

ALTERNATIVNÍ METODY TESTOVÁNÍ TOXICITY CHEMICKÝCH LÁTEK *IN SILICO*

MILON TICHÝ^a, ZDENĚK ROTH^a, KAREL BLÁHA^b a ANDREW P. WORTH^c

^aStátní zdravotní ústav, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,

^bOdbor environmentálních rizik, Ministerstvo životního prostředí, Praha, ^cEuropean Centre for Validation of Alternative Methods, Joint Research Centre, European Commission, 21020 Ispra, Itálie
mtichy@szu.cz

Došlo 7.12.04, přijato 25.2.05.

Klíčová slova: toxicita, predikční toxikologie, *in silico* metody, QSAR, validace

Věnováno Rudolfovi Zahradníkovi, průkopníkovi koncepce kvantitativních vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou účinností.

Obsah

1. Úvod
2. Programy chemické bezpečnosti a alternativní metody testování toxicity
3. Alternativní testování na nižších organismech
4. Extrapolace mezi indexy toxicity stanovené na různých biologických systémech
5. Metody *in silico* – odhady výpočtem
 - 5.1. Přehled metod *in silico*, jejich možnosti, výhody a omezení
 - 5.2. Kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností – analýza QSAR
 - 5.3. Validace modelů analýzy QSAR

1. Úvod

V říjnu 2003 byl Evropskou komisí přijat návrh na nový rámec pro legislativu, pokrývající bezpečnost chemikálií. Podniky a firmy, které importují více než 1 tunu chemické sloučeniny ročně, budou nuceny tuto chemikálii registrovat v centrální datové bance. Cílem je zlepšit ochranu zdraví přírody, včetně lidí, zvýšit inovační kapacity a schopnost konkurence chemického průmyslu v Evropské unii. Tento nový systém je nazýván REACH, což znamená „Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals“.

Je to vyústění tendence posledního desetiletí formulo-

vat legislativní opatření, která se týkají uvádění nových a nových chemických produktů na trh, jejich vnášení do přírodního prostředí a distribuci mezi lidmi. Nová opatření se budou týkat nejen nových chemických látek, uváděných na trh, ale i látek „starých“, které se již delší dobu používají. Tento systém bude ovlivňovat nejen chemický průmysl, ale i odvětví, která chemické produkty při své práci využívají. Dochází k situaci, kdy se výzkum a vývoj nových chemických výrobků může stát levnější než náklady na jejich testování a registraci. Cílem vědeckých organizací a společností proto bylo a je hledat takové alternativní metody testování toxických a nežádoucích účinků chemických sloučenin, pomocí kterých by úkol, zadaný programem REACH a právními normami o kategorizaci chemických sloučenin a chemických přípravků, byl zvládnutelný a levnější.

2. Programy chemické bezpečnosti a alternativní metody testování toxicity

Strategickým záměrem těchto programů je prevence a snížení vlivu chemických látek na zdraví lidí, na zlepšení životního prostředí s cílem dosáhnout zkvalitnění životních podmínek. Dalším cílem je snížit počet obrátlovců, používaných k testování toxicity chemických látek a chemických přípravků. Nicméně výrobce nebo dovozce bude muset předložit pro každou chemickou látku a chemický přípravek uváděný na trh řadu údajů o jejich nebezpečnosti, o jejich vlivu na zdraví, na stav životního prostředí a o vybraných, zákonem citovaných fyzikálně-chemických vlastnostech. Takových údajů si lze představit celou řadu. V Evropské unii byly dohodnuty ty, které jsou pokládány za nebezpečné pro zdraví a ty fyzikálně-chemické vlastnosti, které mohou tuto nebezpečnost indikovat (směrnice 67/548/EHS v platném znění). Tento soubor údajů a vlastností zákon vyžaduje pro určení nebezpečnosti a zařazení chemické sloučeniny do odpovídající kategorie nebezpečnosti. V české legislativě jej lze nalézt v zákoně¹ o chemických látkách a chemických přípravcích, který představuje transpozici evropských předpisů v uvedené směrnici 67/548/EHS. Dále se o nich jedná v zákoně o rostlinolékařské péči² nebo v zákoně o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh³. Údaje o nich je možné nalézt v literatuře, mnohých datových souborech a tabulkách, nebo je stanovit. Předepsané metody pro stanovení potřebných údajů o toxicitě a pro stanovení fyzikálně-chemických vlastností lze najít ve třech vyhláškách⁴, které jsou opět přepisem evropských norem. Údaje budou sloužit při rozhodování, do které kategorie nebezpečnosti bude látka nebo přípravek zařazen a jaké podmínky budou pro zacházení s nimi.

Zákon o ochraně zvířat pak sleduje etický problém

využívání laboratorních zvířat k pokusům a testování. I proto je zdůrazněn význam alternativních postupů při testování toxicity chemických sloučenin a chemických přípravků. Postupů, které rychle poskytují dostatečné informace o toxických a nežádoucích účincích chemických látek, a to při nízkých nákladech, s omezením testů na obratlovcích a při tom s dostatečnou kapacitou, kterou již nemají tradiční způsoby testování. Důležitou oblastí bude bezpečnost expozice chemikáliím ve spojení s dalšími faktory stresu chemického, biologického i psychického (směsi látek, infekce, změny klimatu, nemoci, oslabení funkcí organismu, psychická zátěž, atd.).

