

JADWIGA PISKORSKA-PLISZCZYŃSKA

METODY SAR I QSAR W BADANIU MECHANIZMU DZIAŁANIA DIOKSYN

SAR AND QSAR IN DIOXIN MECHANISM OF ACTION STUDY

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
24-100 Puławy, ul. Partyzantów 57
Kierownik: prof. dr hab. J. Żmudzki

W pracy omówiono przykłady zastosowania metod badania zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną dioksyn i ich znaczenie w ustalaniu mechanizmu działania halogenowych węglowodorów aromatycznych.

WSTĘP

Informacje o potencjalnie niebezpiecznych dla zdrowia związkach chemicznych obecnych w środowisku naturalnym są bardzo ograniczone. Liczba nowych związków rośnie w tempie wyższym niż zostają zakończone klasyczne badania toksyczności tych związków. Równocześnie dążenie do zmniejszenia liczby zwierząt w badaniach toksykologicznych, rosnące koszty tych testów, niska wartość ekstrapolacyjna wyników badań na zwierzętach – spowodowały poszukiwanie zwalidowanych metod alternatywnych przewidywania zagrożenia toksykologicznego związków chemicznych, a na ich podstawie oceny narażenia populacji na ksenobiotyki [4, 7]. Jednym z przykładów testów alternatywnych o podobnej wartości przewidywania toksyczności jak klasyczne badania z użyciem zwierząt doświadczalnych stanowią metody badania zależności aktywności biologicznej związków chemicznych od ich struktury (SAR) a w ich rozwój istotny wkład wniosły w połowie lat sześćdziesiątych prace *Hansch* i wsp. [16, 17].

ZALEŻNOŚCI STRUKTURA CHEMICZNA – AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Badania zależności struktura-aktywność stanowiły przedmiot zainteresowania badaczy od czasu fundamentalnego odkrycia, że aktywność biologiczna związków chemicznych jest uzależniona od ich struktury. Tego typu podejście do obserwowanych zjawisk biologicznych od początkowo prostych analogii jakościowych doprowadziło do opracowania metod ilościowych. Badania relacji między strukturą a aktywnością biologiczną pierwotnie opracowano i zastosowano przy projektowaniu substancji farmakologicznych, herbicydów i pestycydów. Stosunkowo niedawno metodologia SAR znalazła zastosowanie w badaniach korelacji między cechami molekularnymi związków chemicznych a ich działaniem toksycznym dla oszacowania właściwości toksykologicznych. Ewolucja z typowego projektowania leków do oceny ryzyka toksykologicznego

postawiła badaczy przed problemem adaptacji metodologii zarówno w zakresie determinantów molekularnych jak i matematycznej oceny danych.

Zależności określane współcześnie mianem SAR (ang. structure activity relationship) pozwalają ustalić specyficzne cechy cząsteczki badanego związku wpływające na jego aktywność biologiczną i wywodzą się z danych eksperymentalnych uzyskanych z badania grupy związków pokrewnych chemicznie. Ocena istniejących współzależności zależy głównie od podobieństw budowy chemicznej pomiędzy związkami badanymi a znanym związkiem odniesienia. Metody znane pod nazwą QSAR (ang. quantitative structure activity relationship) polegają na znalezieniu odpowiednich parametrów fizyko-chemicznych cząsteczki i ilościowym określeniu za ich pomocą przewidywanej aktywności biologicznej [16]. Analiza QSAR stosując najnowsze osiągnięcia matematyk jak wielowymiarowa analiza wariancji oraz szybkie maszyny cyfrowe o dużej pojemności pamięci dostarcza informacji o relacjach między tymi parametrami a odpowiedzią biologiczną. Bowiern reakcje biologiczne, jak na przykład reakcja enzymatyczna czy oddziaływanie liganda z receptorem uzależnione są od struktury przestrzennej, wiązań niekowalencyjnych (elektrostatycznych, wodorowych, *van der Waalsa*) oraz od równowagi hydrofilowo-hydrofobowej która wpływa na dotarcie toksyny do miejsca działania [16]. *Hansch* i *Leo* stabelaryzowali wartości stałych fizykochemicznych podstawników, dla których doświadczalnie dowiedziono, że charakteryzują one zależności między strukturą chemiczną i biologiczną aktywnością związków i są przydatne dla ilościowego opisywania zależności struktura – aktywność [17]. Do ważniejszych należą stała *Hammeta* (σ) charakteryzująca przepływ elektronów między pierścieniami a podstawnikami, parametry steryczne (elektronowe oddziaływanie podstawników na reakcję, przyciągania międzycząsteczkowe) i stała π , wprowadzona przez *Hanscha* i *Fujitę* a charakteryzującą lipofilny charakter cząsteczki. Model *Hanscha* jest jednym z wielu sposobów ilościowego badania zależności między strukturą chemiczną związków a ich właściwościami biologicznymi, zaś sukces tzw. podejścia *Hanscha* jest oczywisty, na co wskazują dziesiątki jego zastosowań [2, 3, 8, 9, 10, 11, 12].

W zasadzie QSAR jest modelem, który uzależnia biologiczną aktywność serii podobnych związków do jednej lub kilku właściwości cząsteczki. Opracowany dla serii związków pokrewnych chemicznie (np. kongenerów), na postawie aktywności kilku przedstawicieli grupy pozwala przewidzieć aktywność pozostałych.

HALOGENOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE

W ostatnich latach duże zainteresowanie świata naukowego budzą halogenowe węglowodory aromatyczne (HAH, ang. halogenated aromatic hydrocarbons). Oprócz polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD) i dibenzofuranów (PCDF) zalicza się do nich polichlorowane bifenyly (PCB), naftaleny (PCN), trifenyle (PCT), polibromowane bifenyly (PBB) i inne. Związki te wywołują podobny zespół objawów toksycznych i uważa się, że posiadają identyczny mechanizm działania. Badania genetyczne na zwierzętach oraz badania zależności struktura – aktywność biologiczna wykazały, że większość (jeśli nie wszystkie) reakcje biologiczne wywołane przez te związki powstają poprzez przyłączenie toksyn do cytoplazmatycznego białka zwanego receptorem Ah (AhR, ang. aryl hydrocarbon receptor) [29]. Funkcjonalnie receptor Ah, jest białkiem wiążącym się z DNA po uprzednim związaniu liganda i translokacji do jądra komórko-

wego. W wyniku przyłączeniu do DNA aktywnego kompleksu ligand-receptor, następuje transkrypcja odpowiednich genów [25, 27, 44, 48]. Wraz z indukcją cytochromu P-450 następuje skoordynowana indukcja conajmniej 20 monoooksygenaz w tym hydroksylazy arylowej (AHH) oraz O-deetylasy rezorufiny (EROD). Pomiaru aktywności tych enzymów mikrosomalnych są najczęściej stosowaną biochemiczną metodą oceny działania dioksyn [15, 18, 24, 25, 27, 29, 45].

