

ПЕТКО ИВАНОВ ПЕТКОВ

**МОДЕЛИРАНЕ НА ТОКСИЧНИ ЕФЕКТИ, ОСНОВАНИ НА
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НА ХИМИЧНИ СЪЕДИНЕНИЯ С
ЕНЗИМИ, ХОРМОНИ И ДНК**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор”

Научна специалност: 02.11.11 „Технология на биологично
активните вещества”

Научен ръководител: Проф. дхн О. Мекенян
Научен консултант: Проф. д-р С. Димитров

Рецензенти:

Проф. дтн Цонка Годжевъргова
Проф. дхн Ирини Дойчинова

Дисертацията е обсъдена и насочена за защита от разширения катедрен съвет на катедра „Технология на биологично активните вещества” при Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас.

Дисертационният труд е изложен на 156 страници, включва седем таблици, десет фигури и шест приложения. Цитирани са 185 литературни източника.

Изследванията, отразени в дисертацията са проведени в Лабораторията по математична химия при Университет „Проф. д-р Асен Златаров” – Бургас.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала на Университет “Проф. д-р Ас. Златаров” - Бургас

ВЪВЕДЕНИЕ

Токсикологията изучава вредното въздействие на химичните съединения върху биологичните системи. През изминалия век тази наука основно е изследвала токсичното въздействие на редица терапевтични агенти върху човешкото здраве. Днес, токсикологията изучава въздействието на синтетичните химични съединения заедно с техните биохимични и молекулни механизми отговорни за тяхната токсична проява.

Всички живи организми са подложени на въздействието на широк спектър от синтетични и природни химични вещества. Мястото на преобладаващите в миналото токсични метали като: олово, живак и арсен се заема днес от огромното разнообразие от органични молекули, възникнали в ерата на развитие на индустриалната синтетична химия. За да бъдат изучени причините за тяхното токсично въздействие, възникват редица подразделения на науката токсикология. Такива например са: токсикологията на водните организми (*aquatic toxicology*), токсикологията на дивата природа (*wildlife toxicology*), токсикологията на екологичните популации (*ecotoxicology*) и други. Една от най-бързо развиващите се токсикологични дисциплини през последните години е токсикогенетиката (*toxicogenomics*). На практика, повечето токсични въздействия на химичните вещества генерират поражения върху генетичния материал на клетките и в една или друга степен променят заложения в тях генетичен код.

Заедно с развитието на токсикогенетиката възниква и друга токсикологична дисциплина – регулаторната токсикология. Токсиколозите в тази област създават стандарти, с които целят да контролират процесите свързани с производството, използването и отделянето в природата на токсични вещества. Регулаторните органи изискват информация за механизмите, по които тези съединения упражняват токсично действие. По този начин повишават надеждността на провежданите токсикологични

експерименти. Механизмите на токсично действие са в основата на аргументацията на регулаторните органи при вземането на важни решения касаещи риска за човешкото здраве.

Токсиколозите съблюдават за регистрацията на съществуващите и на новите химични съединения, които предстои да бъдат синтезирани. Това налага да се преразгледат законовите изисквания за оценка на биологичната активност на тези съединения. През 2001г. Европейската комисия публикува в т.нар. „Бяла книга” бъдещата си политика в областта на химичните вещества с оглед защитата на човешкото здраве и околната среда. През декември 2006 г. Европейският парламент гласува закона REACH (Регистрация, Оценка и Одобрение на химичните съединения), който влиза в сила от юни 2007 г. Съобразно REACH, на всяко съединение трябва да се открие досие, което да съдържа информация за потенциалната му способност да предизвиква токсични ефекти. Статистическите данни показват, че повече от 30 хиляди индустриални съединения използвани в Европа се нуждаят от допълнително експериментално тестване. Стандартните тестове провеждани върху животни изискват значителни финансови средства и освен това, предизвикват страдания на повече от 20 милиона животни. Стратегията на Европейската комисия е да ограничи използването на тестове върху животни и в същото време цели да стимулира използването на алтернативни подходи за оценка на риска за човешкото здраве. Съобразно политиката на REACH, един алтернативен подход е използването на компютърни (*in silico*) методи.

Компютърните методи са основани на изследване на връзката, която съществува между структурата на химичните съединения и тяхната потенциална активност. На молекулно ниво, изследването на тази връзка позволява да бъдат прогнозирани токсичните ефекти, които тези съединения биха могли да предизвикат в клетките на живите организми. Целта на компютърните модели е да предоставят оценка за токсичността на големи

химични инвентари, без да се налага експерименталното им тестване. На базата на тази оценка, само съединенията с висока вероятност да бъдат токсични ще бъдат подложени на експериментално тестване.

Натрупаните през последните години експериментални данни за токсичността на химичните съединения се използват за създаването на модели оценяващи специфични токсични ефекти като: ендокринна токсичност, мутагенност, генна токсичност, канцерогенност, инхалационна и кожна чувствителност и други.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационната работа е: Извеждане на модели за прогнозиране на биологични ефекти с различна специфичност на обуславящите ги биохимични взаимодействия.

За постигане на тази цел, в дисертационната работа трябва да се решат следните задачи:

Първа задача: Извеждане на модел за прогнозиране афинитета на свързване на органични химични съединения с арил хидрокарбоновия рецептор (AHR). В модела е установена зависимостта, която съществува между афинитета на свързване на химичните вещества и силата на генна експресия.

Втора задача: Създаване на категоризационен модел за прогнозиране способността на химичните съединения да блокират (инхибират) действието на ензима P450 ароматаза.

Трета задача: Разработване на модели за прогнозиране на *in vivo* генотоксични ефекти в черен дроб и в костен мозък на гризачи с отчитане на метаболитната активация и дезактивация на съединенията.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Методи за (Q)SAR моделиране и анализ на молекулната структура

За извеждане на моделите за токсичните свойства, обект на настоящата дисертационна работа, се използват няколко общи метода:

- Генетичен алгоритъм за изследване на конформационното пространство
- Вероятностен класификационен подход – COREPA
- Методи за симулиране на метаболизъм
- Дефиниране областта на проложение на моделите

1.1. Генетичен алгоритъм за конформационен анализ

Използваният в дисертационната работа метод за генериране на конформери, се основава на генетичния алгоритъм (GA) и е оригинално разработен в Лабораторията по математична химия (ЛМХ). Целта е да се намерят ограничен брой конформери попадащи в енергийни минимума на потенциалната енергия, максимално покриващи конформационното пространство. В алгоритъма се прилагат следните конформационни променливи: ротация около ациклични единични и двойни връзки, преместване на свободни ъгли в наситени цикли, отражение на пирамиди образувани при свързване на два или повече наситени цикъла и пермутация на фрагменти. Промяната на коя да е от тези променливи, води до промяна в

конформацията на структурата. За преодоляване на проблема породен от недетерминистичния характер на GA в настоящата работа към алгоритъма е въведена процедура за „насищане” на конформационното пространство. Тя се основава на последователно приложение на GA, като след всяка итерация популацията от конформери се разширява. В същото време, след всяко добавяне, се отстраняват най-неинформативните (структурно сходни) конформери докато се достигне зададен критерий за край на процеса. Алгоритъмът за конформационно размножаване е част от общата схема за 2D-3D миграция, конформационно размножаване и квантово химична оценка на химичните съединения, която е разработена в ЛМХ и е използвана в дисертационната работа.

1.2. Дефиниране на общия реакционен образ на биологично сходни молекули (COREPA)

За моделиране на биологичните свойства, които са обект на дисертационната работа, е използван разработеният в ЛМХ метод за 3-D QSAR анализ наречен COREPA (Common REactivity PAttern). COREPA е вероятностен класификационен подход към дефиниране на общия реакционен образ на група съединения със сходна биологична активност. Основното допускане е: съединенията със сходен биологичен ефект трябва да имат и сходство в стереоелектронната си структура. При анализите, всяко едно съединение се представя с непрекъснато вероятностно разпределение, получено от неговите конформери. Индивидуалните разпределения на съединенията се сумират, за да се построят общите реакционни образи на класовете със сходен биологичен ефект. Получените образи могат да се сравняват и да се намерят молекулните параметри и техните интервали на

вариране, различаващи съответните класове съединения със сходен биологичен ефект.