Alternativními metodami testování jsou rozuměny takové, které mají výše uvedené schopnosti a navíc splňují podmínky „3R“ (nahrazuje, redukuje nebo vylepšuje užití zvířat – Replace, Reduce, Refine)⁵. Tyto alternativní testy zahrnují testy na nižších organismech, *in vitro* na tkáních a buňkách i *in silico* predikční modely na počítačích. Musí splňovat informační a ekonomické požadavky. Musí poskytovat stejné, ne-li lepší informace jako metody tradiční na pokusných zvířatech, již dlouho používané a předepsané v normách.

Organizací, která se těmito aktivitám organizačně, výzkumně i aplikačně věnuje, je zejména ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) ze Společného výzkumného centra Evropské komise (JRC – Joint Research Centre), organizačně OECD. ECVAM, který se zabývá chemickou bezpečností společně s Evropským úřadem pro chemikálie (ECB – European Chemicals Bureau), je součástí Ústavu pro ochranu zdraví a spotřebitelů (IHCP – Institute for Health and Consumer Protection), jednoho z center Společného výzkumného centra Evropské komise. ECVAM započal svou činnost v říjnu 1991 na základě směrnice 86/609/EEC, která v článku 7.2 určuje, že „pokus (na zvířatech) nebude prováděn, pokud je rozumně i prakticky dostupná jiná vědecky uspokojivá metoda pro získání požadovaných výsledků, která nevyžaduje užití zvířat“ a v článku 23 nařizuje, že „Komise a členské státy (Evropské unie) by měly podporovat výzkum těchto metod a validaci takových alternativních technik, které poskytují stejnou úroveň informací, jakou lze získat v pokusech na zvířatech, které však zahrnují užití menšího počtu zvířat nebo které jim způsobují méně bolesti a Komise a členské státy mají přijmout takové další kroky, které považují za přiměřené pro povzbuzení výzkumu na tomto poli“. Toto jsou důležité formulace pro pochopení, kdy a jaké alternativní metody vybírat.

3. Alternativní testování na nižších organismech

K výběru jsou dnes alternativní metody s nižšími organismy a metody výpočetní. Jde převážně o metody, které se dosud běžně nepoužívají, ale které v rámci systému REACH jsou již zdůrazňovány. Ekotoxikologických testů toxicity, prováděných na nižších organismech, které

se v přírodě vyskytují, je pro určení nebezpečnosti celá řada, jiné jsou vyvíjeny a validovány. Běžně používané podle legislativy jsou testy na *Daphnia magna*, na rybách *Poecilia reticulata*, *Pimephales promelas*, laboratorních potkanech, řasách atd.: jde o testy trvající 2–3 dny. Jako alternativní test je vyvíjen např. 48 hodinový test na prvocích *Tetrahymena pyriformis*. Z opravdu rychlých a již v procesu validace lze v současné době vybrat test, známý jako MICROTOX, který využívá zhášení fosforeskujících bakterií *Vibrio fischeri*, dříve *Phosphobacterium phosphoreum*, nejčastěji trvá 15 min, nebo stanovení efektivní koncentrace, která zastaví pohyb u 50 % testovaného souboru oligochaete *Tubifex tubifex* (známých spíše jako nitěnky), který trvá 3–4 min.

4. Extrapolace mezi indexy toxicity stanovené s různými biologickými systémy

Lze extrapolovat výsledky získané s jedním druhem organismů na výsledky, které by byly získané jiným způsobem? Lze. Tímto způsobem lze dokonce verifikovat vhodnost výsledků z alternativních testů, a to korelací s výsledky metod již validovaných, známých a předepsaných ve vyhláškách⁴. Již desetiletí je poukazováno na korelace mezi údaji, které jsou získány různými způsoby – lze je tedy využívat stejně. Různé testy mají pouze různá omezení nebo výhody, analytické charakteristiky apod.

Byla publikována řada studií o statisticky významné těsných korelacích mezi výsledky jednotlivých testů toxicity. Namátkovým výběrem lze uvést práce Kaisera^{6–8}, Schultze^{9,10}, i starší¹¹. Zdůvodnění existence korelací mezi daty o velikosti biologických účinků pro stejné série chemikálií lze najít i v existenci rovnice – modelů QSAR. Bylo publikováno vysvětlení pomocí formální matematiky: jestliže ve dvou rovnicích s proměnnými x a y je pro různé proměnné y totožná proměnná x , pak musí být ve formálním vztahu i obě proměnné y . Za okamžik bude patrné z rovnic QSAR (cit.¹²), že nejčastěji používaná fyzikálně-chemická vlastnost chemických sloučenin pro korelaci s biologickou účinností (účinností bude vždy rozuměna velikost biologického účinku) je log rozdělovacího koeficientu chemikálie mezi vodu a oktan-1-ol, obvykle zkracovaný jako log P_{ow} , případně jen log P (viz rov. (1)). Právě ta je nejméně v 80 % rovnic QSAR, pro neelektrolyty a pro sloučeniny nikoliv přirozené, v lineárních regresních rovnicích používána jako proměnná x (cit.¹³). Tato skutečnost ukazuje, že nejčastěji je dějem určujícím účinnost transport a distribuce chemické sloučeniny. Neznamená to však, že jiné vlastnosti sloučeniny nemohou o toxicitě spolurozhodovat (reaktivita, topologie a geometrie molekuly). Nicméně z toho formálně plyne, že může existovat regresní rovnice i pro proměnné y – biologické účinnosti:

$$BA_i = f(\log P_i), \quad (1)$$

kde i jsou individuální chemikálie testované skupiny chemikálií, BA je biologická účinnost, f nějaká, nejčastěji lineární nebo parabolická, matematická funkce. Pak pro

výsledky dvou testů lze formálně napsat matematickou rovnicí (2):

$$BA_{ij} = f(BA_{ik}) \quad (2)$$

a tuto rovnici použít pro vzájemnou extrapolaci mezi biologickou účinností látky *i* stanovenou testem *j* a jinou biologickou účinností téže látky *i* stanovenou testem *k*. Jinou interpretaci taková rovnice nemá^{14,15}. Pomocí takové regresní rovnice např. mezi experimentálními údaji o EC50 (*Tubifex tubifex*) a o LD50 (potkan) lze vypočítat LD50 na potkanech po orálním podání netestované sloučeniny, známe-li její EC50 (*Tubifex tubifex*), efektivní koncentraci, která inhibuje pohyb u 50 % testované populace oligochaete *Tubifex tubifex* (známé jako niténky) a odčítané po 3 min působení vodného roztoku látky¹⁶. Pravděpodobnost tohoto odhadu výpočtem udávají statistické charakteristiky regresní rovnice. Jak EC50 (*Tubifex tubifex*), tak LD50 (potkan, orálně) koreluje s log P_{ow} .

5. Metody *in silico* – odhady výpočtem

Tradiční i rychlé alternativní laboratorní testy umožnily vytvořit dostatečně rozsáhlé soubory dat dobré kvality, které posloužily a slouží vývoji a validaci predikčních toxikologických výpočetních modelů. Tyto predikční modely byly tvořeny v první řadě z toxikologických údajů, které byly získány v pokusech *in vivo*. Proto odhady, získané těmito modely, jsou po validaci rovnocenné s korespondujícími pokusnými údaji, které byly naměřené v pokusech *in vivo*. Chyba odhadů výpočtem je určena chybou pokusných údajů, které byly pro model použity.

5.1. Přehled metod *in silico*, jejich možností, výhod a omezení

K vytvoření výpočetních modelů zobecněním údajů, které byly získány v pokusech, se nejčastěji děje pomocí technik analýzy QSAR (z angl. Quantitative Structure-Activity Relationships, tj. kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou látek a jejich biologickou účinností)¹². Výpovědní i ekonomická hodnota a správnost této metody procházejí v současné době celosvětovou diskusí ve snaze dát jí právní rámec pro uznávání jejích výsledků na stejné úrovni, jako mají dnes uznané a zákony předepsané metody. To by usnadnilo plnění systému REACH a programy chemické bezpečnosti ve smyslu toxického dopadu používání chemikálií.

Modelů pro odhad toxicity výpočtem (*in silico* testy) existuje řada. Některé mají již i praktické použití, další jsou ve vývoji a ve stavu studií. Lze je shrnout mezi následující typy:

- modely vytvořené a analyzované technikami QSAR,
- kinetické fyziologické simulační modely (PBSP – Physiologically-Based Simulation Models),
- modely založené na biologické podobnosti a allometrických rovnicích,

- expertní systémy založené na souborech znalostí a pravidel,
- modely vytvořené technikami molekulové grafiky,
- kombinace různých modelů s umělou neuronovou sítí (ANN – Artificial Neural Network).

Jsou uváděny pod různými studijními nebo komerčními jmény. Lze je najít v katalogích a v literatuře. Odhady výpočtem se mohou od skutečnosti různě lišit, proto musí být uvedena pravděpodobnost jejich správnosti. Údaje v datovém souboru pro vytvoření modelu ovlivňují faktory dané podmínkami pokusu, jako jsou podmínky expozice, nemoci a jejich léčení, životní historie, věk, atd. Tyto faktory se pak promítají i do správnosti odhadu výpočtem. Vedle těchto faktorů se zapomíná, že reálná expozice je expozice směsí chemikálií. Ve směsi se mohou chemické látky ve svém účinku ovlivňovat a toxicita směsí i stejných chemikálií může být rozdílná (antagonismus, inhibice, synergismus, potenciace aj.). To může být závažné při odhadu zdravotního rizika expozice chemikáliím¹⁷. Dnes existují studie, ve kterých se hledá vhodná fyzikálně-chemická vlastnost, která by byla použitelná pro odhad takových interakcí^{18,19}.

