

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛИГАНД-ЗАВИСИМАТА
ДИСРЕГУЛАЦИЯ НА $PPAR\gamma$:
ОПИСВАНЕ НА ПЪТИЩА, ВОДЕЩИ ДО НЕЖЕЛАН ИЗХОД
И МОЛЕКУЛНО МОДЕЛИРАНЕ**

Мерилин Мазен Ал Шариф

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД, ПРЕДСТАВЕН ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“**

**НАУЧНА ОБЛАСТ: 4. „ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА“
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3. “БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ”
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: “ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРИНЦИПИТЕ И МЕТОДИТЕ НА
КИБЕРНЕТИКАТА В ОБЛАСТТА НА ЗАВИСИМОСТИ
СТРУКТУРА – АКТИВНОСТ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА”**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
ДОЦ. Д-Р ИВАНКА ЦАКОВСКА И ЧЛ. КОР. ПРОФ. ИЛЗА ПЪЖЕВА, ДБН

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:
**ПРОФ. СТЕФКА ТАНЕВА, ДБН
ПРОФ. ИРИНИ ДОЙЧИНОВА, ДХН**

София, 2016



БЪЛГАРСКА
АКАДЕМИЯ
на НАУКИТЕ
— 1869 —

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОФИЗИКА И БИОМЕДИЦИНСКО ИНЖЕНЕРСТВО

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЛИГАНД-ЗАВИСИМАТА
ДИСРЕГУЛАЦИЯ НА $PPAR\gamma$: ОПИСВАНЕ НА ПЪТИЩА,
ВОДЕЩИ ДО НЕЖЕЛАН ИЗХОД И МОЛЕКУЛНО
МОДЕЛИРАНЕ**

Мерилин Мазен Ал Шариф

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД, ПРЕДСТАВЕН ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА
ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН
„ДОКТОР“**

**НАУЧНА ОБЛАСТ: 4. „ПРИРОДНИ НАУКИ, МАТЕМАТИКА И ИНФОРМАТИКА“
ПРОФЕСИОНАЛНО НАПРАВЛЕНИЕ: 4.3. „БИОЛОГИЧЕСКИ НАУКИ“
НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: „ПРИЛОЖЕНИЕ НА ПРИНЦИПИТЕ И МЕТОДИТЕ НА
КИБЕРНЕТИКАТА В ОБЛАСТТА НА ЗАВИСИМОСТИ СТРУКТУРА – АКТИВНОСТ
НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА”**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:
ДОЦ. Д-Р ИВАНКА ЦАКОВСКА И ЧЛ. КОР. ПРОФ. ИЛЗА ПЪЖЕВА, ДБН

ОФИЦИАЛНИ РЕЦЕНЗЕНТИ:
ПРОФ. СТЕФКА ТАНЕВА, ДБН
ПРОФ. ИРИНИ ДОЙЧИНОВА, ДХН

София, 2016

Защитата на дисертационния труд ще се състои на от в заседателната зала на Институт по биофизика и биомедицинско инженерство – Българска академия на науките (ул. Акад. Г. Бончев, бл. 105).

Дисертационният труд е обсъждан на разширен научен семинар на секция „QSAR и молекулно моделиране“ на ИБФБМИ на 28.01.2016 г.

Дисертационния труд съдържа увод, цели и задачи, три глави, обобщение, приноси, списък с използвана литература (291 литературни източника и 15 интернет адреса), списък с публикации и участия в научни форуми, 2 приложения и е в обем от 208 страници.

Автор: Мерилин Мазен Ал Шариф

Заглавие: „Изследване на лиганд-зависимата дисрегулация на PPAR γ : описване на пътища, водещи до нежелан изход и молекулно моделиране“

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

- % max (percent efficacy in relation to the maximum efficacy of a reference compound), процентна относителна ефикасност, спрямо референтно съединение
- 3D QSAR (three dimensional quantitative structure-activity relationship), триизмерна количествена взаимовръзка структура-активност
- 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement), заместване, намаляване и подобряване на тестването върху животни
- Асс (acceptor), акцептор
- АО (adverse outcome effect) – краен нежелан ефект
- АОР (adverse outcome pathway), път, водещ до нежелан изход
- АОР-КВ (Adverse Outcome Pathway Knowledge Base), база данни за пътища, водещи до нежелан изход
- aP2 (adipose fatty acid binding protein), протеин на мастната тъкан, свързващ мастни киселини
- BHK21 ATCC CCL10 (baby hamster kidney cell line from the American Type Culture Collection), клетъчна линия от бебета хамстери от Американската колекция клетъчни култури
- CD36 (FAT/CD36, fatty acid translocase/cluster determinant 36), мембранна транслоказа на мастни киселини
- СМ (community level), ниво на организация съобщество
- CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis), сравнителен анализ на индекси на молекулно подобие
- COS-1, COS-7 (CV-1 in origin, with SV40 genetic material), линии, произхождащи от CV-1 клетъчна линия и носещи генетичен материал от вируса SV40
- COSMOS (Integrated *In Silico* Models for the Prediction of Human Repeated Dose Toxicity of COSMetics to Optimise Safety), Интегрирани *in silico* модели за предсказване на хронична токсичност на козметични продукти с цел оптимизиране на безопасната им употреба
- cSDER кросвалидирана стандартна грешка при специфична критична стойност
- CV-1 (simian - *Cercopithecus aethiops* or normal African green monkey kidney Fibroblast Cells), фибробластна клетъчна линия от бъбрек на африканска зелена маймуна
- Don/Асс (donor/acceptor), донор/акцептор

dq/dr , наклонът на q_{cv}^2 при специфицираната критична стойност, спрямо корелацията между оригиналните и разбърканите зависими променливи

ЕС (environmental contamination), контаминиране на околната среда с даден ксенобиотик/токсин

EC₅₀ (effective concentration), ефективна концентрация; трансактивационна активност

ЕХ (exposure), излагане на действието на ксенобиотика

F, F-отношение между обяснената и необяснената дисперсия за определен брой степени на свобода при значимост от 95%

FSP27 (FSP27/CIDE-C, fat-specific protein 27/cell death-inducing DFF45-like effector), мастно-специфичен протеин 27/ DFF45-подобен ефектор, индуциращ клетъчна смърт

H (helix), спирала

HB (hydrogen bond), водородна връзка

HEK293 (human embryonic kidney 293 cell line), човешка ембрионална, бъбречна клетъчна линия 293

HepG2 (human liver hepatocellular carcinoma cell line), човешка ракова, чернодробна клетъчна линия HepG2

Huh-7 (human liver hepatocellular carcinoma cell line), човешка ракова, чернодробна клетъчна линия Huh-7

Hyd/Aro (hydrophobic/aromatic), хидрофобен/ароматен

I (individual level) индивидуално ниво на организация

IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration), инхибиторна концентрация, необходима за половината от максималния отговор; афинитет на свързване

KEs (key events), ключови събития

LXR (liver X receptor), чернодробен X рецептор

M (molecular), молекулно ниво на организация

MIE (molecular initiating event), молекулно инициращо събитие

MoA (mode of action), начин на действие,

NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), виж НАСБЧД

N_{opt}, оптимален брой компоненти при анализ на частично най-малките квадрати

O (organelle) органелно ниво на организация, клетъчно ниво на организация (C, cellular) и тъканно ниво на организация (T, tissue)

O/S (organ/system level), органно/системно ниво на организация

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), Организацията за икономическо сътрудничество и развитие

P (population level), ниво на организация популация/население

PDB (Protein Data Bank), база данни с протеини

pEC₅₀, отрицателен десетичен логаритъм на EC₅₀

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ),

пероксизомен пролифератор-активиран рецептор гама

Q², очакваната стойност на q² при специфицирана критична стойност на r²_{yy'} (корелационния коефициент между разбърканите отговори и изходните, непроменени данни)

q_{cv}², кросвалидиран коефициент на корелация

qRT-PCR, количествена полимеразна верижна реакция в реално време

r², коефициент на корелация

r_{pred}², предсказващ коефициент на корелация

RXR α (retinoid X receptor alpha), ретиноиден X рецептор алфа

SEE (standard error of estimate), стандартна грешка на оценката

SEP_{CV} (cross-validated standard error of prediction), кросвалидирана стандартна грешка на предсказването

SEURAT-1 (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing), Оценка на безопасност, която в последствие да замести тестването върху животни

SOP (source to outcome pathway), път от източника до нежелания изход

sRT-PCR, полу-количествена полимеразна верижна реакция в реално време

ToP (toxicity pathway), път на токсичност

VS (virtual screening), виж ВС

ВС, виртуален скрининг

НАСБЧД, неалкохолна стеатозна болест на черния дроб

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ.....	3
УВОД.....	7
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	15
ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	15
ГЛАВА 2. МЕТОДИ И ДАННИ.....	16
ГЛАВА 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	17
3.1. Простеатогенни пътища	17
3.1.1. Събиране и анализ на данни.....	17
3.1.2. Описване на AOPs	18
3.1.3. Оценка на чернодробния AOP	20
3.2. Набор от данни за лиганди на PPAR γ	22
3.3. Молекулно моделиране	23
3.3.1. Разработване на фармакофорен модел и протокол за виртуален скрининг ...	24
3.3.2. Разработване на 3D QSAR модел, предсказващ активността на пълни агонисти на PPAR γ	26
3.3.3. Интегриране на BC протокола в комбинирани подходи	29
ГРАФИЧНО РЕЗЮМЕ	30
ПРИНОСИ.....	31
ОБОБЩЕНИЕ.....	32
SUMMARY	34
ЛИТЕРАТУРА.....	36
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	41
ПУБЛИКАЦИИ	41
УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ	44
УЧАСТИЯ В НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ	47
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ.....	47

УВОД

От дълбока древност до наши дни търсенията на човека за себепознание, природосъобразен начин на живот и борба с връхлитащите болести и епидемии са дали тласък в развитието на множество научни направления, свързани с човешкото здраве. Едно от тях е биомедицинското инженерство – интердисциплинарно поле, съчетаващо медицина, токсикология, фармакология, биохимия, молекулярна биология, физика, химия, методи за анализ на структури, математически и инженерни методи.

Още Хипократ е твърдял, че човешкият организъм е свързан с околната среда, която оказва влияние върху естествените му жизнени функции. За съжаление, стремежът на човечеството към повече материални блага, удобства и лукс в ежедневието доведе до съвременния свръх-индустриализиран околнен свят, генериращ редица нежелани ефекти и въздействия върху живите системи. Тонове ксенобиотици, които през последното столетие заляха Земята и нейната биосфера под формата на химически оръжия, индустриални замърсители, фармацевтични и козметични продукти са сериозен риск за стабилността и функционирането на биосистемите и, в частност, за човешкото здраве. В този смисъл качествено и количествено охарактеризиране на потенциалните токсини се явяват ключови моменти в анализа и оценката на риска за здравето.

Основоположникът на токсикологията, Парацелзус много ясно дефинира количествените измерения на нежеланите ефекти, постулирайки, че „дозата прави отровата“. Установяването на количествена връзка структура-активност, молекулното моделиране и изясняването на конкретния начин на действие на потенциалните токсини са сред съвременните подходи на изчислителната (предсказваща) токсикология. Тя се основава на концепцията на 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement), насочена към заместване, намаляване и подобряване на тестването върху животни. Този исторически обрат в разбиранията за токсикологичния анализ произтича от съображения за безопасност, етичност и икономичност. С разработването на алтернативни подходи се гарантира надеждността и възпроизводимостта на експериментите чрез увеличаване на достоверността на моделните тестови системи при изследване на опасността за човешкото здраве.

Настоящият дисертационен труд е фокусиран върху разработването на алтернативни *in silico* подходи, подкрепящи идентифицирането и характеризирането на опасности, свързани с хроничната хепатотоксичност. Токсин-индуцираните поражения на черния дроб, по-специално неалкохолната стеатозна болест на черния дроб, е в центъра на научния интерес.

Актуалността на темата се обуславя от:

- Пълната забрана, наложена от Европейската комисия (2013 г.), за тестване за токсичност на козметични инградиенти върху животни, стимулира разработването на алтернативни подходи (*in vitro*, *in silico*) за идентифициране на потенциални заплахи (Регламент 1223/2009/ЕС OJ L 342, 22.12.2009, р. 59; COM(2013) 135 final).
- Повишения интерес към разработването на алтернативни подходи за оценка на потенциални хепатотоксини (Adler et al., 2011; Landesmann et al., 2012).
- Значителната заболяемост от неалкохолна стеатозна болест на черния дроб (НАСБЧД), която е сериозен риск за появата и развитието на хронични чернодробни нарушения, тъй като засяга 10–35% от населението в световен мащаб. При 12-40% от пациентите стеатозата прогресира до стеатохепатит, който в 15% от случаите води до цироза на черния дроб (Bedogni et al., 2004; Rusu et al, 2015; WHO Global Guidelines, 2012; Bhatia et al., 2012).
- Наличието на данни за ксенобиотик-индуцираната дисрегулация на редица ядрени рецептори като възможни молекулни инициращи събития (MIEs, molecular initiating events) за развитие на стеатозна болест (Landesmann et al., 2012; Mellor et al., 2015).

Обект на изследването на настоящия труд е пероксизомния пролифератор-активиран рецептор гама (PPAR γ)

Обхват: Проучването е фокусирано върху PPAR γ -медираната инициация на неалкохолна стеатозна болест на черния дроб. Изследването обхваща качествено и количествено охарактеризиране на взаимодействието на PPAR γ с негови пълни агонисти, както и организиране и анализ на наличните експериментални данни за избраната патология.

