umožňuje zpracování do kvalitních modelů QSAR. Termíny "experimentální toxikologie" a "metody *in silico*, stanovení výpočtem", nejsou tak v takovém rozporu, jak by se mohly zdát. Metody *in silico*, v první řadě analýza QSAR, patří mezi alternativní metody, které stejně jako metody experimentální toxikologie pomáhají identifikovat nebezpečnost (hazard) látek, tedy jejich toxické a nežádoucí účinky.

### Něco z historie

Přesto, že ještě v 60. letech minulého století nebyla koncepce QSAR příliš přijímána, badatelé ze skotské edinburské skupiny, významný chemik Crum-Brown a jeden ze zakladatelů moderní farmakologie Fraser, již v roce 1869 napsali: "...Nemůže být žádná rozumná námitka proti tomu, že existuje vztah mezi fyziologickým účinkem látky a jejím chemickým složením a konstitucí...". Svůj článek příhodně nazvali "On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action"<sup>3</sup>. Toto téma bylo náplní jedné ze



dvou slavných přednášek<sup>4</sup>, které Sir Frazer přednesl (ve svých 31 letech) na Royal College of Physicians of Edinburgh v roce 1872 (podle<sup>5</sup>).

V roce 1893 uzavřel Richet své studie toxických účinností různých alkoholů, etherů, aldehydů a ketonů tím, že velikost jejich účinků je úměrná jejich rozpustnosti ve vodě.<sup>6</sup> Nezávisle na sobě Mayer<sup>7</sup> a Overton<sup>8</sup> popsali, že narkotická účinnost látek koreluje s jejich rozdělovacím koeficientem mezi olej a vodu. Kritický přelom v kvantitativních studiích, které byly dosud zcela empirické, nastal prací Fergusona<sup>9</sup>, který použil představ termodynamiky. Konstatoval, že stejně velký účinek mají látky při stejně velkém chemickém potenciálu v místě účinku. Řadou studií<sup>10</sup> tak dospěla analýza QSAR ke své moderní historii, která byla odstartována pracemi Zahradníka a Chvapila<sup>11</sup> a Hansche<sup>12</sup>.

### **Kvantitativní vztahy struktura - účinnost**

**QSAR** je zkratka pro kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností (z angl. Quantitative Structure - Activity Relationships) chemických látek (průmyslově vyráběných, nikoliv přirozeně se vyskytujících). Zkratka QSAR se stala nejrozšířenější, dnes jediné užívaná, od 1. Evropské QSAR konference v Praze v roce 1973, kdy se objevila v titulu sborníku konference<sup>13</sup>.

Analýza QSAR je analýza souboru experimentálních údajů o velikosti biologických a fyzikálně chemických vlastností chemických látek metodami matematické statistiky. Soubor údajů se může týkat **série látek** strukturně podobných - homologická série, nebo strukturně různorodých - heterogenní série. Čím větší série, tím výhodnější pro odvození QSAR modelu/rovnice. Rozsah hodnot biologických i fyzikálně chemických vlastností použitých k tvorbě modelu vymezují oblast jeho použitelnosti.

**Model/rovnice QSAR** vyjadřuje vztah mezi velikostí změny v biologické účinnosti a velikostí změny struktury molekuly, třeba změny substituentů (homologická série derivátů benzenu: benzen, toluen, anilin, chlorbenzen, a další), kvantitativně. Za předpokladu, že změna je vztažena ke stejné počáteční struktuře (substituent vodík), můžeme rovnici zapsat jednoduše jako (*I*):

$$BA_i = f(X_i), (I)$$

kde  $BA_i$  je biologická účinnost látky *i*, *f* matematická funkce (přímky, paraboly a jiné),  $X_i$  vlastnost příslušející struktuře látky. Termín **účinnost** v analýze QSAR znamená vždy velikost účinku.

