



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
ZAKŁAD FARMACJI SPOŁECZNEJ

Barbara Wiśniowska

Modelowanie i symulacja elektrofizjologicznych efektów interakcji lekowych –
zastosowanie modeli Quantitative Systems Toxicology do wielowymiarowej
analizy ryzyka działania proarytmicznego

ZAŁĄCZNIK 2A DO WNIOSKU HABILITACYJNEGO:

AUTOREFERAT

Kraków 2018

Spis treści

1. Dane osobowe	2
2. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego.....	4
2.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego.....	4
2.2. Cel badawczy	6
2.3. Wykaz skrótów	7
2.4. Wprowadzenie	8
2.5. Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym w postępowaniu habilitacyjnym	10
2.5.1. Modele typu enhanced-QSAR pozwalające na ocenę interakcji leków z kanałami jonowymi serca	10
2.5.2. Modelowanie i symulacja efektów elektrofizjologicznych politerapii na poziomie kanału jonowego oraz w populacji	23
2.5.3. Modelowanie i symulacje efektów elektrofizjologicznych interakcji leków i choroby....	39
2.6. Podsumowanie	44
3. Pozostałe osiągnięcia naukowe i dydaktyczne	46
3.1. Działalność naukowo-badawcza i dydaktyczna przed uzyskaniem stopnia doktora	46
3.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	47
3.3. Podsumowanie dorobku naukowego.....	49
4. Piśmiennictwo.....	50

1. Dane osobowe

Barbara Wiśniowska

Zakład Farmacji Społecznej, Wydział Farmaceutyczny UJCM w Krakowie,

ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

e-mail: b.wisniowska@uj.edu.pl

Dyplomy i stopnie naukowe

- 2006**
- tytuł magistra farmacji
 - praca magisterska pt. „Rozbudowa neuronowego systemu ME_expert do przewidywania składów mikroemulsji” wykonana w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji UJCM pod kierunkiem dr. Aleksandra Mendyka i opieką naukową prof. dr hab. Renaty Jachowicz
- 2012**
- stopień doktora nauk farmaceutycznych
 - praca doktorska pt. „Modelowanie in silico proarytmicznego działania potencjalnych substancji leczniczych” wykonana w Pracowni Farmakoepidemiologii i Farmakoekonomiki UJCM pod opieką naukową prof. dr hab. Jerzego Brandysa

Przebieg zatrudnienia

- 2014 - obecnie**
- adiunkt w Zakładzie Farmacji Społecznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
- 2007 - 2014**
- asystent w Zakładzie Farmacji Społecznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
- 2007 - 2008**
- współpraca z firmą pharm-info.net
- 2007**
- praca w aptece ogólnodostępnej, magister farmacji

Ukończone kursy

- 2016
 - Warsztaty In Silico Modelling of Proarrhythmia Risk organizowane przez Safety Pharmacology Society, Praga, Czechy
- 2015
 - Warsztaty – wprowadzenie do metodologii opracowywania przeglądów systematycznych organizowane przez Polską Filię Nordic Cochrane Centre oraz Pracownię Podejmowania Decyzji Klinicznych II Katedry Chorób Wewnętrznych UJCM, Kraków, Polska
- 2014
 - Szkolenie z zastosowania techniki patch-clamp do pomiarów elektrofizjologicznych, obsługi aparatu CytoPatch2 zorganizowane przez firmę CytoCentrics, Rostock, Niemcy
- 2014
 - Warsztaty dotyczące wykorzystania modelowania PK-PD w projektowaniu leków organizowane przez firmę Simcyp (Certara), Frankfurt, Niemcy
- 2013
 - Warsztaty z zakresu praktycznych aspektów organizacji i prowadzenia badań klinicznych produktów leczniczych organizowane przez Wydział Lekarski UJCM w ramach Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego, Kraków, Polska
- 2011
 - Kurs z zakresu podstaw farmakologii bezpieczeństwa (safety pharmacology) organizowanym przez Federation of European Toxicologists and European Societies of Toxicology, Paryż, Francja

2. Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl ośmiu publikacji o łącznym współczynniku oddziaływania IF równym 18.326 i punktacji MNiSW równej 175 punktów. W 7 z 8 prac jestem pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, mój średni udział w powstanie przedstawionych publikacji wynosi 72.5%.

Temat osiągnięcia: „Modelowanie i symulacja elektrofizjologicznych efektów interakcji lekowych – zastosowanie modeli Quantitative Systems Toxicology do wielowymiarowej analizy ryzyka działania proarytmicznego”.

2.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

P1. Wiśniowska Barbara, Mendyk Aleksander, Fijorek Kamil, Glinka Anna, Polak Sebastian. (2012) Predictive model for the L-type channel inhibition – multichannel block in QT prolongation risk assessment. *Journal of Applied Toxicology*, 32(10):858-866.

(IF = 2.597, MNiSW = 20, udział własny 80% w tym: koncepcja pracy, budowa bazy danych, opracowanie danych, wykonanie obliczeń, stworzenie modeli i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny).

P2. Polak Sebastian, Wiśniowska Barbara, Glinka Anna, Fijorek Kamil, Mendyk Aleksander. (2013) Slow delayed rectifying potassium current (IKs) analysis of the in vitro inhibition data and predictive model development. *Journal of Applied Toxicology*, 33(8):723-739.

(IF = 3.174, MNiSW = 20, udział własny 40% w tym: koncepcja pracy, budowa bazy danych, opracowanie danych, wykonanie obliczeń, stworzenie modeli i przygotowanie tekstu).

P3. Wiśniowska Barbara, Mendyk Aleksander, Szłęk Jakub, Kończakowski Michał, Polak Sebastian. (2015) Enhanced QSAR models for drug-triggered inhibition of the main cardiac ion currents. *Journal of Applied Toxicology*, 35(9): 1030–1039.

(IF = 2.722, MNiSW = 30, udział własny 80% w tym: koncepcja pracy, budowa bazy danych, opracowanie danych, wykonanie obliczeń, stworzenie modeli i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny).

P4. Wiśniowska Barbara, Tylutki Zofia, Wyszogrodzka Gabriela, Polak Sebastian. Drug-drug interactions and QT prolongation as a commonly assessed cardiac effect - comprehensive overview of clinical trials. (2016) *BMC Pharmacology and Toxicology*, 17(12): 1-15.

(IF = 2.288, MNiSW = 20, udział własny 75% w tym: koncepcja pracy, budowa bazy danych, opracowanie danych, przygotowanie tekstu oraz kierownictwo projektu naukowego obejmującego badania zamieszczone w pracy, autor korespondencyjny).

P5. Wiśniowska Barbara, Polak Sebastian. (2016) Virtual Clinical Trial Toward Polytherapy Safety Assessment: Combination of Physiologically Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic-Based Modeling and Simulation Approach With Drug-Drug Interactions Involving Terfenadine as an Example. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105, 11, 3415-3424.

(IF = 2.713, MNiSW = 30, udział własny 85% w tym: koncepcja pracy, budowa bazy danych, opracowanie danych, wykonanie obliczeń, stworzenie modeli i przygotowanie tekstu oraz kierownictwo projektu naukowego obejmującego badania zamieszczone w pracy, autor korespondencyjny).

P6. Wiśniowska Barbara, Polak Sebastian. (2016) The role of interaction model in simulation of drug interactions and QT prolongation. *Current Pharmacology Reports*, 2(6): 339-344.

(IF = 0, MNiSW = 5, udział własny 85% w tym: koncepcja pracy, budowa bazy danych, opracowanie danych, wykonanie obliczeń, stworzenie modeli i przygotowanie tekstu oraz kierownictwo projektu naukowego obejmującego badania zamieszczone w pracy, autor korespondencyjny).

P7. Wiśniowska Barbara, Lisowski Bartosz, Kulig Magdalena, Polak Sebastian. (2017) Drugs interaction at hERG channel - in vitro assessment of the electrophysiological consequences of drug combinations and comparison against theoretical models. *Journal of Applied Toxicology*, 16:1-9.

(IF = 3.159, MNiSW = 30, udział własny 45% w tym: koncepcja pracy, opracowanie danych, wykonanie obliczeń i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny).

P8. Wiśniowska Barbara, Polak Sebastian. (2018) Drug – physiology interaction and its influence on the QT prolongation – mechanistic modeling study. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 45(3):483-490.

(IF = 1.673, MNiSW = 20, udział własny 90% w tym: koncepcja pracy, opracowanie danych, wykonanie obliczeń, stworzenie modeli i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny).

2.2. Cel badawczy

Celem badawczym było stworzenie hybrydowych modeli matematycznych, łączących różne algorytmy (QSAR, PBPK, QSP) i dane, pozwalających na ocenę efektów elektrofizjologicznych wielu jednocześnie stosowanych leków. W efekcie stworzony system może zostać wykorzystany na różnych etapach rozwoju leku, począwszy od wczesnej fazy odkrywania leku aż do fazy badań postmarketingowych.

Cel realizowano poprzez:

- stworzenie modeli typu enhanced-QSAR pozwalających na ocenę interakcji leków z kanałami jonowymi serca (**P1, P2, P3**)
- modelowanie i symulację kombinacji lekowych, w tym:
 - ocenę in vitro oddziaływania połączeń leków na poziomie kanału jonowego oraz modelowanie i symulacje efektów elektrofizjologicznych kombinacji lekowych (**P6, P7**)
 - modelowanie i symulacje efektów elektrofizjologicznych politerapii wynikających z interakcji farmakokinetycznych i farmakodynamicznych na poziomie populacji (**P4, P5, P6**)
- modelowanie i symulacje efektów elektrofizjologicznych interakcji leków i choroby (**P8**)

2.3. Wykaz skrótów

ANN - sztuczna sieć neuronowa (ang. artificial neural network)

AP - potencjał czynnościowy (ang. action potential)

AUC - pole powierzchni pod krzywą stężenie-czas (ang. area under the concentration-time curve)

CiPA - Comprehensive In vitro Proarrhythmia Assay

CSS - Cardiac Safety Simulator

DDI - interakcja lek-lek (ang. drug-drug interaction)

DDiI - interakcja lek-choroba (ang. drug-disease interaction)

EMA - European Medicine Agency

hERG - human ether-a-go-go-related gene

HR - rytm serca (ang. heart rate)

ICH - Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use)

MISO - multiple input single output

MLP - preceprtony wielowarstwowe (ang. multilayer perceptron)

MON-MLP - monotoniczne perceptrony wielowarstwowe

NF - systemy neuronowo rozmyte (ang. neuro-fuzzy systems)

NRMSE - znormalizowany błąd średniokwadratowy (ang. normalised root mean square error)

PBPD - oparta o fizjologię farmakodynamika (ang. physiologically based pharmacodynamics)

PBPK - oparta o fizjologię farmakokinetyka (ang. physiologically based pharmacokinetics)

PD - farmakodynamika

PK - farmakokinetyka

QSAR - ilościowa zależność struktura-aktywność (ang. Quantitative Structure-Activity Relationship)

QSP - ilościowa farmakologia systemów (ang. Quantitative Systems Pharmacology)

QST(S) - Quantitative Systems Toxicology (and Safety)

QTc - odstęp QT korygowany o rytm serca

RF - las losowy (ang. random forest)

RMSE - błąd średniokwadratowy (ang. root mean square error)

SD - odchylenie standardowe (ang. standard error)

SMO - sequential minimal optimization

SVM - metoda wektorów nonych (ang. support vector machine)

10-CV - metoda 10-krotnego wzajemnego sprawdzania (ang. 10-fold cross-validation)

TdP - torsades de pointes

TQT - thorough QT trial

WEKA - Waikato Environment for Knowledge Analysis

2.4. Wprowadzenie

Celem procesu odkrywania i rozwoju leków jest zapewnienie pacjentom bezpiecznej i skutecznej terapii. Każdy lek zanim zostanie wprowadzony na rynek musi przejść przez wieloetapowy, rozpoczynający się już na wczesnych etapach rozwoju, oparty na danych, rygorystyczny i kompleksowy, proces oceny bezpieczeństwa. Taka strategia oceny bezpieczeństwa jest skuteczna w identyfikacji działań toksycznych na różnych etapach rozwoju leku. Niemniej jednak, mimo restrykcyjnych regulacji i procedur, proces oceny bezpieczeństwa leku nie zapewnia bezpieczeństwa farmakoterapii dla całej populacji pacjentów. We wczesnych latach 90. XX wieku wycofano z obrotu kilka ważnych i skutecznych leków ze względu na ich potencjalne zagrażające życiu działania niepożądane (wydłużanie odstępu QT i arytmia torsade de pointes (TdP)). Fakt ten podkreślił niedostatki obecnie obowiązującej w procesie rozwoju leku strategii oceny bezpieczeństwa kardiologicznego. Jeszcze do niedawna kardiotoxyczność (szczególnie działanie proarytmiczne), była jedną z głównych przyczyn niepowodzeń na późnych etapach rozwoju leku i głównym czynnikiem powodem wycofań z obrotu czy wprowadzania ograniczeń stosowania leków [1, 2]. W 2005 roku, Międzynarodowa Rada Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH) opracowała dwa zbiory wytycznych dotyczących oceny ryzyka działania proarytmicznego [3, 4]. Zaproponowane w dokumentach S7B i E14 i niedługo potem zaimplementowane i obecnie powszechnie stosowane przez przemysł farmaceutyczny badania przedkliniczne i kliniczne opierają się na zaobserwowanej korelacji pomiędzy wydłużeniem odstępu QT w zapisie elektrokardiograficznym a ryzykiem wystąpienia arytmii typu TdP u pacjentów. Jednocześnie wykazano także, że w większości przypadków wydłużenie odstępu QT można powiązać z inhibicją kodowanego genem hERG (human ether-a-go-go-related gene) kanału potasowego w komórkach mięśnia sercowego (Kv11.1) [5–7].

Przyjmuje się, że długość skorygowanego o rytm serca odstępu QT (QTc) >500 ms lub jej zmiana w stosunku do wartości wyjściowej >60 ms wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia arytmii TdP. Wartości te są zwykle stosowane jako graniczne przy podejmowaniu decyzji o przerwaniu podawania leku lub redukcji dawki zarówno w badaniach klinicznych jak i w klinice [4, 8–13]. Z kolei na wczesnych etapach rozwoju, wskaźnikiem właściwości proarytmicznych kandydata na lek, jest potencjał blokowania kanału hERG. Jest on oceniany na podstawie wartości stężenia leku powodującej zmniejszenie prądu potasowego zależnego od hERG o połowę (IC₅₀) i stanowi podstawę podejmowania decyzji o przerwaniu lub kontynuacji badań [8, 14–16]. Strategia minimalizacji ryzyka oparta o te markery wykazała swoją skuteczność w zapobieganiu dopuszczeniu do obrotu leków proarytmicznych. Kosztem tego sukcesu jest jednak ryzyko odrzucenia (nie zawsze koniecznego) cząsteczek, które mogłyby stać się użytecznymi lekami, a więc ograniczenie pacjentom dostępu do nowych terapii, a także znaczny wzrost kosztów procesu opracowania nowego leku. Stąd też rosnąca świadomość niedoskonałości tych markerów i zastrzeżenia co do ich predyktywności [17–20].

Znane są przykłady leków będących silnymi inhibitorami kanału hERG a jednocześnie pozbawionych ryzyka wywołania arytmii (m.in. werapamil, amiodaron, czy flunaryzyna) i odwrotnie, poważne

zaburzenia elektrofizjologii kardiomiocytów wywołane przez leki będące słabymi inhibitorami hERG (m.in. sotalol, aluzosyna) [21–23]. Przykłady te świadczą o niewystarczającej specyficzności testów opartych o ocenę potencjału blokowania kanału hERG [21–23]. Wydłużenie czasu repolaryzacji (w zapisie EKG reprezentowanego przez odstęp QT) może wynikać z redukcji netto prądu odkomórkowego. Dlatego najczęściej powodem błędnej oceny potencjału proarytmicznego danej substancji jest posiadanie przez nią potencjału jednoczesnego blokowania także innych niż hERG kanałów jonowych serca, takich jak kanał KCNQ dla wolnego prądu potasowego (I_{Ks}), kanał wapniowy (prąd Ca^{2+} typu L - I_{CaL}) i/lub kanałów sodowych (prąd I_{Na}) [5, 24–27]. W związku z powyższym, podjęto w ostatnim czasie inicjatywę o nazwie Comprehensive In vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) mająca na celu modyfikację, modernizację i standaryzację istniejących metod przedklinicznej, opartej o pomiary blokowania hERG, oceny bezpieczeństwa kardiologicznego, między innymi poprzez pomiary i ocenę efektów interakcji leku z wieloma kanałami jonowymi, zarówno w warunkach in vitro jak i in silico [17, 28–31].

Ponadto zależność pomiędzy wydłużeniem odstępu QT i arytmii jest złożona, warunkowana nie tylko samymi właściwościami i dawką danego leku, ale również czynnikami zależnymi od pacjenta [17, 32–36]. Biorąc pod uwagę zmienność w populacji pod względem wieku, płci, grup etnicznych, konstytucji genetycznej, chorobowości, w tym upośledzonej funkcji nerek czy wątroby, zaburzeń elektrolitowych, oczywistym jest, że również indywidualne ryzyko rozwoju arytmii polekowej w populacji będzie zmienne. Potwierdza to analiza przypadków polekowej arytmii TdP, w których często zidentyfikować można dodatkowe zewnętrzne czynniki przyczyniające się do jej rozwoju [12, 37, 38].

Wreszcie, złożoność problemu oceny ryzyka arytmii jest dodatkowo zwiększana rzeczywistością kliniczną. Jednym z potencjalnie istotnych, zewnętrznych czynników wpływających na indywidualną zmianę elektrofizjologii serca u pacjenta, jest jednoczesne stosowanie dwóch lub więcej leków. Kliniczne przypadki arytmii TdP często związane są ze zjawiskiem politerapii i interakcjami pomiędzy przyjmowanymi równocześnie lekami (DDI), prowadzącymi do wydłużenia odstępu QT [10, 13, 39–42]. Z drugiej strony niektóre interakcje lekowe mogą zmniejszać lub eliminować niepożądane objawy związane ze stosowaniem jednego ze skojarzonych leków [10, 43–47]. Zmiana ryzyka wystąpienia działań niepożądanych może być spowodowana zarówno zmianą farmakokinetyki (PK) - obejmującą procesy ADME, jak i interakcją farmakodynamiczną (PD) – skutkującą zmianą zależności dawka-efekt. Ryzyko wystąpienia u pacjenta interakcji prowadzącej do wydłużenia odstępu QT wiąże się z częstością zjawiska politerapii w praktyce klinicznej oraz właściwością kanału hERG umożliwiającą wiązanie różnorodnych struktur chemicznych, należących do wielu różnych klas terapeutycznych [48–50].

Kompleksowa i wiarygodna ocena potencjału proarytmicznego leku wymaga uwzględnienia wielu różnorodnych czynników związanych z lekiem i pacjentem. Częściowo zostało to uwzględnione w zaproponowanych niedawno zmianach paradygmatu oceny bezpieczeństwa kardiologicznego (inicjatywa CiPA), między innymi poprzez wskazanie konieczności oceny interakcji leków z wieloma kanałami jonowymi serca i ich wpływu na elektrofizjologię komórek komorowych ludzkiego serca za pomocą metod in silico i testów in vitro z wykorzystaniem m.in. ludzkich kardiomiocytów indukowanych z pluripotencjalnych komórek macierzystych [28, 51–53]. W celu rzetelnej oceny ryzyka wystąpienia

arytmii, informacje dostarczone przez eksperymenty w warunkach *in vitro* i *in silico* muszą zostać zintegrowane z danymi dotyczącymi pacjenta, w tym między innymi z oceną potencjalnych interakcjami między lekami. Formalne regulacje dotyczące analizy interakcji lekowych dotyczą niemal wyłącznie ich komponenty farmakokinetycznej [54]. Częstość występowania klinicznie istotnych interakcji farmakodynamicznych jest znacznie niższa niż interakcji wynikających ze zmian farmakokinetyki jednego ze skojarzonych leków, nie należy jednak ich lekceważyć, gdyż z punktu widzenia bezpieczeństwa pacjentów mogą mieć istotne znaczenie [55]. Wytyczne Europejskiej Agencji Leków (EMA) zalecają badania efektów interakcji farmakodynamicznych w przypadku, gdy dwa leki konkurują o ten sam cel i istnieje prawdopodobieństwo, że będą stosowane jednocześnie [56]. Kryteria te spełniają leki wykazujące potencjał wydłużania odstępu QT. Jednakże liczba możliwych kombinacji leków potencjalnie proarytmicznych jest praktycznie nieograniczona, co sprawia, że ocena wszystkich potencjalnych scenariuszy w badaniach klinicznych nie jest wykonalna.