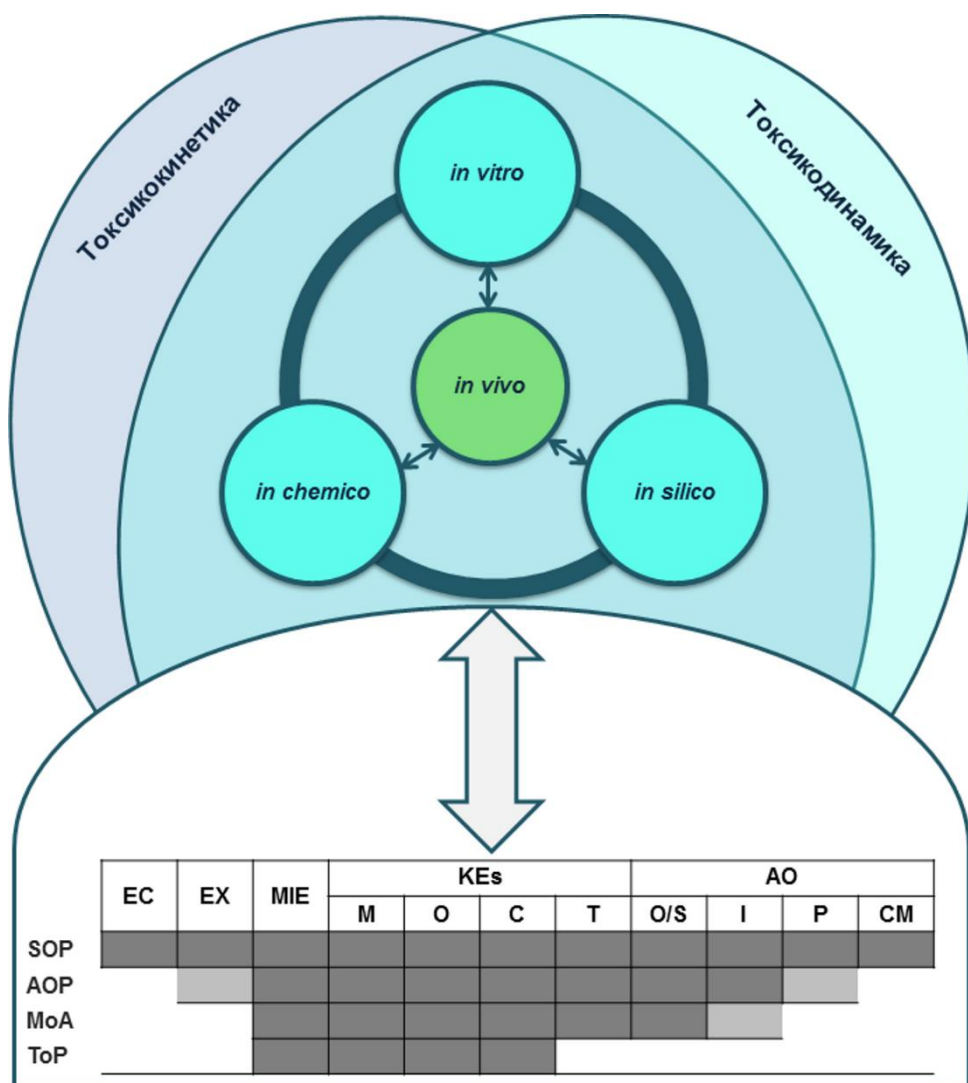
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

В литературния обзор първо са засегнати основните етапи при анализа на риска за човешкото здраве, породен от опасни химикали, а именно: 1) идентифициране на опасността, 2) нейното характеризиране, 3) изследване на излагането на тази опасност и 4) характеризиране на риска. Засегнати са основните аспекти от първите два етапа на изследването на риска, а именно идентифициране на типа и природата на нежелания ефект, който даден агент би могъл да предизвика, и характеристика на опасността, чрез качествено и количествено описание на свойствата, присъщи за този агент и отговорни за нежелания ефект (FAO/WHO, 2008; WHO, 2009).

По-нататък са дискутирани основни аспекти на съвременната токсикология. Тя се основава на концепцията за заместване, редуциране, подобряване на тестването за токсичност върху животни (Russell and Burch, 1959; NC3Rs; Törnqvist et al., 2014). Това разбиране произтича от съображения за безопасност, хуманност, икономичност и се очаква да гарантира надеждността и възпроизводимостта на токсикологичните експерименти.

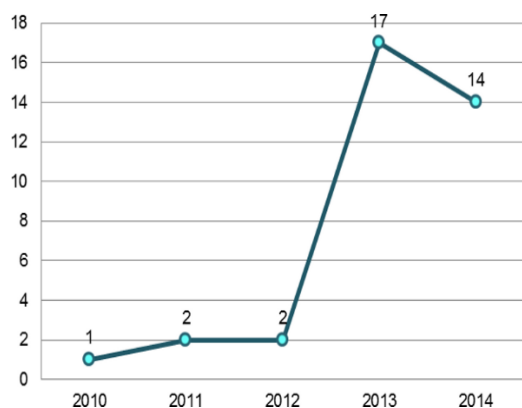
Сред алтернативите на *in vivo* тестването за токсичност са *in chemico*, *in vitro* и *in silico* подходите, които са фокусирани съответно върху функционални анализи; анализи, базирани на клетъчни, тъканни и органни култури и компютърно или *in silico* моделиране (Burden et al, 2014; Fowler, 2012; Rabinowitz et al., 2008; Huh et al., 2011; Altex Proceedings, 2014). Научната информация от всички тези изследвания на потенциални токсини подлежи на организиране, анализ и оценка, за да бъде интегрирана в така наречените пътища, водещи до нежелан изход (AOPs, adverse outcome pathways) (ENV/JM/MONO(2013)6).

В рамките на подхода за описване на пътища се организира химична и биологична информация от появата на токсина в околната среда до проявата на нежелан ефект, като се описват MIE, както и ключови междинни събития и краен нежелан ефект на различни нива на биологична организация. Описаните пътища подпомагат и насочват: (i) разработването на алтернативни модели/методи за изследване на риска и валидирането им спрямо епидемиологични данни и/или данни от *in vivo* експерименти; (ii) разработване на бази данни за споделяне на събраната информация (**Фиг. 1**)

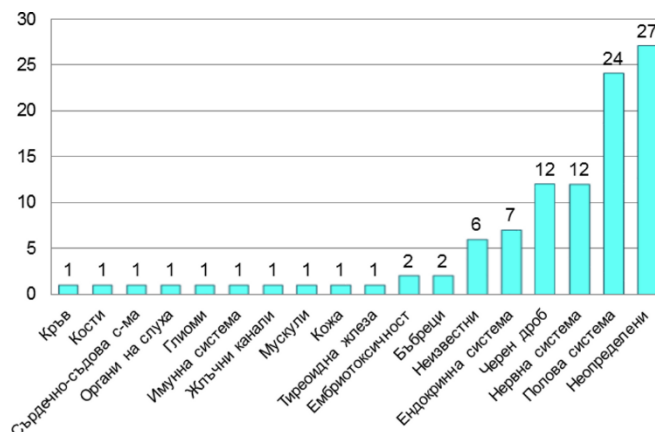


Фигура 1. Интегриране на разработването на алтернативни модели/подходи в рамката за изследване на начина на действие и описване на пътища, водещи до нежелан изход: SOP (source to outcome pathway) – път от източника до нежелания изход, AOP (adverse outcome pathway) – път, водещ до нежелан изход, MoA (mode of action) – начин на действие, ToP (toxicity pathway) – път на токсичност, EC (environmental contamination) – контаминиране на околната среда с даден ксенобиотик/токсин, EX (exposure) – излагане на действието на ксенобиотика, MIE (molecular initiating event) – молекулно инициращо събитие, KEs (key events) – ключови събития на молекулно (M, molecular), органелно (O, organelle), клетъчно (C, cellular) и тъканно (T, tissue) нива на биологична организация, AO (adverse outcome effect) – краен нежелан ефект на органно/системно (O/S, organ/system level) ниво, на ниво индивид (I, individual level), популация/население (P, population level) и съобщество (CM, community level). Тъмно сиви панели – нивото е част от единицата; светло сиви панели – нивото е теоретичното разширение на единицата (адаптирано от ENV/JM/MONO(2013)6).

Програма за разработване на AOPs, инициирана от Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (OECD, <http://www.oecd.org/>) довежда до публикуване на предложените пътища в база данни (AOP-KB, Adverse Outcome Pathway Knowledge Base, <http://aopkb.org/>), която с всяка година се разширява (**Фиг. 2**). Разпределението на депозираните AOPs по органи/системи, показва засиления интерес към хепатотоксичните ефекти (**Фиг. 3**).

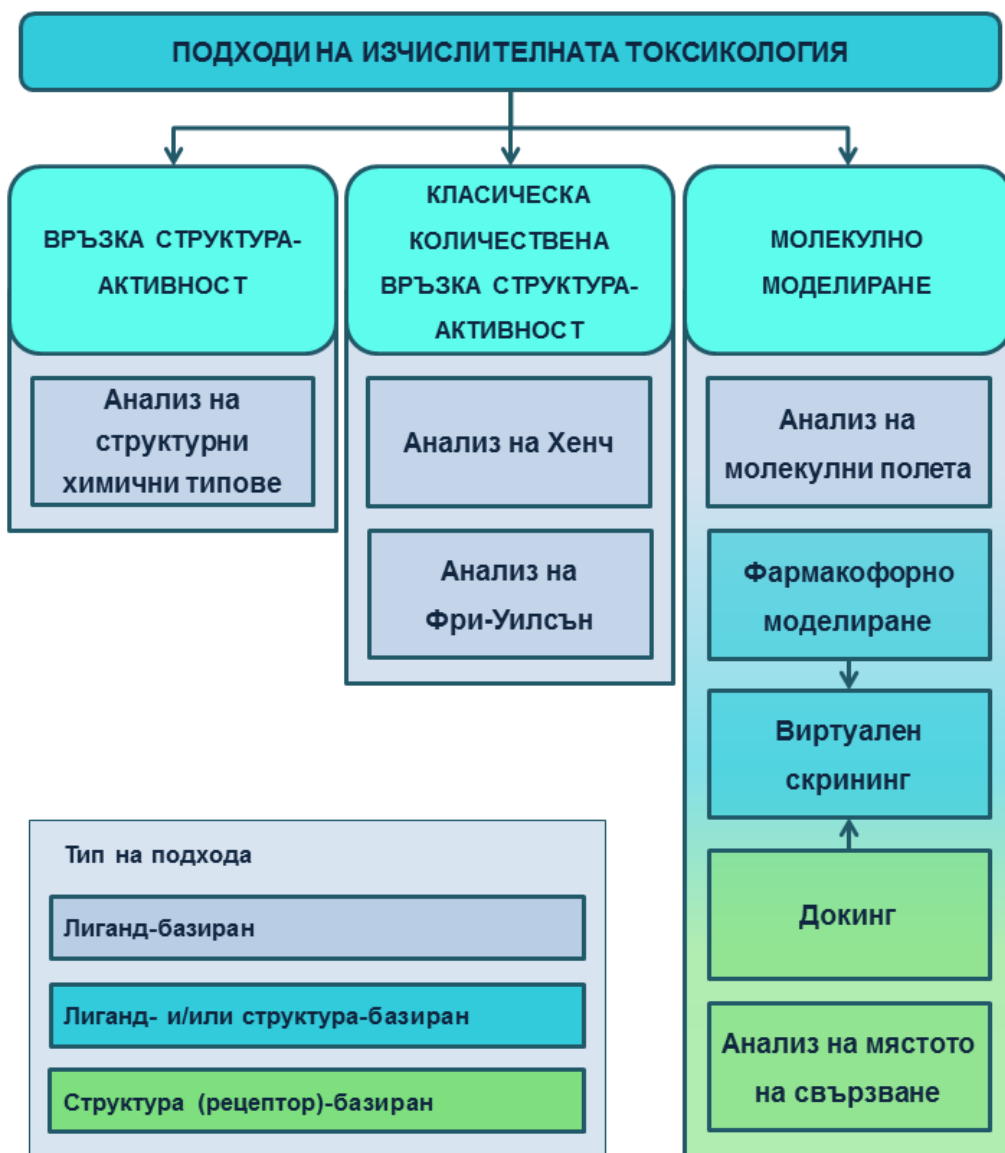


Фигура 2. Брой пътища, водещи до нежелани ефекти, депозиранни по години в AOP-KB



Фигура 3. Разпределение на пътища, водещи до нежелани ефекти в AOP-KB по органи/системи

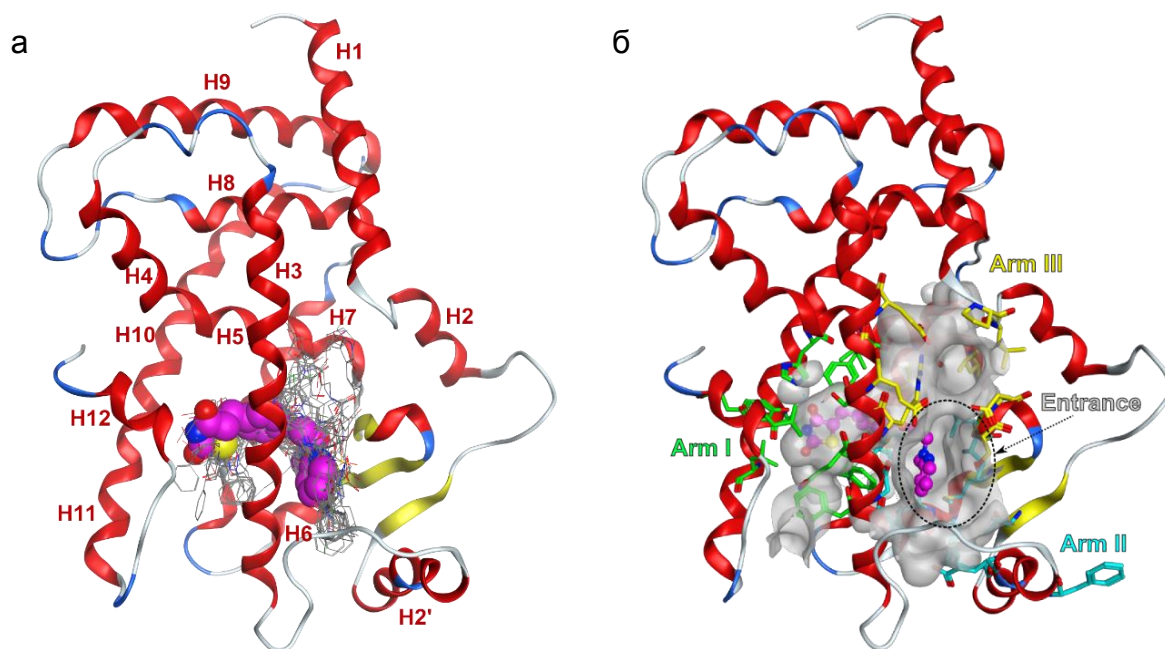
Във втората част на литературния обзор са разгледани *in silico* подходите, които най-често се прилагат в предсказващата (изчислителната) токсикология (**Фиг. 4**). Те най-често включват анализ на връзката структура-активност, например химични подструктури релевантни към определена токсичност; класически подходи за моделиране на количествената връзка структура-активност и по-рядко молекулно моделиране (Cronin and Livingstone, 2004; Cronin, 2010; Combes, 2012; Hartung and Hoffmann, 2009; Patlewicz et al., 2013; Cherkasov et al., 2014; Geenen et al., 2009; EFSA, 2014; Rabinowitz et al., 2008). Те могат да бъдат лиганд-базирани, рецептор (или структура)-базирани и смесени, според това дали разполагаме със структурни данни за токсина, за прицелната му биомолекула или и за двете.