Výsledkem analýzy může být matematická formule, případně soustava formulí a pravidel. Využije se při tom znalost fyzikálně chemických vlastností látek, které jsou získávány mnohem jednodušeji než údaje biologické nebo je lze vypočítat. Model - rovnice - je vytvořen z experimentálních dat a tak simuluje test a testovací objekt, např. LD50 na myši po inhalační expozici. Počítač, který obsahuje modely a metody analýzy QSAR **simuluje** experimentální testovací objekt ("myš v počítači").



Modely QSAR jsou matematické rovnice, kde levá strana je obsazena velikostí vlastnosti biologické v log tvaru, log LD50(myš, iv, 24 hod.), pravá strana velikostí vlastností fyzikálně chemických, topologických nebo kvantově chemických indexů (obecně zvané molekulové deskriptory). Největší nesnáze modelů QSAR je skryta v použitých experimentálních údajích, jejich správnosti a dostupnosti.

To, že kvantitativní vztah mezi chemickou konstitucí látek a jejich biologickou účinností existuje lze vysvětlit znalostmi a představami molekulové biologie a fyzikální chemie. Za prvé, vlastnosti fyzikálně chemické (relativní molekulová hmotnost, bod tání, tense par, spektra a další) i biologické (LD50 pro myš po intravenosním podání za 24 hodin, EC50 pro inhibici pohybu červů po třiminutové expozici, inhibiční koncentrace růstu prvoků IGC50 po dvoudenní expozici, a další) jsou společně dány uspořádáním elektronů v molekule, molekulovými orbitály té které sloučeniny. Za druhé, biologická účinnost, velikost biologického účinku, je určena kritickým procesem, který je nejpomalejší a který určuje velikost účinku - koncentraci účinné látky v místě účinku. Ten může být řízen vlastnostmi molekul trojího druhu (se čtvrtou skupinou konstant, které nelze zařadit ani do jedné ze tří uvedených):

- hydrofobní ("lipofilní")
- elektronové (polární)
- sterického charakteru
- případně ostatní, výše nezařaditelné, např. kombinované z více výše zmíněných příspěvků (molární refrakce, parachor a jiné), topologické indexy a další.

Jednotlivým příspěvkům jsou přiřazovány **fyzikálně chemické vlastnosti**. Ty mohou být odvozeny z procesů, které s testovanými biologickými (toxickými) žádný přímý vztah mít nemusí - ale mohou. Nejužívanější fyzikálně chemickou vlastností se stal rozdělovací koeficient látek mezi n-oktanol a vodu - z toho lze usoudit, že onen kritický proces pro velikost toxického účinku je ukryt v toxikokinetických pochodech

Nejobecnější tvar QSAR rovnice představuje **Hanschova rovnice (2)**:

$$\log BA_i = k_1 \cdot \log P_i + k_2 \cdot (\log P_i)^2 + k_3 R_i + k_4 \cdot S_i + k_5 \quad (2)$$

kde  $BA_i$  je biologická účinnost látky  $i$ ,  $\log P_i$  je rozdělovací koeficient látky  $i$  mezi n-oktanol a vodu,  $R_i$  je konstanta simulující reaktivitu látky  $i$ ,  $S_i$  je konstanta simulující sterické uspořádání molekuly látky  $i$ . Hanschova rovnice, obsahující substituentové konstanty (rovnice 3), vypadá následovně:

$$\log BA_i = k_1 \cdot \sigma_i + k_2 \cdot \sigma_i^2 + k_3 \cdot \rho_i + k_4 \cdot E_s + k_5 \quad (3)$$

kde  $\sigma_i$  je Hanschova substituentová konstanta hydrofobnosti substituentu  $i$ ,  $\rho_i$  jeho Hammettova substituentová konstanta,  $E_s$  Taftova sterická konstanta a koeficienty  $k$  jsou čísla vycházející z regresní analýzy.