Przedstawione powyżej fakty wskazują na potrzebę i przestrzeń do stosowania metod biosymulacji. Biosymulacja, w tym modele QSP, QST(S) (ang. Quantitative Systems Pharmacology/Toxicology and Safety) znajduje wiele zastosowań w procesie odkrywania i rozwoju leku [57]. Metody biosymulacji poprzez integrację rozległej i szczegółowej wiedzy, osiągnięć biologii systemów, farmakokinetyki i farmakodynamiki z technikami modelowania komputerowego, mogą efektywnie wspomagać proces decyzyjny zarówno podczas badań jak i oceny przez organy regulatorowe. Z tego powodu metody modelowania i symulacji są postrzegane jako istotny element nowoczesnego procesu opracowywania leków i oceny ich bezpieczeństwa i są coraz częściej stosowane przez przemysł farmaceutyczny, a ich wykorzystanie jest promowane i wspierane przez światowe instytucje zajmujące się rejestracją produktów leczniczych [58–63].

W niniejszej pracy stworzono hybrydowe modele matematyczne, integrujące wiedzę z wielu dyscyplin, w tym farmakologii, biologii systemów, elektrofizjologii/fizjologii i matematyki oraz łączące różne metody (tj. QSAR, PBPK, QSP) w celu kompleksowej oceny efektów elektrofizjologicznych kombinacji leków na różnych etapach ich rozwoju.

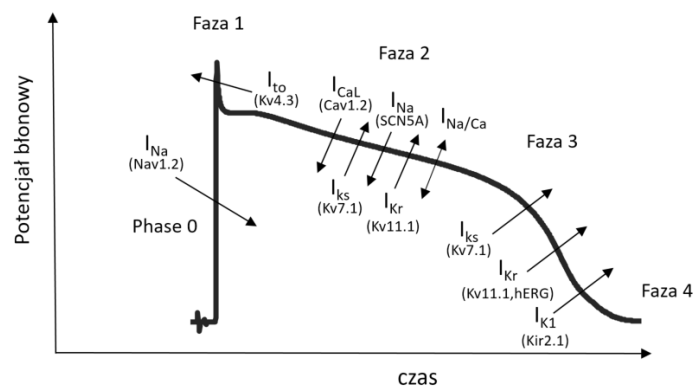
2.5. Wyniki badań związanych z osiągnięciem naukowym w postępowaniu habilitacyjnym

2.5.1. Modele typu enhanced-QSAR pozwalające na ocenę interakcji leków z kanałami jonowymi serca

Narzędzia obliczeniowe mogą wspomagać ocenę potencjału proarytmicznego projektowanych leków na bardzo wczesnych etapach prac badawczo-rozwojowych dając możliwość efektywnej i ekonomicznej analizy bibliotek związków chemicznych. Metody *in silico* oferują znacznie większą w porównaniu z testami *in vivo* i *in vitro*, wydajność skryningu cząsteczek, a ponadto doświadczenia z ich wykorzystaniem mogą być przeprowadzane zarówno na realnie istniejących, zsyntetyzowanych cząsteczkach jak i na cząsteczkach wirtualnych, co daje możliwość ich wykorzystania już na etapie projektowania leku. Narzędzia obliczeniowe pozwalają w krótkim czasie przeanalizować liczne substancje i dowolnie szeroki zakres stężeń. Dzięki temu do etapu syntezy czy badań *in vitro* wybierane są te najbardziej obiecujące.

Doświadczenia *in silico* mogą również dostarczać informacji wspomagających projektowanie i optymalizację doświadczeń *in vitro* i *in vivo* wykonywanych na dalszych etapach.

Komorowy potencjał czynnościowy (ang. action potential – AP) jest wypadkową przepływu dokomórkowych (depolaryzujących) oraz odkomórkowych (repolaryzujących) prądów przez błonę kardiomiocytów (Wykres 1). Generowanie różnicy potencjałów między zewnętrzną i wewnętrzną powierzchnią błony komórek serca zależy w największym stopniu od zmian stężenia jonów sodowych, potasowych, wapniowych i chlorkowych (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-). Faza 0 potencjału czynnościowego jest efektem aktywacji dwóch prądów dokomórkowych, I_{Na} oraz I_{CaL} . Depolaryzacja błony aktywuje prąd potasowy odpowiedzialny za terminację fazy 0 i repolaryzację błony. W fazie 1 uczestniczy także przejściowy odkomórkowy prąd potasowy - I_{to} . Faza plateau (2) charakteryzuje się równowagą pomiędzy prądami odkomórkowymi (szybkim i wolnym prądem potasowym, I_{Kr} i I_{Ks}) oraz prądami dokomórkowymi (późnym prądem sodowym i wapniowym typu L, I_{Na} i I_{CaL}). W fazie tej może także uczestniczyć wymiennik sodowo-wapniowy (I_{NaCa}). Za końcową fazę (3) potencjału czynnościowego oraz powrót do potencjału spoczynkowego (faza 4) odpowiadają prądy potasowe I_{Kr} oraz I_{K1} .



Wykres 1. Rola kanałów jonowych w powstawaniu potencjału czynnościowego kardiomiocytu komorowego.

Kluczowe znaczenie kanału potasowego hERG we wczesnej ocenie bezpieczeństwa kardiologicznego leków zaowocowało znacznym zainteresowaniem i liczbą prac poświęconych tworzeniu modelu *in silico* blokowania kanału hERG do wykorzystania w procesie rozwoju leków [64, 65]. Pozostałe kanały jonowe występujące w komórkach mięśnia sercowego nie cieszyły się podobnym zainteresowaniem. Zgodnie z moją wiedzą, baza danych, której jestem współtwórcą, zbierająca wyniki opisujące blokowanie kanałów wapniowych typu L, sodowych oraz potasowych KCNQ w warunkach *in vitro* jest jedynym publicznie dostępnym źródłem tego rodzaju informacji [66, 67]. Zgromadzone i opracowane dane stanowią podstawę opracowanych modeli enhanced QSAR (ang. quantitative structure-activity relationship) blokowania kanałów jonowych przez leki, a także aktualizacji opracowanego wcześniej modelu dla kanału hERG [P1, P2, P3] [51, 52]. Wyniki generowane przez modele pojedynczych kanałów mogą być wykorzystane jako dane wejściowe dla modeli elektrofizjologii kardiomiocytów, pozwalając na symulację AP czy nawet zapisu EKG [70].

Dla każdego kanału jonowego, tj. $Na_v1.5$, $Ca_v1.2$ oraz $K_v7.1$, odpowiadającego odpowiednio za prąd sodowy (I_{Na}), wapniowy (I_{CaL}) oraz wolną komponentę odkomórkowego prądu potasowego (I_{Ks}), zgromadzono i przeanalizowano dane, które następnie zostały wykorzystane do budowy modeli predykcyjnych.

Podczas budowy bazy danych i analizy zgromadzonych informacji zwrócono uwagę na znaczną heterogenność wartości IC_{50} mierzonych z wykorzystaniem różnych modeli oraz w różnych warunkach doświadczalnych [P1, P2, P3][71, 72]. Przyczyną tych rozbieżności jest brak określonych standardowych protokołów doświadczeń *in vitro* [55,56] powodujący znaczne zróżnicowanie wyników otrzymywanych w różnych laboratoriach. Homogenność danych jest kluczowa dla wydajności i zdolności predykcyjnych modeli *in silico*, dlatego też selekcja danych wykorzystywanych do ich budowy powinna uwzględniać ocenę warunków doświadczalnych w jakich zostały pozyskane. W przypadku heterogennych, pozyskanych ze źródeł literaturowych, zbiorów danych autorzy stosują różnorodne techniki ujednolicania rozbieżnych wyników oznaczeń dla poszczególnych substancji [75–77]. Jednak, procedury łączenia wielu obserwacji w jeden rekord redukują naturalną zmienność i mogą być źródłem niepewności w modelu. Ten sam skutek daje podejście konserwatywne, tj. wybór najniższej obserwowanej w pomiarach *in vitro* wartości IC_{50} . Wskazuje to na konieczność stosowania jednorodnych zbiorów danych, uzyskanych z zastosowaniem jednolitej metodyki, optymalnie pochodzących z jednego laboratorium [78, 79]. Powstaje jednak pytanie czy model zbudowany w oparciu o takie podejście może być zastosowany do ekstrapolacji nie tylko poza przestrzeń chemiczną zbioru uczącego, ale także poza warunki oznaczeń *in vitro* zastosowane do wygenerowania danych. Wynikiem powyższych obserwacji i rozważań było zaproponowanie rozszerzonych modeli QSAR (ang. enhanced QSAR) korelujących opisujące cząsteczkę deskryptory fizykochemiczne i strukturalne z jej potencjałem blokowania kanału jonowego z uwzględnieniem parametrów doświadczeń *in vitro* [P1, P2, P3].

Procedura budowy modelu była podobna dla wszystkich kanałów jonowych i obejmowała:

- gromadzenie danych
- budowę bazy danych i pre-procesing danych
- analizę wrażliwościową i selekcję zmiennych
- budowę i weryfikację modelu

Gromadzenie danych

Przegląd literatury, którego celem było zgromadzenie eksperymentalnych wartości IC_{50} dla substancji blokujących wybrane kanały jonowe, wykonano z wykorzystaniem bibliograficznych baz danych Scopus, Medline oraz Google Scholar. Słowa kluczowe wyszukiwane w tytule, abstrakcie oraz słowach kluczowych obejmowały: '{skrót nazwy prądu}' lub '{pełna nazwa prądu}' lub '{nazwa jonu} channel' lub '{nazwa jonu} current' lub '{skrót nazwy kanału}' lub '{nazwa genu kodującego białko kanału jonowego}' oraz ' IC_{50} '. Nie stosowano ograniczenia czasowego. Jeśli nie uzyskano żadnych wyników dla kombinacji słów kluczowych z nazwą leku, powtarzano wyszukiwane z użyciem nazwy klasy, do której lek należy.

Oceniono wszystkie dostępne publikacje anglojęzyczne. W przypadku, gdy raportowana wartość IC_{50} została zmierzona przez autorów publikacji, zapisywano ją w przygotowanym arkuszu programu Excel, w przeciwnym razie szukano publikacji źródłowej. W analizowanych publikacjach poza wartością IC_{50} poszukiwano także dodatkowych informacji (Tabela 1).

Tabela 1. Opis informacji gromadzonych dla poszczególnych prądów jonowych.

Parametr [jednostka]	Prąd jonowy				Opis
	I_{CaL}	I_{Kr}	I_{Ks}	I_{Na}	
channel type	+	-	+	+	Dla linii komórkowych z heterologiczną ekspresją podjednostek kanału: nazwa genu kodującego lub nazwa kanału i źródło pochodzenia
in vitro cell model	+	+	+	+	Model komórkowy wykorzystany do ekspresji podjednostek kanału lub źródło kardiomiocytów (np. HEK, CHO, XO, guinea pig ventricular myocyte)
stimulation frequency [Hz]	+	-	-	+	Liczba impulsów stymulujących na sekundę
transfection type	+	+	+	+	Metoda ekspresji kanału w komórkach (stabilna lub przejściowa)
temperature [°C]	+	+	+	+	Temperatura utrzymywana podczas doświadczeń
technique	+	+	+	+	Technika rejestracji prądu
Ca ²⁺ bath [mM]	+	-	-	-	Stężenie jonów wapniowych w roztworze omywającym komórki
K ⁺ bath [mM]	-	+	+	-	Stężenie jonów potasowych w roztworze omywającym komórki
Na ⁺ bath [mM]	-	-	-	+	Stężenie jonów sodowych w roztworze omywającym komórki
t1 pulse [ms]	+	+	+	+	Czas trwania pierwszego pulsu w protokole typu step
t2 pulse [ms]	+	+	+	+	Czas trwania drugiego pulsu w protokole typu step
holding potential [mV]	+	+	+	+	Wyjściowa wartość potencjału błonowego
depolarization potential [mV]	+	+	+	+	Napięcie prądu depolaryzującego
repolarization potential [mV]	+	+	+	+	Napięcie prądu repolaryzującego
measurement potential [mV]	+	+	+	+	Wartość potencjału błonowego, przy którym dokonano pomiaru natężenia prądu
protocol	+	+	+	+	Rodzaj protokołu użytego do wyzwolenia prądu (np. step, AP, ramp)
IC_{50} [μM]	+	+	+	+	Stężenie substancji powodujące zmniejszenie rejestrowanego prądu o połowę

Budowa bazy danych i pre-processing danych

Do dalszych etapów budowy modeli wykorzystano tylko rekordy, dla których pozyskano komplet informacji. Rekordy niepełne, opisujące eksperymenty wykonane w niefizjologicznym zakresie pH lub w których komórki były inkubowane z lekiem przez dłuższy czas, lub w których stosowano komórki mrożone zostały wykluczone ze zbioru danych. Zgodnie z założeniami modelu (w przypadku substancji optycznie czynnych model przewiduje efekt racematu) wykluczono również rekordy dotyczące enancjomerów.

Dla wszystkich substancji włączonych do bazy danych uczących dla modelu wyznaczono deskryptory struktury chemicznej oraz właściwości fizykochemicznych przy użyciu algorytmów zaimplementowanych w Marvin Calculator Plugins 5.5.0.1 Chemaxon (Chemaxon, www.chemaxon.com) [P1, P2] oraz oprogramowania typu open-source - PaDEL Descriptor [80] [P3]. Pliki opisujące planarną (2D) strukturę chemiczną cząsteczek zostały pobrane z biblioteki PubChem Compound [81] lub wygenerowane z użyciem narzędzia Marvin ChemSketch do rysowania struktur chemicznych [82]. Decyzja o zmianie narzędzia generującego deskryptory podjęta w trakcie prac nad modelami, była podyktowana planowanym ich wykorzystaniem jako elementu komercyjnego narzędzia oceny kardiotoxyczności – platformy ToxComp (obecnie Cardiac Safety Simulator). Wymóg dostarczania przez użytkownika danych wejściowych generowanych przez zewnętrzne licencjonowane oprogramowanie mógłby ograniczyć dostępność i użyteczność platformy ToxComp. Efektem wprowadzonej zmiany, a więc wykorzystania innego niż dotychczas zbioru deskryptorów, była konieczność przebudowania wszystkich modeli [P3]. Niezależnie od wykorzystywanego źródła deskryptorów, kolejnym etapem budowania modeli było przetwarzanie danych i porządkowanie bazy. Etap ten obejmował usuwanie rekordów, dla których zestaw wygenerowanych deskryptorów był niekompletny oraz parametrów, które dla wszystkich rekordów miały jednakową wartość, lub wartość nienumeryczną. W przypadku parametrów doświadczeń *in vitro* wszystkie zmienne kategoryczne zostały przekształcone w numeryczne przez przypisanie numeru klasy.

Analiza wrażliwościowa i selekcja zmiennych

W efekcie działania procedury generowania i przetwarzania bazy danych otrzymano wektory wejściowe złożone z 110 do 498 zmiennych niezależnych, w zależności od modelu. W celu redukcji rozmiaru wektorów wejściowych i wybrania zmiennych kluczowych dla modelu przeprowadzono analizę wrażliwościową. W przypadku deskryptorów wygenerowanych przy użyciu oprogramowania Marvin, analizę wykonano według algorytmu opracowanego przez Żuradę z poprawkami zaproponowanymi przez Mendyka [83, 84], a w przypadku deskryptorów PaDEL analizę przeprowadzono z użyciem programu fscaret [85]. W obydwu przypadkach na podstawie względnej istotności poszczególnych zmiennych dla predykcji modelu generowany jest ich ranking, a następnie wybierany jest optymalny zbiór danych uczących, tj. zbiór o najmniejszej liczbie zmiennych dający najniższą wartość błędu generalizacji. Przeprowadzona analiza wrażliwościowa pozwoliła na istotne zmniejszenie rozmiarów wektorów wejściowych modeli (Tabela 2).

Budowa i weryfikacja modeli

Zadaniem modeli było znalezienie zależności pomiędzy strukturą cząsteczki i jej właściwościami fizykochemicznymi wraz z parametrami doświadczenia *in vitro* a jej potencjałem blokowania danego prądu jonowego. Jako modelowany punkt końcowy wybrano ujemny logarytm z molowego stężenia substancji powodującego zahamowanie prądu płynącego przez kanał jonowy o połowę (pIC_{50}).

Do budowy wszystkich modeli wykorzystano sztuczne sieci neuronowe (ANN) [P1, P3]. W przypadku modelu IKs testowano również algorytmy: SMOreg (ang. sequential minimal optimization regression), Random Forests (RF) oraz systemy ekspertowe [P2]. Sztuczne sieci neuronowe i systemy neuronowo rozmyte (NF) były realizowane z zastosowaniem programu Nets2010/Nets2012 [P1/P2][86] oraz pakietu R `monmlp` [87][P2, P3]. Modele oparte o algorytm `RandomForest` oraz `SMOreg` przygotowano w programie WEKA - Waikato Environment for Knowledge Analysis [P2][88].

Sztuczne sieci neuronowe (ANN) – nieliniowe, samoadaptujące się systemy przetwarzania informacji zainspirowane strukturą i funkcjonowaniem neuronów [89]. W pracy wykorzystano jeden z najpopularniejszych typów ANN - perceptrony wielowarstwowe (ANN-MLP), o architekturze złożonej z jednej do czterech warstw ukrytych oraz dwoma do stu węzłów w poszczególnych warstwach. Stosowano cztery funkcje aktywacji: liniową (`lin`), tangens hiperboliczny (`tanh`), logistyczną (`sigma`) oraz logarymiczną (`fsr`) wg Bilskiego [90]. Sieci uczono metodą wstecznej propagacji błędu (`back propagation - BP`) ze wskaźnikiem uczenia 0.65 oraz wykorzystaniem techniki momentum (0.3), `delta-bar-delta` i `jog-of-weights`. Liczba iteracji w procesie uczenia wynosiła od 5 000 do 2 000 000 [P1, P2]. W związku ze zmianą oprogramowania wykorzystywanego do budowy modeli dla prądu I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Na} , oraz I_{CaL} , modyfikacji wymagały także parametry uczenia sieci neuronowych. Modele realizowane w środowisku R składały się z dwóch warstw ukrytych oraz od trzech do trzydziestu dwóch węzłów w warstwie. Jako funkcje transformujące stosowano tangens hiperboliczny dla warstw ukrytych oraz funkcję liniową dla warstwy wyjściowej. Ostateczne modele są systemami złożonymi (ang. ensemble method) z 10 sieci o takiej samej architekturze. Każdy z elementów zespołu był trenowany pięciokrotnie (liczba iteracji wynosiła 100, 500, 1000, 2000 i 5000), a następnie najlepsza sieć była wybierana do ostatecznego modelu [P3].

Monotoniczne perceptrony wielowarstwowe (MON-MLP) – architektura sieci będących modyfikacją MLP-ANN [91] składała się z dwóch warstw ukrytych zbudowanych z dwóch do dwudziestu neuronów oraz tangensem hiperbolicznym jako funkcją aktywacji. Sieci MON-MLP trenowane były za pomocą algorytmu grupującego (ang. bagging) budującego zespoły sieci złożone z pięciu do pięćdziesięciu elementów. Agregacja wyników poszczególnych elementów zbioru polega na uśrednieniu wszystkich wyników [P1, P3].

Systemy neuronowo rozmyte (NF) – to systemy hybrydowe łączące zdolności samouczenia się ANN z opartą o reguły wykorzystujące logikę rozmytą architekturą systemów rozmytych. Wykorzystano systemy MISO (ang. multiple input single output) Mamdaniego złożone z pięciu do stu neuronów ukrytych z liniową funkcją aktywacji oraz metodą defuzyfikacji M-SLIDE [92]. Parametry uczenia

Tabela 2. Zmienne wykorzystane do budowy modeli.