Фигура 4. Класификация на основни методи на изчислителната токсикология

За да бъде приложим за регулаторни цели даден *in silico* модел/подход трябва да адресира конкретен ефект; да се основава на ясен алгоритъм; да има дефиниран обхват на приложимост по отношение на моделираните структури; да е придружен с оценка за неговата вътрешна стабилност и предсказваща способност и, ако е възможно, да позволява ясна интерпретация на конкретния механизъм или начин на действие на моделираните съединения (ENV/JM/MONO(2007)2).

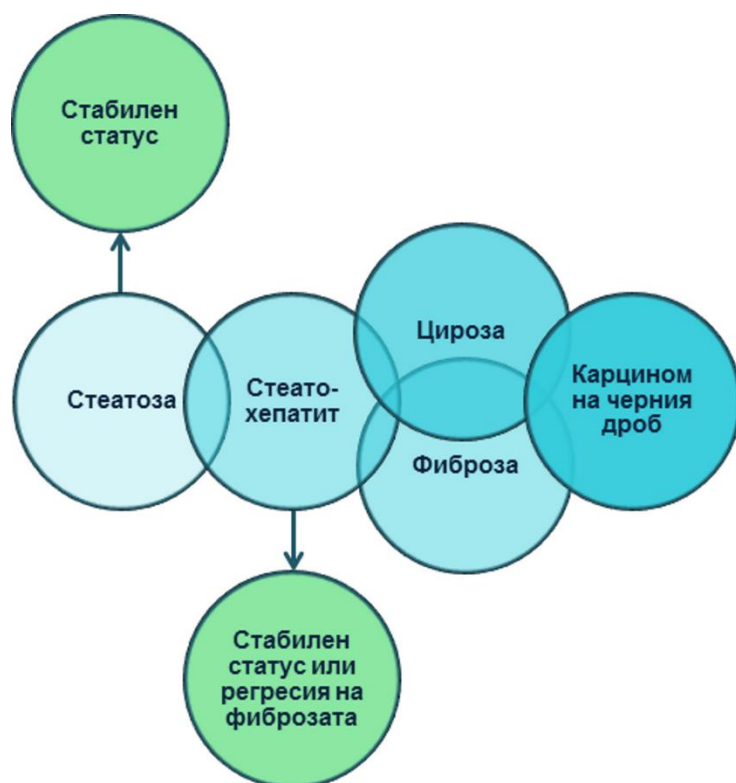
Обектът на настоящото изследване, пероксизомния пролифератор-активиран рецептор гама (PPAR γ), е лиганд-активируем транскрипционен регулатор от стероид-тиреоидното супер-семејство ядрени рецептори. Разпространен е в множество тъкани, регулира редица клетъчни процеси и е атрактивна прицелна биомакромолекула за терапията на широк набор заболявания (Virtue and Vidal-Puig, 2010; Azhar, 2010; Fournier et al., 2007; Grygiel-Górniak, 2014; Brown and Plutzky, 2007; Ahmadian et al., 2013; Lamers et al., 2012). PPAR γ включва: домен за лиганд-независимо активиране, ДНК-свързващ домен, гъвкав свързващ участък и лиганд-свързващ домен. Рецепторът регулира транскрипцията на прицелни гени като хетеродимеризира с ретиноидния X рецептор алфа – RXR α (Azhar, 2010; Ahmadian et al., 2013). PPAR γ има широк Y-образен джоб за свързване с лигандите си, който условно се разделя на рамена I, II и III (Фиг. 5). H12 е алфа спиралата, чиято позиция се явява ключова за взаимодействието на рецептора с коактиватори (Bruning et al., 2007).



Фигура 5. Лиганд-свързващото място на PPAR γ : (а) 58 агониста (оцветени според атомния тип), насложени върху розиглитазон от комплекс 1FM6 (в пурпурно); (б) Рамена (Arms) I, II и III в зелено, цианово синьо и жълто, както и входа (Entrance) за лиганда. H1-H12 – спирали 1-12 на джоба (Tsakovska et al., 2014).

PPAR γ -опосредствената трансактивация включва разпознаване на специфични промоторни области на прицелните гени, хетеродимеризация с ретиноидния X рецептор алфа (RXR α) и свързване на лиганд. Последното отключва активирането на PPAR γ като индуцира конформационни промени, водещи до освобождаване на корепресора и привличане на коактиватора, необходим за инициация на транскрипцията (Gampe et al., 2000; Chandra et al., 2008; Costa et al., 2010; Batista et al., 2015). Пълните и частичните агонисти се различават по набора гени, чиято експресия отключват (Merk and Schubert-Zsilavecz, 2012; Kouskoumvekaki et al., 2013). Това различие обяснява защо нежеланите ефекти са присъщи единствено на пълните агонисти. С оглед на централната роля на PPAR γ в регулацията на липидната хомеостаза, анализът на PPAR γ -опосредстваното развитие на неалкохолна стеатозна болест на черния дроб е от особен интерес.

Черният дроб и мастната тъкан са ключови за липидната хомеостаза. Докато мастната тъкан е специализирана в поемане на мастните киселини от кръвната циркулация, тяхната естерификация до триглицериди и съхранението им в липидни капки, черният дроб ги пренасочва към останалите органи и тъкани, за да задоволи енергийните им потребности. Увеличаване на поемането на мастни киселини в черния дроб, засилената им *de novo* синтеза, пониженото им β -окисление или нарушеният им износ под формата на липопротеинови частици са сред основните причини за развитието на неалкохолна стеатозна болест на черния дроб (Anderson and Borlak, 2008). Последната е комплексно



патологично състояние, което включва чернодробна стеатоза (или затлъстял черен дроб) и неалкохолен стеатохепатит и може да прогресира до чернодробна фиброза, цирроза и рак (Фиг. 6), като по този начин се явява една от най-честите причини за поражения върху черния дроб (Sass et al., 2005; Bedogni et al., 2010).

Фигура 6. Прогресиране на НАСБЧД до рак на черния дроб.

ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Целта на труда е прилагането на концепцията за изследване на начина на действие на ксенобиотици и описването на пътища, водещи до нежелан изход (AOPs), в комбинация с методите на изчислителната токсикология за изясняване и предсказване ролята на лиганд-зависимата дисрегулация на PPAR γ за развитието на неалкохолна стеатозна болест на черния дроб.

ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

От направения обзор на наличната литература, относно състоянието на проблема, както и от формулираната цел, произтичат следните задачи:

1. Разработване на AOP, който да свърже в логическа последователност събития от лиганд-зависимата дисрегулация на PPAR γ (MIE) до неалкохолната стеатозна болест на черния дроб (краен, нежелан ефект).

1.1. Събиране на наличните данни и описване на път.

1.2. Оценка на ключови събития.

2. *In silico* изследване на MIE.

2.1. Събиране, организиране и интегриране на данни за представителни набори от биологично-активни съединения и лиганд-рецепторни комплекси с цел оценка на пътища на токсичност и *in silico* предсказване на биологични ефекти.

2.2. Молекулно моделиране на взаимодействия в кристалографски структури на лиганд-протеинови комплекси.

2.3. Разработване на интегриран *in silico* подход за идентифициране на опасни ксенобиотици и тяхното приоритизиране, комбинирайки фармакофорен и 3D QSAR модели за скрининг на потенциално простеатогенни пълни агонисти на PPAR γ и предсказване на трансактивационната им активност.

ГЛАВА 2. МЕТОДИ И ДАННИ

Методите, възприети при изпълнение на поставените цел и задачи, отразяват интердисциплинарността на научното поле и се състоят в:

- Прилагане на методология, утвърдена от OECD (ENV/JM/MONO(2013)6), за разработване на АОР, включваща описването и оценката на последователността от ключови събития, които са едновременно необходим елемент от етиологията на токсикологичния ефект и са количествено измерими.
- Събиране, анализ и обобщаване на данни за активирането на PPAR γ . Изследвани са всички налични кристалографски комплекси на PPAR γ и негови пълни агонисти, публикувани в Protein Data Bank (PDB, www.rcsb.org, Berman et al., 2000), както и докладваните в литературата (системата на NIH PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) и в ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>; Bento et al., 2014) данни за лиганди на PPAR γ и техните активности.
- Идентификация и анализ на лиганд-протеинови взаимодействия, фармакофорно моделиране и молекулен докинг на пълни агонисти на PPAR γ (MOE platform v. 2014.0901, CCG Inc., <http://www.chemcomp.com>).
- Извеждане на триизмерни количествени зависимости структура-активност (3D QSAR) чрез сравнителен анализ на индекси на молекулно подобие (CoMSIA) за охарактеризиране на връзката между структурата на пълни агонисти на PPAR γ и проявяваната от тях трансактивационна активност (SYBYL-X v. 2.1, Certara USA, Inc.).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

3.1. Простеатогенни пътища

3.1.1. Събиране и анализ на данни

Експерименталните данни от изследвания върху хепатоцити и адипоцити бяха събрани и анализирани, за изследване на възможната връзка между свързването на лиганд с PPAR γ и развитието на стеатоза. Това включи скрининг и класиране на повече от 300 статии, изтеглени от системата на NIH PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) в съответствие със следните критерии: (i) изчерпателност на описаната в източника моделна система; (ii) релевантност на представеното експериментално доказателство спрямо връзката ключово събитие – краен нежелан ефект; (iii) релевантност на представеното експериментално доказателство спрямо връзката MIE – ключово събитие; и (iv) наличие на подходящи моделни системи, доближаващи се до стъпката на химична инициация. Окончателният набор от 72 статии, сред които 26 обзори, е организиран в няколко категории, обобщени във **Фиг. 7**.



Фигура 7. Основни категории (а) обекти и (б) експериментални подходи в подбраните литературни източници.

3.1.2. Описване на AOPs

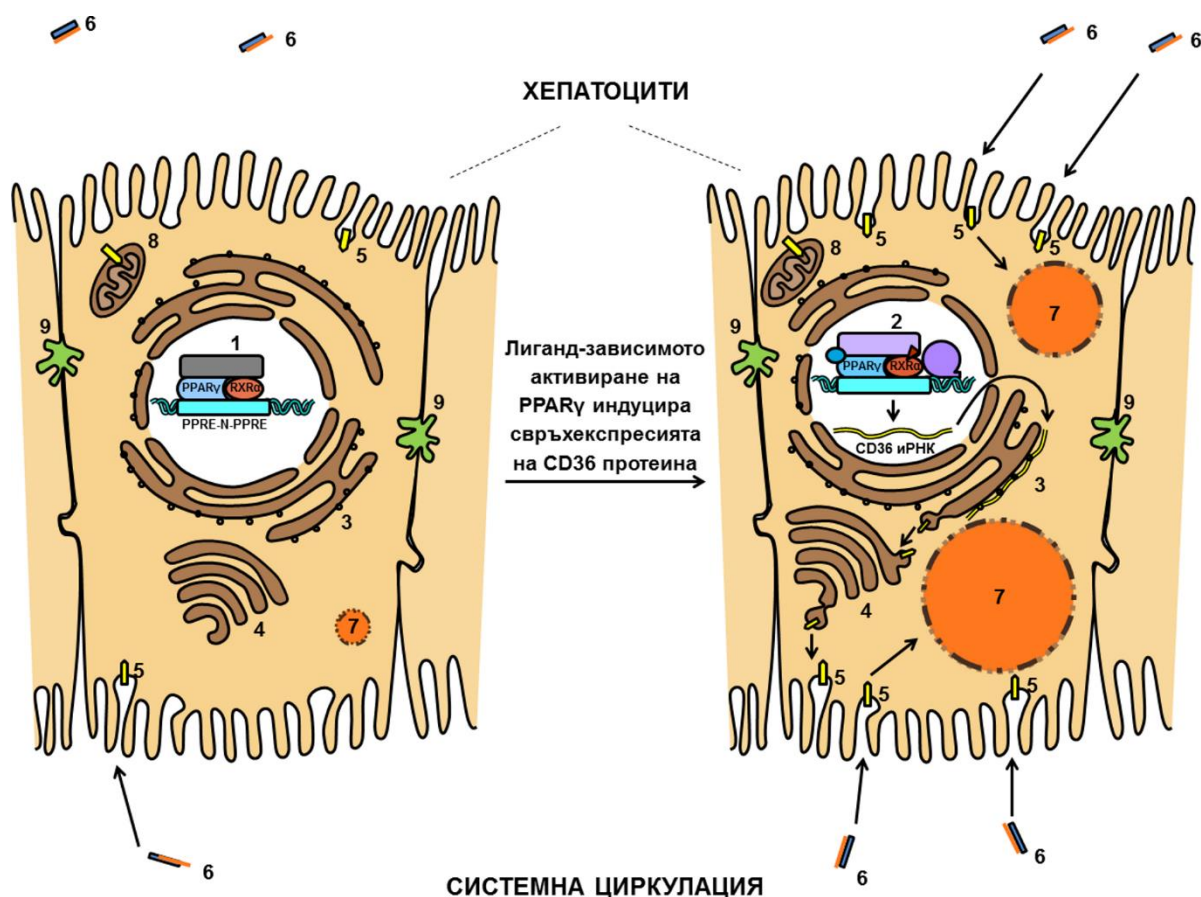
Основавайки се на анализа на наличната информация бяха предложени два пътя, инициирани от лиганд-зависима дисрегулация на PPAR γ (**Фиг. 8**): (i) инхибиране на PPAR γ (с антагонист) в адипоцити и (ii) активиране на PPAR γ (с пълен агонист) в хепатоцити. Пътищата споделят общ краен нежелан ефект, но се отличават по механизма на МПЕ, както и по мястото на действие.



Фигура 8. Опростено представяне на предложените пътища от тъканно-специфична лиганд-зависима дисрегулация на PPAR γ до НАСБЧД.

Съгласно предложения от нас път в мастната тъкан, инхибирането на PPAR γ понижава капацитета на мастната тъкан за съхранение на мастни киселини, отключва възпалителните процеси и намалява секрецията на важни адипокини, отговорни за цялостната липидна хомеостаза. Това веднъж поражда свръх-поемане на мастни киселини в черния дроб, което засилва синтеза и натрупването на триглицериди. Втори път това определя понижената активност на фактори отговорни за β -окислението на тези мастни киселини. При продължително въздействие и двете явления са предпоставка за липотоксичност.