1.3. Вероятностен подход към симулиране на метаболизма (TIMES)

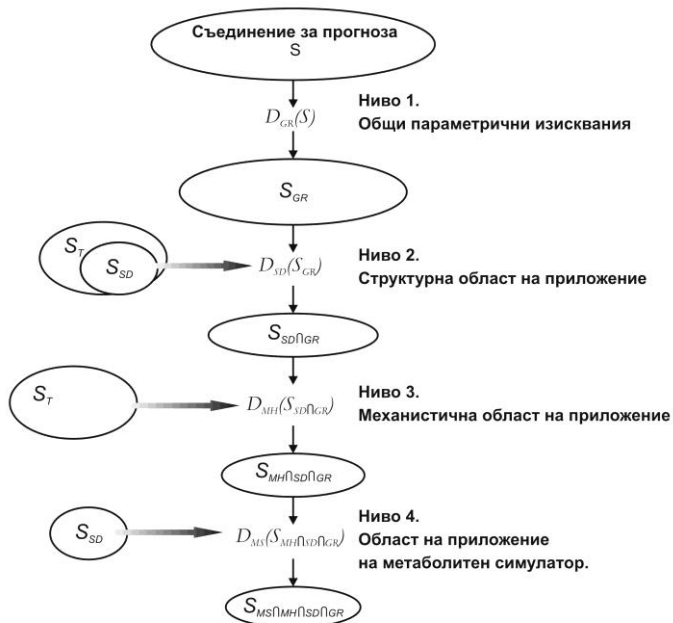
В дисертационната работа е използвана многопътна вероятностна схема за симулиране на метаболизма, наречена TIMES (Tissue Metabolism Simulator), разработена в ЛМХ. Същата включва - метаболитен симулатор и алгоритъм за неговото прилагане. Метаболитният симулатор е съвкупност от йерархично подредени ензимни реакции, които в неявен вид кодират ролята на различните ензими. Всяка молекулна трансформация е съставена от “родителски” фрагмент, трансформационен продукт, и забрани (маски) към реакциите, под формата на инхибиращи фрагменти. Мястото на всяка една реакция в йерархията от трансформации се определя от нейната вероятност тя да се извърши в рамките на времевия интервал, в който се провежда биологичния тест. Приоритизацията на трансформациите, по техните вероятности, позволява контрол върху нарастването на метаболитното дърво и приоритизиране на генерираните метаболити. Това прави разработената система уникална.

Метаболитният симулатор може да се свърже с модели за различни биологични свойства, с цел, да се прогнозира биологичната активност както на “родителските” съединения, така и на техните метаболити.

1.4. Метод за оценка на областта на приложение на моделите

Едно от основните изисквания за използване на (Q)SAR модели за рискова оценка на съединенията е същите да имат ясно дефинирана област на

приложение. За дефиниране на областта на приложение на изведените модели в дисертационната работа е използван стъпков подход.



Фигура 1. Стъпков подход за определяне на областта на приложение на (Q)SAR модел

Първото ниво дефинира допустимите интервали на вариране на физикохимичните свойства на съединенията от обучаващото множество. Втората степен отчита структурното сходство между прогнозираната структура и съединенията от обучаващата серия. Подходът на атом-центрирани фрагменти се използва за да се дефинира това сходство. Третото ниво се основава на механистичното разбиране на моделираното явление. Тук се държи сметка за спецификата на функционалните групи и

интерполационната област на променливите, участващи в модела. Накрая, ако метаболитен симулатор е включен като част от модела, надеждността на генерираните метаболити и метаболитни карти трябва да се отчита при оценка на надеждността на прогнозите.

В зависимост от това, с каква цел се използват прогнозите на модела някои от компонентите на неговата област на приложение могат да се игнорират.

2. Моделиране на свързването на ароматни въглеводороди с AHR

Свързването на ароматните въглеводороди с арил хидрокарбонския рецептор (AHR) води до биосинтезата на голямо разнообразие от метаболитни ензими. В резултат на това, AHR спомага за предотвратяване на натрупването в организма на химични вещества, които ежедневно се освобождават в обкръжаващата ни среда.

През последните 30 години са били изведени десетки (Q)SAR модели за оценяване на потентността на свързване на множество диоксинови и бифенилни аналози с AHR. Основните проблеми, с които се сблъскват тези (Q)SAR модели са: 1) отчитането на 3D структурата и конформационната гъвкавост на ароматните въглеводороди; 2) избора на представителни конформери, които се свързват с рецептора с най-висока потентност; и 3) определянето на структурното сходство на съединенията, които проявяват афинитет за свързване с AHR. Освен това, няма механистични QSAR модели, които да позволяват количествено да се оцени потентността на свързване с AHR при наличието на експериментални данни само за генна експресия и обратно.

Във връзка с представените проблеми, една от задачите на настоящата работа е да се създаде категоризационен модел за прогнозиране на афинитета за свързване на съединенията с AHR. В допълнение към тази задача е да се

изследва количествената зависимост на потентността за свързване на съединенията с АНР със силата на тяхната генна експресия. Тази зависимост позволява количествено да се прогнозира потентността за свързване с АНР при наличието на експериментални данни само за генна експресия и обратното – да се прогнозира генна експресия само с данни за потентност за свързване.

2.1. Обучаващо множество

Категоризационен (Q)SAR модел е разработен на базата на обучаващо множество от 142 структурно разнородни химични съединения с налични данни за свързване с АНР. За целта, потентността на свързване с АНР е представена в относителни еквивалентни единици, REP [%] (Relative Equivalent Potency) на изследваните съединения спрямо тази на радиобелязан TCDD.

Приложена е категорийна схема на моделиране, при която на основата на стойностите за REP на свързване, съединенията от обучаващото множество са разделени в три интервала на активност: 30 съединения с висок афинитет за свързване ($REP \geq 0.1$), 52 съединения със слаб афинитет за свързване ($0 < REP < 0.1$) и 60 съединения без афинитет към рецептора ($REP = 0$). Целите на настоящото моделиране са: 1) да се изведат модели в рамките на всеки един интервал на активност и 2) изведените модели да се групират в обща схема (батерия), която да се използва за прогнозиране на афинитета за свързване с АНР на нови съединения.

Данни за генна експресия са събрани от различни литературни източници за 51 съединения. Способността на съединенията да предизвикват генна експресия може да се представи като относителен афинитет на генна експресия – REP [%] на генна експресия. За 64 съединения са намерени данни едновременно за свързване с АНР и за генна експресия. Данните служат за

изследване на връзката между афинитета на свързване с АНР и силата на генната експресия.

2.2. Резултати и обсъждане

Работната хипотеза, на която се основава извеждането на настоящия SAR модел за свързване с АНР се състои в следното: ако дадено съединение се свързва с АНР и предизвиква генна експресия, то ще бъде отнесено към групата на агонистите, но ако съединението се свързва с рецептора без да предизвиква генна експресия, то ще бъде идентифицирано като антагонист.

Съединенията от обучаващото множество могат най-общо да бъдат отнесени към един от трите химични класа: 1) диоксини и техни структурни аналози, 2) въглеродороди съдържащи кондензирани ароматни ядра и 3) бифенили.

Групата на диоксините включва не само полихалогенирани дибензодиоксини, но също така и съединения, които са техни структурни и механистични аналози. Структурното сходство определя и общия механизъм на взаимодействие с АНР на съединения, принадлежащи на различни химични класове. По този начин, към групата на диоксините могат да бъдат отнесени също: дибензофурани, флаволи, карбазоли и пиридо карбазоли (елиптицини). Структурното сходство на изброените химични групи с диоксините се основава на наличието в централната част на молекулите на всички тези съединения на поне един кислороден атом. Наличието на кислород, сяра или азот допринася за формирането на нуклеофилен център за взаимодействие с рецептора. Освен това, присъствието на халогенни заместители, като: флуор, хлор, бром или йод в периферните части на тези структурни аналози е предпоставка за формирането на втори реакционен център, който в този случай е с преобладаващ електрофилен характер. В този смисъл, всички тези

съединения притежават общ механистичен профил на взаимодействие с АНР и следователно принадлежат на една и съща механистична категория – диоксини и техни структурни аналози.