		Modele enhanced QSAR z deskryptorami Marvin [P1, P2]			Modele enhanced QSAR z deskryptorami PaDEL [P3]		
No.	Typ zmiennej	I _{ks}	I _{cal}	I _{kr}	I _{ks}	I _{na}	I _{cal}
1		model	model	model	model	model	model
2		typ kanału	temperatura	temperatura	typ kanału	stymulacja	temperatura
3		temperatura	Ca2+ [mM]	temperatura	temperatura	t1 puls [s] (depolaryzacja)	Ca2+ [mM]
4		t1 puls [s] (depolaryzacja)	t1 puls [s]	K ⁺ [mM]	K ⁺ [mM]	potencjał spoczynkowy [mV]	t1 puls [s] (depolaryzacja)
5		potencjał spoczynkowy [mV]	potencjał spoczynkowy [mV]	t2 puls [s] (repolaryzacja)	t1 puls [s] (depolaryzacja)	potencjał spoczynkowy [mV]	potencjał spoczynkowy [mV]
6		potencjał depolaryzacji [mV]	potencjał depolaryzacji [mV]	potencjał spoczynkowy [mV]	potencjał spoczynkowy [mV]	potencjał depolaryzacji [mV]	potencjał depolaryzacji [mV]
7	Warunki eksperymentalne			potencjał depolaryzacji [mV]	potencjał depolaryzacji [mV]	potencjał depolaryzacji [mV]	potencjał depolaryzacji [mV]
8				potencjał pomiaru [mV]	potencjał pomiaru [mV]	potencjał pomiaru [mV]	potencjał pomiaru [mV]
9		apKa2	aliphatic ring count	ALogP	ALogP	BCUTp.11	BCUTp.1h
10		ASA H	apKa1	ALogp2	AMR	maxHCsats	MDEC.11
11		ASA P	apKa2	AMR	ATSc4	minHBInt4	MDEC.13
12		ASApplus	aromatic atom count	apol	ATSc5	nX	WPATH
13		azz	aromatic bond count	ATSm1	C3SP2	XLogP	
14		bpKa1	ASA P	ATSm2	C3SP3		
15	Deskryptory cząsteczkowe	heteroaromatic ring count	count	ATSp1	mindO		

Tabela 2 cd. Zmienne wykorzystane do budowy modeli.

16	largest ring size	hetero ring count	ATSp2	n7Ring
17	maximal projection radius	heteroaliphatic ring count	ATSp3	nBase
18	minimal projection area	heteroaromatic ring count	ATSp5	nBondsS2
19	minimal projection radius	logP	BCUTp.1h	nF
20	pl	pH=14.00Hdon	BCUTp.1l	nsCH3
21	rotatable bond count	pH=4.00LogD	ECCEN	SdsN
22	smallest ring size	pH=5.00LogD	naAromAtom	XLogP
23	stereoisomer count	pH=6.00Hdon	nAcid	
24		pH=6.00LogD	nS	
25		pl	nssCH2	
26	rotatable bond count			
27	stereoisomer count			
Zmienna zależna	plC50	plC50	plC50	plC50
Rozmiar wektora wyjściowego	19	26	26	22
				11
				11

systemów neuronowo rozmytych były takie same jak dla ANN-MLP realizowanych z zastosowaniem oprogramowania Nets 2010/2012 [P1, P2, P3].

SMOreg – algorytm wykorzystujący metodę wektorów nośnych (ang. support vector machine - SVM) do estymacji regresji. Do uczenia SVM z jądrem wielominowym zastosowano algorytm SMO (ang. sequential minimal optimization) [93, 94]. Atrybuty nominalne zostały automatycznie przekształcone w binarne [P2].

Lasy losowe (RF) – zespoły drzew losowych, w których decyzja klasyfikacyjna jest kombinacją decyzji pojedynczych drzew. Wszystkie drzewa uczone były za pomocą losowo konstruowanych wektorów wejściowych (identycznych dla wszystkich jednostek). Błąd generalizacji lasu losowego jest uzależniony od siły (wielkość błędu klasyfikacji) i korelacji drzew [95][P1, P2, P3].

Systemy ekspertowe – kombinacje liniowe systemów MPL, NF, SMOreg, i RF. Podczas testowania systemów ekspertowych ich ostateczna decyzja była średnią arytmetyczną predykcji elementów składowych systemu [P2].

łącznie w celu wybrania optymalnego modelu wytrenowano i przetestowano kilkadziesiąt tysięcy modeli. W każdym przypadku najlepszy model wybierany był na podstawie najniższej wartości błędu generalizacji wyrażonego jako wartość RMSE/NRMSE (Równanie 1 i Równanie 2) we wzmacnionej procedurze 10-krotnego wzajemnego sprawdzania (ang. enhanced 10-fold cross-validation – 10-CV).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (pred_i - obs_i)^2}{n}}$$

Równanie 1. obs_i – wartość obserwowana, $pred_i$ – wartość przewidziana, i – numer rekordu danych, n – całkowita liczba rekordów.

$$NRMSE_i = \frac{RMSE_i}{pIC50_{max} - pIC50_{min}} * 100\%$$

Równanie 2. $RMSE_i$ – błąd średniokwadratowy dla rekordu i , $pIC50_{max}$ – maksymalna wartość ujemnego logarytmu stężenia powodującego zahamowanie prądu o połowę (IC_{50}), $pIC50_{min}$ – minimalna wartość ujemnego logarytmu stężenia powodującego zahamowanie prądu o połowę (IC_{50}).

RMSE jest miarą błędu standardowo obliczaną przez oprogramowanie wykorzystywane do budowy modeli. Ze względu na istotne różnice zakresu minimalnych i maksymalnych wartości pIC_{50} dla poszczególnych prądów jonowych porównanie wartości RMSE pomiędzy modelami dla różnych prądów jonowych jest niemożliwe. Dlatego zdecydowano się w ocenie modeli posługiwać wartością NRMSE, która poprzez uwzględnienie indywidualnych zakresów wartości IC_{50} umożliwi wiarygodne porównanie zdolności predykcyjnych. W procesie selekcji optymalnego modelu nie predefiniowano żadnych kryteriów, wybór był podyktowany najniższą wartością błędu RMSE/NRMSE generowaną przez model, a w następnej kolejności maksymalną wartością współczynnika determinacji R^2 .

Standardowa procedura 10-krotnego wzajemnego sprawdzania polega na losowym podziale zbioru uczącego na 10 równolicznych podzbiorów. Jeden z utworzonych podzbiorów jest wykorzystywany jako zbiór testowy dla modelu uczonego na dziewięciu pozostałych podzbiorach, procedura jest powtarzana 10-krotnie, tak że każdy z 10 podzbiorów jest zbiorem testowym tylko raz. Do oszacowania zdolności predykcyjnych modelu wykorzystuje się średni wynik z 10 etapów procedury 10-CV. W opisywanych pracach zastosowano modyfikację standardowej procedury 10-CV w celu zapewnienia najbardziej wymagającego trybu testowania. Modyfikacja wynika bezpośrednio z charakterystyki używanej bazy danych, w której wiele rekordów może opisywać jedną substancję chemiczną, co oznacza, że w przypadku losowego podziału rekordów (standardowa procedura 10-CV) ta sama substancja może znaleźć się równocześnie w zbiorze uczącym i testowym ułatwiając modelowi predykcję. Wprowadzona modyfikacja procedury 10-CV polega na podziale zbioru danych według substancji chemicznych a następnie zastosowaniu grup jako instancji procedury 10-CV. W celu zapewnienia zbliżonych rozmiarów poszczególnych podzbiorów (liczba rekordów) zastosowano algorytm rozwiązujący problem wieloplecakowy. Taka procedura zapobiega obecności tej samej struktury w zbiorze uczącym i testowym jednocześnie i skutkuje możliwością oceny pełnej ekstrapolacji podczas budowy modelu.

Finalnym efektem prac związanych z budową rozszerzonych modeli QSAR było: (1) udostępnienie online bazy danych eksperymentalnie wyznaczonych wartości IC_{50} dla substancji badanych w kierunku blokowania prądów jonowych (Tox-Portal; <http://www.tox-portal.net>) oraz (2) modele QSAR inhibicji prądów I_{Na} , I_{Ca} , I_{Ks} , oraz I_{Kr} , które zostały zaimplementowane w komercyjnym programowaniu oceny bezpieczeństwa kardiologicznego – systemie Cardiac Safety Simulator (CSS, Certara- Simcyp, UK).

Uaktualniana od momentu pierwszej publikacji baza danych [66] zawiera obecnie informacje na temat 713 substancji blokujących prąd I_{Kr} (2204 rekordy), 224 substancji blokujących prąd I_{Ks} (341 rekordów), 221 substancji blokujących prąd I_{Na} (609 rekordów), oraz 199 substancji blokujących prąd I_{CaL} (426 rekordów).

Zarówno znacząca zmienność wartości IC_{50} wyznaczanych w różnych warunkach czy z użyciem różnych modeli in vitro w bazie danych, jak i wyniki analizy wrażliwościowej potwierdzają, że parametry eksperymentu in vitro mają istotny wpływ na wartość mierzonej inhibicji prądu wywołanej lekiem. Stąd wniosek, że dokładny opis oraz opracowanie standardowych warunków pomiarów in vitro mogą być kluczowe dla zdolności predykcyjnych modeli. Zaproponowano więc nowe, uwzględniające informacje o eksperymencie in vitro, podejście do budowy modeli interakcji leku z kanałem jonowym - modele enhanced QSAR. Pozwoliło to na opracowanie modeli o wysokich zdolnościach predykcyjnych.

Ostateczne, włączone do platformy CSS modele powstały z wykorzystaniem pakietu R monmlp i były systemami złożonymi z różnych architektur sieci neuronowych.

Dla blokowania prądu I_{Kr} najlepszym modelem okazał się zbiór 4 architektur sieci neuronowych, reprezentowanych w systemie złożonym z 10 sieci neuronowych:

- architektura no. 1 sieć z 6 i 2 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych
- architektura no. 2 sieć z 8 i 2 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych

- architektura no. 3 sieć z 15 i 2 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych
- architektura no. 4 sieć z 20 i 3 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych

Najlepszy model blokowania prądu I_{Ks} również składał się z 40 elementów równo reprezentowanych przez 4 architektury:

- architektura no. 1. sieć z 4 i 4 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych
- architektura no. 2 sieć z 15 i 3 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych
- architektura no. 3. sieć z 15 i 10 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych
- architektura no. 4. sieć z 20 i 3 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych

Najlepszym modelem blokowania prądu I_{CaL} był system dwudziestoelementowy:

- architektura no. 1. sieć z 6 węzłami w 2 kolejnych warstwach ukrytych
- architektura no. 2. sieć z 20 i 7 węzłami w kolejnych warstwach ukrytych

Natomiast dla blokowania prądu I_{Na} najlepsze wyniki uzyskał system dziesięcioelementowy, którego bazą była architektura złożona z 6 i 3 węzłów w kolejnych warstwach ukrytych sieci neuronowej.

Opracowane modele interakcji leków z kanałami jonowymi mają wysokie zdolności predykcyjne. Błędy generalizacji poszczególnych modeli oceniane w zmodyfikowanej procedurze 10-krotnego wzajemnego sprawdzania przedstawia Tabela 3.

Tabela 3. Błędy generalizacji najlepszych modeli: błąd średniokwadratowy (RMSE) oraz znormalizowany błąd średniokwadratowy (NRMSE).

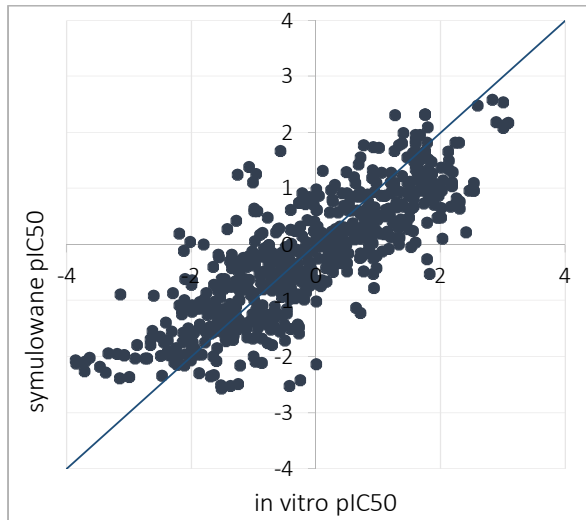
	I_{Kr}	I_{Ks}	I_{Na}	I_{CaL}
RMSE	0.78	0.88	0.98	0.73
NRMSE	11.25%	14.35%	14.33%	22.08%

Porównanie przewidzianych i obserwowanych wartości IC_{50} inhibicji poszczególnych prądów przedstawiono na wykresach 2-5.

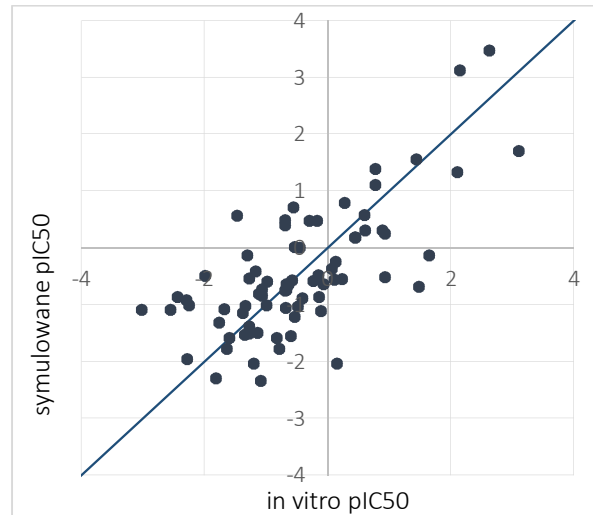
W celu dodatkowej oceny zdolności predykcyjnych metod *in silico* skonfrontowano wyniki działania najlepszego modelu inhibicji kanału potasowego hERG z wysokosprawną techniką *in vitro* (PatchXpress). Zdolność obydwu metod do odtworzenia rezultatów uzyskiwanych standardową metodą – manualną techniką patch clamp – w warunkach zbliżonych do ustawień metody PatchXpress oraz w warunkach fizjologicznych [P3]. W obydwu scenariuszach obliczone wartości RMSE są nieznacznie niższe dla symulacji, jednak różnice nie są statystycznie istotne (test t-Studenta dla podobnych warunków: $P = 0.492$ oraz $P = 0.443$ dla temperatury fizjologicznej) (Tabela 4). Predyktywność obu metod jest podobna, jednak modelowanie oferuje dodatkowe zalety takie jak niski koszt czy możliwość testowania substancji w różnorodnych warunkach doświadczalnych. Uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania modeli enhanced-QSAR jako wydajnego narzędzia pozwalającego na porównanie potencjału proarytmicznego cząsteczek wchodzących w skład projektowanych czy zsyntezowanych bibliotek i

wskazanie kandydatów do dalszych etapów badań lub wykluczenie struktur o nieakceptowalnym potencjale blokowania hERG.

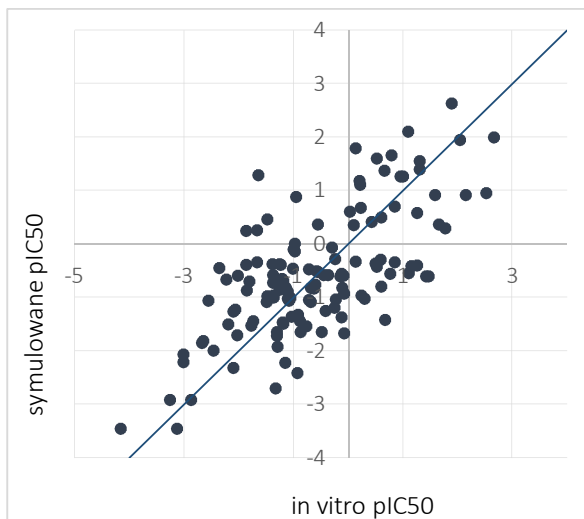
Wykres 2. Porównanie przewidzianej (symulowane pIC50) oraz zmierzonej w warunkach in vitro inhibicji prądu hERG (in vitro pIC50).



Wykres 3. Porównanie przewidzianej (symulowane pIC50) oraz zmierzonej w warunkach in vitro inhibicji wolnego prądu potasowego (in vitro pIC50).



Wykres 4. Porównanie przewidzianej (symulowane pIC50) oraz zmierzonej w warunkach in vitro inhibicji wolnego prądu wapniowego (in vitro pIC50).



Wykres 5. Porównanie przewidzianej (symulowane pIC50) oraz zmierzonej w warunkach in vitro inhibicji wolnego prądu sodowego (in vitro pIC50).

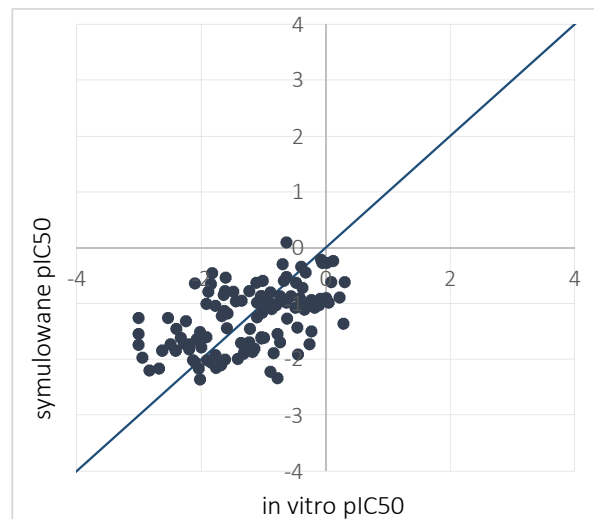


Tabela 4. Porównanie wartości błędu średniokwadratowego (RMSE) dla metody PatchXpress i symulacji dla eksperymentów w warunkach podobnych do parametrów PatchXpress oraz temperaturze fizjologicznej.

	Warunki podobne		Temperatura fizjologiczna	
	PatchXpress	Symulacja	PatchXpress	Symulacja
RMSE	0.82	0.62	0.83	0.69
Liczba substancji	38	39	31	31
P w teście t-Studenta	0.91	0.53	0.06	0.28
Pearson R	0.70	0.85	0.78	0.72

Oparta o pomiary inhibicji kanału hERG predykcja arytmii typu torsad daje niepoprawne wyniki w 30% przypadków. Kramer wykazał, że ocena jednoczesnego blokowania wielu kanałów przez lek poprawia wartość predykcyjną oceny przedklinicznej dla ryzyka arytmii [96]. Stworzony zestaw modeli QSAR daje możliwość oceny interakcji leku z czterema najważniejszymi kanałami jonowymi kardiomiocytów komorowych a dzięki temu gwarantuje lepszą, w porównaniu z oceną jednokanałowej interakcji, dyskryminację pomiędzy cząsteczkami bezpiecznymi i potencjalnie proarytmicznymi. Ponadto przewidziane punkty końcowe mogą zostać użyte jako wejścia dla bardziej złożonych, opartych o fizjologię, modeli opisujących elektrofizjologię komórek serca, pozwalając na ekstrapolowanie efektu proarytmicznego z warunków *in silico* na sytuację *in vivo*. Pełniejsza ocena interakcji leku z kanałami jonowymi daje podstawy do podejmowania bardziej świadomych decyzji dotyczących ryzyka, a przez to uniknięcia niepotrzebnego wykluczenia cząsteczek, które mogłyby stać się bezpiecznymi i skutecznymi lekami.

Aby zilustrować ten problem zaplanowano i wykonano symulację efektów elektrofizjologicznych werapamilu na poziomie populacji. W tym celu wykorzystano system Cardiac Safety Simulator (CSS, Simcyp-Certara UK) implementujący opracowane modele enhanced-QSAR [P2]. Modele enhanced-QSAR są wykorzystywane dla cząsteczek, dla których nie wyznaczono eksperymentalnych wartości IC_{50} dla jednego lub kilku prądów jonowych i umożliwiają kompleksową, rzetelną ocenę ryzyka proarytmicznego w populacji na wczesnych etapach odkrywania i rozwoju leku. Symulowanym punktem końcowym była wartość odstępu QTcF (długość odstępu QT korygowana o rytm serca metodą wg Fridericia) oraz jego zmiana [97]. Jako danych wejściowych dla modelu ciągu kardiomiocytów komorowych [98–100] użyto informacji o zależnym od stężenia blokowaniu kanałów jonowych (przewidziane lub estymowane z raportowanego w literaturze równania Hilla wartości IC_{50}) oraz informacji o farmakokinetyce leku oraz charakterystyce populacji badanej [101]. Wartość IC_{50} werapamilu dla kanału hERG jest niższa niż powszechnie przyjmowany próg bezpieczeństwa decydujący o wykluczeniu substancji z dalszego rozwoju i wynosi $0.37 \mu\text{M}$. Ponadto, jeśli w ekstrapolacji *in vitro-in vivo* uwzględniony zostanie wpływ werapamilu tylko na kanał hERG, przewidziana długość odstępu QTcF przed podaniem leku (baseline) wynosi 338.88 ms, a po jego zastosowaniu ulegała wydłużeniu a średnia wartość QTcF wynosiła 351.17 ms. W badaniach klinicznych średnie wydłużenie odstępu QT przez lek o

5 ms (potwierdzone wartością górnej granicy 95% przedziału ufności powyżej 10 ms) jest interpretowane jako istotny wpływ na repolaryzację komórek serca. W efekcie, nawet jeśli werapamil nie zostałby wycofany z rozwoju na wcześniejszych etapach, wywołana przez niego zmiana, wydłużenie odstępu QTcF o 12 ms zostałaby zinterpretowana jako pozytywny wynik badania TQT i spowodowała konieczność wykonania rozszerzonych badań elektrofizjologicznych w kolejnych etapach. Po uwzględnieniu w symulacji interakcji werapamilu dodatkowo z kanałem Kv1.7, Nav1.5 oraz CaL obserwowano skrócenie odstępu QTcF (Tabela 5).