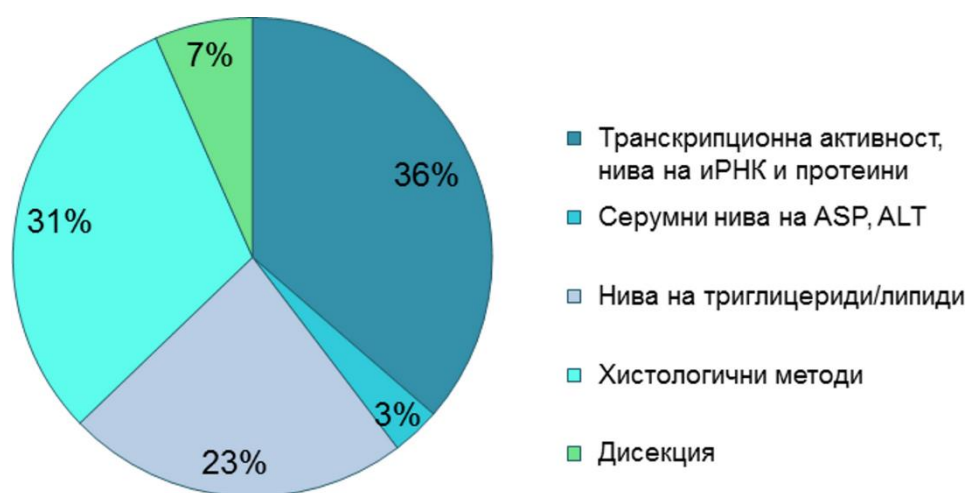
Относно активирането на PPAR γ в хепатоцити – потенциални химични инициатори са пълните агонисти на рецептора. Свърхекспресията на протеини, отговорни за поемането и вътреклетъчния транспорт, синтеза, естерификацията и съхранението на мастните киселини в липидни капки стои в основата на аномалното натрупване на триглицериди и формирането на многобройни или уголемени липидни капки (т. нар. микро- и макровезикуларна стеатоза). Последните са хистологичната картина на развитата НАСБЧД. **Фигура 9** илюстрира един от описаните пътища на PPAR γ -опосредствано пренасищане на хепатоцитите с липиди (Al Sharif et al., 2014).



Фигура 9. Модел на лиганд-зависимото активиране на PPAR γ като потенциално МІЕ за развитие на чернодробна стеатоза, чрез CD36-опосредствано повишено поемане на мастни киселини: (1) PPAR γ -RXR α хетеродимер, върху PPAR γ сигнални последователности (PPRE-N-PPRE) и свързан с корепресор; (2) лиганд-активиран PPAR γ -RXR α хетеродимер с привлечени коактиватор и РНК полимераза II, необходими за експресията на CD36 транслоказата; (3) гранулиран ендоплазмен ретикулум; (4) комплекс на Голджи; (5) CD36, интегрирана в клетъчната мембрана и опосредстваща повишеното поемане на мастни киселини; (6) плазмен протеин (синьо), пренасящ мастни киселини (оранжево); (7) растяща липидна капка, с триглицериди, покрита със специфични протеини; (8) митохондрия; (9) жлъчен канал.

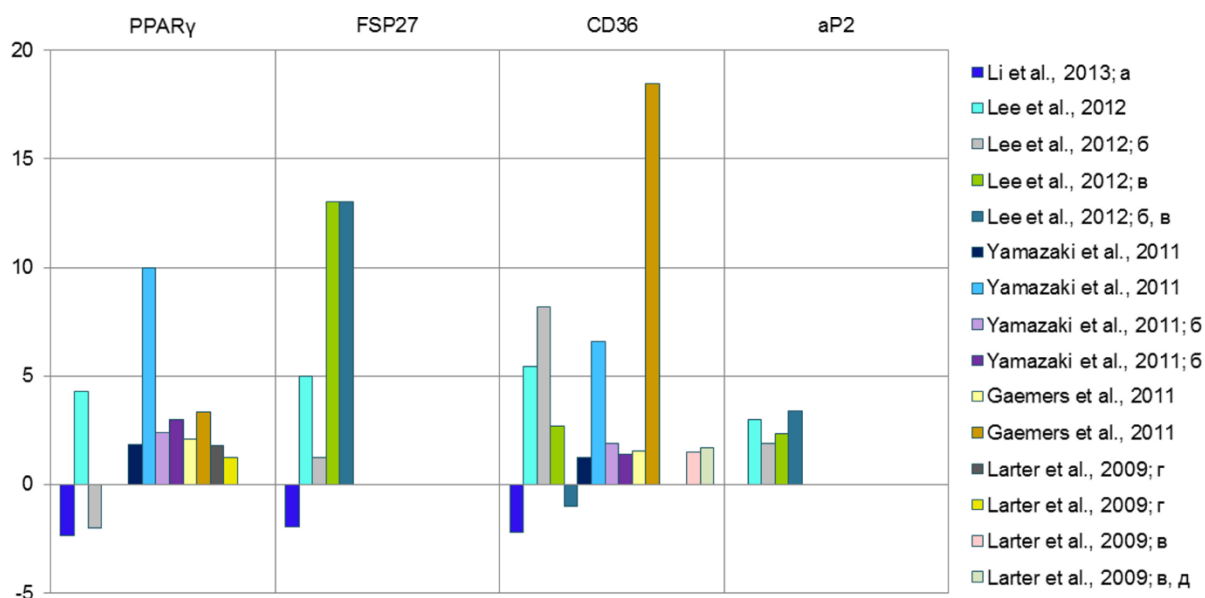
3.1.3. Оценка на чернодробния АОР

По втората подзадача бе извършена оценка на ключови събития в предложения път на лиганд-зависима дисрегулация на PPAR γ в черния дроб. Съгласно класификацията на OECD за тежестта на доказателствата, степента на достоверност на събития, които са експериментално измерени (наблюдавани) с надеждни методи, беше оценена като “МНОГО СИЛНА”. Подобни експериментални данни са нивата на експресия на PPAR γ и прицелните му гени, хистопатологични и серумни маркери на заболяването, съдържанието на триглицериди в черния дроб, морфологични белези на прицелния орган (Фиг. 10). От друга страна оценката за степента на взаимосвързаност между ключовите етапи от пътя бе “СРЕДНА”.

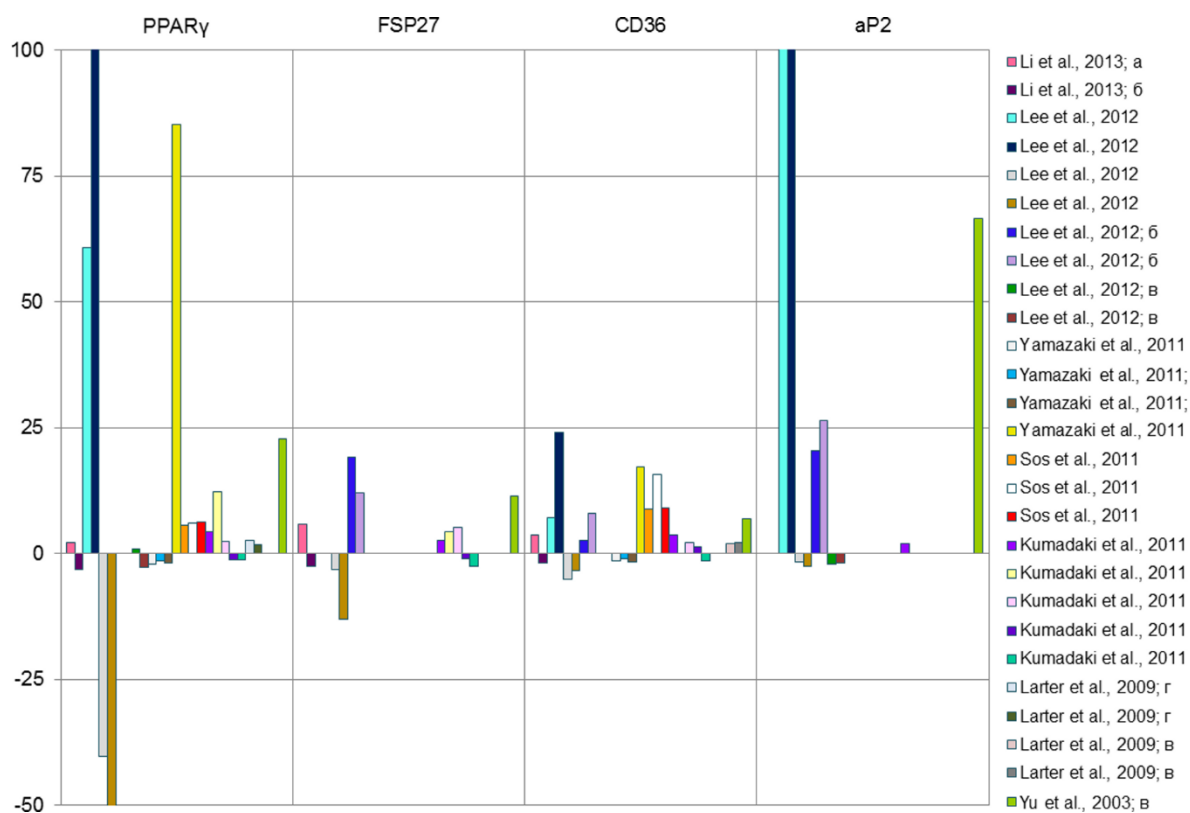


Фигура 10. Разпределение на научните доказателства според типа на изследването. ASP – аспартат аминотрансфераза, ALT – аланин аминотрансфераза.

В допълнение бяха събрани количествени данни за нивата на експресия на един протеин свързан с липидните капки (FSP27) и два, отговорни за поемането и вътреклетъчния транспорт на мастни киселини (CD36, aP2) при различни въздействия върху дейността на PPAR γ . На **Фиг.11** е представена експериментална постановка: моделни животни див тип + вариации на високо-маслена диета + qRT-PCR анализ със следните изключения: (а – *in vitro* третиране с церамид (ендогенен супресор); б – PPAR γ -дефицитна линия; в – микрочипов анализ; г – sRT-PCR анализ; и д – затлъстели, диабетични миши линии с повишен холестерол). **Фигура 12** илюстрира комбинацията от генетични манипулации, засягащи позитивната/негативна регулация на PPAR γ , стандартна диета и qRT-PCR анализ, като изключение от експерименталната постановка е прилагането на: а – високо-маслена диета; б – микрочипов анализ; в – Western blot анализ; г – sRT-PCR анализ.



Фигура 11. Ефект на естествени лиганди (от диетата) върху нивата на иРНК на PPAR γ и някои негови прицелни протеини.

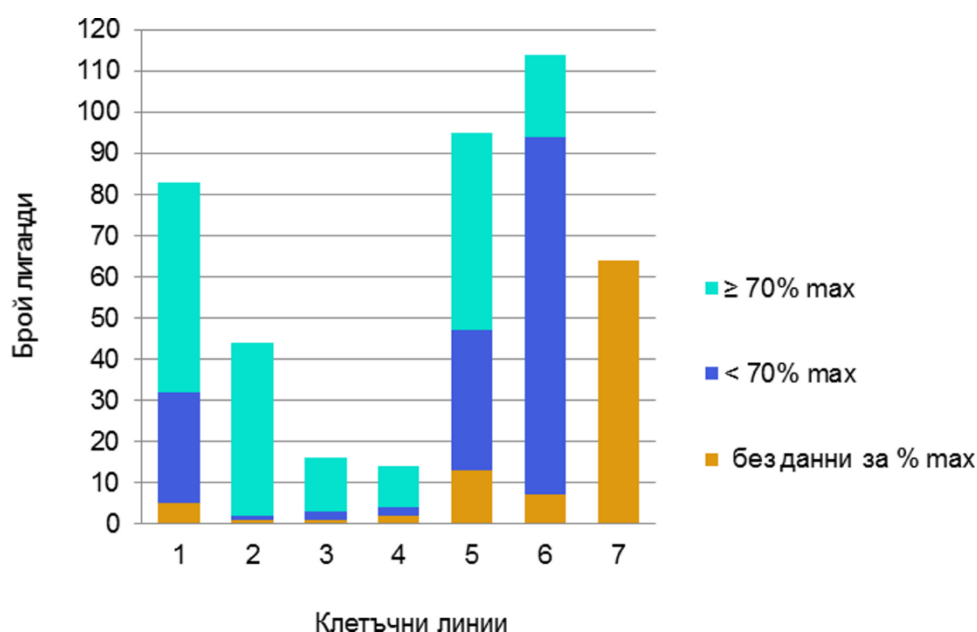


Фигура 12. Ефект на генетични манипулации и/или генетични характеристики върху нивата на иРНК на PPAR γ и някои негови прицелни протеини.

3.2. Набор от данни за лиганди на PPAR γ

След потвърждаване на наличието на връзка между потенциалното MIE и крайния нежелан ефект, бе събрана и анализирана структурна и биологична информация за лиганди на PPAR γ , необходима за разработването на *in silico* и по-точно на фармакофорен и 3D QSAR модели за идентифициране на пълни агонисти на рецептора и предсказване на тяхната активност. Създаден бе публично достъпен набор от данни (<http://biomed.bas.bg/qsarmm/>) за 439 лиганда на PPAR γ и биологичните им активности (афинитет на свързване, IC₅₀; трансактивационна активност, EC₅₀; относителна ефикасност, % max), базирана на литературни източници и PDB.

Разпределението на събраните лиганди според различните човешки/животински клетъчни линии, използвани за измерване на активността и относителната им ефикасност спрямо PPAR γ е показано на **Фиг. 13**.



Фигура 13. Набор от данни за агонисти на PPAR γ : разпределение на лигандите според клетъчните линии, върху които са изследвани, и относителната им ефикасност спрямо PPAR γ . Цифрите 1-7 обозначават различните клетъчни линии: 1 – хамстер/бъбрек (BHK21 ATCC CCL10), 2-4 – маймуна/бъбрек (COS-1, COS-7, CV-1, съответно), 5 – човек/бъбрек (HEK293), 6 и 7 – човек/черен дроб (HepG2, Huh-7, съответно)

3.3. Молекулно моделиране

За целите на *in silico* моделирането за зависима променлива бе избрана трансактивационната активност. Методът за нейното експериментално измерване най-адекватно възпроизвежда инициацията на пътя на токсичност и първите ключови събития в него, а именно лиганд-индуцираното активиране на PPAR γ и последващата транскрипция на референтен прицелен ген.

Изследването на взаимодействията рецептор-лиганд заедно с установяването на корелация между структурните вариации (анализ на молекулни полета) и измененията в активностите на събраните пълни агонисти доведоха до разработването на двустъпкова процедура (**Фиг. 14**), състояща се от: (i) виртуален скрининг (ВС) на химикали на базата на докинг и разработен фармакофорен модел и (ii) 3D модел, базиран на количествена връзка структура-активност.