SAR W BADANIU RECEPTORA DIOKSYN

Badania SAR stanowią również ważną metodę badania chemicznego receptora biologicznego. To nowe podejście badawcze dostarcza informacji o prawdopodobnej budowie miejsca wiązania na receptorze, określa siły fizykochemiczne uczestniczące w interakcji receptora z ligandami i pozwala ocenić rolę receptora w badanym procesie. Stereoselektywna interakcja między receptorem a jego agonistami stanowi silny dowód potwierdzając udział danego receptora w badanych procesach biologicznych [14].

Zastosowanie do badań znakowanego trytem radioliganda (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny) doprowadziło do odkrycia w 1976 roli receptora Ah zaś badania SAR i QSAR potwierdziły jego rolę w mechanizmie działania dioksyn i związków pokrewnych [14, 29, 44]. Celem szczegółowych badań izomerów i kongenerów dioksyn, dibenzofuranów i PCB było określenie wpływu struktury chemicznej tych związków na interakcje z receptorem i uzyskiwane efekty biologiczne i toksyczne [1, 13, 20, 21, 22, 34, 35, 37, 38, 39, 40, 46]. W badaniach tych powinowactwo do AhR określano poprzez kompetycyjne wypieranie [1,6-³H]-2,3,7,8-TCDD z kompleksu z receptorem i określano EC₅₀ dla każdego badanego kongeneru, tj. stężenie redukujące wiązanie swoiste [³H]-TCDD do 50%. Potencjał indukcyjny testowanych związków badano w hepatocytach linii komórkowej H4IIE dokonując pomiaru aktywności enzymów mikrosomalnych (AHH i EROD) i określano ED₅₀, tj. stężenie induktora potrzebne do wywołania 50% odpowiedzi maksymalnej. Równolegle badano toksyczność dioksyn *in vivo* dla szczurów poprzez pomiar spadku masy ciała i inwolucję grasicy, dwóch najczęściej występujących syndromów działania toksycznego dioksyn u zwierząt modelowych [20, 21, 22]. Szukano zależności pomiędzy powinowactwem badanych izomerów i kongenerów do receptora Ah wątroby szczura *in vitro*, a ich aktywnością *in vitro* oraz toksycznością *in vivo*. Ponadto badano wpływ podstawników w cząsteczce PCDD na aktywność tych związków *in vivo*. Ponadto badano wpływ podstawników w cząsteczce PCDD na aktywność tych związków *in vivo* i *in vitro* oraz potencjalne różnice międzygatunkowe cytozolowego AhR wątroby izolowanego od kilku gatunków zwierząt laboratoryjnych [13, 34, 35].

Poniżej zostaną omówione na podstawie piśmiennictwa niektóre przykłady badania zależności struktura – aktywność (SAR) wybranych PCDD, PCDF i grupy pochodnych TriCDD, dzięki którym potwierdzono rolę AhR w mechanizmie działania dioksyn, a które przeprowadzono dla tej grupy przemysłowych i środowiskowych toksyn [20, 21, 22, 23, 32, 33, 38, 39, 40].

WPLYW STRUKTURY CHEMICZNEJ DIOKSYN NA AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNĄ

Na podstawie licznych badań nad charakterystyką wiązania dioksyn i związków pokrewnych do receptora Ah można stwierdzić, że niektóre cechy budowy takie jak

system pierścieni aromatycznych, obecność podstawników i ich sposób rozmieszczenia w cząsteczce są istotne dla wiązania do receptora.

Tabela 1. Wpływ struktury PCDD na powinowactwo do receptora Ah i indukcję enzymów mikrosomalnych *in vitro* [21]
The effect of structure on the *in vitro* rat hepatic cytosolic receptor binding and AHH/EROD induction potencies [21]

PCDD	EC ₅₀ (M) receptor Ah	ED ₅₀ (M) AHH	ED ₅₀ (M) EROD
2, 3, 7, 8	1,10 x 10 ⁻⁸	7,2 x 10 ⁻¹¹	1,9 x 10 ⁻¹⁰
1, 2, 3, 7, 8	7,8 x 10 ⁻⁸	1,1 x 10 ⁻⁸	1,7 x 10 ⁻⁸
2, 3, 7	7,1 x 10 ⁻⁸	3,6 x 10 ⁻⁷	1,4 x 10 ⁻⁷
2, 3, 6, 7	1,6 x 10 ⁻⁷	6,1 x 10 ⁻⁸	1,1 x 10 ⁻⁸
2, 3, 6	2,2 x 10 ⁻⁷	-	-
1, 2, 3, 4, 7, 8	2,8 x 10 ⁻⁷	2,1 x 10 ⁻⁹	4,1 x 10 ⁻⁹
1, 3, 7, 8	7,9 x 10 ⁻⁷	5,9 x 10 ⁻⁷	3,2 x 10 ⁻⁷
1, 2, 4, 7, 8	1,1 x 10 ⁻⁶	2,1 x 10 ⁻⁸	1,1 x 10 ⁻⁸
1, 2, 3, 4	1,3 x 10 ⁻⁶	3,7 x 10 ⁻⁶	2,4 x 10 ⁻⁶
2, 8	3,2 x 10 ⁻⁶	> 1,0 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻⁴
1, 2, 3, 4, 7	6,4 x 10 ⁻⁶	6,6 x 10 ⁻⁷	8,2 x 10 ⁻⁷
1, 2, 4	1,3 x 10 ⁻⁵	4,8 x 10 ⁻⁵	2,2 x 10 ⁻⁶
OCDD	> 1,0 x 10 ⁻⁴	> 1,0 x 10 ⁻⁴	> 1,0 x 10 ⁻⁴
1	> 1,0 x 10 ⁻⁴	> 1,0 x 10 ⁻⁴	> 1,0 x 10 ⁻⁴

PCDD. W tab. I przedstawiono przykładowe wyniki badań izomerów i kongenerów PCDD przeprowadzone przez Masona i wsp. [21], a uzyskane przez nich dane wyraźnie wskazują na istnienie zależności pomiędzy strukturą chemiczną badanych związków a powinowactwem do receptora Ah.