В хода на моделирането беше установено, че диоксините с висок афинитет към АНР притежават нуклеофилен център, заобиколен от поне два бромни или четири хлорни атома (обикновено разположени на позиции 2,3,7 и 8) в периферията на молекулата. За разлика от тях, диоксините с нисък афинитет към рецептора се отличават с наличието на два или три хлорни атома. За фураните, минималният брой на хлорните заместители е четири. Общите структурни характеристики определящи свързването на диоксини и фурани с АНР са представени на Фигура 2.

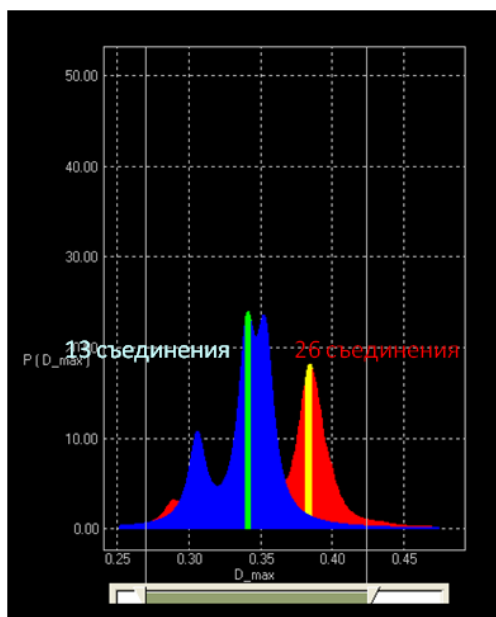


Фигура 2. Структурни характеристики специфични за диоксините и фураните с висок (А) и с нисък (В) афинитет за свързване с рецептора, където Rx може да бъде O, N или S; Ry е Cl или F; Ry₁ е Br или I.

Наличието само на структурни характеристики се оказва недостатъчно условие за моделирането на потентността за свързване на съединенията с АНР. За успешното разграничаване на съединенията с висок афинитет, нисък афинитет и без афинитет към АНР е необходимо добавянето към структурното условие на поне едно параметрично условие.

Параметърът донорна делокализуемост (D_{max}) успешно разграничава диоксините (26 съединения) с висок афинитет към АНР от останалите 13 съединения. Общият реакционен образ на тези съединения е представен на Фигура 3. D_{max} оценява способността на молекулите да отдават електронна

плътност. Колкото са по-високи стойностите на D_{max} , толкова по-лесно се извършва взаимодействието на диоксините с рецептора.

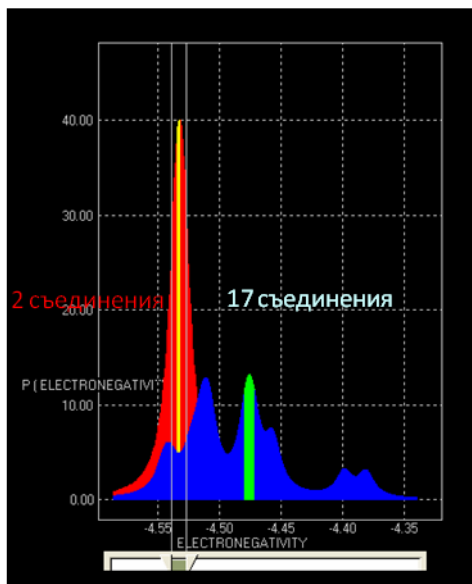


Фигура 3. Общ реакционен образ на диоксините и техните анализи по отношение на D_{max} . Съединенията с висок афинитет към АНР са отбелязани с червен цвят, а съединенията с нисък афинитет към рецептора – със син цвят.

Аналогичен анализ е направен за разграничаване на диоксините с нисък афинитет към АНР от диоксините без афинитет към рецептора. Използван е електронният параметър $E_{НОМО}$, който определя електрон-донорната способност на лигандите.

Група на въглеводородите с кондензирани ароматни ядра е представена от 2 съединения с висок афинитет и 17 съединения с нисък афинитет към АНР. На Фигура 4 се вижда, че електроотрицателност под -4.53 [eV] в молекулите на полиароматните въглеводороди (ПАНs) успешно разделя

съединенията с висок афинитет от тези с нисък афинитет към АНР. Въпреки ограничения брой на силно потентните PAHs е очевидно, че натрупването на електронен заряд в молекулите на лигандите облекчава протичането на донорно-акцепторните взаимодействия с рецептора.



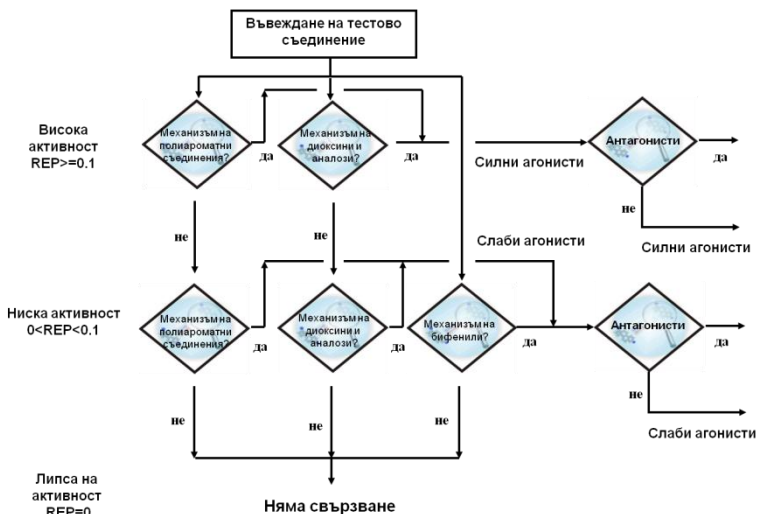
Фигура 4. Електроотрицателността като дискриминиращ параметър на полиароматните въглеводороди с висок афинитет (червен образ) от тези с нисък афинитет (син образ) към АНР.

Бифенилите от обучаващото множество попадат в две категории на активност: с нисък афинитет и без афинитет към АНР. За разграничаването на активните бифенили (5 съединения) от неактивните представители на този химичен клас (26 съединения), структурният критерий за активност е комбиниран с два молекулни параметъра: $\log K_{ow}$ и E_{LUMO} . $\log K_{ow}$ оценява способността на веществата да се разпределят в липофилната (октанол) и в

липофобната (вода) среда. Високите стойности на $\log K_{OW}$ за активните бифенили са индикация за облекчената дифузия на тези лиганди през липидните слоеве на клетъчната стена. Другият молекулен параметър (E_{LUMO}) в модела отчита енергията на най-ниско заетата молекулна орбитала. Колкото са по-ниски стойностите на този параметър за активните бифенили, толкова по-лесно те ще приемат електронна плътност от рецептора, т.е. ще бъдат акцептори на електрони.

От представените резултати следва, че съединенията взаимодействат с рецептора по два различни механизма. Диоксини и полиароматни въглеводороди взаимодействат с рецептора, чрез пренос на електронна плътност от лигандите към AHR. При бифенилите, механизмът на взаимодействие с рецептора се основава на електронен преход от рецептора към лигандите.

Структурните характеристики заедно с дискриминиращите параметри, които обуславят механизмите на свързване с рецептора в трите нива на активност са организирани в батерия от модели, която е представена на Фигура 5. Прогнозиращата способност на батерията може да се представи като отношение на коректно прогнозираните активни и неактивни съединения към общия брой съединения от обучаващото множество. За изведените механистични модели това отношение е 82%.