Tabela 5. Wyniki wirtualnego badania klinicznego werapamilu. Zmiana długości odstępu QTcF przy uwzględnieniu interakcji wyłącznie z kanałem hERG oraz ze wszystkimi kanałami jonowymi (hERG, Kv1.7, Nav1.5 and CaL).

	QTcF [ms]					
	hERG (dane in vitro)			cztery kanały jonowe (przewidziany CaL+dane in vitro)		
	Średnia	min	max	średnia	min	max
Baseline	338.9	330.9	346.8	337.7	333.2	345.2
Werapamil	351.2	343.2	357.7	325.1	321.2	331.2

Wyniki wirtualnego badania klinicznego udowadniają, że ocena wpływu stosowania leku na długość odstępu QT oparta jedynie o pomiary siły hamowania prądu hERG prowadzi do błędnych wniosków, w tym przypadku przeszacowania ryzyka, i możliwego niepotrzebnego wykluczenia z rozwoju obiecujących struktur.

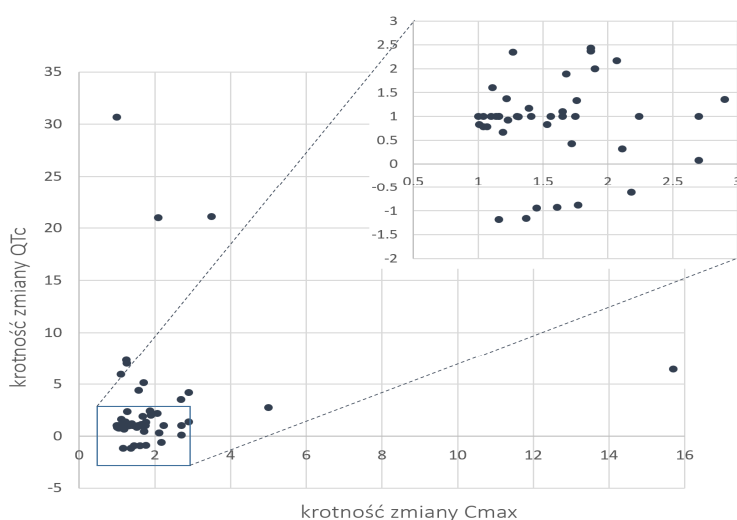
2.5.2. Modelowanie i symulacja efektów elektrofizjologicznych politerapii na poziomie kanału jonowego oraz w populacji

Opisane wyżej wyniki przeprowadzonych badań, wskazują jak istotne jest uwzględnienie interakcji wielokanałowych dla rzetelnej oceny bezpieczeństwa kardiologicznego leku. Na poziomie pacjenta, predykcja ryzyka jest dodatkowo komplikowana przez różnorodne czynniki, takie jak wiek, płeć, konstytucja genetyczna, stan zdrowia, dobowe zmiany rytmu serca czy stężeń elektrolitów. Modele matematyczne szczegółowo opisujące fizjologię serca pozwalają na uwzględnienie różnych źródeł zmienności wewnątrz- i międzyosobniczej umożliwiając ekstrapolowanie ryzyka kardiologicznego z poziomu leku do poziomu populacji. Efektem wcześniej opisanych prac było stworzenie wielopoziomowego modelu QSTS (ang. Quantitative Systems Toxicology and Safety) umożliwiającego translację wyników wczesnej oceny ryzyka do sytuacji klinicznej [36, 102]. Platforma Cardiac Safety Simulator integruje dane z badań in vitro (zmierzone eksperymentalnie lub przewidziane przy pomocy modeli enhanced QSAR) z mechanistycznymi modelami elektrofizjologii kardiomiocytów lewej komory serca oraz bazami zawierającymi dane o fizjologii, genotypie i cechach demograficznych populacji. W

efekcie CSS umożliwia modelowanie wywołanego lekiem wydłużenia odstępu QT u ludzi i ocenę ryzyka populacyjnego z uwzględnieniem zmienności w populacji.

W warunkach klinicznych dodatkowym czynnikiem komplikującym ocenę ryzyka kardiologicznego jest politerapia i wynikające z niej interakcje lek-lek (DDI), których efekt modyfikuje ryzyko związane z pojedynczym lekiem [10, 43–46, 50, 103, 104].

Interakcja jako zaplanowany efekt i powód połączenia leków może optymalizować skuteczność terapii i zmniejszać ryzyko działań niepożądanych. Kiedy jednak interakcja nie jest zamierzona i skutkuje pojawieniem się działań niepożądanych, stanowi poważny problem zarówno dla pacjenta jak i systemu opieki zdrowotnej. Ze względu na rosnącą częstość politerapii w populacji oraz ryzyko wydłużania odstępu QT związane z lekami reprezentującymi wiele klas terapeutycznych i struktur chemicznych, ocena efektów interakcji lekowych w procesie oceny bezpieczeństwa kardiologicznego wydaje się być niezwykle istotna. W celu zobrazowania roli i potencjalnego znaczenia klinicznego kombinacji lekowych dla bezpieczeństwa kardiologicznego, wykonano przegląd wyników opublikowanych badań klinicznych dotyczących farmakokinetycznych i/lub farmakodynamicznych interakcji lekowych i ich wpływu na elektrofizjologię ludzkiego serca [P4]. Zastosowana strategia wyszukiwania z wykorzystaniem baz PubMed i Scopus pozwoliła zidentyfikować ponad 4500 publikacji, które poddano wstępnej ocenie zgodności z celem badania. Proces oceny znalezionych publikacji ograniczył liczbę publikacji do 76, które spełniały kryteria włączenia. Zmiana ryzyka wystąpienia działania niepożądanego jako efekt interakcji może wynikać ze zmian farmakokinetyki (PK) (procesy ADME) lub farmakodynamiki (PD) leku. W procesie rozwoju leku, in vitro i w badaniach klinicznych, analizowane są przede wszystkim interakcje farmakokinetyczne [56]. Jak pokazują zgromadzone i przeanalizowane informacje, w przypadku niektórych interakcji obserwowane zmiany PK nie mają znaczącego wpływu na zmianę długości odstępu QTc, a stężenie leku we krwi nie koreluje liniowo z obserwowanym efektem elektrofizjologicznym (Wykres 6). Wskazuje to na potrzebę uwzględnienia dodatkowych komponentów, poza zmianami PK, podczas oceny ryzyka proarytmii związanego z politerapią.



Wykres 6. Porównanie krotności zmian parametrów farmakokinetycznych (C_{max}) i farmakodynamicznych (QTc). Krotność zmiany= C_{max} Kombinacji_leków/ C_{max} Leku oraz ΔQTc Kombinacji_leków/ ΔQTc Leku.

Analiza komponenty farmakodynamicznej interakcji lekowych jest znacznie trudniejsza niż komponenty farmakokinetycznej, definiowanej jako zmiana parametrów PK (C_{max} i AUC), przede wszystkim ze względu na mnogość potencjalnych punktów końcowych wymagających oceny dla konkretnego efektu klinicznego. W przypadku arytmii TdP, wydłużenie odstępu QT może być wykorzystane jako stosunkowo bezpieczny i łatwy do zmierzenia wskaźnik efektu farmakodynamicznego interakcji, jednak liczba kombinacji leków potencjalnie związanych z wydłużeniem odstępu QT jest praktycznie nieograniczona, co uniemożliwia kompleksową ocenę komponenty PD interakcji w procesie rozwoju leku i badaniach klinicznych. Ponadto, niemożliwe jest testowanie efektów interakcji w szczególnych, istotnych z punktu widzenia praktyki klinicznej, grupach pacjentów, jak np. u pacjentów w podeszłym wieku, cierpiących na wiele schorzeń lub krytycznie chorych, poddawanych politerapii, u których ryzyko DDI jest znacznie zwiększone [105]. W konsekwencji wiele efektów niepożądanych będących wynikiem interakcji lekowych ujawnia się dopiero po zarejestrowaniu i wprowadzeniu leku na rynek. Możliwość badania szerokiego zakresu kombinacji z wykorzystaniem różnego typu danych oferuje zastosowanie w ocenie interakcji lekowych modeli komputerowych [106–112]. Z tego względu stworzony został model typu Quantitative Systems Toxicology and Safety (QSTS) umożliwiający predykcję ryzyka proarytmii poprzez połączenie informacji o właściwościach fizykochemicznych i strukturalnych (modele enhanced-QSAR), danych *in vitro*, opartych o fizjologię modeli farmakokinetycznych (PBPK, zaimplementowane w platformie Simcyp Simulator; Certara-Simcyp, UK) i farmakodynamicznych (PBPD, zaimplementowanych w platformie Cardiac Safety Simulator; Certara-Simcyp, UK) oraz modeli zmienności populacyjnej. Użyteczność modelu i jego zdolności predykcyjne zostały przetestowane z wykorzystaniem terfenadyny [P5].

Terfenadyna jest przykładem leku, dla którego ekstrapolacja *in vitro-in vivo* jest skomplikowana i wymaga podejścia systemowego, wykorzystującego szeroki zakres danych uzyskanych w badaniach przedklinicznych. Dodatkowo, jest także przykładem leku, którego przydatność kliniczna nie uzasadnia potencjalnego ryzyka proarytmii zwanego z jej stosowaniem. Terfenadyna może być traktowana jako prolek, którego potencjał blokowania kanału hERG jest eliminowany poprzez wydajny metabolizm zachodzący za pośrednictwem enzymów CYP 3A4, w wyniku którego powstaje aktywny farmakologicznie metabolit (feksofenadyna). Jednak, kiedy rezerwa repolaryzacji lub aktywność cytochromu CYP 3A4 jest zmniejszona, np. w wyniku równoczesnego stosowania leków wydłużających odstęp QT lub inhibitorów CYP, osiągnięte w osoczu stężenia terfenadyny mogą wywoływać efekty kardiologiczne. Przewidywanie efektu *in vivo* dodatkowo komplikuje stosunkowo duża objętość dystrybucji terfenadyny świadcząca o znacznym wiązaniu leku w tkankach obwodowych, co oznacza, że stężenie w osoczu nie odzwierciedla stężenia leku w miejscu jego działania.

W celu zidentyfikowania dostępnych wyników badań klinicznych dotyczących elektrofizjologicznych efektów interakcji lekowych terfenadyny przeszukiwano trzy bibliograficzne bazy danych: PubMed, Scopus, oraz Google Scholar. Ostatecznie z prawie 200 znalezionych publikacji, do badań symulacyjnych włączono siedem, które spełniły kryteria włączenia tj. jednoczesny pomiar parametrów farmakokinetycznych (stężenie leków we krwi) oraz farmakodynamicznych punktów końcowych (długość odstępu QT). Zmiany ekspozycji na terfenadynę, wynikające z jej interakcji z innymi

równocześnie stosowanymi lekami, będącymi inhibitorami jej metabolizmu i jednocześnie posiadającymi potencjał wydłużania odstępu QT (klarytromycyną, erytromycyną, flukonazolem, fluoksetyną, itrakonazolem, ketokonazolem oraz paroksetyną) symulowano z wykorzystaniem platformy Simcyp Simulator (Wykres 7). Dla cząsteczek terfenadyny oraz jej metabolitu, feksofenadyny, przygotowano modele na podstawie zgromadzonych danych literaturowych (Tabela 6). W przypadku pozostałych leków skorzystano z gotowych plików cząsteczek oferowanych przez platformę Simcyp [P5, P6]. We wszystkich symulacjach w celu modelowania stężenia leków w tkance serca zastosowano model full PBPK (modele full PBPK (whole-body) szczegółowo opisują tkanki i organy istotne dla procesów ADME leku [113]). Parametry wirtualnego badania klinicznego, tj. parametry demograficzne populacji, dawki, schematy dawkowania, czas trwania, były identyczne z opisanymi w publikacjach źródłowych parametrami rzeczywistych badań. Wyniki wszystkich symulacji odtworzyły obserwowaną klinicznie zmienność populacyjną stężeń terfenadyny. Zarówno wartości C_{max} i AUC, jak i profile farmakokinetyczne, zostały przewidziane zadowalająco dobrze, choć można zauważyć, że opracowany model ma tendencję do niedoszacowania stężeń terfenadyny w późnej fazie eliminacji.

W przeprowadzonych wirtualnych badaniach, tak jak podczas obserwacji klinicznej, stężenia terfenadyny podczas monoterapii były niższe od granicy wykrywalności zastosowanych metod pomiarowych (~5 ng/mL). Kompletne porównanie obserwowanych i przewidzianych profili stężenia w osoczu – czas dla obydwu scenariuszy badania, tj. monoterapia terfenadyną oraz terfenadyna+inhibitor, możliwe było dla dwóch par: terfenadyna-fluoksetyna oraz terfenadyna-paroksetyna. W obydwu przypadkach wyniki symulacji (wartości C_{max} , AUC i profil PK) są zadowalające.

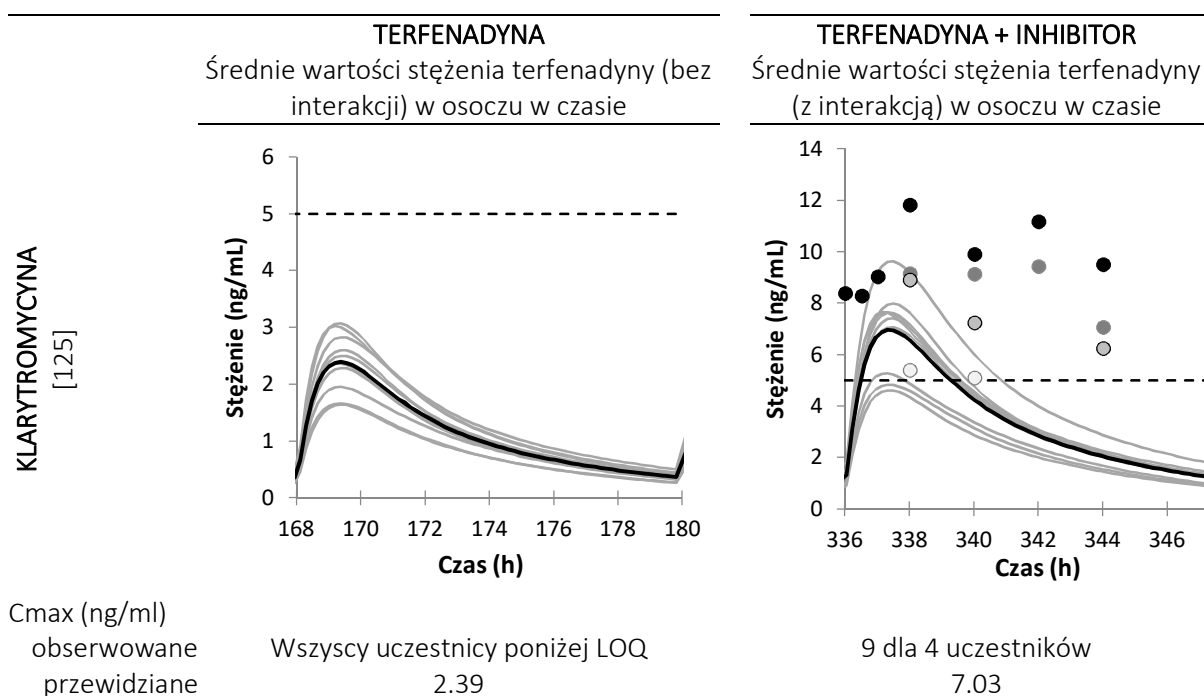
Tabela 6. Parametry fizykochemiczne oraz farmakokinetyczne terfenadyny wykorzystane podczas badań symulacyjnych.

Zmienna	Wartość parametru	Źródła i uwagi
Typ parametru		
LogP	5.69	[114]
pKa	9.5	[115]
Fracja wolna w osoczu	0.03	[116, 117]
Wchłanianie		
Model	ADAM	
Pe _{eff,man} (10 ⁻⁴ cm/s)	1.26	Przewidziane na podstawie danych Caco-2 (Simcyp)
fa	0.787	Przewidziane na podstawie danych fizykochemicznych (Simcyp)
ka (1/h)	0.52	Przewidziane na podstawie danych fizykochemicznych (Simcyp)
Przenikalność Caco-2 (x10 ⁻⁶ cm/s);	5.47	[118]
	Propranolol: 21.29	
Apical pH:basolateral pH 7.4:7.4		
Dystrybucja		
Model	Full PBPK	Model limitowany tempem perfuzji dla wszystkich organów

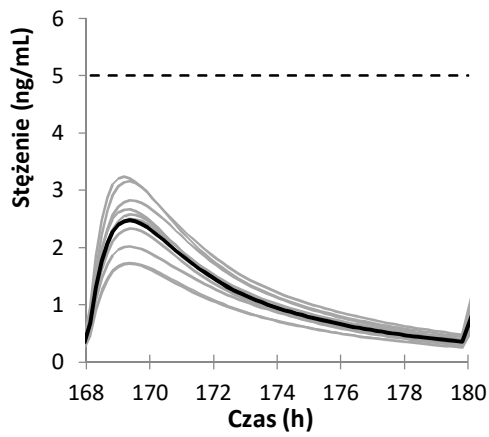
V_{ss} (L/kg)	4.43	Przewidziane (Simcyp)
Kp heart:plasma	3.91	Przewidziane (Simcyp)
Eliminacja		
rCYP 3A4	Km=9; Vmax=1257	[120]
	fumic=0.2	Wartość optymalizowana
rCYP 3A4	Km=13; Vmax=206	[120]
	fumic=0.2	Wartość optymalizowana
Dodatkowy klirens wątrobowy (HLM)	800	Wartość oszacowana na podstawie całościowego klirensu HLM[121] i informacji o klirensie związanym z CYP3A4 oraz 2D6
	fuinc = 0.3	Wartość optymalizowana
Dodatkowy klirens jelitowy	1650	[121]
	fuinc = 0.075	Wartość optymalizowana
Aktywny wychwyt do hepatocytów	0.85	Wartość optymalizowana

ADAM – model advanced dissolution absorption metabolism; HLM – ludzkie mikrosomy wątrobowe (ang. human liver microsomes).

Wykres 7. Porównanie wyników badania wirtualnego i klinicznego. Farmkokinetyka terfenadyny.