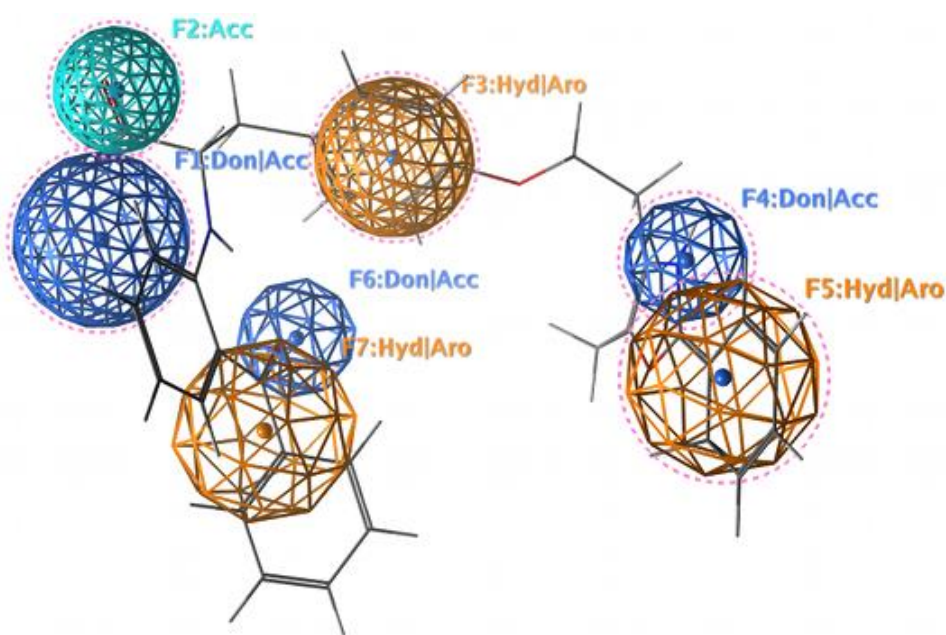


Фигура 14. Молекулно моделиране на работния процес за изучаване на пълното активиране на PPAR γ : стъпка 1 – ВС за предсказване на пълни агонисти и стъпка 2 – 3D QSAR моделиране, за предсказване на тяхната активност.

3.3.1. Разработване на фармакофорен модел и протокол за виртуален скрининг

Първата стъпка от молекулното моделиране бе насочена към разработване на подход за идентифициране на потенциални пълни агонисти на прицелната биомолекула, представляващи риск за развитието на чернодробна стеатоза. Комбинирани бяха възможностите на лиганд- и структура-базирани методи в молекулното моделиране. Разчитайки на 3D структурните данни от кристалографски комплекси на PPAR γ с негови пълни агонисти в PDB бе разработен 7-точков фармакофорен модел с открити 4 съществени фармакофорни точки (**Фиг. 15**). Бе използван софтуерът MOE (MOE v. 2014.0901). В **Табл. 1** са дефинирани описаните фармакофорни признаци (Tsakovska et al., 2014).

Четири-точковият фармакофор бе приложен за две цели: дискриминиране между пълни и частични агонисти на PPAR γ , както и генериране и пространствено подравняване на биологично достоверни конформери за последващото 3D QSAR моделиране. Оценени бяха неговата чувствителност и специфичност: чувствителност спрямо пълни агонисти – 85%; специфичност, относно частични агонисти – 44%; специфичност, относно съединения, които не са лиганди на рецептора – 77%.



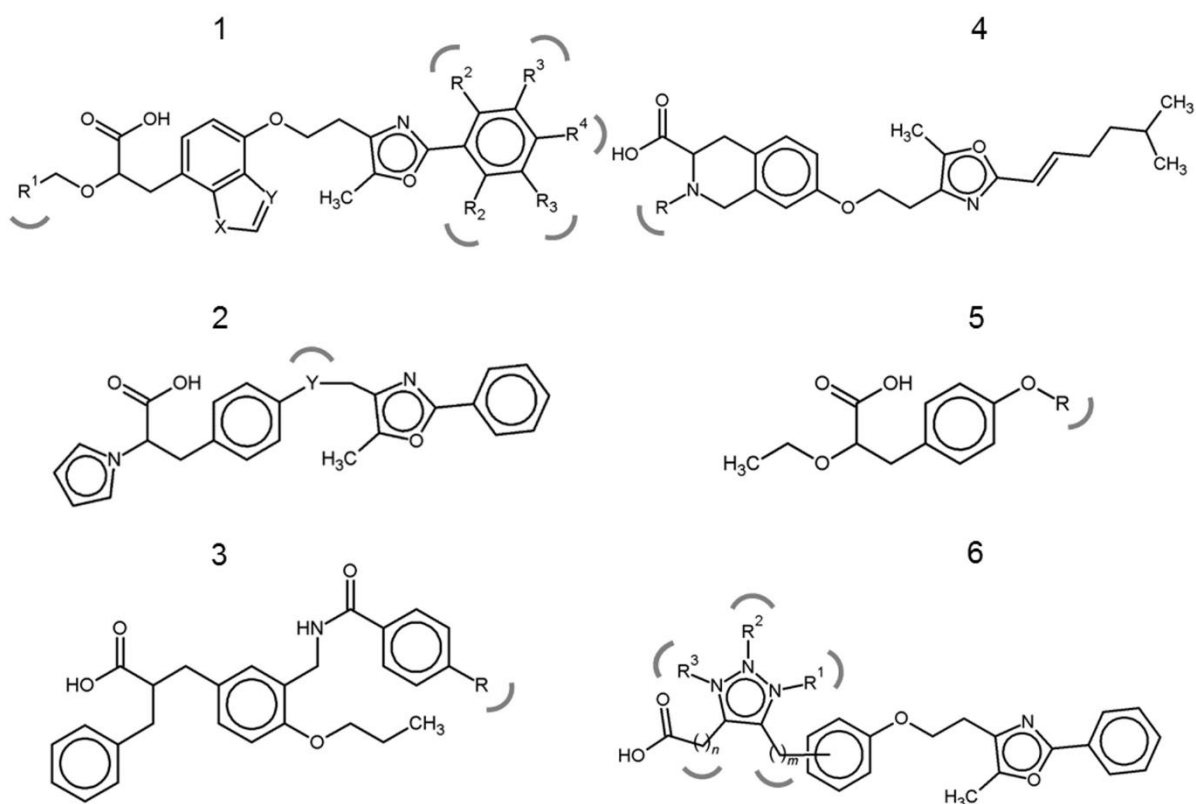
Фигура 15. Фармакофорен модел на пълни агонисти на PPAR γ . Признаците, които описват по-малко рестриктивния 4/5-точков фармакофорен модел, са оградени с пунктирна линия.

Таблица 1. Описание на фармакофорните признаци във фармакофорния модел на пълни агонисти на PPAR γ : Don – донорен; Acc – акцепторен; Hyd – хидрофобен; Aro – ароматен.

Фармакофорен признак	Локализация в PPAR γ	Взаимодействия с ключови аминокиселинни остатъци в джоба на свързване
F1: Don/Acc	Рамо I	Участва във взаимодействия от типа донор на водородна връзка (HB) и/или акцептор на HB с остатъци His449 (H11) и Tyr473 (H12); отговорен за прякото взаимодействие с H12 и стабилизирането на активната ѝ позиция
F2: Acc	Рамо I	Участва във взаимодействия от типа акцептор на HB със Ser289 (H3), His323(H5), Tyr 327 (H5); отговорен за стабилизирането на H12 в активната позиция
F3: Hyd/Aro	Рамо I	Съответства на хидрофобното обкръжение; стабилизира позициите на признаци F1 и F2
F4: Don/Acc	Рамо II	Може да осъществява взаимодействия от типа донор на водородна връзка (HB) и/или акцептор на HB, директно или чрез водни молекули, със Ser342 (H5), Cys285 (H3) и Arg 288 (H3); стабилизира позата на лиганда в джоба на свързване
F5: Hyd/Aro	Рамо II	Съответства на хидрофобното обкръжение; стабилизира позата на лиганда в джоба на свързване
F6: Don/Acc	Рамо I	Може да участва във водород-донорни и/или водород-акцепторни взаимодействия, опосредствани от водна молекула; стабилизира позата на лиганда в джоба на свързване
F7: Hyd/Aro	Рамо I	Съответства на хидрофобното обкръжение; стабилизира позата на лиганда в джоба на свързване

3.3.2. Разработване на 3D QSAR модел, предсказващ активността на пълни агонисти на PPAR γ

Втората стъпка от молекулярното моделиране бе насочена към извеждането на зависимост в подкрепа на приоритизацията за последващо тестване на пълни агонисти на PPAR γ чрез предсказване на техните активности. На тази стъпка бе разработен 3D QSAR модел за предсказване трансактивационната активност на пълните PPAR γ агонисти, разчитайки на събраните данни и фармакофорния модел. Извеждането на подобна зависимост бе осъществено на четири основни етапа. Първият бе селекцията на набор от структури за моделиране, като за разумен праг за подбор единствено на пълни агонисти бе определена относителна ефикасност, която не е по-ниска от 70%. **Фигура 16** илюстрира няколко базисни подструктури, притежаващи структурни скелети характерни за част от 170-те моделирани съединения.



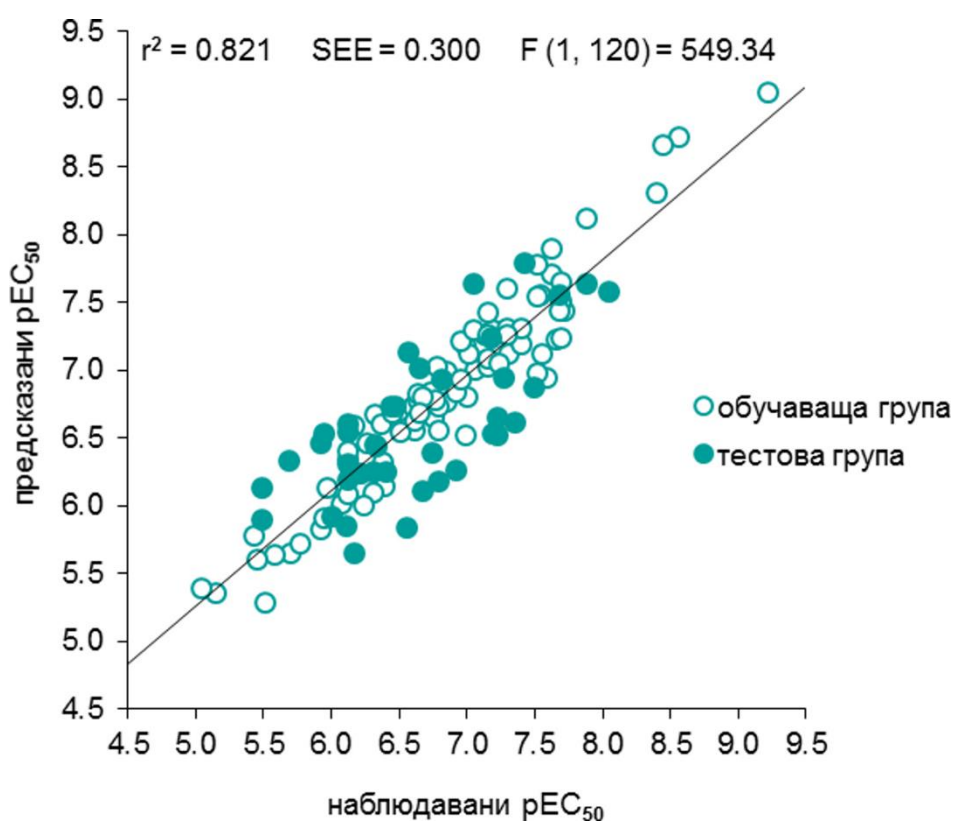
Фигура 16. Примерни структурни скелети от набора съединения за *in silico* моделиране: 1 – Bènardeau et al., 2009; 2 – Casimiro-Garcia et al., 2008; 3 – Ohashi et al., 2013; 4 – Otake et al., 2012, 5 – Sauerberg et al., 2002; 6 – Zhang et al., 2009.

Структурното разнообразие произтича от различните възможни заместители на базисните подструктури и обяснява вариациите в наблюдаваните биологични активности на съответните съединения. Построяването на надежден за целите на предсказването модел се основава на разбирането, че колкото по-разнообразна е обучаващата група структури, толкова по-обширна е областта му на приложимост.

На втория етап от моделирането, генериране на пози, бе проведен докинг с фармакофорен филтър в лиганд-свързващото място на рецептора, с цел пространствено подравняване на структурите и възпроизвеждане на най-вероятните биоактивни конформации. Подравнените 170 лиганда бяха поставени в симулационна кутия, имитираща джоба на рецептора, и подложени на сравнителен анализ на индекси на молекулно подобие – Comparative Molecular Similarity Indices Analysis (за краткост CoMSIA). Бе използван софтуерът SYBYL (SYBYL-X v. 2.1).

На третия етап бяха изведени множество CoMSIA модели, чиято вътрешна предсказваща способност бе оценена чрез кросвалидиране. Най-стабилният модел разработен на базата на най-голямата и структурно разнообразна обучаваща група от пълни агонисти до момента (83) включва електростатични, водород-акцепторни и хидрофобни CoMSIA полета. Той се характеризира със следните статистически параметри: $q_{cv}^2 = 0.610$, $N_{opt} = 7$, $SEP_{CV} = 0.505$. Допълнителна Y-рандомизация ($q_{cv}^2 = -0.114$, $SEP_{CV} = 0.824$) и прогресивен скрамблинг ($Q^2 = 0.437$, $cSDEP = 0.598$, $dq/dr = 1.06$) потвърдиха стабилността на модела.

На последния етап бе оценена предсказващата способност на модела ($r_{pred}^2 = 0.552$), чрез валидиране върху външна тестова група (обучаваща група = 83, тестова група = 39, съотношение = ~ 2:1). Полученият предсказващ коефициент на корелация е близък до крос-валидирания коефициент на корелация, което отново потвърждава стабилността на предсказването в контекста на вътре- и между-лабораторните вариации в измерването на биологичните данни, както и комплексната природа на зависимата променлива. Финалният регресионен модел беше построен на базата на оптималния брой компоненти от анализа на частично най-малките квадрати (Al Sharif et al., 2016). **Фигура 17** представя корелацията между експериментално наблюдаваните и предсказаните от най-добрия 3D QSAR модел pEC_{50} стойности за обучаващата и тестовата групи агонисти.



Фигура 17. Предсказани (предсказани pEC_{50}) спрямо експериментално наблюдавани pEC_{50} (наблюдавани pEC_{50}) стойности за обучаващата (83) и външната тестова (39) групи. Регресионна статистика: r^2 – коефициент на корелация; SEE – стандартна грешка на оценката, $F(1, 120)$ – F-отношение между обяснената и необяснената дисперсия за определен брой степени на свобода при значимост от 95%.