Najaktywniejszy związek (2,3,7,8-TCDD) posiada atomy chloru we wszystkich 4 pozycjach bocznych, zaś zmniejszenie liczby atomów chloru w tych pozycjach powoduje obniżenie powinowactwa pozostałych tetrachlorodibenzo-p-dioksyn do receptora (2,3,6,7-, 1,3,7,8- i 1,2,3,4-TCDD). Niewielka różnica w strukturze pomiędzy 1,3,7,8- i 2,3,6,7-TCDD (tj. w pozycji 1,3 oraz 1,2 lub 6,7) powoduje aż pięciokrotnie niższe powinowactwo do receptora. Dodatkowe atomy chloru wyraźnie obniżają wiązanie się związku (1,2,3,7,8-penta, 1,2,3,4,7,8-heksa i oktachloro-dibenzo-p-dioksyna) do AhR.

Struktura badanych PCDD wyraźnie decyduje również o ich działaniu indukcyjnym podobnie jak o wiązaniu do receptora. Zmiana podstawników w 1,3,7,8- i 2,3,6,7-tetrachlorodibenzo-p-dioksynach znacząco zmniejszyła ich siłę indukcyjną. Dodatkowe atomy chloru (penta-, heksa- i oktachlorodibenzo-p-dioksyna) również zmniejszyły aktywność indukcyjną w stosunku do 2,3,7,8-TCDD. Porównując się wiązania receptora *in vitro* z toksycznością *in vivo* tych samych izomerów i kongenerów PCDD można stwierdzić, że te same cecha budowy decydują o ich toksyczności [21].

Stopień powinowactwa do receptora badanych izomerów i kongenerów PCDD potwierdza znaczenie struktury chemicznej dioksyn zaś wysoka stereoselektywność obserwowanych interakcji receptora Ah stanowi dowód przemawiający za jego udziałem

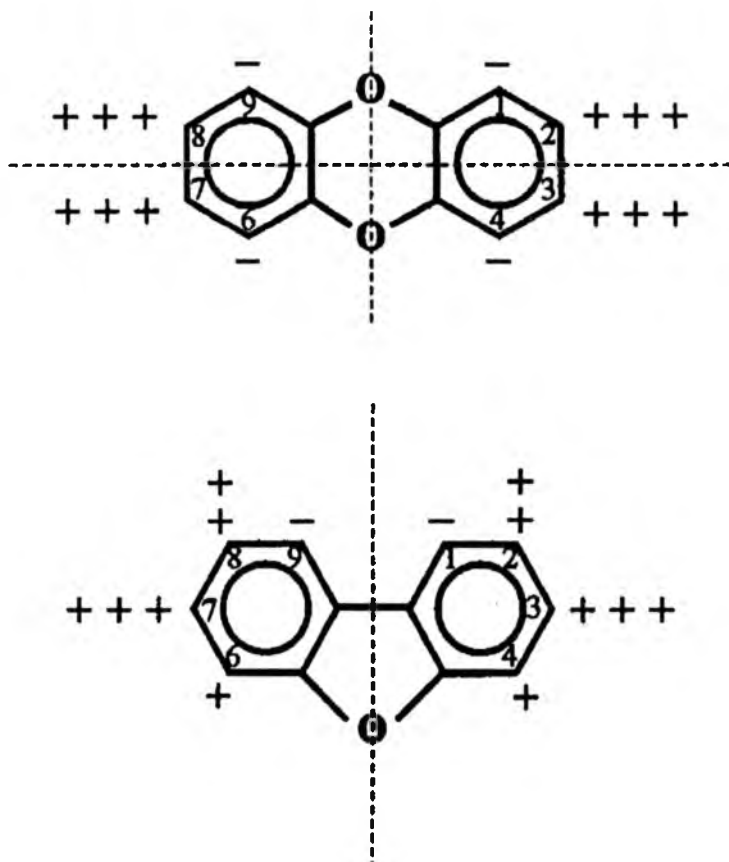
w mechanizmie działania dioksyn [14, 27, 44]. Poland i wsp. w swoich pionierskich pracach pierwsi opisywali podobne korelacje pomiędzy wiązaniem receptora *in vitro* a siłą indukcyjną *in vivo* i toksycznością ostrą (DL_{50}) dla serii kongenerów PCDD [29].

Podczas gdy wiązanie receptora *in vitro* wyraźnie koreluje z indukcją enzymów i toksycznością *in vivo* stwierdzono brak korelacji liniowej pomiędzy dwoma testami *in vitro* (tj. wiązaniem do receptora a indukcją enzymów) [20, 21, 22]. Również Bandiera i Denomme obserwowali słabą korelację pomiędzy obydwoma testami *in vitro* [1, 13]. Stosując metodę QSAR dla innej serii dioksyn wykazali oni, że powinowactwo do receptora zależy głównie od lipofilności podstawników, a indukcyjność ponadto od rozmiaru podstawnika. Ich zdaniem zmiany konformacyjne powstającego kompleksu AhR – ligand są przyczyną tych różnic a wskazywałoby na to pojawienie się parametru ΔB_s w matematycznym równaniu QSAR opisującym ilościowo wpływ struktury na indukcję enzymatyczną danej serii pochodnych 2,3,-dichlorodibenzo-p-dioksyn [1, 13].