Фигура 5. Йерархично организирана батерия от механистични SAR модели за свързване с АНР.

Йерархичното прилагане на дефинираните механистични модели позволява да се даде категорийна оценка за афинитета на свързване на тестови съединения с АНР. За целта, активността на съединенията се оценява, чрез последователното прилагане на моделите асоциирани с висок и с нисък афинитет на свързване. При отрицателен отговор на заложените в тях условия за активност, съединенията ще бъдат прогнозирани като неспособни да взаимодействат с АНР. Положителните прогнози от моделите в кое да е от двете нива на активност, задължително се проверяват за наличието на критерии за антагонизъм (описани по-долу). Антагонистите се отделят в специална категория, докато всички останали активни съединения се класифицират като силни или слаби агонисти.

АНР антагонизъм

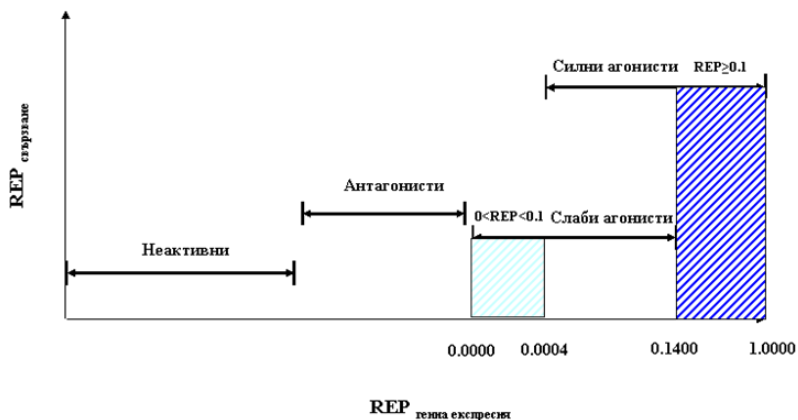
Широк набор от заместени флаволи и елиптицини са идентифицирани като лиганди способни да взаимодействат с АНР, но за някои от тях крайният ефект от това взаимодействие не е съпроводен с генна експресия, т.е. те са антагонисти. Подобно на агонистите, антагонистите се характеризират с голяма концентрация на електронна плътност в молекулите, което определя афинитета им за свързване с рецептора. Взаимодействието на тези съединения с АНР е съпроводено с образуването на водородни връзки с останалите протеини от рецепторния комплекс. В резултат от това взаимодействие, рецепторът заедно с лиганда не успяват да се освободят от съпътстващите ги протеини в комплекса. Това възпрепятства образуването на хетеродимер, взаимодействието с ДНК и последваща генна експресия.

За разлика от агонистите, при които концентрацията на електронна плътност е локализирана в централната част на молекулите, при антагонистите електронният заряд е концентриран в периферията им. Антагонистите се характеризират с наличието в периферните си части на функционални групи, които са способни да участват в образуването на водородни връзки, като нитро, триазидни и други групи.

Връзка между свързване с АНР и генна експресия

Ограниченият брой публикувани данни за афинитета на свързване с АНР, често затруднява моделирането на този ефект. За сметка на това в литературата има значителен брой налични данни оценяващи крайният ефект от взаимодействието с рецептора, т.е. генната експресия. Целта на настоящото изследване е да се установи връзката на потентността за АНР свързване с предизвиканата в резултат на това генна експресия. Този анализ е основан на

64 съединения с данни едновременно за свързване с рецептора и за генна експресия. Резултатите от анализа показват, че антагонистите и неактивните съединения не проявяват генна експресия. Силните агонисти проявяват силна генна експресия, докато слабите агонисти – слаба генна експресия (Фигура 6).



Фигура 6. Съпоставяне на данните за AHR свързване и за генна експресия съответно за: неактивни съединения, антагонисти, слаби агонисти (светло син свят) и силни агонисти (тъмно син свят).

Обобщението, че слабите агонисти предизвикват слаба генна експресия, а силните агонисти – силна генна експресия, може се направи само за тази част от съединенията, които имат гранични стойности на REP експр. (щрихованата област). Съществува област ($0.0004 \leq \text{REP експр.} \leq 0.1400$), за която намерената корелация между свързване и генна експресия не е информативна, заради идентифицирането в нея едновременно на силни и на слаби агонисти. За да се разграничат силните от слабите агонисти в тази „неинформативна” област е нужно да се разшири множеството от съединения, за които има данни едновременно за свързване и за експресия.

3. Моделиране инхибирането на цитохром P450 ароматаза

Цитохром P450 ароматаза е ензим, който е отговорен за превръщането на андрогените в естрогени. Високите нива на естрогени в периферните тъкани на жените създава предпоставка за възникването на редица хормонални заболявания, сред които е ракът на гърдата. Един от начините за понижаване нивото на естрогени е блокирането на тяхната синтеза с помощта на инхибитори на ароматазата. Този подход позволява откриването на нови лекарствени средства за борба с рака на гърдата. Разпознаването на тези инхибитори е важно и заради факта, че много от тях са широко разпространени в природата и нарушават нормалния хормонален цикъл в гръбначните животни.

Съществуват десетки (Q)SAR модели за прогнозиране способността на множество стероидни и нестероидни съединения да инхибират действието на ензима ароматаза. Повечето от тези (Q)SAR модели предоставят механистична интерпретация на всеки етап от взаимодействието на инхибиторите с каталитичния център на ензима. Слабост на всички тези модели е, че са изведени за отделните химични класове.

В тази връзка, целта на настоящето моделиране е: 1) да се идентифицират структурните характеристики, които са специфични за активността на стероидните и нестероидните инхибитори на ароматазата и 2) обобщаване на тези структурни характеристики в йерархично организирано дърво на решенията. Това ще позволи идентифицирането на нови инхибитори на ароматазата, чрез приоритизиране на голям брой структурно разнородни природни и синтетични вещества.

3.1. Обучаващо множество

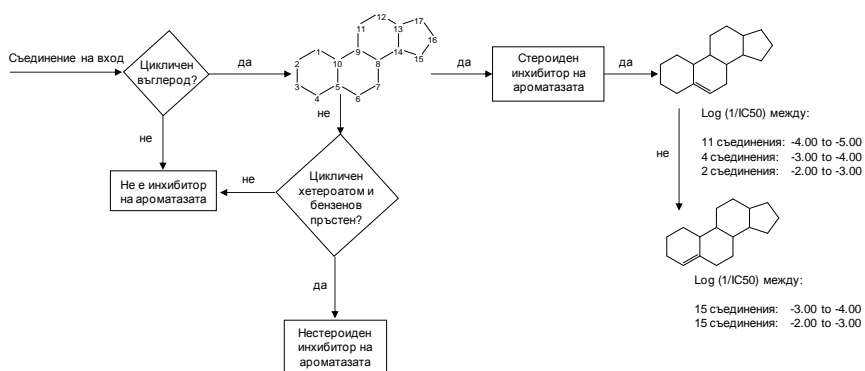
За извеждане на модела бяха използвани експериментални данни за 222 структурно разнородни химични съединения, събрани от различни литературни източници. Данните са представени в $\log (1/IC50)$ и оценяват способността на тези съединения да инхибират действието на ароматазата. С $IC50$ се отбелязва концентрацията на тестовото вещество, която е необходима за да предизвика 50% инхибиране действието на ароматазата. За целта на експеримента, превръщането на радиобелязан андростендион в естрон е изследвано в микрозомна фракция от човешка плацента.

3.2. Резултати и обсъждане

Установено е, че всички инхибитори на ароматазата в обучаващото множество притежават циклична структура, което наложи въвеждането на структурен критерии за цикличност. По този начин, всяко съединение се проверява на вход за наличие на поне един въглероден атом включен в цикъл. Класификацията на инхибиторите на ароматазата е представена на Фигура 7.