5.2. Kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností – analýza QSAR

První studie v moderním slova smyslu dnes nepoužívanějších metod *in silico*, analýzy QSAR, se objevily díky organickým a fyzikálním chemikům z Pomona College v Kalifornii^{20,21} a z Ústavu hygieny práce a chorob z povolání v Praze^{22,23}. Analýza QSAR doznala z metod *in silico* největšího rozšíření a možnost jejího praktického použití při odhadu velikosti toxických účinků chemických látek je přijímána. Proto zbytek tohoto příspěvku bude věnován jí.

První vážné setkání pracovníků, kteří se o kvantifikaci vztahů mezi chemickou konstitucí a velikostí biologických účinků zajímali a kteří tuto oblast studovali, se odehrálo v Praze v roce 1973 (cit.²⁴). Na tomto sympoziu to sice nebylo poprvé, kdy se objevila zkratka QSAR (do té doby 2–3×), ale prakticky poprvé ve větším a psaném měřítku a od této doby se začala běžně používat pro kvantitativní vyjádření vztahů mezi chemickou strukturou (konstitucí) a biologickou účinností (velikostí biologického účinku). Od tohoto 1. evropského symposia QSAR bylo jen evropských symposií již uspořádáno čtrnáct (1976 Suhl, 1979 Budapest, 1982 Bath, 1984 Bad Segeberg, 1986 Portorož, 1988 Interlaken, 1990 Sorrento, 1992, Strasbourg, 1994 Barcelona, 1996 Lausanne, 1998 Copenhagen, 2000 Düsseldorf, 2002 Bournemouth, 2004 v evropské části Istanbulu). Byly založeny další řady konferencí QSAR v různých kontinentech světa, semináře QSAR pro užití v toxikologii životního prostředí, existují dva časopisy věnované jen technikám analýzy QSAR (QSAR Journal – v kombinaci s molekulovou grafikou a obsahující abstrakty z článků o QSAR z ostatních časopi-

sů; SAR and QSAR in Environmental Research), byla založena a stále existuje aktivní celosvětová QSAR Society. Užitečnost a využitelnost technik analýzy QSAR byla pro hledání nových léčiv a v predikční toxikologii prokázána. Možnost náhrady tradičních experimentálních metod metodami *in silico*, počítačovými modely, expertními systémy a molekulovou grafikou se zřetelně rýsovala. O vývoji a validaci expertních systémů se začalo vážně přemýšlet²⁵.

Modely QSAR jsou matematické rovnice, které umožňují vypočítat velikosti biologického účinku (účinnosti) chemických látek z jejich chemické konstituce. Ta je vyjádřena fyzikálně-chemickými vlastnostmi molekul, jejich topologickými indexy nebo kvantově-chemickými indexy (molekulové deskriptory). Největší nesnáze analýzy QSAR je skryta v použitých experimentálních biologických datech. Podmínkou jejich použitelnosti je jejich dostatečné statistické ohodnocení a validace. Analýza QSAR apeluje na standardizaci podmínek, za kterých biologické testy probíhají a na důkladném předpisu jejich provádění. Často se chybí v nedodržování doby působení látky.

Za předpokladu, že biologická účinnost je určena kritickým, stupněm určujícím účinnost, je rovnovážná konstanta (v biologických systémech za podmínek ustáleného stavu platí extratermodynamická pravidla) tohoto procesu spjata se změnou Gibbsovy energie. Tu lze složit z příspěvků, kterými se na změně biologické účinnosti podílejí změny ve struktuře molekuly:

- hydrofobní („lipofilní“),
- elektronový (polární),
- sterický,

jak to navrhl Hansch²⁶. Jednotlivým příspěvkům jsou přiřazovány různé fyzikálně-chemické konstanty, které jsou odvozeny z procesů, které vždy nemusí mít s testovanými biologickými (toxickými) procesy žádný přímý vztah.

Jako hydrofobní konstanta je v převážné míře používán logaritmus rozdělovacího koeficientu chemikálie mezi oktan-1-ol a vodu ($\log P$, $\log P_{ow}$). Bez naděje není logaritmus rozdělovacího koeficientu látky mezi olej a vzduch ($\log P_{oa}$) zvláště pro toxické účinnosti, které jsou měřené při inhalační expozici. Méně jsou vidět rozdělovací koeficienty látek, stanovené v jiných soustavách nemísitelných nebo málo mísitelných rozpouštědel. Dále to může být rozpustnost ve vodě, tlak nasycených par, konstanty odvozené z chromatografických dat, substituentové konstanty Hansche π (cit.²⁷), fragmentární konstanty podle Rekkera²⁸ i další.

Pro sloučeniny, které disociují, je používán rozdělovací koeficient mezi oktan-1-ol a vodu, korigovaný na ionizaci, $\log D$. Transportu přes membrány i rozdělení sloučeniny mezi dvě fáze se účastní převážně ta část molekul, které nejsou disociovány. Proto je výhodnější hodnotu $\log P$ korigovat na ionizaci a tu pro korelaci použít. $\log D$ lze vypočítat pro různá pH prostředí a závisí na disociační konstantě sloučeniny, nebo pK_a . Pro výpočet hodnot pK i pro výpočet $\log D$ v závislosti na pH prostředí existují

dostupné výpočtové programy.