PCDF. Podobnie jak dla dioksyn, dzięki badaniom SAR i QSAR, wykazano znaczenie struktury chemicznej polichlorowanych dibenzofuranów w wywoływaniu aktywności biologicznej. Stosując takie same metody badawcze wykazano, że również pozycje boczne (2,3,7,8) posiadają istotne znaczenie w wywoływaniu efektów biologicznych [20]. Powinowactwo jak i indukcja enzymów zależą od liczby atomów chloru: obniżanie atomów chloru powoduje zarówno obniżenie siły indukcyjnej jak i powinowactwa do receptora. Najaktywniejszymi ligandami okazały się tetra-, penta- i heksachlorodibenzofurany zawierające chlor w pozycjach 2,3,7,8. Zwiększanie atomów chloru w pozostałych pozycjach obniża aktywność PCDF. Najsilniej z receptorem Ah wiąże się 2,3,7,8-TCDF, w którym atomy chloru zajmują również cztery pozycje boczne cząsteczki. Obecność dodatkowego atomu chloru w pozycji 1 lub 4 skutkuje zwiększeniem aktywności w porównaniu do związków zawierających tylko 3 atomy w pozycjach bocznych oraz 2 w pozostałych tj. 1,2,3,7,8- 2,3,4,7,8-PCDF były bardziej aktywne niż 1,3,4,7,8-; 2,3,4,7,9-; 1,2,3,7,9- i 1,2,4,6,8-pentachlorodibenzofurany. Dwie pary badanych izomerów (1,3,4,7,8- i 1,2,4,7,8- oraz 2,3,4,7- i 2,3,4,8-), które różniły się podstawnikami tylko w pozycjach C-2 (lub C-8) oraz C-3 (lub C-7) znacząco różniły się między sobą potencjałem indukcyjnym.

Dibenzofurany podobnie jak dioksyny powodują syndrom głodzenia, zanikanie grasicy, immunotoksyczność, zmiany rozwojowe płodów. Zależna od struktury chemicznej jest ich toksyczność *in vivo* tj. spadek masy ciała i atrofia grasicy u samców szczur, które potraktowano tymi związkami [27]. Najbardziej toksyczny związek tej grupy *in vivo* (2,3,7,8- TCDF) był również najsilniejszym induktorem enzymów mikrosomalnych *in vivo* i wykazywał również najwyższe powinowactwo do receptora *in vitro* [20, 21, 22].

Pomimo bardzo podobnej budowy chemicznej dioksyn i dibenzofuranów wpływ pozycji chloru na aktywność biologiczną PCDF jest nieco odmienny a spowodowany jest asymetryczną budową cząsteczki (jedna oś symetrii przez atom tlenu w pierścieniu dibenzofuranu). Na podstawie analizy ich budowy a aktywności *in vivo* i *in vitro* ustalono, że poszczególne pozycje w pierścieniu dibenzofuranu w różnym stopniu wpływają na aktywność biologiczną PCDF, tj. C-3 (lub C07) > C-2 (lub C-8) jest > C-4 (lub C-6) > C-1 (lub C-9) (ryc. 1.), podczas gdy w cząsteczce dioksyn wszystkie pozycje są równoważne [44].



Ryc. 1. Wpływ atomów chloru w różnych pozycjach cząsteczki kongenerów PCDD i PCDF na powinowactwo do receptora Ah [37].

The different effects of chlorine substituents at different position in the dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran rings on relative receptor binding affinities of PCDD and PCDF congeners [37].

7x-2,3,8TriCDD. Wpływ podstawników na aktywność serii analogów można oddać ocenie ilościowej poprzez pomiar korelacji między efektem biologicznym (np. powinowactwo receptora) a znanymi fizykochemicznymi cechami podstawników takimi jak lipofilność (π), elektoujemność (σ), pojemność wiązań wodorowych (HB) i parametry steryczne (ΔB_s , ΔV_w) [15, 16, 19, 30]. Zastosowanie do badań QSAR m. in. serii pochodnych 7x-2,3,8-trichlorodibenzo-p-dioksyny (7x-2,3,8-TriCDD) pozwoliło na ustalenie relacji pomiędzy strukturą chemiczną, powinowactwem do receptora i biologiczną siłą działania tych związków oraz określenia, które parametry fizykochemiczne podstawników są istotne dla powinowactwa dioksyn do AhR, a w rezultacie wpływają na biologiczną siłę działania tych związków [14, 44]. Bowiernie nie tylko obecność atomów

chloru i ich sposób rozmieszczenia w cząsteczce ale również inne podstawniki są istotnymi strukturalnymi determinantami dla interakcji R-L [13, 22, 23, 26, 38]. W kolejnych doświadczeniach badane pochodne zawierały w pozycji C-7 jeden z następujących podstawników: -OH, -NO₂, -F, -CH₃, -OCH₃, -CF₃, -Br, -I, -Cl, -CN, -H. Np. zastąpienie atomu chloru wodorem w pozycji C-7 2,3,7-trichlorodibenzo-p-dioksyny (powstaje 2,3-dichlorodibenzo-p-dioksyna) powoduje redukcję jej powinowactwa do AhR kilkaset razy a ta różnica wynika z odmiennych właściwości fizykochemicznych obu kongenerów [14].

W wyniku przeprowadzonej analizy wielowymiarowej regresji liniowej dla 11 pochodnych 7x-2,3,8-TriCDD [32, 38] na podstawie wiązania do receptora Ah wątroby szczura, myszy, chomika i świnki morskiej otrzymano następujące równania matematyczne, które ilościowo charakteryzują proces wiązania ligandów do receptora Ah izolowanego od czterech gatunków zwierząt [32]:

$$p EC_{50} (\text{szczur}) = 7,196 + 0,600\delta - 0,255 \Delta E_s + 1,683 HB \quad (A)$$

$$p EC_{50} (\text{myszy}) = 6,365 + 1,641\pi + 1,206\sigma^o \quad (B)$$

$$p EC_{50} (\text{chomik}) = 7,539 + 0,911\pi - 0,557\Delta V_w + 0,913\sigma^o \quad (C)$$

$$p EC_{50} (\text{świnka morska}) = 6,892 + 1,035\pi \quad (D)$$

gdzie π określa lipofilność podstawników, ΔE_s efekt steryczny, σ^o – elektoujemność, HB – pojemność wiązań wodorowych, ΔV_w – pojemność *van der Waalsa*.