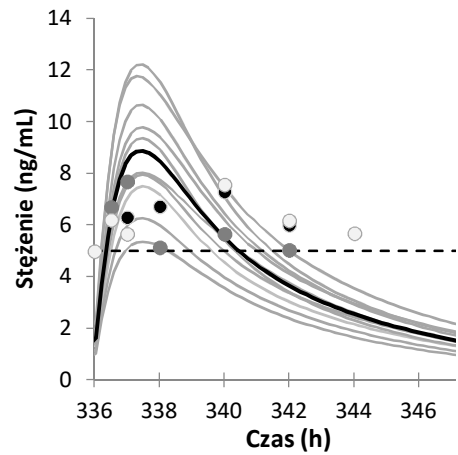


ERYTROMYCINA
[125]



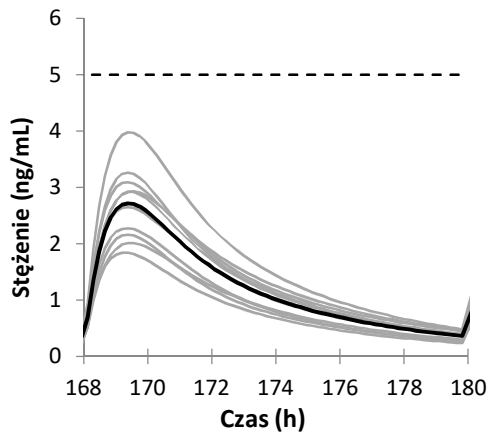
C_{max} (ng/ml)
obserwowane
przewidziane

Wszyscy uczestnicy poniżej LOQ
2.47



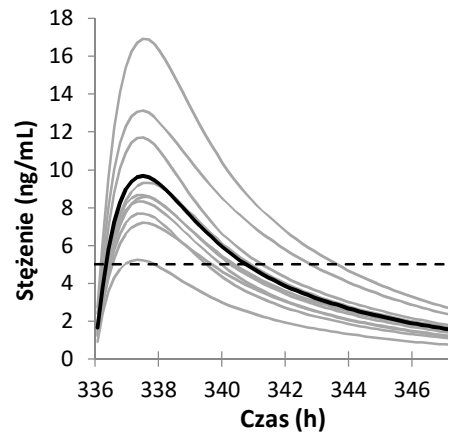
7.6 dla 3 uczestników
8.98

ERYTROMYCINA
[123]



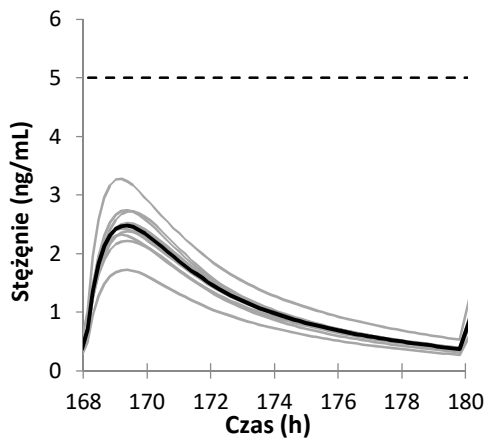
C_{max} (ng/ml)
obserwowane
przewidziane

Wszyscy uczestnicy poniżej LOQ
2.71



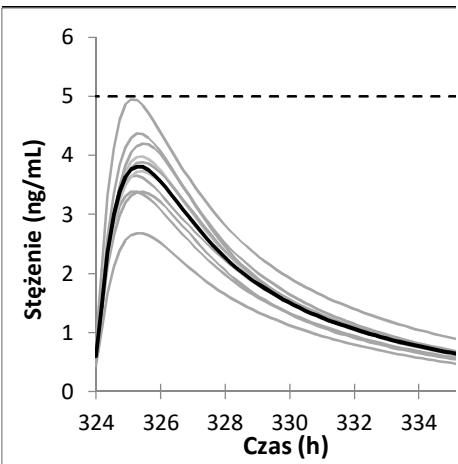
20.3 dla 3 uczestników
9.74

FLUKONAZOL
[124]



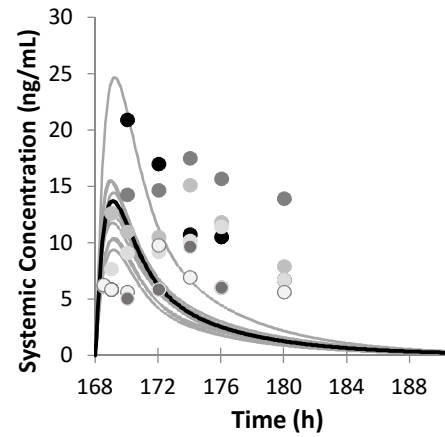
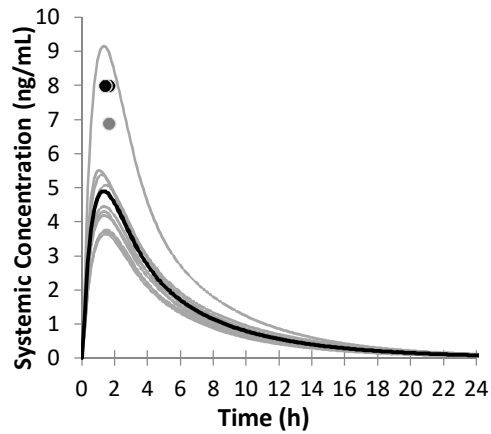
C_{max} (ng/ml)
obserwowane
przewidziane

Wszyscy uczestnicy poniżej LOQ
2.48



Wszyscy uczestnicy poniżej LOQ
4.11

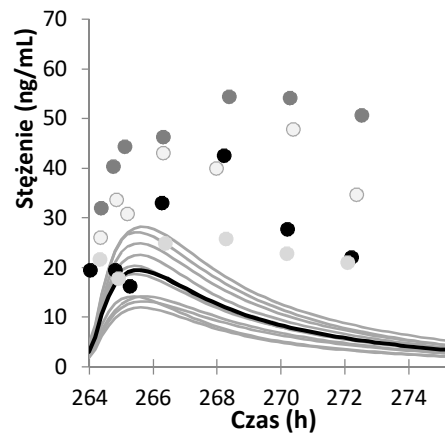
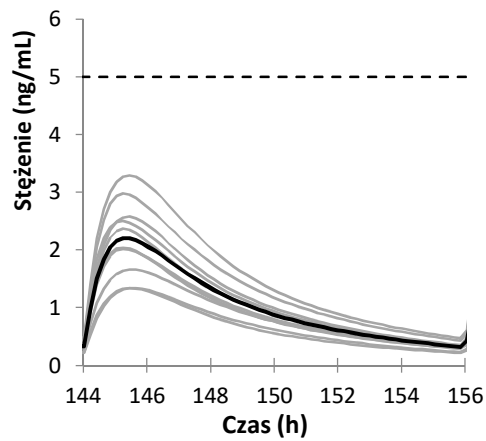
ITRAKONAZOL
[127]



Cmax (ng/ml)
obserwowane 7.63 dla 3 uczestników
przewidziane 4.9

14.97 dla 3 uczestników
14.6

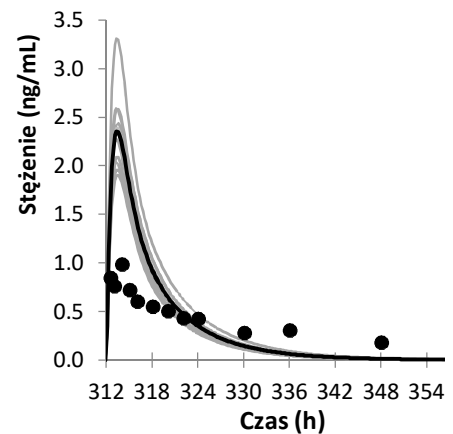
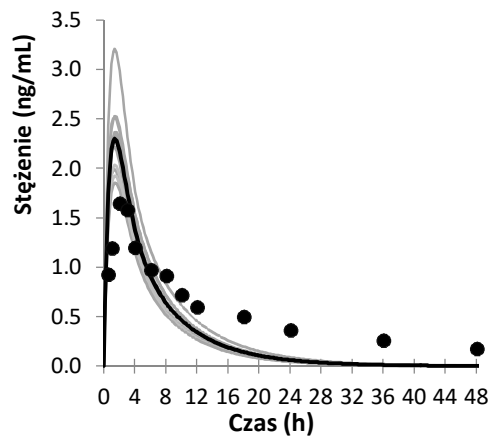
KETOKONAZOL
[128]



Cmax (ng/ml)
obserwowane 7 dla 1 uczestnika
przewidziane 2.23

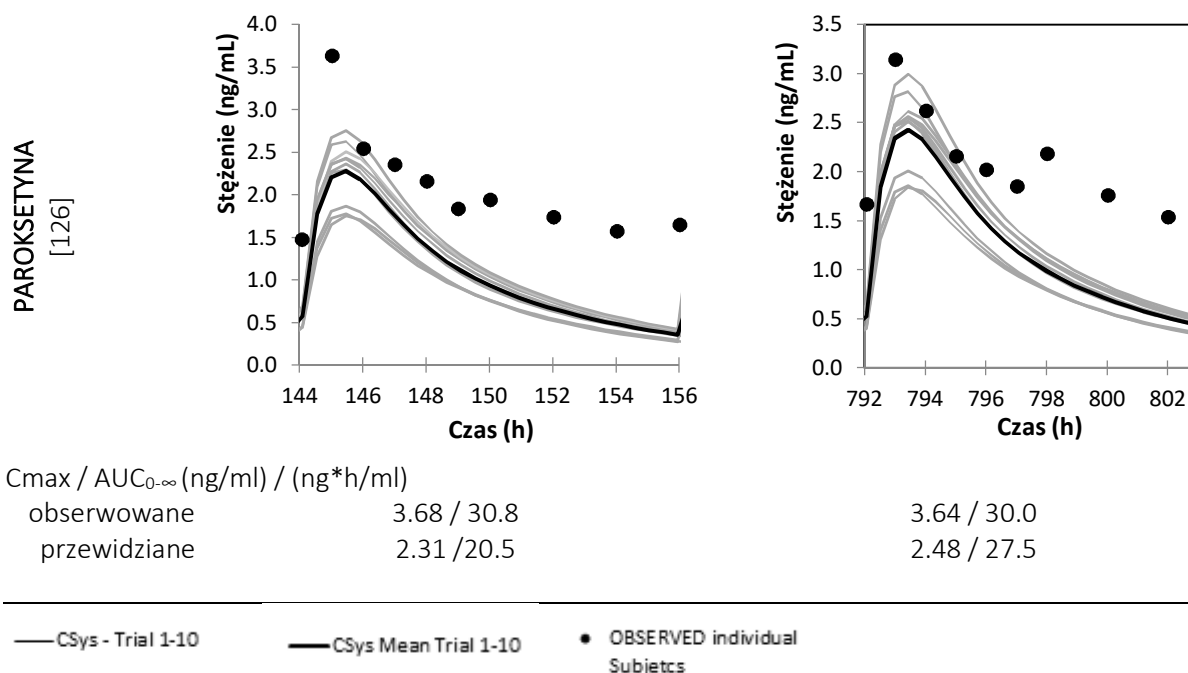
NA
19.67

FLUOKSETYNA
[122]



Cmax / AUC_{0-∞} (ng/ml) / (ng*h/ml)
obserwowane 2 / 24.6
przewidziane 2.3 / 15.3

1.4 / 14.2
2.3 / 15.3



Csys – średnie stężenie w osoczu przewidziane w 10 wirtualnych badaniach klinicznych (pogrubiona linia) oraz średnie w pojedynczych wirtualnych badaniach (linie); linia przerywana - LLOQ (dolna granica wykrywalności); punkty – obserwowane dane indywidualne

* średnia wartość policzona dla uczestników, u których stężenie terfenadyny w osoczu było wyższe niż LLOQ

** wartości C_{max} raportowane tylko dla 3 uczestników

Komponentę farmakodynamiczną efektu interakcji terfenadyny w populacji pacjentów symulowano z wykorzystaniem platformy Cardiac Safety Simulator 2.0 [P5]. Zastosowano model ten Tusscher-Noble-Noble-Panfilov kardiomiocytu lewej komory [97]. Zróżnicowanie prądów jonowych w komórkach wsierdza, komórkach M oraz komórkach nasierdza symulowano stosując jednowymiarowy model włókna ściany komory serca, ze standardową dystrybucją komórek poszczególnych typów, odpowiednio 50:30:20 i współczynnikiem dyfuzji 0,0016 cm²/ms. Bodziec stymulujący włókno podawany był od strony endokardium. Równania modelu łączone były metodą Eulera. Wyniki działania modelu 1D wykorzystano do wygenerowania zapisu pseudo-EKG (model symuluje wyłącznie komórki komorowe, dlatego generowany przez niego zapis EKG pomija załamek P). Domyślny krok czasowy i przestrzenny w modelu wynosi odpowiednio $\Delta x = 0.01$ mm i $\Delta t = 0.01$ ms. Całkowity czas symulacji został ustawiony na 10 000 ms, dodatkowo podczas symulacji w początkowej fazie dodawane są dodatkowe cykle, w celu osiągnięcia stanu stacjonarnego, zapewnienia stabilności modelu i uniknięcia błędów obliczeniowych. Wywołane lekiem zmiany prądu jonowego symulowano wprowadzając do równań opisujących poszczególne prądy (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Na} , I_{Ca}) współczynnik inhibicji (ang. inhibition factor) wyliczony na podstawie literaturowych danych z doświadczeń in vitro opisujących zależność stężenie-inhibicja prądu dla modelowanego leku (Równanie 3).

$$\text{Inhibition Factor} = \frac{1}{1 + (IC_{50}/[D])^n}, \quad \text{Równanie 3.}$$

gdzie IC_{50} to stężenie leku powodujące 50% zahamowanie danego prądu; n współczynnik Hilla; $[D]$ stężenie leku w μM . Do symulacji pseudo-EKG wykorzystano indywidualne wartości stężeń wolnej frakcji leku w tkance sercowej (odpowiednik efektywnego stężenia leku w miejscu działania) w punktach czasowych odpowiadających rejestracji EKG w badaniu klinicznym. Dla wszystkich wartości stężeń wyliczono odpowiadające im współczynniki inhibicji. Zmienność w populacji oraz wewnątrzosobniczą symulowano w wirtualnym badaniu z wykorzystaniem symulatora wirtualnych populacji (ang. virtual population generator) [129, 130], modelu okołodobowych zmian częstości rytmu serca [131], oraz specyficzny dla płci model okołodobowych zmian stężeń trzech głównych jonów (Ca^{2+} , K^+ oraz Na^+) [132, 133].

Uwzględnienie w modelu komponenty farmakodynamicznej interakcji leków wymaga oceny łącznego efektu działania kilku leków w miejscu działania (np. na poziomie kanału jonowego). Stosowanych jest kilka metod pozwalających obliczyć wypadkową wielkość efektu stosowania kilku leków [134], brak jednak zgodności co do modelu standardowego interakcji [135]. Do najczęściej wykorzystywanych należy model addytywności Loewe'a (syntopowy) oraz model niezależności Bliss'a (allotopowy) [136–138]. Znaczenie wyboru modelu interakcji dla uzyskiwanych wyników oceniono na przykładzie interakcji trzech leków: ketokonazolu (KETO), loratadyny (LOR) i desloratadyny (DL). Badano trzy modele interakcji: prosta addycja, niezależność Bliss'a oraz addytywność Loewe'a (odpowiednio: Równanie 4, Równanie 5, Równanie 6) przy założeniu maksymalnego poziomu inhibicji prądu wynoszącego 1 (100%).

Równanie 4. Model prostej addycji dla par leków.

$$\text{dla } I_a + I_b \leq 1: I_{a,b} = I_a + I_b;$$

$$\text{dla } I_a + I_b > 1: I_{a,b} = 1$$

Równanie 5. Model niezależności Bliss'a (allotopowy) dla par leków.

$$I_{a,b} = 1 - ((1 - I_a) * (1 - I_b))$$

Równanie 6. Model addytywności Loewe'a (syntopowy) dla par leków.

$$I_{a,b} = ((I_a / (1 - I_a) + I_b / (1 - I_b)) / ((I_a / (1 - I_a) + I_b / (1 - I_b) + 1))$$

Dla połączeń trójlekowych powyższe wzory zostały zmodyfikowane:

Równanie 7. Model prostej addycji dla trzech leków.

$$\text{dla } I_a + I_b + I_c \leq 1: I_{a,b,c} = I_a + I_b + I_c;$$

$$\text{dla } I_a + I_b + I_c > 1: I_{a,b,c} = 1$$

Równanie 8. Model niezależności Bliss'a (allotopowy) dla trzech leków.

$$I_{a,b,c} = 1 - ((1 - I_a) * (1 - I_b) * (1 - I_c))$$

Równanie 9. Loewe additivity model (syntopic) dla trzech leków.

$$I_{a,b,c} = (I_a / (1 - I_a) + I_b / (1 - I_b) + I_c / (1 - I_c)) / ((I_a / (1 - I_a) + I_b / (1 - I_b) + I_c / (1 - I_c)) + 1)$$

gdzie:

I_a , I_b , I_c oznacza inhibicję prądu związaną ze stężeniem leku a, b, i c, obliczoną na podstawie specyficznej dla leku wartości IC_{50} oraz n (współczynnik Hilla).

W pierwszym etapie procedury wyboru odpowiedniego dla rozwiązywanego problemu modelu interakcji leków na poziomie kanału jonowego opracowano metodykę oceny interakcji lekowych w warunkach *in vitro*. W warunkach eksperymentalnych badano hamowanie prądu I_{Kr} dla pojedynczych leków, par oraz połączeń trójlekowych. Pomiary metodą patch-clamp wykonano przy życiu półautomatycznego aparatu CytoPatch2. Do wyzwolenia prądu I_{Kr} w komórkach HEK transfekowanych genem kodującym białko kanału hERG zastosowano protokół typu step (ze skokową zmianą potencjału), mierzono potencjał blokowania prądu końcowego (ang. tail). W badaniach par leków testowano trzy poziomy stężeń: odpowiadające oznaczonej dla pojedynczego leku wartości IC_{50} , stężenie poniżej i powyżej tej wartości. W badaniu efektów połączenia trzech leków stężenia loratadyny i desloratadyny były stałe, a stężenia ketokonazolu odpowiadały wartości jego IC_{50} , oraz wartościom niższym i wyższym od IC_{50} (łącznie 4 punkty) [P7]. Oznaczone eksperymentalnie wartości inhibicji dla poszczególnych punktów pomiarowych wykorzystano do oceny modeli DDI. Porównywano poprawność predykcji ocenianą jako RMSE (Równanie 1). Obserwowany efekt (inhibicja prądu) połączenia dwóch leków był zależny od stężenia. Przy niższych wartościach stężeń obserwowano synergizm, przy wyższych efekt był subaddytywny. Dla połączeń trzech leków efekt był subaddytywny niezależnie od wartości stężeń. Wyniki wyznaczonych eksperymentalnie i obliczonych teoretycznie wartości inhibicji prądu przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Wyznaczone eksperymentalnie (średnia inhibicja) i przewidziane (model syntopowy, allotopowy i prostej addycji) wartości inhibicji prądu hERG dla pojedynczych leków, par i połączeń trójlekowych.

Loratadyna			
LOR [μ M]	Średnia inhibicja	n	SEM
2.5	0.187	4	0.022
3.125	0.203	4	0.05
6.25	0.637	6	0.026
12.5	0.847	7	0.029
Desloratadyna			
DL [μ M]	Średnia Inhibicja	n	SEM
0.5	0.135	4	0.005
1	0.363	4	0.016

5	0.707	4	0.014
10	0.894	4	0.01

Ketokonazol

KETO [μ M]	Średnia Inhibicja	n	SEM
0.5	0.428	5	0.026
1	0.439	5	0.016
2.5	0.825	2	0.008
5	0.931	2	0.021

Loratadyna + Desloratadyna

LOR [μ M]	DL [μ M]	Średnia inhibicja	n	SEM	Allotopowy	Syntopowy	Addytywny
1.35	0.65	0.216	5	0.018	0.261	0.253	0.269
2.7	1.3	0.52	5	0.034	0.506	0.466	0.576
5.4	2.6	0.769	5	0.038	0.802	0.714	1
10.8	5.2	0.961	3	0.008	0.96	0.891	1
RMSE					0.0288	0.0552	0.1233

Loratadyna + Ketokonazol

LOR [μ M]	KETO [μ M]	Średnia inhibicja	n	SEM	Allotopowy	Syntopowy	Addytywny
1.35	0.163	0.296	9	0.015	0.207	0.2	0.171
2.7	0.325	0.618	11	0.016	0.431	0.396	0.433
5.4	0.65	0.866	10	0.012	0.747	0.664	0.949
10.8	1.3	0.959	10	0.008	0.942	0.874	1
RMSE					0.1197	0.1632	0.1209

Desloratadyna + Ketokonazol

DL [μ M]	K [μ M]	Średnia inhibicja	n	SEM	Allotopowy	Syntopowy	Addytywny
0.65	0.163	0.257	5	0.01	0.351	0.326	0.347
1.3	0.325	0.575	5	0.023	0.566	0.511	0.631
2.6	0.65	0.772	5	0.018	0.776	0.693	1
5.2	1.3	0.9	3	0.013	0.913	0.83	1
RMSE					0.0477	0.0707	0.1353

Loratadyna (L) + Desloratadyna (DL) + Ketokonazol (K)

[L] [μ M]	[DL] [μ M]	[K] [μ M]	Średnia inhibicja	n	SEM	Allotopowy	Syntopowy	Addytywny
1.35	0.65	0.16	0.343	11	0.02	0.383	0.349	0.438
1.35	0.65	0.33	0.553	12	0.036	0.478	0.43	0.565
1.35	0.65	0.65	0.735	8	0.037	0.605	0.547	0.738
1.35	0.65	1.3	0.862	8	0.024	0.739	0.684	0.919
RMSE					0.099	0.1433	0.0557	

Loratadyna (L) + Desloratadyna (DL) + Ketokonazol (K)								
[L] [μM]	[DL] [μM]	[K] [μM]	Średnia inhibicja	n	SEM	Allotopowy	Syntopowy	Addytywny
2.7	1.3	0.16	0.426	4	0.023	0.588	0.517	0.746
2.7	1.3	0.33	0.718	4	0.019	0.651	0.563	0.874
2.7	1.3	0.65	0.857	4	0.024	0.736	0.635	1
2.7	1.3	1.3	0.916	3	0.016	0.825	0.73	1
RMSE						0.1158	0.1704	0.1964

LOR – Loratadyna; DL – desloratadyna; KETO – Ketokonazol

SEM – błąd standardowy średniej; n- liczba testowanych komórek dla danego stężenia; RMSE – błąd średniokwadratowy

Dla większości testowanych połączeń (wszystkie pary oraz jedno z dwóch połączeń trójlekowych), najmniejszy błąd i największą predyktywność wykazywał model allotopowy. Wyjątek stanowiło połączenie ketokonazolu z niskimi stężeniami desloratadyny i loratadyny. Wyniki eksperymentów pozwalają stwierdzić, że wykorzystane w doświadczeniach leki łączą się z różnymi miejscami wiązania kanału hERG. Ponadto wykazano, że eksperymentalne badania in vitro połączeń wielu leków są możliwe i dostarczają wiarygodnych wyników. Konieczne jest jednak przeprowadzenie większej liczby eksperymentów, aby możliwe było zbudowanie teoretycznego modelu interakcji wielolekowych o predyktywności wyższej niż oferowana przez obecnie stosowane algorytmy.