Nejčastěji používané elektronové (nebo polární) konstanty jsou Hammettovy konstanty σ nebo jejich modifikace. Dále lze najít použití Taftovy konstanty pro polární substituenty σ^* , Swain-Luptonovy rezonanční nebo indukční konstanty, i dipólový moment. Z kvantově-chemických indexů reaktivity to bývá elektronová hustota na reaktivním atomu, index nukleofilní nebo elektrofilní superdelokalizovatelnosti, energie nejvyššího obsazeného nebo nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu nebo jejich rozdíl.

Sterické konstanty jsou odvozeny z rozměrů molekuly a jejich vlivu na okolí molekuly: např. van der Waalsův poloměr substituentu, plocha molekuly, objem molekuly i molární objem (nezaměňovat), dokonce i relativní molekulová hmotnost, rozměry substituentu ve třech prostorových osách apod. Nejčastěji je možné se setkat s Taftovou sterickou substituentovou konstantou E_s . Sem by se daly zařadit i topologické indexy konektivity χ .

Uvedené substituentové i globální konstanty jsou uvedeny jen namátkou. Autoři v množství publikací jich prezentovali dlouhou řadu. Rovněž bylo publikováno, že mezi sebou často korelují a je zbytečné hledat další a další.

Údaje o toxických účincích (nebo obecně biologických) a o fyzikálně-chemických vlastnostech jsou zpracovávány metodami matematické statistiky. Nejvýznamnějšího úspěšného využití dosáhla Hanschova rovnice^{26,29,30} (viz rov. (3) a (4)):

$$\log C = k_1\pi^2 + k_2\pi + k_3\sigma + k_4E_s + k_5, \text{ případně} \quad (3)$$

$$\log C = k_1(\log P_{ow})^2 + k_2\log P_{ow} + k_3\sigma + k_4E_s + k_5, \quad (4)$$

C je index toxického (biologického) účinku (např. LD50, EC50), π je Hanschova substituentová konstanta, σ Hammettova konstanta, E_s Taftova sterická substituentová konstanta, konstanty k_1, k_2, k_3, k_4 a k_5 jsou konstanty vzešlé ze statistického zpracování souborů párů dat o chemických sloučeninách ve studovaném souboru. Druhá mocnina konstanty π nebo $\log P_{ow}$ simuluje nelineární průběh závislosti parabolickou funkcí; simulací různými matematickými funkcemi nelineárního tvaru bylo publikováno více, Hanschova aproximace však nelinearitu popisuje dostatečně a je nejpoužívanější. Obvykle dostačuje i aproximace přímkou, protože soubor chemikálií není dostatečně rozsáhlý, aby pokryl i nelineární části závislosti. Význam parabolické rovnice spočívá i v tom, že umožňuje najít optimální hodnotu hydrofobnosti chemikálie jako extrém derivací parabolické závislosti (viz rov. (5)):

$$\delta \log C / \delta \log P_{ow} = 0 \quad (5)$$

Jiným používaným způsobem je výpočet konstant *de novo* (viz (6)), kterému dali základ Free a Wilson³¹, čemuž se blíží výpočet fragmentárních konstant podle Rekkera²⁸:

$$BA = \sum a_n + \mu \quad (6)$$

a_n jsou příspěvky n -tých částí molekuly (substituentů) k biologické účinnosti BA a μ označuje účinnost základní části molekuly, které ve studované sérii látek nemění svoji strukturu. Pokud je nalezena souvislost konstanty *de novo*

s fyzikálně-chemickou vlastností, mění se tím vlastně v přístup Hansche. Metoda Freeho a Wilsona má tu výhodu, že předem nemusíme znát žádnou strukturní konstantu molekul.

Na analýzu biologických účinností bylo též rozšířeno použití Hammettovy rovnice – $\alpha\beta$ rovnice^{22,23} (viz (7)):

$$\log(\tau_i/\tau_{Et}) = \alpha\beta \quad (7)$$

τ_i a τ_{Et} jsou molární účinné koncentrace i -té látky v sérii a ethylderivátu téže série strukturně příbuzných látek (jde o relativní účinnost), konstanta α je závislá pouze na měřené účinnosti, na testovaném biologickém systému a na testované sérii látek, konstanta β souvisí pouze se substituentem nebo fragmentem molekuly. Pro alkyly byla publikována těsná korelace mezi substituentovými konstantami Hansche π a substituentovými konstantami β Zahradníka³².