Nejčastěji model vystačí s hydrofobními konstantami (rovnice 4 a5):

$$\log BA_i = k_1 \cdot \log P_i + k_2, \text{ případně } (4)$$



$$\log BA_i = k_1 \cdot \log P_i + k_2 \cdot (\log P_i)^2 + k_3 \quad (5)$$

Tvar Hammettovy rovnice použil k vytvoření modelu Rudolf Zahradník (- rovnice) (6):

$$\log \left( \frac{BA_i}{BA_{et}} \right) = \rho \cdot \sigma_i \quad (6)$$

kde  $BA_i$  je velikost biologického účinku látky  $i$ ,  $BA_{et}$  velikost biologického účinku ethyl derivátu jako referenční látky, konstanta zahrnující podmínky biologického testu a konstanta, popisující vliv alkyly.

Uvedené modely jsou v predikční toxikologii nejpoužívanější. Ve farmakologii zakořenila spíše **fragmentální analýza**, jež výpočtem konstant *de novo* (Free-Wilsonova analýza) slouží při hledání struktury molekul nových účinných léčiv. Fragmentální analýza spočívá v představě, že každý fragment molekuly přispívá určitou, vždy stejnou, velikostí biologického účinku do biologické účinnosti celé molekuly (rovnice 7):

$$BA_i = a_n + u \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad (7)$$

kde  $a_n$  jsou příspěvky fragmentů molekuly a  $u$  je biologická účinnost té části molekuly, která se nemění. O předpokladu aditivity těchto příspěvků se vedou diskuse.

**Metody nebo techniky analýzy QSAR** jsou obvyklé i méně obvyklé metody matematické analýzy: regresní analýza s jedním nebo více parametry, lineární i nelineární, faktorová analýza, analýza hlavní komponenty, shluková analýza, rozpoznávání obrazců (pattern recognition), diskriminantová analýza, umělá neuronová síť, kybernetické techniky jako je metoda učícího se stroje, genetický algoritmus a jiné

**Statistické hodnocení** modelů QSAR je nedílnou součástí modelů. Korelační rovnici musí vždy doprovázet údaj o počtu párů (biologický účinek a fyzikálně chemická vlastnost) použitých dat, tj. počet látek v sérii ( $n$ ), korelační koeficient ( $r$ ), standardní odchylka odhadnutých dat ( $SD$ ), případně F-testy a t-testy. Modely QSAR pro legislativní účely musí doprovázet další statistické údaje o dobré shodě, prediktivitě, reprodukovatelnosti<sup>14,15</sup>.

Samostatnou kapitolu tvoří **extrapolace toxických indexů** mezi různými biologickými testy<sup>16</sup> (QAAR - Quantitative Activity - Activity Relationships, případně QTTR - Quantitative Toxicity - Toxicity Relationships, kvantitativní vztahy mezi dvěma různými toxickými indexy, stanovené na různých testovacích objektech, dvěma aktivitami - účinnostmi, např. extrapolace  $EC_{50}$  pro rybu z  $EC_{50}$  na nitěnkách pomocí matematické formule). K tomuto stále živému problému přispívá analýza QSAR: vysoký, nejméně 85%, podíl modelů QSAR vystačí s logaritmem rozdělovacího koeficientu látek mezi  $n$ -oktanol a vodu jako molekulovým deskriptorem. To znamená, že pravá část jejich rovnice obsahuje stejnou nezávisle proměnnou  $x - \log P$ , a to umožňuje vzájemnou korelaci levých stran  $y - \log$  biologické účinnosti. Vztah pro vzájemný přepočítání toxických indexů lze i vypočítat. Ten je formálně matematický, nemá nic společného s podobností mechanismů (i když může).



Kombinace modelů QSAR s modely ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) se stává výzkumně zajímavá i komerčně výhodná. 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. Jako **expertní programy** pro odhad i kvality toxického účinku výpočtem, jsou označovány soubory pravidel, znalostí, údajů o toxických indexech, statistického hodnocení, výpočetních programů molekulových deskriptorů a metod matematické statistiky.