Kolejnym etapem oceny wpływu wybranego modelu interakcji na wyniki oceny bezpieczeństwa politerapii, przeprowadzono wirtualne badanie, w którym oceniany był wpływ zastosowanego modelu DDI na wyniki symulacji wpływu leków na długość odstępu QT [P6]. W Tabeli 7 porównano wyniki symulacji z zastosowaniem różnych modeli interakcji z klinicznie obserwowanymi wartościami odstępu QT. Dopasowanie przewidywanej wartości zmiany QTc (ΔQTc) do obserwowanej klinicznie mierzone było za pomocą odległości (Równanie 10). ΔQTc obliczano jako różnicę pomiędzy długością korygowanego o rytm serca odstępu QTc u pacjenta poddanego terapii (pojedynczym lekiem lub kombinacją leków) a jego długością przed podaniem leku (baseline).

Równanie 10. Odległość.

$$D = \sqrt{(\Delta T_{pred} - \Delta T_{obs})^2 + (\Delta T + I_{pred} - \Delta T + I_{obs})^2 + ((\Delta T + I_{pred} - \Delta T_{pred}) - (\Delta T + I_{obs} - \Delta T_{obs}))^2}$$

gdzie:

Δ – zmiana długości odstępu QT

T – terfenadyna

I – inhibitor

pred – wartość przewidziana

obs – wartość obserwowana

W prawie wszystkich badaniach (z wyjątkiem dotyczącego ketokonazolu) różnica pomiędzy średnią obserwowaną a średnią przewidzianą wartością ΔQT_c nie była istotna statystycznie (w teście t-Welcha) (Tabela 8).

Tabela 8. Porównanie średnich obserwowanych i przewidzianych wartości odstępu QT.

		odstęp QT [ms]				% przypadków, w których wybór modelu DDI zmienia wnioski dot. oceny bezpieczeństwa leku
		wartość obserwowana	wartość przewidziana – model addycji ¹	wartość przewidziana – model Bliss ¹	wartość przewidziana – model Loewe ¹	
Fluoksetyna [122]	BL	372.4		396.0		
	T	374.9		398.5		
	I	-		400.9		
	T+I	379	401.6	400.8	400.2	0.1
		Odległość		1.49	2.59	3.34
Erytromycyna [123]	BL			392.8		
	T ²	8		398.5		
	I ²	21		403.7		
	T+I ²	39	418.2	413.6	411.4	2.8
		Odległość		18.38	22.75	25.13
Flukonazol [124]	BL	398.5		395.2		
	T	398.4		401.3		
	I			414.3		
	T+I	411	422.6	418.6	416.8	3.8
		Odległość		31.28	26.02	23.65
Itrakonazol ³ [127]	BL	376		430.5		
	T	390		438		
	I	brak efektu		486.9		

	T+I	417	452.2	448.9	447.3	2.3
		Odległość	24.05	28.50	30.68	
Ketokonazol [128]	BL	408		394.5		
	T	416		395		
	I	-		415.4		
	T+I	490	439	427.9	423.6	5.6
		Odległość	48.61	64.03	70.14	
Klarytromycyna [125]	BL	409		395.5		
	T	410		401.4		
	I	407		393.9		
	T+I	430	404.4	403.8	402.7	0.2
		Odległość	21.43	22.96	23.79	
Erytromycyna [125]	BL	394		397.5		
	T	408		403.7		
	I	409		405.8		
	T+I	428	420.1	415.6	413.5	3.3
		Odległość	14.27	19.46	22.17	
Paroksetyna [126]	BL	381		392.0		
	T	387		394.5		
	I	-		393.5		
	T+I	386	396.6	393.6	396.8	0
		Odległość	4.69	4.86	4.78	

pogrubienie – najlepszy model (najniższa wartość odległości); BL – bez leku (baseline); T – terfenadyna; I – inhibitor

¹ metoda oszacowania wpływu DDI na prąd jonowy

² w badaniu raportowany tylko zmianę QT

³ maksymalna wartość QT

Modele Loewe'a i Blissa zakładają odpowiednio wspólne lub różne miejsca wiązania dla leków wchodzących w interakcję. Zgodnie z danymi literaturowymi dotyczącymi miejsc wiązania leków, model Loewe'a powinien dawać najlepsze wyniki w przypadku fluoksetyny, flukonazolu, ketokonazolu, paroksetyny, oraz, prawdopodobnie, itrakonazolu, gdyż podobnie jak terfenadyna łączą się one z wewnętrzną domeną kanału hERG. Analogicznie model Blissa powinien dawać najlepsze wyniki w przypadku erytromycyny oraz, prawdopodobnie, klarytromycyny, które wiążą się od strony zewnętrznej komórki, do zewnętrznej domeny kanału hERG. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń nie potwierdzają tego założenia; w większości przypadków najlepsze, tj. najbardziej zbliżone do obserwacji klinicznych, wyniki dawał model prostej addycji.

Istotność wyboru modelu DDI sprawdzano również na poziomie indywidualnym. W prowadzonych we wczesnych etapach fazy klinicznej badaniach oceniających efekty działania leku na repolaryzację komórek serca (tzw. thorough QT study) granicę zmieniającą wnioski z oceny bezpieczeństwa leku stanowi średnie wydłużenie odstępu QT ok. 5 ms (potwierdzone górną granicą 95% przedziału ufności dla efektu średniego powyżej 10 ms). W poszczególnych badaniach odsetek pacjentów, w przypadku których różnica pomiędzy predykcjami poszczególnych modeli była większa lub równa od 5 ms, wahał się od 0-78%, w zależności od leku wchodzącego w interakcję. Istotne znaczenie mają jednak tylko te przypadki, w których wybór modelu zmienia wnioski odnośnie bezpieczeństwa leku (wynik badania TQT). Wyniki przedstawione w Tabeli 7, pokazują że odsetek przypadków, w których w zależności od wybranego modelu DDI próg bezpieczeństwa (wydłużenie QTcB o 5 ms) jest lub nie jest przekraczany jest niski. Ponadto różnice pomiędzy wartościami przewidzianymi przez trzy różne modele nie były istotnie statystyczne, co pozwala stwierdzić, że w przypadku braku synergii czy antagonizmu, dla klinicznej oceny bezpieczeństwa kardiologicznego kombinacji leków na poziomie populacji (średnie wartości dla grupy pacjentów) wybór modeli DDI nie ma znaczenia. Jednocześnie należy podkreślić, że wybór modelu DDI może mieć znaczący wpływ na wynik oceny bezpieczeństwa stosowania politerapii u indywidualnych pacjentów.

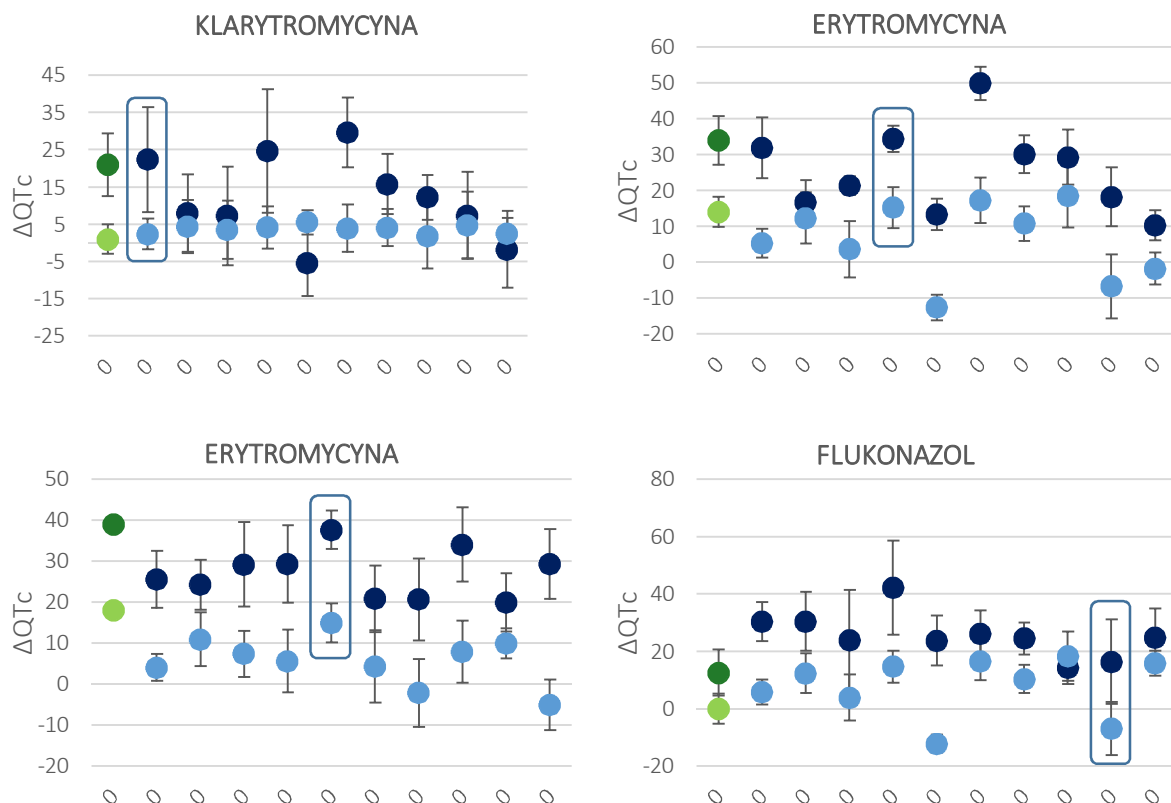
W celu oceny czy zaproponowany model QSTS, integrujący wiedzę z różnych dziedzin (w tym farmakologii, biologii systemów, elektrofizjologii/fizjologii i matematyki) z opartymi o fizjologię modelami farmakokinetycznymi (PBPK) oraz szczegółowymi biofizycznymi modelami kardiomiocytów ludzkiego serca, umożliwia predykcję elektrofizjologicznych konsekwencji interakcji lekowych terfenadyny, przeprowadzono serię wirtualnych doświadczeń [P5]. W celu oceny zmienności pomiędzy badaniami, dla każdego zidentyfikowanego wcześniej badania klinicznego przeprowadzono 10 odpowiadających wirtualnych prób. Uwzględniając wyniki opisanych wcześniej badań dotyczących wyboru modelu DDI, w symulacjach do wyliczenia całkowitego zahamowania prądu wywołanego zastosowaniem kombinacji leków, zastosowano model prostej addycji. Wyniki symulacji porównano z raportowanymi w badaniach klinicznych interakcji terfenadyny farmakodynamicznymi punktami końcowymi. Efekt farmakodynamiczny stosowania terfenadyny w monoterapii i w połączeniu z innymi lekami, podobnie jak w badaniach klinicznych, oceniano ilościowo poprzez ocenę zmiany długości odstępu QT skorygowanej o rytm serca metodą Bazetta [139]. Wyniki wirtualnych badań klinicznych przedstawia Tabela 9 oraz Wykres 8.

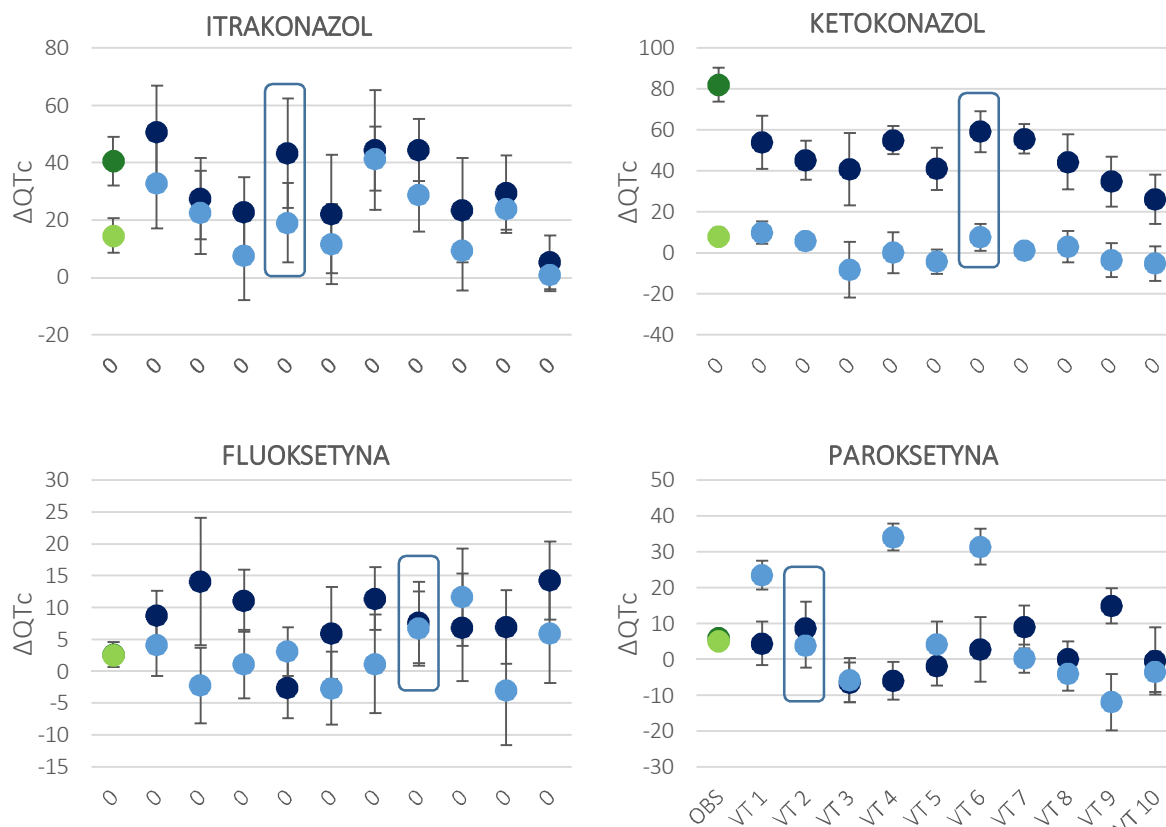
Tabela 9. Średnie przewidziane (z 10 wirtualnych badań) i obserwowane (raportowane w badaniu klinicznym) zmiany długości odstępu QTc dla terfenadyny oraz jej połączeń z innymi lekami.

Δ QTc [ms]		INHIBITOR							
		KLARYTROMYCINA	ERYTROMYCINA	ERYTROMYCINA	ITRAKONAZOL	KETOKONAZOL	FLUKONAZOL	FUOKSETYNA	PAROKSETYNA
Terfenadyna monoterapia	obserwowane	1	14	18	14	8	0	3	6
	przewidziane	12*	6	6	8	1	6	3	13
Terfenadyna +inhibitor	obserwowane	21	34	39	41	82	12.5	7	5
	przewidziane	14*	26	25	22	46	27	8	9

* Nie testowana – brak raportowanej wartości SEM

Wykres 8. Porównanie zmian długości odstępu QTcB (Δ QTc) symulowanych w 10 wirtualnych badaniach (BW) oraz obserwowanych w badaniach klinicznych (OBS). Ramką zaznaczono model najlepiej odwzorowujący dane kliniczne.





OBS – obserwowana w badaniu klinicznym wartość QTcB

VT n – wirtualne badanie

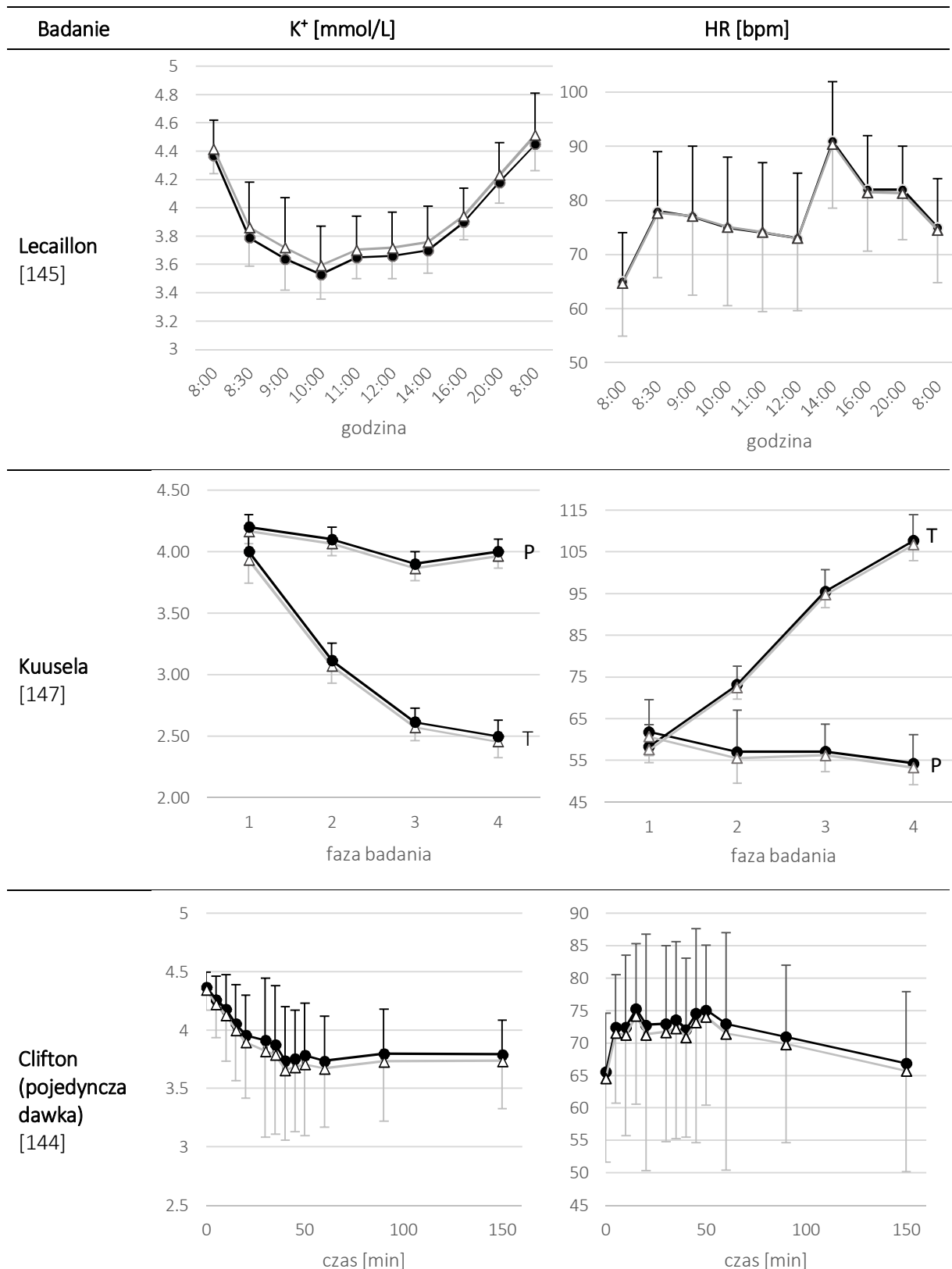
We wszystkich przypadkach, kombinacja opartych o fizjologię modeli farmakokinetycznych oraz farmakodynamicznych właściwie odtwarzała różnice pomiędzy monoterapią a stosowaniem terfenadyny w połączeniu z innym lekiem. Wartość średnia przewidzianego przez model wydłużenia odstępu QTc różniła się istotnie od średniej wartości obserwowanej w badaniach klinicznych (test t-Welcha na poziomie istotności 0.05) tylko dla badania z ketokonazolem. Symulacje prawidłowo odtworzyły także obserwowaną klinicznie znaczącą zmienność międzysobniczą (Wykres 8). W badaniach wirtualnych monoterapię terfenadyną skutkowało średnim wydłużeniem odstępu QTc w granicach 0-13 ms, co jest zgodne z wynikami obserwacji klinicznej (średnie wydłużenie 0-18 ms). Ograniczenia stworzonego modelu QSTS przedyskutowano w publikacji [P5]. Pomimo wielu czynników mogących wprowadzać niepewność do modelu, po zoptymalizowaniu parametrów niepewnych lub brakujących, zaproponowany model QSTS umożliwia wiarygodną ekstrapolację wyników doświadczeń in vitro do sytuacji klinicznej i pozwala przewidzieć kliniczne konsekwencje interakcji lekowych.