Pro každou rovnici QSAR je vyžadováno alespoň minimální statistické ohodnocení: počet párů údajů (biologický – fyzikálně-chemický pro každou látku série) n , charakteristika série chemických látek, pro které byla rovnice odvozena, korelační koeficient těsnosti korelace r , chyba odhadu pomocí rovnice; statistické hodnocení bylo rozšířeno na chybu vypočtené konstanty rovnice (např. t -testem), objevuje se F -test, χ^2 -test. Hodnoty musí být uváděny pouze v jednotkách molární koncentrace. Musí být uvedena pravděpodobnost správnosti odhadnuté hodnoty indexu toxicity. Musí být uvedena oblast hodnot všech použitých indexů, toxických a fyzikálně-chemických, pro kterou může být použita. Validace rovnic QSAR je prováděna odhadem toxické účinnosti výpočtem pro vybraný a na sérii látek, které sloužily k odvození rovnice, nezávislý testovací soubor látek. Z výsledků je vypočtena spolehlivost a predikční schopnost rovnice, parametry, které rovnici hodnotí z hlediska využitelnosti pro odhad toxické účinnosti výpočtem. Principy validace rovnic QSAR vycházejí z principů validace experimentálních metod, jen jsou poněkud upraveny³³. Validování alternativních metod/testů spočívá zejména v potvrzení jejich spolehlivosti (reprodukovatelnosti výsledků), významu, vědecké hodnoty a praktické použitelnosti pro zamýšlenou aplikaci. Při validaci rovnic QSAR by měl být tento proces rozšířen o požadavek stanovení predikční schopnosti, o hodnocení jejich robustnosti a o mechanistický výklad použití molekulových deskriptorů (fyzikálně-chemických vlastností). Důležité je uvádění experimentálních podmínek měření i detaily statistického zpracování a hodnocení. Dnes (2002–2005) to je předmětem urputné diskuse.

Rovnice QSAR, jejich analýzu a interpretaci lze využít pro získání informací o toxických účincích chemických látek a jejich velikosti, o kinetických procesech, kterým chemikálie v organismu podléhají (absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování), o distribuci a osudu chemikálií v životním prostředí a v neposlední řadě i o fyzikálně-chemických vlastnostech chemikálií.

V dnešní době rozvíjející se výpočtové techniky je již řada počítačových programů, založených na analýze QSAR, souborech znalostí a souboru pravidel, které jsou

komerčně dostupné. Ty jsou vyvinuty jak pro odhad kvality toxického účinku (karcinogenita, mutagenita, neurotoxicita, a další), tak hlavně pro odhad velikosti určitého účinku. To vše ze znalosti pouhé chemické struktury „testované“ látky. Jsou dodávány programy pro výpočet rozdělovacího koeficientu chemikálie mezi oktan-1-ol a vodu, $\log P_{ow}$, je řada programů pro výpočet rovnic QSAR regresní analýzou z primárních údajů o indexech toxicity a fyzikálně-chemických vlastnostech i pro další postupy matematické statistiky uplatňované v analýze QSAR (shluková analýza, analýza hlavní komponenty, diskriminantová analýza a jiné, mnohem vyspělejší analýzy až po využití techniky umělé neuronové sítě a samoučícího se stroje).

5.3. Validace modelů analýzy QSA

Na jednání v Setubal (Setubal, Portugalsko, 4.–6. března 2002, společné jednání International Council of Chemical Associations a European Chemical Industry Council na téma „Regulatory Use of (Q)SAR for Human Health and Environmental Endpoints“) byly vybrány a odsouhlaseny metody a modely QSAR a SAR, označované pak jako (Q)SAR, pro další jednání o legislativních možnostech využití jejich výsledků pro určování nebezpečnosti chemických sloučenin jako alternativní k doposud používaným.

Na pařížské schůzce skupiny expertů pro (Q)SAR (květen 2004), která se konala pod patronací a kterou organizovaly OECD a JRC, bylo zformulováno pět kritérií, „setubalských“^{33–36} principů pro validaci (Q)SAR, které byly dále projednány a schváleny na 37. společné schůzi OECD (listopad 2004):

- v modelu (Q)SAR musí být jasně definovaný měřený/odhadovaný účinek,
- jasně a zřetelně musí být popsán algoritmus, kterým byl model (rovnice QSAR) vytvořen nebo u expertních systémů musí být přesně popsán vznik znalostí a pravidel v basi znalostí,
- musí být definována oblast použitelnosti,
- musí být popsána požadovaná vnitřní a vnější kontrola reprodukovatelnosti, robustnosti a správnosti validovaného modelu,
- pokud možno sladit použité molekulové deskriptory s mechanismem účinku.

Zároveň s tím se započal vytvářet manuál, průvodce, pro validaci samotných počítačů, na kterých budou modely vytvářeny a použitých programů pro vytvoření a ohodnocení modelů (metody matematické statistiky, programy pro statistické ohodnocení modelů, a to i těch nejjednodušších, apod.).

Stále prozatím není jasné, zda odhad toxického indexu výpočtem bude nutné verifikovat biologickým pokusem, i když může být, díky odhadu výpočtem – testem *in silico* – mnohem jednodušší, kratší, případně jiným alternativním testem i rychlejší a bez použití obratlovců. V případě, kdy výsledky metod *in silico* budou negativní

(neodhadují žádný toxický účinek), měl by být proveden odpovídající biologický pokus, kterým se negativní výsledek potvrdí nebo vyvrátí. Tak jako v případě laboratorního testu, musí být i postup odhadu výpočtem technikami QSAR vhodně a dostatečně dokumentován a archivován.