Zależności występujące pomiędzy wiązaniem do cytozolowego receptora wątroby szczura a indukcją enzymu AHH w hodowli H4IIE wywołaną badanymi pochodnymi opisuje kolejne równanie QSAR w publikacji *Romkes* i wsp.:

$$pED_{50} = 3,208 + 0,950 pEC_{50} (\text{receptora szczura}) - 0,955 \Delta B_5,$$

gdzie ΔB_5 jest parametrem sterycznym [32]. Z tego równania, opisującego ilościowo zależności między strukturą 11 badanych pochodnych, a powinowactwem do receptora dioksyn oraz odpowiedzią biologiczną wynika, że indukcja AHH uzależniona jest od powinowactwa związku do AhR cytozolu wątroby szczura oraz od parametru sterycznego (rozmiaru podstawnika). Sugeruje to również, że w dalszych etapach mechanizmu działania dioksyn podstawniki mogą odgrywać ważną rolę (np. w aktywacji receptora) przed ostateczną ekspresją genu CYP1A1 [31].

W pracach *Romkes* i wsp. [33, 34] dla scharakteryzowania ilościowego zależności struktura – powinowactwo (QSAR) określono znaczenie wiązań elektronowych, wodorowych oraz charakteru hydrofobowego w stosunku do EC₅₀ tj. wielkości obliczonej na podstawie kompetycyjnego wiązania grupy pochodnych TriCDD. Uzyskane równania korelacyjne (A-D) pokazują, że zarówno zwiększone przyjmowanie elektronów przez podstawniki (σ ma wartość dodatnią) jak również charakter hydrofobowy, podwyższają właściwości wiążące liganda do receptora. Także podstawniki akceptujące wiązania wodorowe sprzyjają powinowactwu do receptora Ah. Analizując wszystkie cztery wzory matematyczne można stwierdzić, że dla tej samej grupy związków chemicznych (pochodnych 2,3,8-TriCDD) różne parametry rządzą przyłączeniem ligandów czyli receptory pochodzące z od różnych zwierząt (szczur, mysz, świnka morska, chomik) wykazują różne właściwości. Równania QSAR (A-D) interakcji pochodnych TriCDD z receptorem Ah dla czterech gatunków zwierząt modelowych potwierdzają heterogenną naturę

receptora [26, 28, 32] a najistotniejsze czynniki dla efektywnej interakcji w miejscu wiązania, to siły hydrofobowe, elektronowe i wiązania wodorowe. Postuluje się, że miejsce wiązania [3H]TCDD stanowi niewielką hydrofobową kieszeń zawierającą jedną lub więcej grup polaryzacyjnych [1, 44]. Skoro więc wiązanie do receptora Ah i wynikająca stąd indukcja monoooksygenaz może być podwyższona lub obniżona przez różne podstawniki cząsteczkowe, różnice w aktywności tej klasy związków muszą zależeć od właściwości podstawników.

Z licznych badań nad toksycznością dioksyn i związków pokrewnych wynika, że wrażliwość zwierząt na toksyczne działanie HAH jest mocno zróżnicowana. Dawka toksyczna (DL_{50}) wynosi od 1–5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (odpowiednio świnka morska i chomik). Co leży u podstaw tak dużych różnic – trudno określić. Chociaż istnieją znaczne różnice międzygatunkowe w toksyczności, poziom receptora w wątrobie szczura, myszy, świnki morskiej i chomika jest podobny (40–80 fmoli/mg białka cytozolu). Wobec tego ilość receptora nie może decydować o wrażliwości tych zwierząt na działanie dioksyn a stopień wrażliwości może wynikać z bliżej nieokreślonych cech i właściwości receptora.

Różnice występujące we wzorach matematycznych opisujących istniejące zależności (A-D) wyraźnie wskazują, że przyłączanie tej samej grupy związków (ligandów) do receptora zależy od źródła jego pochodzenia (szczur, mysz, świnka morska, chomik). W obrębie jednego gatunku (np. szczur) lipofilność była głównym czynnikiem regulującym wiązanie do receptora. Jednak tej zależności między lipofilnym charakterem podstawników a powinowactwem do receptora Ah nie można uogólniać na inne gatunki zwierząt. Bowiern badania porównawcze przeprowadzone dla pozostałych gatunków zwierząt wykazały, że dominujący fizykochemiczny czynnik decydujący o wiązaniu liganda do receptora jest różny dla poszczególnych gatunków zwierząt. Powinowactwo do receptora świnki morskiej zależy tylko od lipofilności, do receptora myszy od lipofilności i charakteru elektroujemnego podstawników a dla receptora chomika obok lipofilności i elektroujemności dodatkowe znaczenie mają efekty steryczne (ΔV_w). Można więc sądzić, że u podstaw różnej wrażliwości zwierząt na dioksyny najprawdopodobniej leży heterogenna natura ich receptora, na co wskazują przedstawione wyniki badania QSAR.

Bazując również na dostępnych danych można stwierdzić, że toksyczność *in vivo* koreluje silnie z wiązaniem liganda [20, 22]. Tak jak odpowiedź na toksyczne działanie występuje w różnym nasileniu u poszczególnych gatunków zwierząt tak i różne powinowactwo kongenerów HAH do receptora uzależnione jest od gatunku zwierzęcia [32].

Relacje między strukturą chemiczną rodziny HAH, a właściwościami indukcyjnymi są wyraźne. Toksyczne efekty takie jak atrofia grasicy, spadek masy ciała, immunotoksyczność, śmiertelność ostra a także indukcja CYP1A1 koreluje z względnym powinowactwem HAH do receptora Ah [27, 28]. Dlatego ważnym krokiem w przewidywaniu efektów wywoływanych przez te związki było określenie ich powinowactwa do receptora Ah i wszystkie te badania potwierdzają, że wiązanie liganda do receptora jest zasadniczym elementem w mechanizmie działania dioksyn. Obserwuje się natomiast brak korelacji liniowej dla obydwu testów *in vitro* (powinowactwo do AhR i indukcja enzymów). Różna więc siła odpowiedzi biologicznej na działanie dioksyn i związków pokrewnych mierzona aktywnością enzymów AHH i EROD wskazuje, że nie samo

przyłączeniu liganda do receptora ale jego struktura chemiczna decyduje, że utworzony kompleks R-L jest mniej lub bardziej aktywnym biologicznie [32, 37]. Autorzy powyższych badań konkludują, że po związaniu liganda przez receptor w ostatecznej ekspresji genów znaczące mogą być procesy aktywacyjne kompleksu, które opisywano dla receptora Ah [26, 27, 28, 44].