### Programy chemické bezpečnosti a QSAR

Světově prosazovaný REACH je chemická legislativa, kterou předložila Evropská Unie v roce 2003, schválil Evropský parlament s účinností od 1. června 2007 a převzaly ostatní státy a je zkratkou z anglického Registration, Evaluation, Authorisation (and restriction) of Chemicals. Program má zajistit, aby nejpozději do roku 2020 byly používány pouze chemické látky se známými vlastnostmi a způsobem, který nepoškozuje životní prostředí a zdraví člověka. Záměrem těchto programů je prevence a snížení vlivu chemických látek a jejich směsí na zdraví lidí i na stav životního prostředí.

Další cíl je snížení počtu obratlovců, kteří jsou nutní pro testování toxicity chemických látek. To ale tvoří nedílnou součást ochrany přírody, tedy i lidí, před toxickými a nežádoucími účinky chemických látek a chemických přípravků. Důsledkem rozhodnutí o programech chemické bezpečnosti jsou tedy zvýšené informační, ekonomické, ale i etické požadavky. A těm všem analýza QSAR vyhovuje. Pro uspokojení požadavků programu REACH neexistuje dnes žádná jiná, dostatečně vyvinutá a prověřená metoda.

Hledají se kritéria modelů QSAR, aby výsledky, které umožňují získat, byly použitelné pro legislativní účely místo klasických, prověřených metod (*in vitro* i *in vivo*). Probíhají jednání na úrovni světových a světově uznávaných organizací (OECD, EU, EPA US)<sup>17</sup>. Některé státy již dnes analýzu QSAR a její modely pro legislativní účely úspěšně a bez obtíží používají.

### LITERATURA

1. Tichý M. (red.): *QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry*. Pharmacochimistry Library Vol. 8, Elsevier, Amsterdam, New York (1985)
2. Tichý M., Rucki M., Hanzlíková I., Roth Z.: *ATLA-Altern. Lab. Anim.* 35, 229 (2007)
3. Crum-Brown A., Fraser T. R.: *Trans. Roy. Soc. (Edinburg)* 25, 693 (1868-1869)
4. Frazer T. R.: *Brit. Med. J.* ii, 457 (1872)
5. Gaddum J. H.: *Ann. Rev. Pharmacol.* 2, 1 (1962)
6. Richet M.C.: *C. R. Soc. Biol.* 45, 775 (1893)
7. Mayer H.: *Arch. Expt. Pathol. Pharmacol.* 42, 109 (1899)
8. Overton E.: *Studien über die Narkose*. Fischer, Jena 1901
9. Ferguson J.: *Proc. Roy. Soc., Ser. B* 127, 387 (1939)
10. Waisser K.: *Chem. Listy* 92, 867-869 (1998).



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

11. Zahradník R., Chvapil M.: *Experientia* 16, 511 (1960)
12. Hansch C., Maloney P. P., Fujita T., Muir R. M.: *Nature* 194, 178 (1962)
13. Tichý M. (red.): *Quantitative Structure-Activity Relationships*. Sborník 1. European QSAR Symposium, Praha 1973. *Experientia Suppl.* 23, Akadémia Kiadó, Budapest, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart (1976)
14. Jaworska J. S., Comber M., Auer C., Van Leeuwen C. J.: *Environ. Health Persp.* 111, 1358 (2003)
15. Eriksson L., Jaworska J., Worth A. P., Cronin M. T. D., Mc Dowell R.M., Gramatica P.: *Environ. Health Persp.* 111, 1361 (2003)
16. Tichý M., Trčka V., Roth Z., Krivucová M.: *Environ. Health Persp.* 81, 321 (1985)
17. Tichý M., Roth Z., Bláha K., Worth A. P.: *Chem. Listy* 99, 675 (2005)