Nesmí se zapomínat, že to vše bylo umožněno – a leckdy zatím stále jiná možnost není – lopotnou experimentální prací a získáváním údajů o toxicitě klasickými způsoby. A to i na obratlovcích za podmínek kontroly kvality analýz i používaných zvířat. Až dostatečné množství experimentálních údajů ve validovaných datových souborech, objevy ve vztazích mezi chemickou strukturou a biologickou účinností i vývoj metod matematické statistiky, kvantové chemie, molekulové grafiky a počítačové techniky umožnily zobecnění primárních údajů o toxicitě chemikálií do matematických algoritmů a vznik testů *in silico*, dávající informace použitelné na stejné úrovni jako z pokusů *in vivo*.

Seznam zkratk a symbolů

ANN	Artificial Neural Network, umělá neuronová síť – matematicko-statistická technika simulující mechanismus neuronové sítě pro účely matematické analýzy dat
BA _i	biologická účinnost (aktivita), tj. velikost biologického účinku chemické sloučeniny <i>i</i>
<i>E_s</i>	Taftova substituentová sterická konstanta
EC50	efektivní (účinná) koncentrace, která ovlivní 50 % sledované populace, v tomto případě inhibice pohybu oligochaete <i>Tubifex tubifex</i> (nitěnky)
ECVAM JRC	European Centre for Validation of Alternative Methods, Joint Research Centre, European Commission, Evropské centrum pro validaci alternativních metod, jako součást Společného výzkumného centra Evropské komise, Ispra, Itálie
<i>f</i>	obecné označení matematické funkce
IHCP	Institute for Health and Consumer Protection, Institut pro ochranu zdraví a spotřebitelů, součást Společného výzkumného centra Evropské komise, Ispra, Itálie
log <i>P_{ow}</i>	rozdělovací koeficient chemikálie mezi oktan-1-ol a vodu, též označení pouze log <i>P</i>
log <i>P_{oa}</i>	rozdělovací koeficient chemikálie mezi olej a plyn (vzduch)
PBSM	Physiologically-Based Simulation Models, též PBKM Physiologically-Based Kinetic Models, kompartmentové modely, popisující kinetiku chemických sloučenin v organismu a charakterizované fyziologickými parametry (rychlost průtoku krve venózní a arteriální, ventilace plic, rychlostní konstanty biotransformace, apod.)
QSAR	Quantitative Structure – Activity Relationships, kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností

REACH	Registration, Evaluation and Autorization of Chemicals, registrace, kategorizace a autorizace chemikálií – zařazení chemikálií podle jejich nebezpečnosti na základě testování toxických, chemických a fyzikálně-chemických vlastností, program chemické bezpečnosti Evropské unie, formulovaný v roce 2004
α	konstanta biologické Hammettovy rovnice podle Zahradníka
β	substituentová konstanta biologické Hammettovy rovnice podle Zahradníka
δ	derivace, matematický pojem v diferenciálním počtu
π	substituentová konstanta hydrofobnosti (lipofility) Hansche
σ	substituentová konstanta Hammetta
τ_i, τ_{Et}	účinné molární koncentrace látky <i>i</i> a referenčního ethylderivátu studované série látek v biologické Hammettově rovnici podle Zahradníka
χ	topologický index konektivity
χ^2	test statistického hodnocení korelace (též <i>F</i> -test, <i>t</i> -test jako další statistické testy)
3R	Replace, Reduce, Refine, používaná zkratka v oblasti ochrany pokusných zvířat, jejíž autoři jsou Russell a Burch (1959): zkvalitnit (postupy a práci při pokusech s pokusnými obratlovci), zredukovat (používané počty pokusných obratlovců), nahradit obratlovce při testování chemikálií (toxicity nebo farmakologických účinků) a ukazující směr, kam se má ubírat činnost při ochraně pokusných zvířat i zdraví přírody, včetně lidí.

Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 305/03/1169, grantu IGA MZ ČR NJ/7435-3, grantu MŽP ČR VaV/340/2/01 a Státního zdravotního ústavu. Za pomoc při zpracovávání tématu děkuji Viktorovi Mejstříkovi.

LITERATURA

1. Zákon č. 356/2003 Sb. o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů.
 2. Zákon č. 147/1996 Sb. o rostlinolékařské péči.
 3. Zákon č. 120/2002 Sb. o podmínkách uvádění biocidních přípravků a účinných látek na trh a o změně některých souvisejících předpisů.
 4. Vyhláška Ministerstva vnitra ČR č. 164/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení nebezpečných vlastností chemických látek a chemických přípravků z hlediska hořlavosti a oxidačních schopností.
- Vyhláška Ministerstva životního prostředí ČR č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a che-*