ZNACZENIE PRAKTYCZNE BADAŃ SAR

Analiza QSAR okazała się użyteczną w opisywaniu fizykochemicznych determinantów rządzących działaniem dioksyn. Metoda może być pomocną w przewidywaniu powinowactwa i potencjału indukcyjnego innych związków chemicznych, podobnie jak okazała się użyteczną dla badania PCB [1, 14, 44, 48]. Nie jest bowiem trudno sobie wyobrazić, że fizykochemiczne oddziaływania, które pełnią zasadniczą rolę w modelu *Hansch*a (tj. efekty hydrofobowe, elektronowe i przestrzenne), są tymi samymi determinantami, które decydują o działaniu mutagenów czy kancerogenów na DNA, i które determinują procesy metabolicznego transformowania początkowo nieaktywnych na poziomie komórki związków chemicznych do związków agresywnych.

Wyniki badań właściwości toksycznych halogenowych węglowodorów aromatycznych z zastosowaniem metod badania zależności SAR i QSAR znalazły praktyczny aspekt aplikacyjny. Opracowane na ich podstawie współczynniki toksyczności stosuje się do wyrażenia toksyczności względnej mieszanin PCDD/PCDF/PCB. Obserwacje wynikające z badań SAR i QSAR stanowią mechanistyczną bazę dla powstania i rozwoju koncepcji TEF (ang. toxicity equivalent factor) dla indywidualnych związków tej grupy. Toksyczność mieszanin PCDD i PCDF określa się za pomocą TEF w stosunku do najbardziej toksycznego związku tj. 2,3,7,8-TCDD [40, 41, 42].

Tę względną toksyczność chlorowanych kongenerów dioksyn obliczono na podstawie efektów biologicznych uzyskanych w badaniach na zwierzętach (DL_{50} , kancerogenność, wpływ na reprodukcję) oraz na wynikach testów *in vitro* jak powinowactwo do receptora, indukcja enzymów mikrosomalnych i immunotoksyczność.

Jednym z głównych zastosowań współczynników TEF jest przekształcanie danych analitycznych uzyskanych w wyniku analizy chemicznej badanej próbki do tzw. równoważników toksyczności TCDD (ang. TCDD TEQ). Pozwala to na oszacowanie całkowitej toksyczności mieszaniny kongenerów występujących w badanej próbce. TEQ stanowi sumę iloczynów stężenia poszczególnych kongenerów i współczynników TEF tych kongenerów. Obecnie istnieje tylko jedna metodologia oceny ryzyka narażenia na działanie mieszaniny halogenowych węglowodorów aromatycznych. Addytywność zastosowana w tej koncepcji została potwierdzona wieloma badaniami zależności SAR i QSAR *in vivo* oraz *in vitro* [14, 39, 43].

PODSUMOWANIE

Dział toksykologii określane jako „QSAR w toksykologii” ogromnie rozwinął się w czasie ostatnich kilkunastu lat o czym świadczy ciągle wzrastająca liczba publikacji i konferencji naukowych oraz specjalistyczne czasopismo naukowe „SAR and QSAR in Environmental Research”. Badania QSAR znalazły zastosowanie w określaniu korelacji bioaktywności wszystkich rodzajów związków organicznych ze wszystkimi rodzajami efektów biologicznych.

Hansch w przedstawionej w połowie lat 90-tych publikacji o ekspansji metod QSAR w toksykologii ocenia, że pomimo opublikowania dotąd około 20 tys. wyników zastosowań w chemii i ponad 6 tys. wyników badań korelacji biologicznych, metoda ta wciąż jest we wczesnym etapie rozwoju i będzie podlegała dalszej ewolucji. Jednakże uzyskane dotąd konkretne wyniki badania zależności między strukturą chemiczną, a biologiczną aktywnością związków chemicznych będą trwałe, a ich wartość będzie rosła wraz ze wzrostem bazy danych dla metod alternatywnych [17].

Należy oczekiwać, że strategia rozwoju alternatywnych metod oznaczania toksyczności będzie wielokierunkowa; opracowane zostaną metody komputerowego modelowania procesu toksycznego przy wykorzystaniu ilościowych zależności między strukturą, a aktywnością związków chemicznych (QSAR), przy jednoczesnej symulacji procesów fizjologicznych organizmu ludzkiego.

Idea opracowania skomputeryzowanego modelu określania toksyczności bazującego na danych z piśmiennictwa oraz poprzedzanie eksperymentów symulacjami komputerowymi do niedawna wydawała się niemożliwa. Obecne techniki informacyjne pozyskiwania i magazynowania baz danych znacznie obniżają koszty takich działań. Szybki i tani dostęp do baz danych zapewnia system informacji w istniejących właściwości fizycznych związków to ustalenie właściwości toksycznych jest możliwe poprzez proste obliczenia matematyczne bazujące na strukturach związków pokrewnych. Poprzez ustalone w ten sposób parametry, w połączeniu z innymi deskryptorami można odróżniać związki kancerogenne od niekancerogennych. Nawet mając do czynienia ze związkami różniącymi się budową chemiczną istnieje możliwość opracowania efektywnego badania SAR bazującego na fizykochemicznych deskryptorach [2]. Symulacja poprzez model SAR znacznie zredukuje ilość zwierząt eksperymentalnych, zwiększy informacje otrzymywane z doświadczeń toksykologicznych. Takie podejście zwiększy również zaufanie do teoretycznych przewidywań i zintegruje toksykologów ze światem mechanistycznym nowoczesnej biologii, która rozwija się z biologii molekularnej.