Всички съединения, които не отговарят на условието за цикличен въглерод ще бъдат класифицирани като неспособни да инхибират ароматазата. Ако съединението отговори на условието за цикличност, то ще бъде насочено към следващата нода, в която структурният критерии за активност е свързан с наличието на стероидна структура. Съединенията, които притежават стероиден скелет ще бъдат класифицирани като стероидни инхибитори, докато останалите съединения ще бъдат насочени към нода с критерии за активност по нестероиден механизъм. Наличието на цикличен хетероатом и бензеново ядро се считат за необходими условия за проявата на нестероидна инхибираща способност. При отрицателен отговор на критерия за нестероидност,

съединението отново ще бъде отнесено към групата на неактивните съединения.



Фигура 7. Категоризиране на ново съединение като стероиден инхибитор, нестероиден инхибитор или като съединение, което не е инхибитор на ароматазата.

Стероидни инхибитори на ароматазата

Оказва се, че между мястото на двойната връзка в стероидния скелет и потентността на тези инхибитори съществува пряка зависимост. За установяване на тази зависимост е направен структурен анализа на всички стероиди от обхващаното множество.

Стероидните инхибитори могат да бъдат класифицирани като такива със силна или слаба активност, в зависимост от това дали двойната връзка е позиционирана при четвъртия (Δ^4) или при петия (Δ^5) въглероден атом (виж Фиг. 7). Анализът на стероидните инхибитори с двойна връзка в Δ^5 позиция показва, че 65% от тях притежават слаба активност ($-4.00 < \log(1/IC50) < -5.00$), 23% се характеризират с умерена активност ($-3.00 < \log(1/IC50) < -4.00$) и 12% имат висока активност ($-2.00 < \log(1/IC50) < -3.00$). Този резултат

показва, че повечето стероидни инхибитори с двойна връзка в Δ^5 позиция проявяват слаба активност спрямо ароматазата. От друга страна, половината от стероидите с двойна връзка в Δ^4 позиция притежават висока активност ($-2.00 < \log (1/IC50) < -3.00$), докато другата половина притежават умерена активност към ароматазата. Важно е да се отбележи, че в тази група липсват инхибитори, които проявяват слаба активност. Този резултат дава индикация, че стероидните инхибитори, наподобяващи структурните характеристики (мястото на двойната връзка) на натуралния субстрат андрост-4-ен дион се отличават с по-висока активност от стероидите с двойна връзка в Δ^5 позиция (андрост-5-ен дион). Тези инхибитори участват в процеса на ароматизация с афинитет към ензима сравним с този на прототипа. Инхибиторите съдържат фрагменти, които ги отличават от прототипът и именно на тях се дължи необратимото инхибиране на P450 ароматаза.

Нестероидни инхибитори на ароматазата

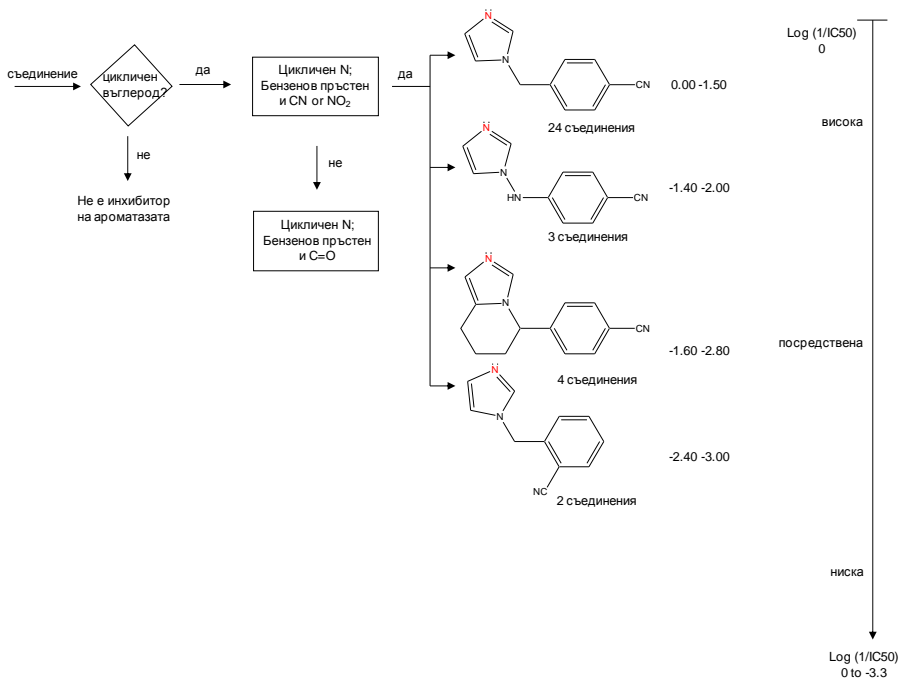
Повечето нестероидни инхибитори в обучаващото множество имат по-висока активност ($0.00 < \log (1/IC50) < -3.30$) от тази на стероидните инхибитори. Причината за това е, че докато стероидните инхибитори се съревновават с прототипа за свързване с ароматазата, нестероидните инхибитори директно блокират действието на ензима чрез координиране на Fe^{3+} в него. Координирането на Fe^{3+} става с помощта на свободната електронна двойка при хетероатома в молекулата на тези съединения. Следователно, колкото по-висока е електроотрицателността на хетероатома, толкова по-силно се очаква да бъде взаимодействието с ароматазата.

Освен наличието на хетероатом, силата на взаимодействие с ароматазата се определя и от наличието на допълнителна функционална група, която се характеризира с електронно-акцепторни свойства. Ролята на тази група е да осигури образуването на водородни връзки с каталитичния център

на ензима. Прави впечатление, че за ефективното взаимодействие с ароматазата, в молекулата на инхибитора трябва да присъстват едновременно два вида функционални групи: една електронно-донорна група (N, O или S) за координирането на желязото и една електронно-акцепторна група ($C\equiv N$ или NO_2) за образуване на водородни връзки. Изтегляйки електронната плътност към себе си, електронно-акцепторната група понижава заряда на хетероатома, което се отразява негативно на координиращата му способност. Този ефект е толкова по-силно изразен, колкото по-близо в молекулата са разположени тези две функционални групи.

Преносът на електронен заряд в молекулата може да се ограничи с използването на хидрофобна въглеродородна верига, която да разделя двете взаимно компенсиращи се функционални групи. Тази хидрофобна верига изпълнява две функции: 1) ограничава преноса на електрони от донорната към акцепторната група и 2) осигурява взаимодействие с алифатните аминокиселини в каталитичния център на ензима.

На Фигура 8 се показано, че всички съединения от обучаващото множество, които притежават азотен хетероатом, $C\equiv N$ или NO_2 група и въглеродородна (метиленова) верига се отличават с много висока инхибираща способност ($0.00 < \log (1/IC_{50}) < -1.50$). Влиянието на метиленовата верига върху потентността на инхибиторите е изследвана за тази част от тях, при които CH_2 групата е заменена с NH. Оказва се, че NH групата осигурява електронен мост между азота и CN групата, като така понижава потентността на инхибиторите ($-1.40 < \log (1/IC_{50}) < -2.00$). Наличието на обемисти въглеродородни вериги също оказва негативно влияние върху активността ($-1.60 < \log (1/IC_{50}) < -2.80$) на тези инхибитори. Допуска се, че обемистите вериги затрудняват позиционирането на инхибитора в мястото им на взаимодействие с ароматазата.



Фигура 8. Структурни характеристики специфични за високо активните нестероидни инхибитори.

Позицията на акцепторните групи в бензеновото ядро също оказва влияние върху активността на нестероидните инхибитори. Анализа на експерименталните данни показва, че инхибиторите с C≡N група на орто-позиция в бензеновото ядро се отличават с по-ниска активност ($-2.40 < \log(1/IC_{50}) < -3.00$) от пара-заместените им производни. Това понижаване на активността може да се обясни с отрицателния индукционен (или поляризационен) ефект (-I). Този ефект отчита поляризацията на връзките в молекулите и възниква, когато въглеродната верига е свързана с електроотрицателни атоми от въглерода. Както може да се очаква, индукционното влияние на заместителите прогресивно намалява с увеличаване броя на въглеродородните връзки. Следователно, колкото по-малък е броят на

връзките между заместителя и хетероатома, толкова по-голям ще бъде отрицателния индукционен ефект, т.е. толкова по-силно ще е влиянието на заместителя. С високите стойности на -I може да се обясни по-ниската активност на орто-заместените нестероидни инхибитори.