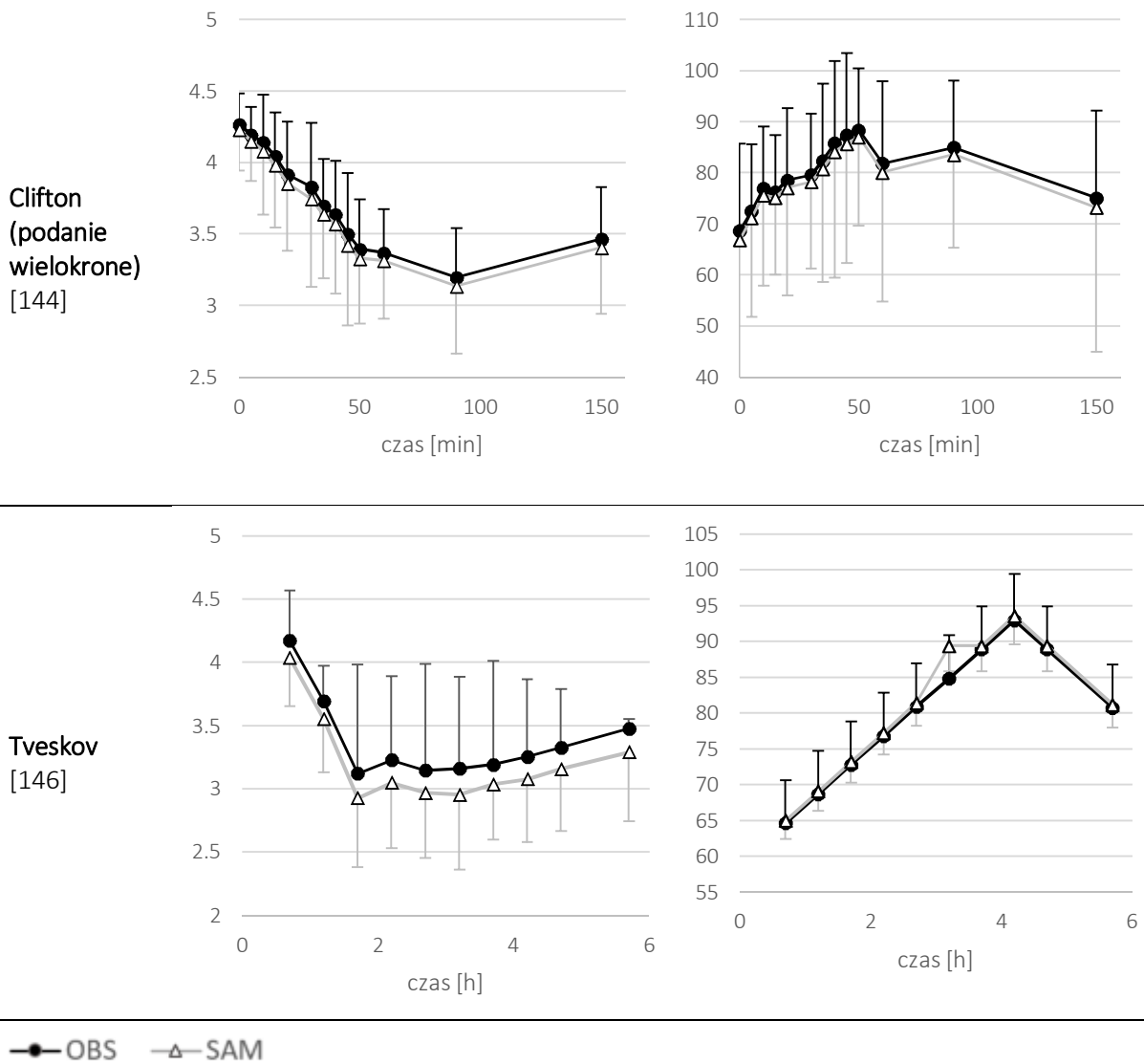
2.5.3. Modelowanie i symulacje efektów elektrofizjologicznych interakcji leków i choroby

Przedstawione powyżej badania pierwotnie koncentrowały się na modelowaniu interakcji leku z wieloma celami (kanałami jonowymi). Problem ten został następnie rozszerzony w kierunku modelowania interakcji wielu leków między sobą oraz wielu leków z wieloma kanałami równocześnie. W warunkach klinicznych dodatkowym czynnikiem, który może wchodzić w interakcje z prowadzoną u pacjenta farmakoterapią i modyfikować indywidualne ryzyko proarytmii, jest stan zdrowotny (choroba).

Interakcja lek-choroba (DDisI) występuje, gdy (1) schorzenie pacjenta wpływa na aktywność i/lub bezpieczeństwo leku, lub (2) gdy lek nasila występujące u pacjenta objawy chorobowe, lub (3) powoduje chorobę czy zmiany fizjologii modyfikujące jego (lub innych równocześnie stosowanych leków) farmakokinetykę i farmakodynamikę. Wystąpieniu kardiologicznych objawów niepożądanych farmakoterapii, takich jak wydłużenie odstępu QT i ryzyko arytmii typu TdP, mogą sprzyjać m.in. niektóre chory i leki, które powodują zaburzenia równowagi elektrolitowej lub zaburzenia rytmu serca. Hipokalcemia, hipomagnezemia, a zwłaszcza hipokalemia, prowadzą do przedłużenia repolaryzacji komórek mięśnia sercowego [140–143], co stanowi dodatkowy czynnik rozwoju arytmii, zwłaszcza u pacjentów z wrodzonymi zaburzeniami rytmu serca czy stosującymi leki wydłużające odstęp QT. Z tego względu, spowodowane lekiem lub stanem chorobowym zaburzenia równowagi elektrolitowej powinny być wzięte pod uwagę w modelowaniu i predykcji ryzyka proarytmii. Jako kontynuację poprzednich prac przeprowadzono ocenę użyteczności metod modelowania i symulacji QSTS dla przewidywania wpływu interakcji lek-choroba (definiowana jako zmiana parametrów fizjologicznych, np. zaburzenia homeostazy potasu w organizmie) na odstęp QT [P8]. W celu zgromadzenia danych klinicznych koniecznych do przeprowadzenia i oceny wyników symulacji przeszukiwano bibliograficzne bazy danych (PubMed, Google Scholar). Zastosowana strategia wyszukiwania wraz z kryteriami włączenia wyłoniła cztery publikacje [144–147]. Wirtualne badania przeprowadzono z wykorzystaniem platformy CSS według metodyki opracowanej w poprzednio opisanych eksperymentach [P5, P6, P7]. Uwzględnienie w symulacji obserwowanej zmienności stężeń potasu i rytmu serca (HR, przeliczonego na częstotliwość pobudzeń RR) wymagało symulowania każdego punktu czasowego (lub fazy badania) osobno. Indywidualne wartości stężeń potasu i rytmu serca dla pacjentów z badanej populacji były próbkowane losowo na podstawie raportowanej w badaniach klinicznych wartości średniej parametrów i ich zmienności (współczynnik zmienności – ang. coefficient of variation; CV). Wartości IC_{50} dla poszczególnych kanałów jonowych dla formoterolu i terbutaliny zostały przewidziane z wykorzystaniem stworzonych modeli enhanced QSAR [P1, P2, P3] ze względu na brak literaturowych danych doświadczalnych. Osiągane w badaniach aktywne stężenia obydwu leków były niższe o przynajmniej dwa rzędy wielkości od wartości IC_{50} , stąd nie oczekiwano zmian QT wynikających z blokowania kanału hERG. Zgodnie z założeniem, model nie przewidywał zahamowania prądu potasowego, a obserwowane zmiany odstępu QT były konsekwencją zmian stężeń potasu wywołanych podawaniem leku. Przedstawione na wykresach, w publikacjach raportujących wyniki badań klinicznych, dane dotyczące średnich stężeń potasu oraz profile zmian QT i HR zostały, zdigitalizowane, a indywidualne dla uczestników badania wartości parametrów losowo wybrane w systemie CSS. W badaniu przeprowadzonym przez Tveskova i wsp. [41] raportowane były tylko wartości wyjściowe i maksymalne rytmu serca; wartości HR dla poszczególnych punktów czasowych wyznaczono za pomocą interpolacji liniowej pomiędzy tymi wartościami. Wyniki próbkowania HR i stężeń potasu dowodzą poprawności zastosowanej metody (Wykres 9).

Wykres 9. Wyniki próbkowania stężeń potasu (SD) oraz HR (SD) dla raportowanych w badaniach klinicznych punktów. OBS – wartości obserwowane w badaniu klinicznym, SAM – wartości z próbkowania z rozkładu zmiennej o zadanym współczynniku zmienności (CV). Oś X – punkty raportowane w badaniu klinicznym, oś Y – stężenie potasu [mmol/L] lub HR [bpm], P – faza placebo, T – podanie terbutaliny.

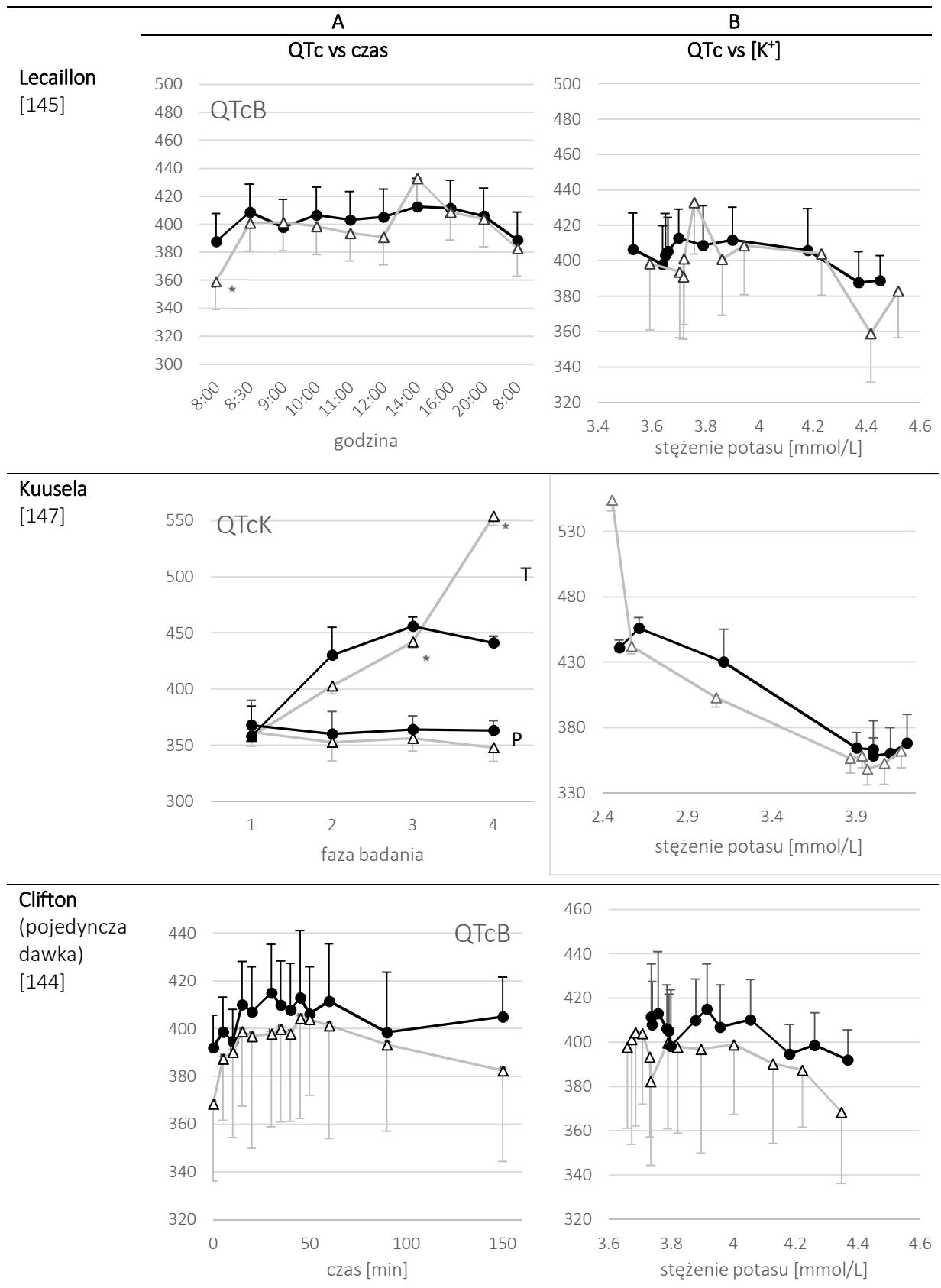


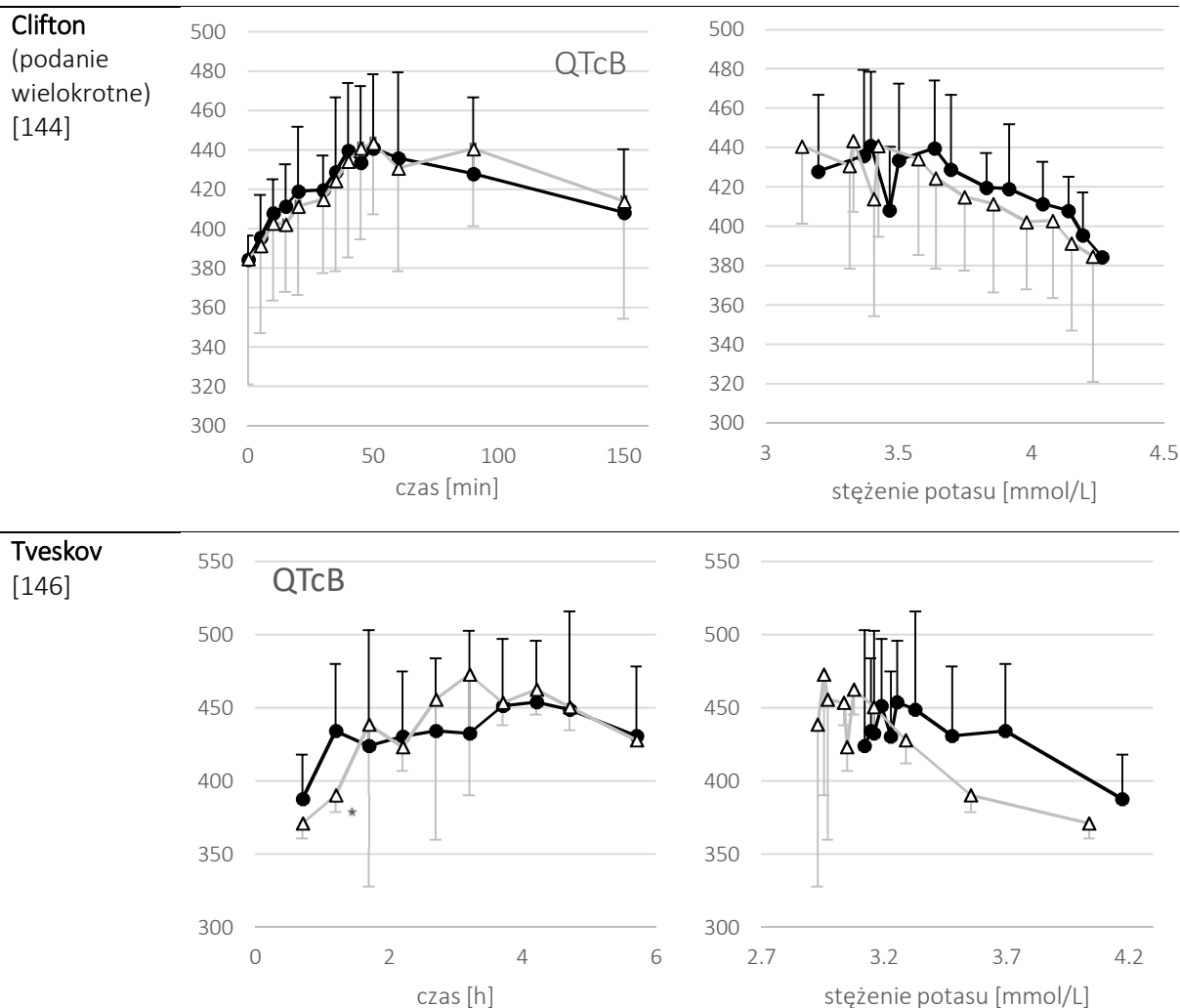


OBS – wartości obserwowane w badaniu klinicznym values; SAM – wartości próbkowane. Oś X – raportowane punkty badania; oś Y – stężenie potasu [mmol/L] lub HR [bpm]; P – faza placebo, T – podanie terbutaliny.

Na podstawie wygenerowanych zapisów pseudo-EKG dla indywidualnych pacjentów (z losowo przypisanym HR i stężeniem potasu) wyliczono wartości QT, indywidualne dla wszystkich uczestników badania oraz średnią (wraz z odchyleniem standardowym) dla próby badanej. Podczas analizy wyników symulacji do obliczenia wartości QTc stosowano taką samą metodę korekcji jak w odpowiadającym badaniu klinicznym, tj. metodę Bazetta [139] w raporcie Cliftona, [144], Lecailona [145], i Tveskova [146] oraz metodę Karjalainena [148] w badaniu Kuusela [147]. Wyniki wirtualnych badań odtwarzają zmiany długości odstępu QTc zmierzone u pacjentów a także obserwowaną zmienność międzypersonalną (Wykres 10).

Wykres 10. Obserwowane i przewidziane wartości zmian QTc dla punktów czasowych lub faz badania (panel A) oraz stężenia potasu (panel B). Oś X – korygowany o rytm serca odstęp QT [ms], koła – wartości obserwowane, trójkąty – wartości przewidziane, P – faza placebo, T – podanie terbutaliny.





Oś Y – korygowany o rytm serca odstęp QT [ms]; koła – wartości obserwowane; trójkąty – wartości przewidziane; P – faza placebo, T – podanie terbutaliny.

Zmiana odstępu QTc była skorelowana ze stężeniem potasu zarówno w badaniach klinicznych jak i symulacjach (współczynnik korelacji, $r = 0.6$, w badaniu Lecaillona $r=0.55$). Wyniki te dowodzą, że model umożliwia odtworzenie w wirtualnym środowisku mechanizmu zaburzeń elektrofizjologicznych, tj. obniżenia stężenia potasu w osoczu. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że modelowanie i symulacja może być cennym narzędziem pozwalającym ilościowo ocenić wpływ, spowodowanych elektrofizjologicznie nieaktywnymi, niekardiologicznymi lekami, zmian stężenia potasu i rytmu serca. Można również zakładać, że możliwa jest symulacja efektów zmian spowodowanych także innymi czynnikami, jak choroba, nawyki żywieniowe czy utrata płynów fizjologicznych.

2.6. Podsumowanie

Metody obliczeniowe stanowią integralną część procesu odkrywania i rozwoju leków, są także wykorzystywane do celów rejestracyjnych [63, 149–153]. Ze względu na potencjalne konsekwencje społeczne, ekonomiczne i zagrożenie dla indywidualnych pacjentów, dużo uwagi ze strony przemysłu, organów regulatorowych i środowisk naukowych, poświęcane jest problemowi interakcji lekowych.

Przeprowadzone i przedstawione powyżej badania, stanowiące podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego, miały na celu stworzenie hybrydowego modelu łączącego różne techniki modelowania – empiryczne (QSAR) i mechanistyczne (PBPK i Quantitative Systems Toxicology and Safety) pozwalającego na ocenę elektrofizjologicznych efektów stosowania wielu jednocześnie stosowanych leków na różnych etapach procesu ich rozwoju. Stworzony system oferuje możliwości analizy zagadnień trudnych lub niemożliwych do analizy w badaniach przedklinicznych i klinicznych ze względu na problemy natury technicznej, merytorycznej czy etycznej. Opisany model umożliwia analizę różnych scenariuszy klinicznych, pozwalając na wczesną identyfikację potencjalnych interakcji lekowych i ocenę prawdopodobieństwa poważnych działań niepożądanych. Zastosowanie opracowanego modelu w procesie decyzyjnym podczas rozwoju leku może być cenne z punktu widzenia czasu jego trwania i kosztów. System składa się ze zbioru czterech modeli enhanced QSAR wywołanej lekiem inhibicji kanałów jonowych [P1, P2, P3] oraz metodologii oceny interakcji lek-lek [P4, P5, P6, P7] i lek-choroba [P8] na poziomie kanałów jonowych i w warunkach klinicznych. Model może znaleźć zastosowanie już we wczesnych fazach prac nad lekiem, ze względu na możliwość predykcji zmian odstępu QT na podstawie struktury chemicznej cząsteczki z wykorzystaniem modeli QSAR. W miarę postępu prac nad lekiem, model może być wzbogacany o dane eksperymentalne. Gdy w procesie rozwoju leku zostaną wygenerowane dane z doświadczeń in vitro oceniających jego bezpieczeństwo kardiologiczne i zgromadzona zostanie odpowiednia wiedza na temat farmakokinetyki leku i jego metabolitów, model umożliwia symulację badań klinicznych i wiarygodne szacowanie ryzyka kardiologicznego w populacji.