Oczywiście stosowanie metod QSAR w toksykologii nie jest tak powszechne jak w chemii leków; najczęściej stosuje się je w ekotoksykologii. Dobrym przykładem są podejmowane wysiłki amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (US EPA) w celu ustalenia QSAR jako jednego z podstawowych narzędzi w polityce regulacji prawnych i w podejmowaniu decyzji administracyjnych. EPA gromadzi zarówno dane z piśmiennictwa jak i wyniki własnych badań QSAR dla różnych klas związków chemicznych i dla różnych organizmów. Dla nowych związków chemicznych, przed ich dopuszczeniem do stosowania, wymaga się wyników badań ekotoksykologicznych z użyciem odpowiedniego modelu QSAR [47, 49].

Oprócz znaczenia praktycznego, metody QSAR są przedmiotem zainteresowania świata naukowego również dlatego, że reprezentują jeden z niewielu obszarów, w których zjawiska biologiczne podlegają systematycznej ocenie ilościowej.

J. Piskorska-Pliszczyńska

SAR AND QSAR IN DIOXIN MECHANISM OF ACTION STUDY

Summary

Thousand chemicals are present within our environment, and for many of them, there is a little reliable information detailing their relative hazard. Added to that increasing concern over the use of animals in toxicity testing, high costs of these tests has made the search for and validation of alternative methods to predict the hazard and the relative risk of xenobiotics. QSAR (quantitative structure activity relationship) attempt to relate statistically the biological activity of compound with its physicochemical and structural properties. QSAR methods are often seen as the first step for valid toxicological prediction.

Halogenated aromatic hydrocarbons typified by polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDD), dibenzofurans (PCDF) and biphenyls (PCBs) have been identified as residues in almost every component of the ecosystem. Some chemicals in this class cause adverse biological effects after binding to an intracellular cytosolic protein called the Ah receptor (AhR). Because of importance of the Ah receptor in determining toxicity, there have been a number of attempts to model the relationship between receptor binding and structure of xenobiotics. QSAR have found wide use in correlating the bioactivity of dioxins and related compounds with many kinds of biological entities. This paper will briefly summarise some SAR and QSAR study for halogenated aromatics as ligand for Ah receptor and the characteristic biological and toxic responses elicit by this class of chemicals. These study strongly support the role of AhR in dioxin toxicity.

PIŚMIENICTWO

1. *Bandiera S., Sawyer T., Campbell M.A., Fujita T., Safe S.*: Competitive binding to the cytosolic 2,3,7,8-TCDD receptor: effects of structure on the affinities of substituted halogenated biphenyls-a QSAR approach. *Biochem. Pharmacol.* 1983, 32, 3801.
2. *Benigni R., Underlie C., Giuliani R.*: Structure – activity studies of chemical carcinogenesis: use of an electrophilic reactivity parameter in a new QSAR model. *Carcinogenesis* 1989, 10, 55.
3. *Benigni R., Giuliani A.*: Quantitative structure – activity relationship (QSAR) studies of mutagens and carcinogens. *Med. Res. Rev.* 1996, 16, 267.
4. *Benson R.*: Structure – activity relationships in the threshold assessment. *Drug Met. Rev.* 1987, 18, 331.
5. *Bigelow S.A., Nebert D.W.*: The Ah regulatory gene products. Survey of nineteen polycyclic aromatic hydrocarbons and fifteen benz[a]pyrene metabolites capacity to bind the cytosolic receptor. *Toxicol. Lett.* 1982, 10, 109.
6. *Bondi A.*: Van der Waals volumes and radii. *J. Phys. Chem.* 1964, 12, 441.
7. *Chu I.*: Alternative methods to animal testing. *ATLA.* 1995, 23, 257.
8. *Clements R.G., Nabholz J.V., Zeeman M.G., Auer C.M.*: The application of structure – activity relationships (SARs) in the aquatic toxicity evaluation of discrete organic chemicals. *Sar and QSAR in Environm. Res.* 1995, 3, 203.
9. *Cronin M.T.D., Dearden J.C.*: QSAR in toxicology. 1. Prediction of aquatic toxicity. *Quant. Struct. – Act. Relat.* 1995, 14, 1.
10. *Cronin M.T.D., Dearden J.C.*: QSAR in toxicology. 2. Prediction of acute mammalian toxicity and interspecies correlations. *Quant. Struct. – Act. Relat.* 1995, 14, 117.
11. *Cronin M.T.D., Dearden J.C.*: QSAR in toxicology. 3. Prediction of chronic toxicities. *Quant. Struct. – Act. Ralat.* 1995,14, 329.