Предложените в настоящата дисертация алтернативни подходи са част от инициатива за разработване на *in silico* подходи за предсказване на потенциалната хепатотоксичност на козметични инградиенти (SEURAT-1, <http://www.seurat-1.eu>; COSMOS, <http://www.cosmostox.eu>), но са приложими за всякакви класове химикали, които структурно попадат в обхвата на моделите, както и в процеса на компютърно подпомогнатия лекарствен дизайн за превантивна рестрикция на кандидат-лекарства с потенциални нежелани ефекти.

3.3.3. Интегриране на ВС протокола в комбинирани подходи

ВС протоколът е успешно комбиниран с други компютърни модели (Tsakovska et al, 2015; Fioravanzo et al., 2015; Vitcheva et al., 2015; <http://knimewebportal.cosmostox.eu/>; Chemotyper, <https://chemotyper.org>, Yang et al., 2015) в интегрирани *in silico* подходи за идентифицирането на простеатогенни пълни агонисти на PPAR γ :

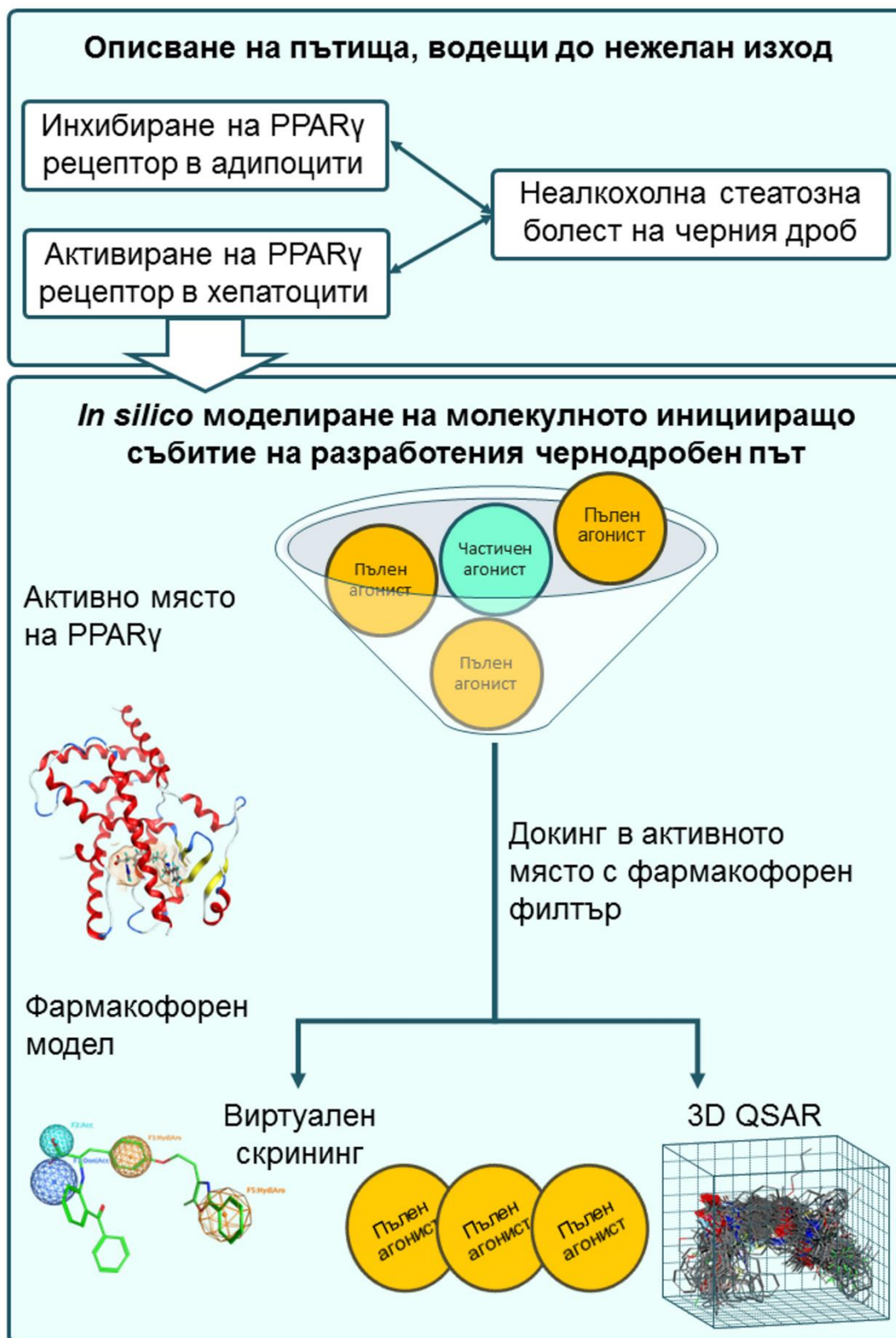
- Излъчени бяха двойни PPAR γ /LXR лиганди с висок приоритет за тестване за стеатогенност (поради общи за двата регулаторни протеина прицелни метаболитни пътища).
- Проведен бе скрининг на база данни (структурни и биологични) за хронична токсичност и бе идентифициран пиперонил бутоксида като простеатогенно съединение, чиито механизъм на токсично действие се осъществява потенциално посредством пълно активиране на PPAR γ .

Петте основни стъпки в разработването и интегрирането на *in silico* подходи в експертни системи на базата на AOPs, са:

- Избор на релевантен за изследваната патология рецептор за *in silico* моделиране
- Анализ и организиране на наличното знание: разработване на пътища, съставяне на бази данни, обобщаване на *in silico* модели
- Проучване и валидиране на различни методи за молекулно моделиране на MIE
- Интегриране на *in silico* моделите в комбинирани подходи за идентифициране на опасни химични съединения
- Въвеждане на комбинираните подходи в регулаторни рамки за алтернативен анализ на риска

Това изследване показва, че молекулното моделиране, както и събирането и анализа на релевантни за дадена патология *in vivo* токсикологични данни в комбинация с анализ на подструктури могат да се допълват в контекста на логическата рамка за AOPs (Al Sharif et al., 2016). То покрива първите четири от гореописаните пет стъпки.

ГРАФИЧНО РЕЗЮМЕ



ПРИНОСИ

- 1. Описани са два тъканно-специфични пътя (в черния дроб и мастната тъкан), свързващи лиганд-зависимата дисрегулация на PPAR γ с неалкохолната стеатозна болест на черния дроб.**
 - Ключови събития от чернодробния път са количествено оценени и са очертани пропуски в данните, откриващи поле за допълнителни *in vitro* анализи.
 - Предложените пътища са основа за разработването на *in silico* модели, които да предсказват лиганд-зависимата дисрегулация на PPAR γ и ключови събития.
- 2. Събрани са структурни и биологични данни за агонисти на PPAR γ , които бяха организирани и интегрирани във виртуална библиотека. Това е най-пълният и обширен набор от агонисти на PPAR γ с публичен достъп (наличен на <http://biomed.bas.bg/qsarimm/>).**
- 3. Построен е фармакофорен модел на пълни агонисти на PPAR γ , който е използван за разработването на протокол за виртуален скрининг на съединения.**
 - Разработеният протокол е успешно приложен за предсказване на пълния агонистичен ефект на съединения.
 - Протоколът е съчетан с подходи на молекулното моделиране за предсказване на потенциални дуални PPAR γ /LXR лиганди с цел приоритизация на химикали, изискващи особено внимание, поради очакваният им синергичен простеатогенен ефект.
 - Протоколът е съчетан с „read-across“ процедура основана на подструктури, в рамките на комбиниран подход, целящ предсказване на простеатогенния ефект на химикали и изясняване на възможния механизъм на токсичния ефект (пълнен агонизъм спрямо PPAR γ).
- 4. Изведен е 3D QSAR (CoMSIA) модел, предсказващ трансактивационната активност на пълни агонисти на PPAR γ . Моделът превъзхожда подобни предходни модели, тъй като се основава на най-големия и структурно разнообразен набор от съединения, гарантирайки разширяване на областта на приложимост. Статистическите параметри, получени при проведеното изчерпателно валидиране на модела, го утвърждават като надежден за прогностични цели.**
- 5. Предложен е двустъпков *in silico* подход, комбиниращ разработените протокол за виртуален скрининг и 3D QSAR модел, за скриниране и приоритизация на потенциални простеатогенни лиганди.**

ОБОБЩЕНИЕ

В заключение, работата, представена в настоящата дисертация, включва прилагането на методи на изчислителната токсикология (фармакофорно моделиране, молекулен докинг и 3D QSAR анализ) в комбинация с описване на AOPs, с цел изследване на PPAR γ -опосредстваната хепатотоксичност и разработване на *in silico* подходи, подкрепящи идентифицирането и характеризирането на опасности за човешкото здраве.

На базата на събраните и обобщени експериментални доказателства, бяха описани два AOPs, фокусирани върху връзката между дисрегулацията на PPAR γ и неалкохолната стеатозна болест на черния дроб и очертаващи тъканно-специфични каскади от събития, инициирани от лиганд-индуцираното активиране (черен дроб) или инхибиране (мастна тъкан) на рецептора. Също така бяха събрани количествени данни, относно ключови събития в чернодробния път. Причинно-следствената връзка в рамките на предложените пътища подчертава значимостта на избраните MIEs и поставя акцент върху ключови области, изискващи допълнителни *in vitro/in silico* проучвания. Чернодробният път, адресиращ конкретна група от химични инициатори (пълни агонисти на PPAR γ), стана солидна механистична основа за разработването на модели, предсказващи MIE, както и за тяхното интегриране в комбинирани подходи.

Структурните и биологични данни за пълни и парциални агонисти на PPAR γ , събрани от PDB, ChEMBL и от литературни източници, послужиха за съставянето на най-големия публично достъпен набор от данни за лиганди на PPAR γ (<http://biomed.bas.bg/qsarmm/>). Той предоставя достоверни данни за целите на моделирането.

Задълбоченият анализ на ключовите взаимодействия между PPAR γ и неговите лиганди бе проведен върху целенасочено подбрани кристалографски комплекси, определяйки молекулните детерминанти на изследваното MIE и позволявайки разработването на фармакофорен модел на пълни агонисти на PPAR γ . Използването на този фармакофор в рамките на алгоритъм за докинг в лиганд-свързващото място на PPAR γ представлява ключов елемент на валидирана процедура за виртуален скрининг (BC) за идентифициране на пълни агонисти. Успешното прилагане на този BC в комбинация с LXR-базирани модели и „read across“ процедура, за търсене на подструктури, направи възможна приоритизацията на потенциални простеатогенни химични съединения, действащи като дуални PPAR γ /LXR лиганди и за предсказване на възможния начин на действие (пълнен PPAR γ агонизъм) на хепатотоксичния пиперонил бутоксид.

Използвайки разработения фармакофор-базиран докинг и събраните данни за пълни агонисти, бе изведен 3D QSAR модел. Приложен беше CoMSIA подход за установяване на корелацията между разликите в химичните структури и вариациите в трансактивационните им активности. Докладваните качество на приближението, стабилност и предсказваща способност на изведената количествена връзка структура-активност свидетелстват за надеждността на модела, необходима за прилагането му за регулаторни цели, а числеността и структурното разнообразие на съединенията в обучаващата група са определящи за предимството на модела по отношение на обхват на приложимост спрямо предходни такива.

На базата на разработените AOP и предсказващи модели, бе предложен механизтично правдоподобен *in silico* подход за скрининг на потенциални простеатогенни химични съединения, действащи чрез пълно активиране на PPAR γ (фармакофор-базиран BC) и за предсказване на тяхната активност на основата на характеристични хидрофобни, водород-акцепторни и електростатични CoMSIA полета (3D QSAR модел).

Разработените пътища, набор от данни и комбиниран *in silico* подход представляват солидна основа за последващо изследване, обмен на знание и приложимост посредством: **(i)** подобряване на пътищата и депозирането им в Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (OECD); **(ii)** генериране на предложения за регулаторни анализи на базата на описаните ключови събития; **(iii)** разработване на обогатена база данни с лиганди на PPAR γ ; **(iv)** допълнително токсикологично валидиране на разработените модели спрямо установени простеатогенни съединения и **(v)** разработване и валидиране на тримерни подструктури.

SUMMARY

In summary, the work presented in this thesis has exploited a variety of predictive toxicology methods (pharmacophore modelling, docking, and 3D QSAR analysis) in combination with AOP development in order to investigate the PPAR γ -mediated hepatotoxicity and to develop an integrated *in silico* approach supporting hazard identification and characterisation.

On the basis of the collected and systemised experimental evidence, two AOPs focused on the relationship PPAR γ dysregulation – NAFLD have been developed, outlining tissue-specific cascades of events initiated by a ligand-induced receptor activation (in liver) or inhibition (in adipose tissue). Moreover, quantitative data have been collected, regarding key events in the liver AOP. The causal relationships within the proposed AOPs underline the relevance of the selected MIEs and emphasise the anchor points for further *in vitro/in silico* exploration. The hepatic AOP, addressing a particular domain of chemical initiators (PPAR γ full agonists), became a solid mechanistical basis for the development of predictive models of the MIE as well as their integration in combined approaches.

The structural and biological data for PPAR γ full and partial agonists harvested from PDB, ChEMBL and literature sources have resulted in the largest publicly available PPAR γ ligands dataset (<http://biomed.bas.bg/qsarmm/>). It offers high quality data, organised for modelling purposes.

The comprehensive analysis of the key PPAR γ -ligand interactions has been performed within the purposefully selected crystallographic complexes, affirming the molecular determinants for the studied MIE and allowing for the development of a pharmacophore model of PPAR γ full agonists. Its use within an algorithm for docking into the PPAR γ binding pocket produced the core element of a thoroughly validated virtual screening (VS) procedure for identification of full agonists. The successful application of the proposed VS protocol in combination with LXR-based models and chemotype-based read across procedure allowed for the prioritisation of potential prosteatotic chemicals acting as dual PPAR γ /LXR binders and for the prediction of the possible mode of action (PPAR γ full agonism) of the hepatotoxic piperonyl butoxide.

Using the developed pharmacophore-based docking and the collected full agonists data, a 3D QSAR model has been derived. The CoMSIA approach has been used to correlate the changes in the structures to the variations in their transactivation activities.

The reported goodness-of-fit, robustness and predictivity of the established quantitative structure-activity relationship evidenced the reliability of the model necessary for its regulatory acceptance, while the size and the structural diversity of the training set characterised the superiority of the model's applicability domain compared to previously reported ones.