Идентифицираните структурни характеристики, специфични за двата вида инхибитори на ароматазата са имплементирани в йерархично организирано дърво на решенията. С най-висок приоритет са силните инхибитори на ароматазата, следвани от тези с по-нисък афинитет и т.н. С помощта на така организираната профилираща схема може да се изследва способността на огромен брой химични съединения да блокират действието на ензима ароматаза.

4. Моделиране на *in vivo* генотоксични ефекти

Съществуват два типа експериментални системи, които се използват за оценяване на генотоксични ефекти. Единият тип са *in vivo* системите, при които биологичната активност на веществата се оценява в целия жив организъм. Другият тип са *in vitro* системите, при които експерименталните условия са свързани с използването на бактериални или животински клетки, т.е. експериментите се провеждат в изкуствена среда. Разликите в експерименталните условия *in vitro* и *in vivo* често са предпоставка за получаването на несъответстващи резултати за едно и също съединение в тези две системи. Такива различия не само затрудняват интерпретирането на крайния генотоксичен ефект, но също така правят невъзможно компютърното моделиране на съответното биологично свойство.

За решаването на този проблем, в дисертационната работа са дефинирани следните две задачи: 1) да се създаде *in vitro-in vivo* екстраполационна схема, която да позволява идентифицирането на съединения, за които

несъответствията в експерименталните данни се дължат само на разлика в метаболитния капацитет на двете системи и 2) да се отчете възможността за активация и дезактивация на химични съединения при моделирането на *in vivo* генотоксични ефекти в костен мозък и в черен дроб на гризачи.

4.1. Експериментални данни за генотоксичност

557 структурно разнородни химични съединения са събрани от различни литературни източници, целящи да опишат възможността за формиране на вторични ядра в костен мозък на гризачи. Тези съединения са използвани за изграждане на модела за генотоксичност в костен мозък.

Литературни данни оценяващи *in vitro* мутагенността на базата на тестовете Ames, CA или MLA са намерени за 397 химични съединения. Данните от *in vitro* Ames теста с отчитане на метаболитната активация (+S9) са представени от 283 химични съединения. Данни за *in vitro* CA са събрани за 296 съединения, докато данни за *in vitro* MLA са намерени за 194 съединения.

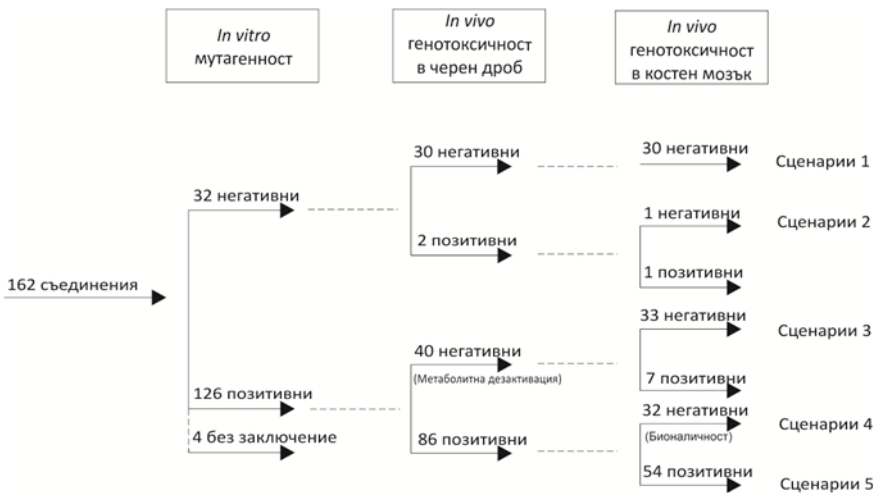
Генотоксичността в черен дроб е изследвана на базата на 185 химични съединения тествани с Comet, UDS или TGR в *in vivo* среда. *In vivo* Comet теста предоставя генотоксични данни за 127 (69%) от общия брой 185 химични съединения. TGR теста допринася в това изследване с генотоксични данни за 34 (18%) от общо 185 съединения. *In vivo* UDS предоставя най-малък брой генотоксични данни за черен дроб на гризачи, а именно 24 (13%) от 185 съединения. От общия брой 185 химични съединения, 109 (59%) са с позитивни генотоксични данни и 76 (41%) са с негативни данни.

4.2. Резултати и обсъждане

Работната хипотеза за моделиране на сложни токсикологични ефекти се основава на допускането, че взаимодействията на съединенията с ДНК и/или със специфични протеини (хистон, топоизомераза и др.) обхващат целия диапазон от възможни въздействия, които биха могли да нарушат нормалното функциониране на клетките. Например, формирането на вторични ядра възниква в резултат на взаимодействие с ДНК и/или с протеини (класогенност), но също така и чрез нарушаване на функциите на делителното вретено (анеугенност, т.е. взаимодействие с протеини). В тази връзка, реакционната компонента на *in vivo* моделите за прогнозиране на генотоксични ефекти в черен дроб и в костен мозък би следвало да се основава на взаимодействията на съединенията с ДНК и с протеини.

***In vitro* - *in vivo* екстраполация на данни за генотоксични ефекти**

За изграждането на *in vitro-in vivo* екстраполация, на чиято логика е залегнало разработването на представените механистични *in vivo* модели, е необходимо да разполагаме с експериментални данни, които да оценяват генотоксичността за едни и същи съединения в три нива на биологична организация - *in vitro*, *in vivo* в черен дроб и *in vivo* в костен мозък. Такова препокриващо се множество от експериментални данни е намерено за 162 химични съединения. Разпределението на генотоксичните данни по трите нива на биологична организация са обобщени в екстраполационна схема, която е представена на Фигура 9.



Фигура 9. Екстраполоационна схема с данни за генотоксичност в три нива на биологична организация

Изследването в първото ниво на биологична организация се базира на 162 химични съединения, за които са налични позитивни и негативни *in vitro* експериментални данни получени от: Ames (+S9), CA, MLA тестове. Заключение за *in vitro* мутагенност не може да се направи за четири от 162-те съединения, поради наличието на конфликтни данни от Ames и CA. Всички четири съединения са позитивни в Ames и негативни в CA, което е в конфликт с работната ни хипотеза. Дадено съединение се счита за негативно (немутагенно), ако дава отрицателни резултати във всички тестове. За да се приеме за позитивно (мутагенно) съединението е достатъчно да бъде положително дори и само в един от изследваните тестове.

32-те *in vitro* негативни съединения са тествани за активност в *in vivo* среда както в черен дроб, така и в костен мозък. 30 от тези 32 немутагенни

съединения се оказват негативни и в *in vivo* среда. 2 съединения, които са *in vitro* негативни показват позитивен ефект в *in vivo* среда. Тези две съединения са: 1,4- dichlorobenzene (CAS:104-46-7) и cyproterone acetate (CAS:427-51-0). Те проявяват активността си още във второто ниво на биологична организация, т.е. в черния дроб. От тях, само 1,4- dichlorobenzene се оказва позитивно в костен мозък. Подобен анализ на данните за тези две съединения показва, че биоактивация (*in vitro* негативно – *in vivo* позитивно) в черен дроб е възможна само за cyproterone acetate. Не са намерени убедителни данни за биоактивация директно в костен мозък дори и за съединения, които не са част от екстраполационната схема. Счита се, че този тип биоактивация се наблюдава в изключително редки случаи.