12. Cronin M.T.D. and Dearden J.C.: QSAR in toxicology. 4. Prediction of non-lethal mammalian toxicological endpoints and expert systems for toxicity prediction. *Quant. Struct. – Act. Relat.* 1995, 14, 518.
13. Denomme M.A., Homonko K., Fujita T., Sawyer T., Safe S.: The effects of substituents on the cytosolic receptor binding affinities and AHH induction potencies of 7-substituted-2,3-dichlorodibenzo-p-dioxin. QSAR analysis. *Mol. Pharmacol.* 1985, 27, 656.
14. Goldstein J.A., Safe S.: Mechanism of action and structure – activity relationships for the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxin and related products, wyd. *Kimbrough and Jensen*. Elsevier Sci. Publ. 1989, 239.
15. Hansch C.: A quantitative approach to biochemical structure – activity relationships. *Acc. Chem. Res.* 1969, 2, 232.
16. Hansch C., Leo A.: Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. A Willey Interscience Publication, wyd. *John Willey & Sons*, Toronto, 1969.
17. Hansch C., Hoekman D., Leo A., Zhang L., Li P.: The expanding role of quantitative structure – activity relationships (QSAR) in toxicology. *Toxicol. Lett.* 1995, 79, 45.
18. Jones P.C., Galeazzi D.R., Fisher J.M., Whitlock J.P.: Control of cytochrome P1–450 gene expression by dioxin. *Science* 1985, 227, 1499.
19. Kutter E., Hansch C.: Steric parameters in drug design: monoamine oxidase inhibitors and antihistamines. *J. Med. Chem.* 1969, 12, 647.
20. Mason G., Sawyer T., Keys B., Bandiera S., Romkes M., Piskorska-Pliszczyńska J., Żmudzka B., Safe S.: Polychlorinated dibenzofurans (PCDFs): correlation between *in vivo* and *in vitro* structure – activity relationships. *Toxicol.* 1985, 37, 1.
21. Mason G., Farrell K., Keys B., Piskorska-Pliszczyńska J., Safe L., Safe S.: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins: quantitative *in vitro* and *in vivo* structure – activity relationships. *Toxicology* 1986, 41, 21.
22. Mason G., Farrell K., Keys B., Piskorska-Pliszczyńska J., Safe L., Safe S.: Polychlorinated dibenzo-dioxins: quantitative *in vitro* and *in vivo* structure – activity relationships. *Toxicology* 1986, 41, 21.
23. Mekenyan O., Veith G., Call D.J., Ankley G.T.: A QSAR evaluation of Ah receptor binding of halogenated aromatic xenobiotics. *Environm. Health Perspect.* 1996, 12, 1302.
24. Nebert D.W., Gelboin H.V.: Substrate-inducible microsomal aryl hydroxylase in mammalian cell culture. I. Assay and properties of induced enzyme. *J. Biol. Chem.* 1968, 243, 6242.
25. Nebert D.W., Gelboin H.V.: The *in vitro* and *in vivo* induction of aryl hydrocarbon hydroxylase in mammalian cells of different species, tissue, strains and developmental and hormonal states. *Arch. Biochem. Biophys.* 1969, 134, 76.
26. Piskorska-Pliszczyńska J., Safe S.H.: Radioligand – dependent properties of the Ah receptor from rat and mouse hepatic cytosol. *Chemosphere* 1988, 119, 963.
27. Piskorska-Pliszczyńska J.: Toksyczność i mechanizm działania dioksyn. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 94.
28. Poellinger L., Lund J., Gillner M., Hansson L.A., Gustafsson A.A.: Physicochemical characterization of specific and nonspecific polyaromatic hydrocarbon binders in rat and mouse liver cytosol. *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 13535.
29. Poland A., Glover E., Kende A.S.: Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 1976, 251, 4936.
30. Purdy R.: A hierarchical QSAR model for predicting carcinogenicity. *Intern Lab News.* 1997, 6, 16.

31. Reddick D.S., Huang Y., Harper P.A., Okey A.B.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholantrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1. *J. Biol. Chem.* 1994, 269, 12118.
32. Romkes M., Piskorska-Pliszczyńska J., Keys B., Safe S., Fujita T.: Quantitative structure – activity relationships: analysis of interaction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 2-substituted analogues with rat, mouse, quinea pig and hamster cytosolic receptor. *Cancer Res.* 1987, 47, 5108.
33. Romkes M., Safe S., Mason G., Piskorska-Pliszczyńska J., Fujita T.: Binding of substituted aryl hydrocarbons to the Ah receptor—a QSAR analysis. *Chemosphere* 1987, 16, 1719.
34. Romkes M., Piskorska-Pliszczyńska J., Safe S.: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on hepatic and uterine estrogen receptor levels in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1987, 87, 306.
35. Safe S., Sawyer T., Mason G., Bandiera S., Keys B., Romkes B., Piskorska-Pliszczyńska J., Żmudzka B., Safe L.: Polychlorinated dibenzofurans: quantitative structure – activity relationships. *Chemosphere* 1985, 14, 675.
36. Safe S.: Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1986, 26, 371.
37. Safe S., Fujita T., Romkes M., Piskorska-Pliszczyńska J., Homonko K., Denome M.A.: Properties of 2,3,7,8-TCDD receptor a QSAR approach. *Chemosphere* 1986, 15, 1657.
38. Safe S., Piskorska-Pliszczyńska J., Denome M.A., Leece B.A., Towner R., Li S.M.A.: Modulation of 2,3,7,8-TCDD hepatic cytosolic receptor levels by PCB and organochlorine pollutants. *Chemosphere* 1986, 15, 2085.
39. Safe S., Mason G., Keys B., Farrell K., Żmudzka B., Sawyer T., Piskorska-Pliszczyńska J., Safe L., Romkes M., Bandiera S.: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans correlation between *in vitro* and *in vivo* structure – activity relationships. (SARs). *Chemosphere* 1986, 15, 1725.
40. Safe S.: Determination of 2,3,7,8-TCDD equivalent factors (TEFs): support for the use of the *in vitro* AHH induction bioassay. *Chemosphere* 1987, 16, 791.
41. Safe S., Mason G., Ferrell K., Keys B., Piskorska-Pliszczyńska J., Madge J.A., Chittim B.: Validation of the *in vitro* bioassays for 2,3,7,8-TCDD equivalents. *Chemosphere* 1987, 16, 1723.
42. Safe S., Mason G., Sawyer T., Zacharewski T., Harris M., Keys B., Farrell K., Holcomb M., David D., Safe L., Piskorska-Pliszczyńska J., Leece B., Denome M.A., Hutzinger O., Thoma H., Chittim B., Madge J.: Development and validation of *in vitro* induction assays for toxic halogenated aromatic mixtures: a review. *Toxic. Industr. Health.* 1989, 5, 757.
43. Safe S.H.: The aryl hydrocarbon (Ah) receptor. *ISI Atlas of Science. Pharmacology* 1988, 78.
44. Sawyer T., Safe S.: PCB isomers and congeners: induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin o-deethylase enzyme activities in rat hepatoma cells. *Toxicol. Lett.* 1982, 13, 87.
45. Sawyer T., Jones D., Rosanoff K., Mason G., Piskorska-Pliszczyńska J., Safe S.: The biological and toxin effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in chickens. *Toxicol.* 1986, 39, 197.
46. Sokołowski M.: Dioksyny. Ocena zagrożenia środowiska naturalnego oraz metody ich wykrywania. *Biblioteka Monitoringu Środowiska, Warszawa* 1994.
47. Starek A.: Toksykologia związków chloroorganicznych w zarysie. *Roczn. PZH.* 1996, 47, 1.
48. Zeeman M., Auer C.M., Clements R.G., Nabholz J.V., Boethling R.S.: U.S. EPA regulatory perspective on the use of QSAR for new and existing chemical evaluations. *SAR and QSAR Environ. Res.* 1995, 3, 179.