On the basis of the developed hepatic AOP and predictive molecular models, a mechanistically justified combined *in silico* approach has been proposed to screen for potential prosteatotic chemicals acting through PPAR γ full activation (pharmacophore-based VS) and to predict their potency based on characteristic hydrophobic, HB acceptor and electrostatic CoMSIA fields (3D QSAR model).

The developed pathways, dataset and combined *in silico* approach constitute a solid fundamental for further exploration, knowledge transfer and applicability by: **(i)** AOP refinement and introduction to OECD; **(ii)** generation of proposals for regulatory assays, which is based on the outlined key events; **(iii)** development of an enriched PPAR γ ligands' database; **(iv)** further toxicological validation of the developed models against experimentally observed prosteatotic compounds and **(v)** 3D chemotypes development and validation.

ЛИТЕРАТУРА

- Adler S, Basketter D, Creton S, et al., Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. *Arch Toxicol.* 2011 May;85(5):367-485. doi: 10.1007/s00204-011-0693-2. Epub 2011 May 1. Review. PubMed PMID: 21533817.
- Ahmadian M, Suh JM, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013 May;19(5):557-66. doi: 10.1038/nm.3159. Epub 2013 May 7. Review. PubMed PMID: 23652116; PubMed Central PMCID: PMC3870016.
- Al Sharif M, Tsakovska I, Pajeva I, Alov P, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Yang C, Mostrag-Szlichtyng A, Vitcheva V, Worth AP, Richarz AN, Cronin MTD, The Application of Molecular Modelling in the Safety Assessment of Chemicals: A Case Study on Ligand-Dependent PPAR γ Dysregulation, *Toxicology*, 2016, doi: 10.1016/j.tox.2016.01.009.
- Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev.* 2008 Sep;60(3):311-57. doi: 10.1124/pr.108.00001. Review. PubMed PMID: 18922966.
- Azhar S. Peroxisome proliferator-activated receptors, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Future Cardiol.* 2010 Sep;6(5):657-91. doi: 10.2217/fca.10.86. Review. PubMed PMID: 20932114; PubMed Central PMCID: PMC3246744.
- Batista MR, Martínez L. Conformational Diversity of the Helix 12 of the Ligand Binding Domain of PPAR γ and Functional Implications. *J Phys Chem B.* 2015 Dec 17;119(50):15418-29. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b09824. Epub 2015 Dec 3. PubMed PMID: 26598113.
- Bedogni G, Bellentani S. Fatty liver: how frequent is it and why?. *Ann Hepatol.* 2004; 3: 63-65; Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology.* 2010 May;51(5):1820-32. doi: 10.1002/hep.23594. Review. PubMed PMID: 20432259.
- Bento AP, Gaulton A, Hersey A, Bellis LJ, Chambers J, Davies M, Krüger FA, Light Y, Mak L, McGlinchey S, Nowotka M, Papadatos G, Santos R, Overington JP. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D1083-90. doi: 10.1093/nar/gkt1031. Epub 2013 Nov 7. PubMed PMID: 24214965; PubMed Central PMCID: PMC3965067; <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):235-42. PubMed PMID: 10592235; PubMed Central PMCID: PMC102472.; www.rcsb.org
- Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart J.* 2012 May;33(10):1190-200. doi: 10.1093/eurheartj/ehr453. Epub 2012 Mar 8. Review. PubMed PMID: 22408036.
- Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation.* 2007 Jan 30;115(4):518-33. Review. PubMed PMID: 17261671.

- Bruning JB, Chalmers MJ, Prasad S, et al. Partial agonists activate PPARgamma using a helix 12 independent mechanism. *Structure*. 2007 Oct;15(10):1258-71. PubMed PMID: 17937915.
- Burden N, Mahony C, Müller BP, et al. Aligning the 3Rs with new paradigms in the safety assessment of chemicals. *Toxicology*. 2015 Apr 1;330:62-6. Review. PubMed PMID: 25932488.
- Chandra V, Huang P, Hamuro Y, et al.. Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA. *Nature*. 2008 Nov 20;456(7220):350-6. doi: 10.1038/nature07413. PubMed PMID: 19043829; PubMed Central PMCID: PMC2743566.
- COM(2013) 135 final, Communication from the Commission to the European Parliament and the Council on the animal testing and marketing ban and on the state of play in relation to alternative methods in the field of cosmetics, Brussels, 11.3.2013
- COSMOS, <http://www.cosmostox.eu>
- Costa V, Gallo MA, Letizia F, et al. PPARG: Gene Expression Regulation and Next-Generation Sequencing for Unsolved Issues. *PPAR Res*. 2010;2010. pii: 409168. doi: 10.1155/2010/409168. Epub 2010 Sep 8. PubMed PMID: 20871817; PubMed Central PMCID: PMC2943117.
- FAO/WHO (2008) Codex Alimentarius Commission procedural manual, 18th ed. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Codex Alimentarius Commission (ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_18e.pdf)
- Fioravanzo E, Kovarich C, Bassan A, Ciacci A, Al Sharif M, Pajeva I, Alov P, Richarz AN, Worth AP, Palczewska A, Steinmetz FP, Yang C, Tsakovska I (2015) Use of molecular modelling approaches for the evaluation of potential binding to nuclear receptors involved in liver steatosis, SEURAT-1 Final Symposium, 4 December 2015, Brussels, Belgium
- Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. *Placenta*. 2007 Feb-Mar;28(2-3):65-76. Epub 2006 Jul 10. Review. PubMed PMID: 16834993.
- Fowler BA. Biomarkers in toxicology and risk assessment. *EXS*. 2012;101:459-70. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4_16. Review. PubMed PMID: 22945579.
- Gaemers IC, Stallen JM, Kunne C, Wallner C, van Werven J, Nederveen A, Lamers WH. Lipotoxicity and steatohepatitis in an overfed mouse model for non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1812(4):447-58. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.01.003. Epub 2011 Jan 7. PubMed PMID: 21216282.
- Gampe RT Jr, Montana VG, Lambert MH, et al. Asymmetry in the PPARgamma/RXRalpha crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000 Mar;5(3):545-55. PubMed PMID: 10882139.
- Grygiel-Górniak B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J*. 2014 Feb 14;13:17. doi: 10.1186/1475-2891-13-17. Review. PubMed PMID: 24524207; PubMed Central PMCID: PMC3943808.
- <http://knimewebportal.cosmostox.eu/>
- Kouskoumvekaki, I.; Petersen, R.K.; Fratev, F.; et al. Discovery of a Novel Selective PPAR γ Ligand with Partial Agonist Binding Properties by Integrated *in Silico/in Vitro* Work Flow. *J. Chem. Inf. Model*. 2013, 53, 923–937.

- Kumadaki S, Karasawa T, Matsuzaka T, Ema M, Nakagawa Y, Nakakuki M, Saito R, Yahagi N, Iwasaki H, Sone H, Takekoshi K, Yatoh S, Kobayashi K, Takahashi A, Suzuki H, Takahashi S, Yamada N, Shimano H. Inhibition of ubiquitin ligase F-box and WD repeat domain-containing 7 α (Fbw7 α) causes hepatosteatosis through Krüppel-like factor 5 (KLF5)/peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 (PPAR γ 2) pathway but not SREBP-1c protein in mice. *J Biol Chem*. 2011 Nov 25;286(47):40835-46. doi: 10.1074/jbc.M111.235283. Epub 2011 Sep 12. PubMed PMID: 21911492; PubMed Central PMCID: PMC3220464.
- Lamers C, Schubert-Zsilavecz M, Merk D. Therapeutic modulators of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR): a patent review (2008-present). *Expert Opin Ther Pat*. 2012 Jul;22(7):803-41. doi: 10.1517/13543776.2012.699042. Epub 2012 Jun 15. Review. PubMed PMID: 22697317.
- Landesmann B., Goumenou M., Munn S., and Whelan M., Description of prototype modes-of-action related to repeated dose toxicity, Reference Report By the Joint Research Centre of the European Commission, Institute for Health and Consumer Protection, 2012.
- Larter CZ, Yeh MM, Van Rooyen DM, Teoh NC, Brooling J, Hou JY, Williams J, Clyne M, Nolan CJ, Farrell GC. Roles of adipose restriction and metabolic factors in progression of steatosis to steatohepatitis in obese, diabetic mice. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 Oct;24(10):1658-68. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05996.x. PubMed PMID: 19788606.
- Lee YJ, Ko EH, Kim JE, Kim E, Lee H, Choi H, Yu JH, Kim HJ, Seong JK, Kim KS, Kim JW. Nuclear receptor PPAR γ -regulated monoacylglycerol O-acyltransferase 1 (MGAT1) expression is responsible for the lipid accumulation in diet-induced hepatic steatosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Aug 21;109(34):13656-61. doi: 10.1073/pnas.1203218109. Epub 2012 Aug 6. PubMed PMID: 22869740; PubMed Central PMCID: PMC3427113.
- Li Y, Dong J, Ding T, Kuo MS, Cao G, Jiang XC, Li Z. Sphingomyelin synthase 2 activity and liver steatosis: an effect of ceramide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 suppression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jul;33(7):1513-20. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301498. Epub 2013 May 2. PubMed PMID: 23640498; PubMed Central PMCID: PMC3784343.
- Mellor CL, Steinmetz FP, Cronin MT. The identification of nuclear receptors associated with hepatic steatosis to develop and extend adverse outcome pathways. *Crit Rev Toxicol*. 2015 Oct 9:1-15. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26451809.
- Merk D, Schubert-Zsilavecz M. Nuclear receptors as pharmaceutical targets: rise of FXR and rebirth of PPAR? *Future Med Chem*. 2012 Apr;4(5):587-8. doi: 10.4155/fmc.12.8. PubMed PMID: 22458677.
- MOE (Molecular Operating Environment), version 2014.0901; Chemical Computing Group Inc., 2015, <http://www.chemcomp.com>
- NC3Rs (<https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>)
- NIH PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- OECD (2007), Guidance document on the validation of (quantitative)structure-activity relationships [(Q)SAR] models, OECD Environment Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 69, OECD, Paris, France, ENV/JM/MONO(2007)2.

- OECD (2013), Guidance Document on Developing and Assessing Adverse Outcome Pathways, Series on Testing and Assessment No. 184, OECD, Paris, France, ENV/JM/MONO(2013)6.
- Rabinowitz JR, Goldsmith MR, Little SB, Pasquinelli MA. Computational molecular modeling for evaluating the toxicity of environmental chemicals: prioritising bioassay requirements. *Environ Health Perspect.* 2008 May;116(5):573-7. doi: 10.1289/ehp.11077. PubMed PMID: 18470285; PubMed Central PMCID: PMC2367647
- Regulation 1223/2009/EC of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, OJ L 342, 22.12.2009, p. 59.
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*, London:Methuen, London, 1959 (http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/chap1a)
- Rusu E, Enache G, Jinga M, et al., Medical nutrition therapy in non-alcoholic fatty liver disease - a review of literature. *J Med Life.* 2015 Jul-Sep;8(3):258-62. Review. PubMed PMID: 26351523; PubMed Central PMCID: PMC4556902.
- Sass DA, Chang P, Chopra KB. Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review. *Dig Dis Sci.* 2005 Jan;50(1):171-80. Review. PubMed PMID: 15712657.
- Sauerberg P, Pettersson I, Jeppesen L, Bury PS, Mogensen JP, Wassermann K, Brand CL, Sturis J, Wöldike HF, Fleckner J, Andersen AS, Mortensen SB, Svensson LA, Rasmussen HB, Lehmann SV, Polivka Z, Sindelar K, Panajotova V, Ynddal L, Wulff EM. Novel tricyclic- α -alkyloxyphenylpropionic acids: dual PPAR α /gamma agonists with hypolipidemic and antidiabetic activity. *J Med Chem.* 2002 Feb 14;45(4):789-804. PubMed PMID: 11831892.
- SEURAT-1, <http://www.seurat-1.eu>
- Sos BC, Harris C, Nordstrom SM, Tran JL, Balázs M, Caplazi P, Febbraio M, Applegate MA, Wagner KU, Weiss EJ. Abrogation of growth hormone secretion rescues fatty liver in mice with hepatocyte-specific deletion of JAK2. *J Clin Invest.* 2011 Apr;121(4):1412-23. doi: 10.1172/JCI42894. Erratum in: *J Clin Invest.* 2011 Aug 1;121(8):3360. Dosage error in article text. PubMed PMID: 21364286; PubMed Central PMCID: PMC3069761.
- SYBYL-X, version 2.1, Tripos International, 2013, <https://www.certara.com/>
- Törnqvist E, Annas A, Granath B, et al. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One.* 2014 Jul 23;9(7):e101638. doi: 10.1371/journal.pone.0101638. eCollection 2014. PubMed PMID: 25054864; PubMed Central PMCID: PMC4108312.
- Tsakovska I, Al Sharif M, Alov P, Diukendjieva A, Fioravanzo E, Cronin MT, Pajeva I. Molecular modelling study of the PPAR γ receptor in relation to the mode of action/adverse outcome pathway framework for liver steatosis. *Int J Mol Sci.* 2014 May 5;15(5):7651-66. doi: 10.3390/ijms15057651. PubMed PMID: 24857909; PubMed Central PMCID: PMC4057697.
- Tsakovska I, Al Sharif M, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Vitcheva V, Mostrag-Szlichtyng A, Yang C, Steinmetz F, Cronin M (2015) *In silico* approaches to support liver toxicity screening of chemicals: Case study on molecular modelling of ligands - nuclear receptors interactions to predict potential steatogenic effects. 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16 September 2015, Porto, Portugal

- Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar;1801(3):338-49. doi: 10.1016/j.bbali.2009.12.006. Epub 2010 Jan 6. Review. PubMed PMID: 20056169.
- WHO, World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis, 2012.
- WHO, World Health Organisation (2009), Chapter 2 Risk Assessment and its Role in Risk Analysis In *Environmental Health Criteria 240: Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food*. WHO, Geneva, <http://www.who.int/foodsafety/publications/chemical-food/en/>
- Yamazaki T, Shiraishi S, Kishimoto K, Miura S, Ezaki O. An increase in liver PPAR γ 2 is an initial event to induce fatty liver in response to a diet high in butter: PPAR γ 2 knockdown improves fatty liver induced by high-saturated fat. *J Nutr Biochem*. 2011 Jun;22(6):543-53. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.04.009. Epub 2010 Aug 30. PubMed PMID: 20801631.
- Yang C, Tarkhov A, Marusczyk J, Bienfait B, Gasteiger J, Kleinoeder T, Magdziarz T, Sacher O, Schwab CH, Schwoebel J, Terfloeth L, Arvidson K, Richard A, Worth A, Rathman J. New publicly available chemical query language, CSRML, to support chemotype representations for application to data mining and modeling. *J Chem Inf Model*. 2015 Mar 23;55(3):510-28. doi: 10.1021/ci500667v. Epub 2015 Feb 19. PubMed PMID: 25647539.; <https://chemotyper.org>
- Zhang H, Ryono DE, Devasthale P, Wang W, O'Malley K, Farrelly D, Gu L, Harrity T, Cap M, Chu C, Locke K, Zhang L, Lippy J, Kunselman L, Morgan N, Flynn N, Moore L, Hosagrahara V, Zhang L, Kadiyala P, Xu C, Doweyko AM, Bell A, Chang C, Muckelbauer J, Zahler R, Hariharan N, Cheng PT. Design, synthesis and structure-activity relationships of azole acids as novel, potent dual PPAR α / γ agonists. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Mar 1;19(5):1451-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.01.030. Epub 2009 Jan 15. PubMed PMID: 19201606.

**НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С
ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

ПУБЛИКАЦИИ

НАУЧНИ СТАТИИ В СПИСАНИЯ С ИМПАКТ ФАКТОР

1. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Pajeva I, Alov P, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Yang C, Mostrag-Szlichtyng A, Vitcheva V, Worth AP, Richarz AN, Cronin MTD, The Application of Molecular Modelling in the Safety Assessment of Chemicals: A Case Study on Ligand-Dependent PPAR γ Dysregulation, *Toxicology*, **2016**, doi: 10.1016/j.tox.2016.01.009.

ИФ = 3.621 (2014)

2. **Al Sharif M**, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I, Tsakovska I. Modes-of-action related to repeated dose toxicity: tissue-specific biological roles of PPAR γ ligand-dependent dysregulation in nonalcoholic fatty liver disease, *PPAR Research (a special issue PPARs and Metabolic Syndrome)*, **2014**, Article ID 432647.

ИФ = 2.509 (2014)

3 цитирания в:

- Mellor CL, Steinmetz FP, Cronin MT. The identification of nuclear receptors associated with hepatic steatosis to develop and extend adverse outcome pathways, *Crit Rev Toxicol*. 2016 Feb;46(2):138-52. doi: 10.3109/10408444.2015.1089471
- Barbosa AM, Francisco PC, Motta K, Chagas TR, dos Santos C, Rafacho A, Nunes E. Fish Oil Supplementation Attenuates the Changes in the Plasma Lipids Caused by Dexamethasone Treatment in Rats, *Appl Physiol Nutr Metab*, 2015, doi: 10.1139/apnm-2015-0487
- V. Zuang, B. Desprez, J. Barroso, S. Belz, E. Berggren, C. Bernasconi, J. Bessems, S. Bopp, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, C. Dumont, V. Gouliarmou, C. Griesinger, M. Halder, A. Janusch-Roi, A. Kienzler, B. Landesmann, F. Madia, A. Milcamps, S. Munn, A. Price, P. Prieto, M. Schäffer, J. Triebe, C. Wittwehr, A. Worth, M. Whelan.. EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches, European Union, 2015, pp. 1-114

- 3 Tsakovska I., **Al Sharif M**, Alov P, Diukendjieva A, Fioravanzo E, Cronin M.T.D, Pajeva I. Molecular modelling study of PPAR γ receptor in relation to the mode of action / adverse outcome pathway framework for liver steatosis. Int. J. Mol. Sci. **2014**, 15, 7651-7666. (ISSN 1422-0067). **ИФ = 2.862 (2014)**

2 цитирания в:

- *Defining Molecular Initiating Events in the Adverse Outcome Pathway Framework for Risk Assessment* By: Allen, Timothy E. H.; Goodman, Jonathan M.; Gutsell, Steve; et al. *CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY* Volume: 27 Issue: 12 Pages: 2100-2112 Published: DEC 2014
- Zuang V, Desprez B, Barroso J, Belz S, Berggren E, Bernasconi C, Bessems J, Bopp S, Casati S, Coecke S, Corvi R, Dumont C, Gouliarmou V, Griesinger C, Halder M, Janusch-Roi A, Kienzler A, Landesmann B, Madia F, Milcamp A, Munn S, Price A, Prieto P, Schäffer M, Triebe J, Wittwehr C, Worth A, Whelan M. *EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches, European Union, 2015, pp. 1-114.*

ПУБЛИКУВАНИ ДОКЛАДИ ОТ КОНФЕРЕНЦИИ

1. **Al Sharif M**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I. (2015) *In silico* modelling of full PPAR γ agonists: a step towards liver steatosis risk assessment, International Conference Of Young Scientists, 11 – 12 June **2015**, Plovdiv, Bulgaria, Scientific Researches of the Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv, Series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine, Vol. XVII, p. 182-186, ISSN1311-9427

РЕЗЮМЕТА ОТ КОНФЕРЕНЦИИ, ПУБЛИКУВАНИ В НАУЧНИ СПИСАНИЯ

1. Tsakovska I, **Al Sharif M**, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Vitcheva V, Mostrag-Szlichtyng A, Yang C, Steinmetz F, Cronin M (2015) *In silico* approaches to support liver toxicity screening of chemicals: Case study on molecular modelling of ligands–nuclear receptors interactions to predict potential steatogenic effects. Toxicology Letters 238 Supplement: S173 **ИФ = 3.262 (2014)**
2. Vitcheva V, **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Mostrag-Szlichtyng A, Cronin MTD, Yang C, Pajeva I (2014) Description of the MoA/AOP linked with PPARgamma receptor dysregulation leading to liver fibrosis. Toxicology Letters 229 Supplement: S49 **ИФ = 3.262 (2014)**
3. Diukendjieva A, **Al Sharif M**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I (2014) PPAR γ agonists and liver steatosis: mode-of-action characterisation and *in silico* study, Journal of Biomedical and Clinical Research, vol.7, n.1, suppl.1, p.39
4. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I (2014) PPAR γ -related hepatotoxic mode-of-action: quantitative characterization and *in silico* study of the molecular initiating event involving receptor activation. Altex Proceedings 3, 1/14: 56-57 **ИФ = 5.467 (2014)**
5. **Al Sharif M**, Alov P, Cronin M, Fioravanzo E, Tsakovska I, Vitcheva V, Worth A, Yang C, Pajeva I (2013) Toward better understanding of liver steatosis MoA: Molecular modelling study of PPAR gamma receptor. Toxicology Letters 221 Supplement: S85 **ИФ = 3.262 (2014)**

1 цитиране в:

- Sullivan KM, Manuppello JR, Willett CE. Building on a solid foundation: SAR and QSAR as a fundamental strategy to reduce animal testing. SAR QSAR Environ Res. 2014, 25: 357-365.

УЧАСТИЯ В МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

ПОСТЕРИ

1. Fioravanzo E, Kovarich C, Bassan A, Ciacci A, **Al Sharif M**, Pajeva I, Alov P, Richarz AN, Worth AP, Palczewska A, Steinmetz FP, Yang C, Tsakovska I (2015) Use of molecular modelling approaches for the evaluation of potential binding to nuclear receptors involved in liver steatosis, SEURAT-1 Final Symposium, 4 December 2015, Brussels, Belgium
2. Tsakovska I, **Al Sharif M**, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Vitcheva V, Mostrag-Szlichtyng A, Yang C, Steinmetz F, Cronin M (2015) *In silico* approaches to support liver toxicity screening of chemicals: Case study on molecular modelling of ligands - nuclear receptors interactions to predict potential steatogenic effects. 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16 September 2015, Porto, Portugal
3. Vitcheva V, Mostrag-Szlichtyng A, Sacher O, Bienfait B, Shwab C, Tsakovska I, **Al Sharif M**, Pajeva I, Yang C (2015) *In vivo* data mining and *in silico* metabolic profiling to predict diverse hepatotoxic phenotypes: Case study of piperonyl butoxide. 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 13-16 September 2015, Porto, Portugal
4. Tsakovska I, Kovarich S, Bassan A, Ciacci A, **Al Sharif M**, Pajeva I, Alov P, Cronin MTD, Worth A, Palczewska A, Steinmetz FP, Yang C, Fioravanzo E (2015) Modelling studies to support the prediction of molecular initiating events for liver steatosis: LXR and PPAR γ binding, SEURAT-1 Fifth Annual Meeting, 21-22 January 2015, Barcelona, Spain
5. Jereva D, **Al Sharif M**, Diukendjieva A, Alov P, Pencheva T, Tsakovska I., Pajeva I (2014) Nuclear ER α and PPAR γ : receptor- and ligand-based analysis. 16th Congress of the European Neuroendocrine Association, 10-13 September 2014, Sofia, Bulgaria, Book of Abstracts - Basic Metabolism, Abstract-ID: 564, p. 88 (**Награда за най-добър постер**)
6. Vitcheva V, **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Mostrag-Szlichtyng A, Cronin MTD, Yang C, Pajeva I (2014) Description of the MoA/AOP linked with PPAR γ receptor dysregulation leading to liver fibrosis. 50th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 7-10 September 2014, Edinburgh, Scotland, UK
7. Tsakovska I, **Al Sharif M**, Alov P, Vitcheva V, Fioravanzo E, Mostrag-Szlichtyng A, Yang C, Cronin MTD, Pajeva I (2014) *In silico* ligand screening based on a pharmacophore model of PPAR γ full agonists. 16Th International Workshop on Quantitative Structure-Activity Relationships in Environmental and Health Sciences, 16-20 June 2014, Milan, Italy
8. Kovarich S, **Al Sharif M**, Alov P, Bassan A, Cronin MTD, Fioravanzo E, Mostrag-Szlichtyng A, Pajeva I, Tsakovska I, Vitcheva V, Worth AP, Yang C (2014) Molecular

Modelling Studies of LXR and PPAR gamma Receptors in Relation to the MoA/AOP Framework for Liver Steatosis. SEURAT-1 4th Annual Meeting, 5-6 February **2014**, Barcelona, Spain

9. Tsakovska I, Jereva D, **Al Sharif M**, Alov P, Diukendjieva A, Pencheva T, Fioravanzo E, Cronin M, Worth A, Yang C, Pajeva I (2013) Structure- and ligand-based analysis of ligand-nuclear receptor ER α and PPAR γ complexes. CMTPI-2013 - 7th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, 8–11 October **2013**, Seoul, Korea
10. Tsakovska I, **Al Sharif M**, Diukendjieva A, Alov P, Vitcheva V, Fioravanzo E, Cronin M, Worth A, Yang C, Pajeva I (2013) From PPAR γ activation to liver steatosis: adverse outcome pathways description and molecular modelling study. CMTPI-2013 - 7th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, 8–11 October **2013**, Seoul, Korea
11. **Al Sharif M**, Alov P, Cronin M, Fioravanzo E, Tsakovska I, Vitcheva V, Worth A, Yang C, Pajeva I (2013) Toward better understanding of liver steatosis MoA: Molecular modelling study of PPAR gamma receptor. 49th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), 2 September **2013**, Interlaken, Switzerland

ДОКЛАДИ

1. **Al Sharif M**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I. (2015) Study of the ligand-dependent dysregulation of PPAR γ – adverse outcome pathways and molecular modelling. Humboldt Kolleg, Bulgarian-German Scientific Cooperation: Past, Present and Future, 26 – 28 November 2015, Sofia, Bulgaria, Book of abstracts, p. 36
2. **Al Sharif M**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I. (2015) In silico screening approach to predict liver toxicity of potential PPAR γ agonists. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: from Plant to Pharmacy Shelf (ICNPU), 14 – 17 October 2015, Plovdiv, Bulgaria, Book of abstracts, SL-9, p. 46 (**Награда за най-добър доклад**)
3. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Pajeva P, Fioravanzo E, Bassan A, Kovarich S, Mostrag-Szlichtyng A, Vitcheva V, Yang C (2015) From PPAR γ ligand dependent dysregulation to liver steatosis: MoA description and molecular modelling study. CMTPI-2015 - 8th International Symposium on Computational Methods in Toxicology and Pharmacology Integrating Internet Resources, 21-25 June 2015, Chios, Greece
4. **Al Sharif M**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I. (2015) *In silico* modelling of full PPAR γ agonists: a step towards liver steatosis risk assessment, International Conference Of Young Scientists, 11 – 12 June 2015, Plovdiv, Bulgaria
5. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I (2014) PPAR γ -related hepatotoxic mode-of-action: quantitative characterisation and *in silico* study of the molecular initiating event involving receptor activation. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 24-28 August 2014, Prague, Czech Republic, Abstract in ALTEX proceedings, Volume 3, No. 1., Theme II Predictive toxicology, Session II Pathways approaches in toxicology: 1c-212, p. 56-57, ISSN 2194-0479.
6. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I. COSMOS General Assembly Meeting, Erlangen'2014
7. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I. COSMOS General Assembly Meeting, Milan'2014
8. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I. COSMOS General Assembly Meeting, Barcelona'2014
9. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I. COSMOS General Assembly Meetings, Ljubljana'2013

УЧАСТИЯ В НАЦИОНАЛНИ НАУЧНИ ФОРУМИ

ПОСТЕРИ

1. Diukendjieva A, **Al Sharif M**, Alov P, Tsakovska I, Pajeva I, PPAR γ agonists and liver steatosis: mode-of-action characterisation and *in silico* study, VII-th National Congress of Pharmacology, 17 – 19 October **2014**, Medical University Pleven, Bulgaria

ДОКЛАДИ

1. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I (**2014**) From ligand-dependent dysregulation of PPAR γ to nonalcoholic fatty liver disease. Scientific session for students and young scientists "Biomedicine and Quality of Life", 2 October **2014**, IBPhBME-BAS, Sofia, Bulgaria, Book of abstracts, p. 24
2. **Al Sharif M**, Tsakovska I, Alov P, Vitcheva V, Pajeva I (**2013**) Modes-of-action related to repeated dose toxicity: from PPAR γ ligand-dependent dysregulation to non-alcoholic fatty liver disease, 8th Workshop "Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products", 27-29 November **2013**, Sofia, Bulgaria, Proceedings of the eighth workshop on biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, Edited by: Dimitar Kadiysky and Radostina Alexandrova, D01., p.108-109, ISSN 2367 – 5683

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

1. EU Project n° 266835 ("Integrated *in silico* models for the prediction of human repeated dose toxicity of cosmetics to optimise safety (COSMOS)") - Research project funded by the European Community's 7th Framework Program (FP7/2007-2013) and from Cosmetics Europe
2. Project BG051PO001-3.3.06-0040 "Establishment of interdisciplinary teams of young scientists in the field of fundamental and applied research relevant to medical practice", implemented with financial support of the operative program Human Resources Development" financed by the European Social Fund of the European Union



БЪЛГАРСКА
АКАДЕМИЯ
на НАУКИТЕ
— 1869 —