Аналогично сравнение на данните по трите нива беше направено и за 126-те *in vitro* позитивни съединения. 40 (32%) от тези 126 съединения се оказват *in vivo* негативни в черен дроб. Този резултат показва, че *in vitro* позитивният ефект не може да бъде използван като идентификатор за позитивен генотоксичен ефект в *in vivo* среда. Метаболитната логика в живите организми е различна от тази в инкубационна среда и често води до дезактивация на *in vitro* позитивни съединения. Останалите 86 (68%) от 126 съединения проявяват позитивен ефект в *in vivo* черен дроб. 54 (63%) от тези 86 са позитивни също и в *in vivo* костен мозък. Останалите 32 (37%) от тези 86 съединения се оказват негативни в *in vivo* костен мозък. Допуска се, че концентрацията на тези 32 съединения постепенно се изчерпва в хода на транспортиране до костния мозък в резултат на взаимодействие с протеини.

40-те съединения, които са идентифицирани като негативни в *in vivo* черен дроб също бяха изследвани за *in vivo* ефект в костен мозък. 33 (83%) от тези 40 съединения се оказват негативни и в *in vivo* костен мозък. Останалите 7 (17%) съединения от тях са позитивни в костен мозък. Данните за тези съединения бяха детайлно анализирани от експерти с цел да се изследва

потенциалната възможност за метаболитна активация на съединенията директно в отдалечения костен мозък. Резултатите от този анализ показваха, че несъответствието на данните за генотоксичност в черен дроб и в костен мозък се дължат на различия в типа на администриране на веществата, в метаболизма на изследваните гризачи (мишки и плъхове) и др.

Моделиране на *in vivo* генотоксичност в костен мозък

Моделирането за *in vivo* генотоксичност в костен мозък се основава на експериментални данни за 557 химични съединения. Моделът се състои от две компоненти: 1) реакционна компонента взаимствана от *in vitro* модела за хромозомни нарушения и 2) симулатор на метаболизма в живи организми.

Работната хипотеза на *in vivo* модела в костен мозък е, че ако достъпът на родителско съединение или негов реакционен продукт до ДНК или протеините в клетките е неограничен, то разлика в реакционната способност *in vitro* и *in vivo* не би следвало да се наблюдава. В този смисъл, **реакционната компонента на *in vivo* модела в костен мозък може да бъде същата като тази в *in vitro* SA модела.** В *in vivo* среда, достъпът на реакционните продукти до клетките в живите организми често е затруднен от фактори, като адсорбция, разпределение, метаболизъм и отделяне (ADME). Това налага необходимостта от въвеждане в *in vivo* модела на втора компонента, която адекватно да пресъздава токсикокинетичните процеси, протичащи в живите организми, т.е. на *in vivo* метаболизма.

Нов **симулатор на метаболизма** в плъхове е разработен на базата на документиран *in vivo* метаболитни пътища за 220 структурно разнообразни химични съединения. Изграждането на документираната метаболитна база е съобразено със следните изисквания:

- Данни за метаболизма: само в *in vivo* среда

- Вид гризачи: само плъхове
- Експериментална система: целият организъм
- Да не са използвани ензимни стимулатори или инхибитори

Настоящата версия на метаболитния симулатор се състои от 506 структурно обобщени молекулни трансформации, които могат да бъдат отнесени към следните групи:

- 26 спонтанно протичащи трансформации, т.е. които не са ензимно катализирани
- 415 Фаза I ензимно катализирани трансформации, като: епоксидиране, алифатно окисление, хидролиза на естери, дехалогениране и др.
- 65 Фаза II ензимно катализирани трансформации, като свързване с глутатион, сулфатиране, ацетилиране и др.

Важно е да се отбележи, че *in vitro* системите представляват механична смес от животински (или бактериални) клетки, тестваното вещество и изкуствена метаболитна система, която е смес от микрозомни и цитозол. Реакционните продукти получени в тези системи се намират в директен контакт с ДНК и протеините в клетките и могат лесно да проявят генотоксичното си действие. В живите организми, метаболитните ензими работят организирано под формата на сложни ензимни комплекси. В такава среда, получените реакционни продукти следват определена метаболитна „логика“, наричана още канален ефект. При него, ензимите образуват комплекси, метаболони, в резултат на което продуктът на дадена трансформационна реакция представлява субстрат на следващата трансформационна реакция без да напуска метаболон. Така, реакционните продукти в *in vivo* среда не са в директен контакт с ДНК и протеините в

клетките и често не успяват да упражнят генотоксичен ефект, тъй като биват трансформирани до водоразтворими продукти.

Костният мозък има силно ограничен метаболитен капацитет и липсата на генотоксичен ефект в него не може да се обясни с метаболитни трансформации. Известно е, че силно реакционноспособните вещества или техните метаболити могат да взаимодействат с протеините, които срещат по пътя си към костния мозък. Това може да доведе до изчерпване на биологичната наличност на веществата, но тази дезактивация не е метаболитна.

С цел адекватно да се симулира *in vivo* дезактивацията на съединенията, в настоящата версия на модела са въведени два типа дезактивационни пътища. Първият тип дезактивационни пътища имат за цел да обяснят липсата на генотоксичен ефект в черен дроб и в костен мозък на съединения, които са позитивни в *in vitro* среда. Те отчитат метаболитната дезактивация, която протича в черния дроб. Вторият тип дезактивационни пътища обясняват липсата на генотоксичен ефект в костен мозък на съединения, които са позитивни в *in vitro* среда и в *in vivo* черен дроб. Те отчитат изчерпването на реакционните продукти в резултат на взаимодействие с протеини по пътя си към костния мозък. Въведени са 76 дезактивационни пътища от първия тип и 52 дезактивационни пътища от втория тип. Отчитайки дезактивацията на съединенията както в черен дроб, така и по пътя им към костния мозък, в *in vivo* MNT модела бяха постигнати задоволителни статистически резултати: чувствителност от 82% и специфичност от 61%. Умерената специфичност на модела се дължи на факта, че дезактивационни пътища бяха дефинирани само за тази част от фалшивите позитиви, за които бяха намерени наблюдавани данни за генотоксичност в черен дроб. Предстои да се направи подробно търсене в литературата на данни за генотоксичност в черен дроб и на останалите фалшиви позитиви.

Моделиране на *in vivo* генотоксичност в черен дроб

Моделът за *in vivo* генотоксичност в черен дроб е изведен на базата на обучаващо множество от 185 структурно разнообразни съединения, оценени за активност с един от трите теста: Comet, UDS, TGR. Реакционната компонента на *in vivo* модела в черен дроб е същата като тази на *in vivo* модела в костен мозък, но метаболитната компонента е заимствана само частично. Дезактивацията на съединенията по пътя им към костния мозък не са обект на изследване в този модел, тъй като отчитаме само генотоксичността в черен дроб. Извеждането на *in vivo* модела в черен дроб изцяло се основава на метаболитната „логика” идентифицирана в *in vitro-in vivo* екстраполацията на данни за 162 съединения. Следвайки тази „логика” повечето от съединенията, които са *in vitro* негативни ще останат негативни в *in vivo* среда, като биоактивация в черен дроб може да се очаква само за малък брой съединения (супротероне acetate). Една част от съединенията (или техните метаболити), които са позитивни в *in vitro* среда са подложени на *in vivo* метаболитна дезактивация в черен дроб. Това определя тяхната неспособност да причинят генотоксичност в този орган. Следвайки тази логика, ако дадено *in vitro* позитивно съединение не е подложено на метаболитна дезактивация в черния дроб, то ще бъде прогнозирано от модела като *in vivo* генотоксично. В настоящата версия на модела бяха идентифицирани 76 метаболитни дезактивационни пътя в черен дроб. Моделът се характеризира с висока чувствителност от 85%, но показва сравнително ниска специфичност от 49%. Причината за ниската специфичност е, че дезактивация е идентифицирана само за тази част от фалшивите позитиви, които са част от екстраполационната схема. Предстои анализ на останалите фалшиви позитиви от модела.

