STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

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 "integrovaný" 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[1] se snahou využít predikčních vlastností modelů QSAR pro odhad velikosti toxických a nežádoucích účinků chemických látek dosud netestovaných před jejich používáním a distribucí mezi lidi 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*[2] 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 edinburgské 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 fysiologickým účinkem látky a jejím chemickým složením a konstitucí...".* Svůj článek příhodně nazvali "On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action"[3]. Toto téma bylo náplní jedné ze

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

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.[6] Nezávisle na sobě Mayer[7] a Overton[8] 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[9], který použil představ termodynamiky. Konstatoval, že stejně velký účinek mají látky při stejně velkém chemickém potenciálu v místě účinku. Řadou studií[10] tak dospěla analýza QSAR ke své moderní historii, která byla odstartována pracemi Zahradníka a Chvapila[11] a Hansche[12].

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 jedině užívaná, od 1. Evropské QSAR konference v Praze v roce 1973, kdy se objevila v titulu sborníku konference[13].

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 *(1)*:

$BA_i = f(X_i)$, *(1)*

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 nesnáz 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 tříminutové expozici, inhibiční koncentrace růstu prvoků IGC50 po dvoudenní expozici, a další) jsou společně dány uspořádáním elektronů v molekule, molekulovými orbitaly 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)*:

$\log BA_i = k_1.\log P_i + k_2.(\log P_i)^2 + k_3R_i + k_4.S_i + k_5$ *(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 stérické uspořádání molekuly látky i. Hanschova rovnice, obsahující substituentové konstanty *(*rovnice *3)*, vypadá následovně:

$\log BA_i = k_1.>i + k_2.>i^2 + k_3>i + k_4.E_s + k_5$ *(3)*

kde >i je Hanschova substituentová konstanta hydrofobnosti substituentu i, >i jeho Hammettova substituentová konstanta, E_s Taftova stérická konstanta a koeficienty k jsou čísla vycházející z regresní analýzy.

Nejčastěji model vystačí s hydrofobními konstantami (rovnice *4* a*5*):

$\log BA_i = k_1.\log P_i + k_2$, případně *(4)*

$\log BA_i = k_1.\log P_i + k_2.(\log P_i)^2 + k_3$ *(5)*.

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

log (>i/>et) = pan> *(6)*

kde >i je velikost biologického účinku látky i, >et velikost biologického účinku ethyl derivátu jako referenční látky, konstanta zahrnující podmínky biologického testu a konstanta, popisující vliv alkylu.

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*):

$BA_i = a_n + u$ (n = 1, 2, 3,...) *(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[14,15].

Samostatnou kapitolu tvoří **extrapolace toxických indexů** mezi různými biologickými testy[16] (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 EC50 pro rybu z EC50 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 přepočet 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, Metobolism, 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)[17]. Některé státy již dnes analýzu QSAR a její modely pro legislativní účely úspěšně a bez obtíží používají.

LITERATURA

1. Tichy M. (red.): *QSAR in Toxicology and Xenobiochemistry*. Pharmacochemistry 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. Pharmakol. *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).

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)