- mických přípravků stanoví základní metody zkoušení fyzikálně-chemických vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí.*
Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 443/2004 Sb., kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků.
5. Russell M. M. S., Burch R. L.: *Principles of Human Experimental Technique*. Methuen, London 1959.
 6. Kaiser K. L. M., Esterby S. T.: *Sci. Total Environ.* 109/110, 499 (1991).
 7. Kaiser K. L. M., McKinnon M. B., Fort F. L.: *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 1599 (1994).
 8. Kaiser K. L. M.: *Environ. Health Persp.* 106, Suppl. 2, 583 (1998).
 9. Schultz T. W., Watt N. L., Lin D. T.: *Bull. Environ. Chem. Toxicol.* 44, 67 (1990).
 10. Seward J. R., Hamblen E. L., Schultz T. W.: *Chemosphere* 47, 93 (2002).
 11. Kanaga E. E.: *Environ. Sci. Technol.* 12, 1322 (1978).
 12. Tichý M.: *Účinnost xenobiotik a chemická struktura*. Avicenum, Praha 1983.
 13. Hansch C., Hoekman D., Leo A., Weininger D., Selssie C. D.: *Chem. Rev.* 102, 783 (2002).
 14. Tichý M., Trčka V., Roth Z., Krivucová M.: *Environ. Health Persp.* 81, 321 (1985).
 15. Tichý M., Bořek-Dohalský V., Rucki M. v knize: *Progress in Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation* (Balls M., van Zeller A.-M., Halder M. E., ed.), str. 513. Elsevier BV, Amsterdam 2000.
 16. Tichý M., Rucki M., Hanzlíková I., Čihák R., Dynterová A., Feltl L., Roth Z.: *České Pracov. Lék.* 6, 138 (2005).
 17. Tichý M., Bořek-Dohalský V., Rucki M., Reitmajer J., Feltl L.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75 (Suppl.), S133 (2002).
 18. Tichý M., Cikrt M., Roth Z., Rucki M.: *SAR QSAR Environ. Res.* 9, 155 (1998).
 19. Tichý M., Bořek-Dohalský V., Rucki M., Feltl L., v knize: *Predictive Toxicology of Chemicals: Experience and Impact of Artificial Intelligence Tools* (Gini C. G., Katritzky A. R., ed.), str. 152. Am. Assoc. Artificial Intelligence Press, Menlo Park 1999.
 20. Hansch C., Maloney P. P., Fujita T., Muir R. M.: *Nature* 194, 178 (1962).
 21. Hansch C., Muir R. M., Fujita T., Maloney P. P., Geiger F., Streich M.: *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2817 (1963).
 22. Zahradník R., Chvapil M.: *Experientia* 16, 511 (1960).
 23. Zahradník R.: *Experientia* 18, 534 (1962).
 24. Tichý M. (ed.): *Quantitative Structure-Activity Relationships*. Akadémia Kiadó, Budapest, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart 1976.
 25. Dearden J. C., Barratt M. D., Benigni R., Bristol D. W., Combes R. D., Cronin M. T. D., Judson P. N., Payne M. P., Richard A. M., Tichy M., Worth A. P., Yourick J. J.: *ECVAM Workshop Rep.* 24, ATLA 25, 223 (1997).
 26. Hansch C., Fujita T.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1616 (1964).
 27. Fujita T., Iwasa J., Hansch C.: *J. Am. Chem. Soc.* 86, 5175 (1964).
 28. Rekker R. F.: *The Hydrophobic Fragmental Constants*. Vol. 1. Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam 1977.
 29. Hansch C.: *Acc. Chem. Res.* 2, 232 (1969).
 30. Hansch C. v knize: *Drug Design* (Ariens E. J., ed.), Vol. 1, str. 271. Academic Press, New York 1971.
 31. Free S. F., Wilson J. W.: *J. Med. Chem.* 7, 393 (1964).
 32. Kopecký J., Boček K.: *Experientia* 23, 125 (1967).
 33. Jaworska J. S., Comber M., Auer C., Van Leeuwen C. J.: *Environ. Health Persp.* 111, 1358 (2003).
 34. Eriksson L., Jaworska J., Worth A. P., Cronin M. T. D., McDowell R. M., Gramatica P.: *Environ. Health Persp.* 111, 1361 (2003).
 35. Cronin M. T. D., Walker J. D., Jaworska J. S., Comber M. H. I., Watts C. D., Worth A. P.: *Environ. Health Persp.* 111, 1376 (2003).
 36. Cronin M. T. D., Jaworska J. S., Walker J. D., Comber M. H. I., Watts C. D., Worth A. P.: *Environ. Health Persp.* 111, 1391 (2003).

M. Tichý^a, Z. Roth^a, K. Bláha^b, and A. P. Worth
 (National Health Institute, Šrobárova 48, 100 42 Praha 10, ^b Section of Environmental Hazards, Ministry of Environment, Praha, ^cEuropean Centre for Validation of Alternative Methods, Joint Research Centre, European Commission, 21020 Ispra, Italy): **Alternative in silico Methods for Toxicity Testing of Chemical Compounds**

The aim of this contribution is to review trends, demands, criteria, possibilities and limitations in the identification of hazard associated with chemical compounds and chemical preparations and to outline the legislation and alternative methods in testing toxicity of chemicals, in particular QSAR methods and models and their use for regulatory purposes.