ИЗВОДИ

1. Разработени са модели за оценка на ендокринна и генна токсичност, които са в съответствие с одобрените от OECD принципи за валидност на (Q)SAR: 1) добре дефиниран токсичен ефект, 2) ясен алгоритъм, 3) определена област на приложимост, 4) подходящо измерване на статистическите характеристики, възпроизводимостта и предсказателните свойства и 5) механистично интерпретиране на модела и параметрите участващи в него.
2. Изведен е модел за прогнозиране на афинитета за свързване на химичните съединения с арил хидрокарбонения рецептор (AHR). Моделът отчита количествената зависимост, която съществува между потентността за свързване на съединенията с AHR и силата на генната експресия. Тази зависимост позволява количествено да се прогнозира афинитетът към рецепторно свързване с данни само за генна експресия и обратното – да се прогнозира генна експресия с данни само за афинитет на свързване.
3. Разработен е SAR модел за прогнозиране на способността на химичните съединения да блокират действието на цитохром P450 ароматаза, който е отговорен за превръщането на андрогените в естрогени. Моделът позволява да се идентифицират структурните характеристики, които определят силата на инхибиращото действие на стероидни и нестероидни съединения. Структурните характеристики са йерархично организирани в дърво на решенията, което облекчава приоритизирането на голям брой химични съединения.
4. Създадена е работна схема от 162 химични съединения с налични експериментални данни за мутагенност и генна токсичност в три различни нива на биологична организация: *in vitro*, *in vivo* в черен дроб

и *in vivo* в костен мозък. Анализът на литературните данни за тези съединения позволява да се идентифицира метаболитната „логика”, която определя биологичната наличност на съединенията в живите организми. На тази метаболитна „логика” се основава разработването на два *in vivo* модела за генотоксичност - в черен дроб и в костен мозък.

Списък на публикациите, свързани с дисертационната работа

1. O. Mekenyan, Dimitrov, S., Pavlov, T., Dimitrova, G., Todorov, M., **Petkov, P.**, Kotov, S. (2012), Simulation of chemical metabolism for fate and hazard assessment. V. Mammalian hazard assessment, *SAR and QSAR in Environmental Research*, Vol. 23, pp. 553-606.
2. O. G. Mekenyan, **Petkov, P.I.**, Kotov, S.V., Stoeva, S., Kamenska, V.B., Dimitrov, S.D., Honma, M., Hayashi, M., Benigni, R., Donner, E.M., Patlewicz, G., (2012) Investigating the relationship between in vitro-in vivo genotoxicity: Derivation of mechanistic QSAR models for in vivo liver genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation which encompass metabolism, *Chemical Research in Toxicology*, Vol. 25, pp. 277-296.
3. **P.I. Petkov**, Rowlands, J.C., Budinsky, R., Zhao, B., Denison, M.S., Mekenyan, O., (2010), Mechanism-based common reactivity pattern (COREPA) modelling of aryl hydrocarbon receptor binding affinity, *SAR and QSAR in Environmental Research*, Vol. 21, pp. 187-214.
4. **P.I. Petkov**, Temelkov, S., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., Mekenyan, O.G., (2009), Mechanism-based categorization of aromatase inhibitors: A potential discovery and screening tool, *SAR and QSAR in Environmental Research*, Vol. 20, pp. 657-678.

Списък на участия в научни форуми, свързани с дисертационния труд

1. Presentation of mutagenicity, skin sensitization, hormonal toxicity and pipeline models implemented in TIMES, **Oral Presentation**, Expert meeting, 13-17 May, 2013, Tokyo, Japan.
2. Predicting in vivo liver genotoxicity and in vivo bone marrow micronucleus formation simulating in vivo metabolism, **Oral Presentation**, 15th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in Environmental and Health Sciences, 18-22, June, 2012, Tallinn, Estonia.
3. Investigating in vitro-in vivo genotoxicity gap: mechanistic models for in vivo liver genotoxicity and in vivo micronucleus based on metabolism considerations, **Poster Presentation**, SETAC Europe 21st Annual Meeting, 15-19 May, 2011, Milan, Italy.
4. Modeling in vivo bone marrow micronucleus test by simulating detoxification pathways, **Poster Presentation**, SETAC Europe 20th Annual Meeting, 23-27 May, 2010, Seville, Spain.
5. Mechanistically Based Categorization of Aromatase Inhibitors, **Oral Presentation**, Fifth International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, 4-8 July, 2009, Istanbul, Turkey.
6. Mechanism based Common Reactivity Pattern (COREPA) modeling of AHR binding affinity, **Oral Presentation**, Fourth International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, 1-5 Sept., 2007, Moscow, Russia.

Забелязани цитати:

1. J. Devillers, (2013) Methods for building QSARs, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 930, pp. 3-27.
2. J. Devillers, Devillers, H., Decourtye, A., Aupinel, P., (2010), Internet resources for agent-based modelling, *SAR and QSAR in Environmental Research*, Vol. 21, pp. 337-350.
3. A. K. Madan, Bajaj, S., Dureja, H., (2013), Classification models for safe drug molecules, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 930, pp. 99-124.
4. E.-Y., Choi, Lee, H., Dingle, R.W.C., Kim, K.B., Swanson, H.I., (2012), Development of novel CH223191-based antagonists of the aryl hydrocarbon receptor, *Molecular Pharmacology*, Vol. 81, pp. 3-11.
5. A. Eisner, Luoh, S.-W., (2011), Breast cancer medications and vision: Effects of treatments for early-stage disease (Review), *Current Eye Research*, Vol. 36, pp. 867-885.
6. N. Quignot, Bois, F.Y. (2013), A Computational Model to Predict Rat Ovarian Steroid Secretion from In Vitro Experiments with Endocrine Disruptors, *PLoS ONE*, Vol. 8, Article number 53891 (In Press).
7. Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Koç, F., Öztemel, S., Aksoy, H., Mamur, S., Demirtaş Korkmaz, F. (2013) Genotoxicity assessment of vaccine adjuvant squalene, *Food and Chemical Toxicology* 56, pp. 240-246.

Участие в научни проекти:

1. Проекти с водещи световни компании:
 - Dow Chemical (САЩ):
 - Изграждане на база данни за AHR агонизъм и антагонизъм

- Създаване на модел за прогнозиране на афинитета за свързване на ароматни въглеводороди с AHR и последващата генна експресия.
 - DuPont (САЩ):
 - Екстраполация на експериментални данни за генотоксичност в три различни нива на биологична организация
 - Изграждане на модел за прогнозиране на генотоксични ефекти в черен дроб и костен мозък
2. Проекти с Национални Институты:
- National Institute of Health Science (Япония):
 - Проверяване на качеството на наличните в литературата данни за мутагенност и генотоксичност
 - Разширяване на обучаващото множество за Ames мутагенност
 - Изследване на възможността от метаболитна биоактивация в черен дроб

Използвани съкращения:

ADME	адсорбция, разпределение, метаболизъм и отделяне
AHR	арил хидрокарбонов рецептор
ARNT	хетеродимер на арил хидрокарбоновия рецептор
CA	хромозомни аберации
Comet	гел електрофореза
COREPA	Вероятностен подход към дефиниране на общ реакционен образ
GA	генетичен алгоритъм
IC50	концентрация инхибираща на 50% даден биологичен ефект

MLA	тест оценяващ мутагенност в лимфоцити на мишки
MNT	тест оценяващ формирането на вторични ядра
NADPH	никотинамид аденин динуклеотидфосфат
PAH	полиароматни въглеродороди
REACH	закон на Европейската Общност за оценка и регистрация на химичните съединения
QSAR	количествена връзка между структура и свойства
REP	относителен афинитет
SAR	връзка между структура и свойства
TCDD	2,3,7,8 – тетрахлородибензо диоксин
[3H]TCDD	радиобелязан тетрахлородибензо диоксин
TFT	трифлуоротимидин
TGR	тест за оценка на транс генни мутации в гризачи
TIMES	симулатор на метаболизма в тъкани
UDS	непредвидени синтези на ДНК
XRE	област от ДНК отговорна за свързване с ксенобиотици