3. Pozostałe osiągnięcia naukowe i dydaktyczne

3.1. Działalność naukowo-badawcza i dydaktyczna przed uzyskaniem stopnia doktora

Już podczas studiów magisterskich moje zainteresowania koncentrowały się na zastosowaniach narzędzi modelowania matematycznego i inteligencji obliczeniowej w naukach farmaceutycznych. W 2005 roku dołączyłam do koła naukowego Sztuczne Sieci Neuronowe w Technologii Postaci Leku, prowadzonego przez dr. Aleksandra Mendyka w Katedrze Technologii Postaci Leku i Biofarmacji. Prace związane z zastosowaniem sztucznych sieci neuronowych do modelowania i analizy danych realizowane w ramach koła naukowego w maju 2006 sfinalizowała obrona pracy magisterskiej pt. „Rozbudowa neuronowego systemu ME_expert do przewidywania składów mikroemulsji”. Po ukończeniu obowiązkowego stażu w aptece ogólnodostępnej zostałam zatrudniona w Pracowni Farmakoepidemiologii i Farmakoekonomiki (2007) na stanowisku asystenta. Od tego czasu moja aktywność naukowa obejmowała tematykę modelowania i symulacji w naukach farmaceutycznych oraz opieki farmaceutycznej. Jestem autorem lub współautorem kilku publikacji naukowych oraz doniesień konferencyjnych z dziedziny opieki farmaceutycznej i doradztwa w samoleczeniu [154–159] oraz analizy zjawiska compliance pacjentów [160, 161]. Jestem także współautorem podręcznika opieki farmaceutycznej dla studentów farmacji [162]. W latach 2007-2010 byłam kierownikiem finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego projektu dotyczącego oceny compliance w terapii nadciśnienia i hipercholesterolemii na podstawie danych refundacyjnych gromadzonych przez Narodowy Fundusz Zdrowia. Kilkakrotnie uczestniczyłam w organizacji konferencji z zakresu opieki farmaceutycznej (Załącznik 3). Do moich podstawowych obowiązków dydaktycznych należało przygotowanie i prowadzenie zajęć dla studentów studiów magisterskich z przedmiotów: opieka farmaceutyczna, farmacja praktyczna, prawo farmaceutyczne, farmakoekonomika oraz higiena i epidemiologia. W okresie od 2008 do 2012 zrealizowałam ogółem 1001 godzin zajęć ze studentami (wymagane pensum 771). Moja dodatkowa działalność dydaktyczna obejmowała prowadzenie szkoleń i wykładów, głównie z zakresu opieki farmaceutycznej i prawa farmaceutycznego, na kursach podyplomowych (specjalizacja z farmacji aptecznej) oraz szkoleniach, w tym internetowych publikowanych w serwisie e-dukacja.pl i e-farmacja.net, prowadzonych w ramach kształcenia ustawicznego farmaceutów. Byłam także trenerem na zorganizowanym przez firmę Regulatory Affairs Doradztwo kursie dotyczącym poszukiwania i zarządzania danymi naukowymi dla pracowników działu medycznego firmy Roche Polska.

Od roku 2009, jestem członkiem nieformalnego, interdyscyplinarnego zespołu, którego prace koncentrują się na toksykologii obliczeniowej, a dokładniej na problemie potencjalnego działania proarytmicznego leków. Byłam wykonawcą w finansowanym przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, którego celem było opracowanie modelu interakcji leków z kanałem potasowym hERG. Kilkakrotnie uczestniczyłam także jako wykładowca i współorganizator w warsztatach naukowych Computational Pharmacy Workshops, mających na celu popularyzację stosowania narzędzi toksykologii obliczeniowej w naukach farmaceutycznych. W latach 2010 do 2012 byłam wykonawcą w projekcie "Computational Toxicology - an in vitro extrapolation platform - in vivo of a cardiotoxic effect" w ramach programu LIDER finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju (NCBiR). Efektem prac

zespołu było opracowanie systemu (Cardiac Safety Simulator - CSS) wspomagającego proces badań i rozwoju leków, który został następnie skomercjalizowany przez firmę Certara. Jednym z elementów projektu była opracowana i opublikowana baza danych udostępniająca informacje dotyczące substancji o potencjale blokowania prądu hERG [66, 67]. Analiza zgromadzonych danych zaowocowała opracowaniem współczynników ekstrapolacji wartości IC_{50} leków otrzymanych w różnych warunkach eksperymentalnych na warunki standardowe (model HEK, temperatura fizjologiczna) [72, 163]. Przygotowana baza danych stanowiła również punkt wyjścia dla dalszych badań, których część kontynuowana była również po uzyskaniu stopnia doktora, dotyczących modelowania zależności struktura-aktywność pomiędzy substancjami chemicznymi a inhibicją kanału hERG przy wykorzystaniu różnorodnych algorytmów analizy danych [68, 69, 164–167, 167–169]. Efektem prowadzonych w okresie przed uzyskaniem stopnia doktora prac było 10 doniesień konferencyjnych [164–173], 11 publikacji naukowych [67–69, 71, 72, 163, 174–178] oraz jeden rozdział książki [179] oraz obroniona w 2010 roku praca doktorska pt. „Modelowanie in silico proarytmicznego działania potencjalnych substancji leczniczych” i uzyskanie stopnia doktora nauk farmaceutycznych ze specjalizacją w dziedzinie toksykologii. W 2011 roku moje osiągnięcia naukowe zostały wyróżnione nagrodą Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJCM.

Podsumowanie dorobku naukowego przed uzyskaniem stopnia doktora:

Liczba publikacji: 16

Liczba doniesień konferencyjnych: 15

Całkowity impact factor (IF): 13.285

Suma punktów MNiSW: 184

3.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych moje obowiązki dydaktyczne zostały poszerzone o opiekę nad magistrantami i recenzowanie prac magisterskich; jestem także promotorem pomocniczym w dwóch przewodach doktorskich. Do moich obowiązków należy również współkoordynowanie zajęć z przedmiotu higiena i epidemiologia oraz przygotowanie materiałów, harmonogramów, regulaminów, aktualizacja sylabusów oraz udział w przygotowaniu i przeprowadzeniu zaliczeń z przedmiotu higiena i epidemiologia, farmakoekonomika, oraz prawa farmaceutycznego (do 2015). W okresie 2012 – 2018 przeprowadziłam ogółem 1508 godzin zajęć (wymagane pensum 1050) dla studentów studiów magisterskich kierunku Farmacja. Dodatkowo zaczęłam również prowadzić zajęcia dla studentów studiów podyplomowych „Badania Kliniczne Produktów leczniczych”. Od roku 2015 jestem kierownikiem tych studiów i odpowiadam za ich organizację, modyfikacje programu, aktualizację sylabusów i regulaminu, oraz przygotowanie i przeprowadzenie egzaminu końcowego oraz testu zaliczeniowego do wprowadzonego przeze mnie, akredytowanego przez organizację

TransCelerate Biopharma INC., szkolenia z zakresu Dobrej Praktyki Klinicznej (GCP). W tym roku byłam trenerem na kursie dla pracowników naukowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku dotyczącym zarządzania informacją medyczną organizowanym w ramach współfinansowanego przez Unię Europejską projektu POWER.

Moja aktywność naukowa po uzyskaniu stopnia doktora w dalszym ciągu związana była z modelowaniem kardi toksycznego działania leków, jednak zakres badań został znacznie poszerzony. Cel prowadzonych prac z budowy stosunkowo prostego systemu klasyfikacji ryzyka proarytmicznego został rozszerzony do znacznie bardziej kompleksowej oceny bezpieczeństwa kardiologicznego leków. W roku 2014 cykl prac poświęcony prezentacji platformy oceny potencjału kardi toksycznego substancji chemicznych został nagrodzony przez Wydział Medyczny Polskiej Akademii Nauk. Komercjalizacja wytworzonego w wyniku opisanych prac produktu (systemu CSS) pozwoliła zaplanować i utworzyć unikalne w skali Uniwersytetu laboratorium badań elektrofizjologicznych, dzięki czemu poszerzyłam swój warsztat badawczy. Wygenerowane w laboratorium dane z pomiarów elektrofizjologicznych *in vitro* wykorzystano w opisanym wcześniej procesie budowy modelu QSTS [P6, P7] [180–183].

Większość moich badań została przeprowadzona jako element projektu grantowego SONATA 6 (finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki) oraz sześciu projektów finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (w czterech z nich byłam kierownikiem projektu w pozostałych dwóch wykonawcą). Projekty te dotyczyły oceny czynników modyfikujących ryzyko działania proarytmicznego na poziomie populacji, w tym interakcji wielokanałowych leku, mutacji genów kodujących białka kanału hERG, interakcji lek-lek, oraz wywołanych farmakoterapią lub chorobą zaburzeń fizjologii (Załącznik 3). Wyniki prowadzonych prac zostały opublikowane oraz zaprezentowane na konferencjach międzynarodowych [P1-P8][17, 66, 130, 184–195]. Moje osiągnięcia naukowe zostały dwukrotnie, w 2014 i 2015 roku, nagrodzone nagrodą Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJCM.

Zdobyta podczas realizacji projektów wiedza oraz poczynione obserwacje zostały podsumowane w artykułach przeglądowych dotyczących zastosowania metod modelowania i symulacji w ocenie bezpieczeństwa kardiologicznego leków [196] problemów i trudności związanych z komputerowymi metodami jego predykcji [35], ze szczególnym uwzględnieniem roli zmienności międzyosobniczej [36, 197]. W opublikowanym w czasopiśmie Drug Discovery and Development [198] artykule przeglądowym przedyskutowano także problem braku standardów klasyfikacji dla potencjału działania proarytmicznego leków, co wydaje się szczególnie istotne ze względu na obecne zmiany paradygmatu oceny bezpieczeństwa kardiologicznego leków, w którym modele matematyczne i metody *in silico* odgrywają ważną rolę. Jako głos w aktualnej dyskusji dotyczącej użyteczności badań TQT jako narzędzia predykcji proarytmii opublikowano pracę, w której oceniono korelację pomiędzy wynikami badań TQT a rzeczywistym ryzykiem arytmii TdP w populacji [199].

Od stycznia 2018 jestem zaangażowana w realizowany we współpracy z Bundesinstitut für Risikobewertung projekt, którego celem jest budowa modelu PBPK przezskórnego wchłaniania chemikaliów z matrycy stałych.

Podsumowanie dorobku naukowego po uzyskaniu stopnia doktora:

Liczba publikacji: 27

Liczba doniesień konferencyjnych: 27

Całkowity impact factor (IF): 59.428

Suma punktów MNiSW: 569

3.3. Podsumowanie dorobku naukowego

Na mój całkowity dorobek naukowy składa się (dane na 01.06.2018):

- publikacji oryginalnych i poglądowe: 34
- rozdziałów w pracach zbiorowych: 5
- doniesień zjazdowych na konferencjach polskich i zagranicznych: 42
- publikacji popularnonaukowych: 3

Sumarycznie:

- IF = 72.713
- punkty MNiSW = 753
- indeks Hirscha = 8
- cytowania: 237

4. Piśmiennictwo

1. Lavery H, Benson C, Cartwright E, Cross M, i in. (2011) How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br J Pharmacol* 163:675–693. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01255.x
2. Redfern WS, Ewart L, Hammond TG, Bialecki R, i in. (2010) Impact and frequency of different toxicities throughout pharmaceutical life cycle. *The Toxicologist* S1:1081.
3. ICH 2005 Guidance for Industry S7B Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals.
4. ICH 2005 (2005) Guidance for Industry. E14 Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Non-Antiarrhythmic Drugs.
5. Suessbrich H, Waldegger S, Lang F, Busch AE (1996) Blockade of HERG channels expressed in *Xenopus* oocytes by the histamine receptor antagonists terfenadine and astemizole. *FEBS Lett* 385:77–80
6. Roy M, Dumaine R, Brown AM (1996) HERG, a primary human ventricular target of the non-sedating antihistamine terfenadine. *Circulation* 94:817–823.
7. Brown AM (2005) HERG block, QT liability and sudden cardiac death. *Novartis Found Symp* 266:118–31; discussion 131-5, 155–8.
8. Committee for Proprietary Medicinal Products (1997) Point to consider: the assessment of the potential for QT interval prolongation by non cardiovascular medicinal products.
9. Heist EK, Ruskin JN (2005) Drug-induced proarrhythmia and use of QTc prolonging agents: Clues for clinicians. *Heart Rhythm* 2:S1–S8.
10. Heist EK, Ruskin JN (2010) Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine. Drug-Induced Arrhythmia. *Circulation* 122:1426–1435. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.894725
11. Trinkley KE, Page RL, Lien H, Yamanouye K, Tisdale JE (2013) QT interval prolongation and the risk of torsades de pointes: essentials for clinicians. *Curr Med Res Opin* 29:1719–1726. doi: 10.1185/03007995.2013.840568
12. Tisdale JE (2016) Drug-induced QT interval prolongation and torsades de pointes. *Can Pharm J CPJ* 149:139–152. doi: 10.1177/1715163516641136
13. Li M, Ramos LG (2017) Drug-Induced QT Prolongation And Torsades de Pointes. *Pharmacy and Therapeutics* 43(7): 473–477.
14. De Ponti F, Poluzzi E, Montanaro N (2000) QT-interval prolongation by non-cardiac drugs: lessons to be learned from recent experience. *Eur J Clin Pharmacol* 56:1–18.
15. Gintant GA, Su Z, Martin RL, Cox BF (2006) Utility of hERG assays as surrogate markers of delayed cardiac repolarization and QT safety. *Toxicol Pathol* 34:81–90. doi: 10.1080/01926230500431376
16. Pugsley MK, Hancox JC, Curtis MJ (2008) Perception of validity of clinical and preclinical methods for assessment of torsades de pointes liability. *Pharmacol Ther* 119:115–117. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.004
17. Polak S, Pugsley MK, Stockbridge N, Garnett C, Wiśniowska B (2015) Early Drug Discovery Prediction of Proarrhythmia Potential and Its Covariates. *AAPS J* 17:1025–1032. doi: 10.1208/s12248-015-9773-1
18. Shah RR (2002) Drug-induced prolongation of the QT interval: regulatory dilemmas and implications for approval and labelling of a new chemical entity. *Fundam Clin Pharmacol* 16:147–156. doi: 083 [pii]

19. Gintant G, Sager PT, Stockbridge N (2016) Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat Rev Drug Discov* 15:457–471. doi: 10.1038/nrd.2015.34
20. Letsas KP, Tsirikas S, Letsas GP, Sideris A (2011) Drug-Induced Proarrhythmia: QT Interval Prolongation and Torsades de Pointes. *Hosp Chron* 6:118–122.
21. Hondeghem LM, Carlsson L, Duker G (2001) Instability and triangulation of the action potential predict serious proarrhythmia, but action potential duration prolongation is antiarrhythmic. *Circulation* 103:2004–2013
22. Martin RL, McDermott JS, Salmen HJ, Palmatier J, i in. (2004) The utility of hERG and repolarization assays in evaluating delayed cardiac repolarization: influence of multi-channel block. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:369–379. doi: 00005344-200403000-00007 [pii]
23. Mirams GR, Cui Y, Sher A, Fink M, i in. (2011) Simulation of multiple ion channel block provides improved early prediction of compounds' clinical torsadogenic risk. *Cardiovasc Res* 91:53–61. doi: 10.1093/cvr/cvr044
24. Lee JH, Park YH, Kim JT, Kim CS, Kim HS (2014) The effect of sevoflurane and ondansetron on QT interval and transmural dispersion of repolarization in children. *Paediatr Anaesth* 24:421–425. doi: 10.1111/pan.12339
25. January CT, Riddle JM (1989) Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type Ca²⁺ current. *Circ Res* 64:977–990.
26. Szabo B, Sweidan R, Rajagopalan C, Lazzara R (1994) Role of Na⁺ : Ca²⁺ Exchange Current in Cs⁺ - Induced Early Afterdepolarizations in Purkinje Fibers. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5:933–944.
27. Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, i in. (1996) Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation* 94:1996–2012
28. Sager PT, Gintant G, Turner JR, Pettit S, Stockbridge N (2014) Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. *Am Heart J* 167:292–300. doi: 10.1016/j.ahj.2013.11.004
29. Hanson LA, Bass AS, Gintant G, Mittelstadt S, i in. (2006) ILSI-HESI cardiovascular safety subcommittee initiative: evaluation of three non-clinical models of QT prolongation. *J Pharmacol Toxicol Methods* 54:116–129. doi: 10.1016/j.vascn.2006.05.001
30. Cavero I, Holzgrefe H (2014) Comprehensive in vitro Proarrhythmia Assay, a novel in vitro/in silico paradigm to detect ventricular proarrhythmic liability: a visionary 21st century initiative. *Expert Opin Drug Saf* 13:745–758. doi: 10.1517/14740338.2014.915311
31. Pugsley MK, Dalton JA, Authier S, Curtis MJ (2014) Safety pharmacology in 2014: new focus on non-cardiac methods and models. *J Pharmacol Toxicol Methods* 70:170–174. doi: 10.1016/j.vascn.2014.08.004
32. De Bruin ML, Pettersson M, Meyboom RH, Hoes AW, Leufkens HG (2005) Anti-HERG activity and the risk of drug-induced arrhythmias and sudden death. *Eur Heart J* 26:590–597. doi: 10.1093/eurheartj/ehi092
33. Roden DM (2004) Drug-induced prolongation of the QT interval. *N Engl J Med* 350:1013–1022. doi: 10.1056/NEJMra032426
34. Zeltser D, Justo D, Halkin A, Prokhorov V, i in. (2003) Torsade de pointes due to noncardiac drugs: most patients have easily identifiable risk factors. *Medicine (Baltimore)* 82:282–290. doi: 10.1097/01.md.0000085057.63483.9b

35. Wiśniowska B, Mendyk A, Fijorek K, Polak S (2014) Computer-based prediction of the drug proarrhythmic effect: problems, issues, known and suspected challenges. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol* 16:724–735. doi: 10.1093/europace/euu009
36. Polak S, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, Mendyk A (2014) In vitro-in vivo extrapolation of drug-induced proarrhythmia predictions at the population level. *Drug Discov Today* 19:275–281. doi: 10.1016/j.drudis.2013.10.009
37. Schwartz PJ, Woosley RL (2016) Predicting the Unpredictable: Drug-Induced QT Prolongation and Torsades de Pointes. *J Am Coll Cardiol* 67:1639–1650. doi: 10.1016/j.jacc.2015.12.063
38. Wysowski DK, Corken A, Gallo-Torres H, Talarico L, Rodriguez EM (2001) Postmarketing reports of QT prolongation and ventricular arrhythmia in association with cisapride and Food and Drug Administration regulatory actions. *Am J Gastroenterol* 96:1698–1703. doi: S0002-9270(01)02490-X [pii]
39. Prosser JM, Mills A, Rhim ES, Perrone J (2008) Torsade de pointes caused by polypharmacy and substance abuse in a patient with human immunodeficiency virus. *Int J Emerg Med* 1:217–220. doi: 10.1007/s12245-008-0052-0
40. Cocco G, Jerie P (2015) Torsades de pointes induced by the concomitant use of ivabradine and azithromycin: an unexpected dangerous interaction. *Cardiovasc Toxicol* 15:104–106. doi: 10.1007/s12012-014-9274-y
41. Shaffer D, Singer S, Korvick J, Honig P (2002) Concomitant risk factors in reports of torsades de pointes associated with macrolide use: review of the United States Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 35:197–200. doi: CID011407 [pii]
42. Hajjesmaeili M, Afzal G, Z Z (2017) Poly Pharmacy-Induced Long-QT Syndrome and Torsades de Pointes: A Case Report. *J Pharm Care Health Syst* 04:. doi: 10.4172/2376-0419.1000174
43. Zeuli JD, Wilson JW, Estes LL (2013) Effect of combined fluoroquinolone and azole use on QT prolongation in hematology patients. *Antimicrob Agents Chemother* 57:1121–1127. doi: 10.1128/AAC.00958-12
44. van der Sijs H, Kowlesar R, Klootwijk AP, Nelwan SP, i in. (2009) Clinically relevant QTc prolongation due to overridden drug-drug interaction alerts: a retrospective cohort study. *Br J Clin Pharmacol* 67:347–354. doi: 10.1111/j.1365-2125.2008.03357.x
45. Katoh T, Saitoh H, Ohno N, Tateno M, i in. (2003) Drug interaction between mosapride and erythromycin without electrocardiographic changes. *Jpn Heart J* 44:225–234.
46. Boyce MJ, Baisley KJ, Warrington SJ (2012) Pharmacokinetic interaction between domperidone and ketoconazole leads to QT prolongation in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Br J Clin Pharmacol* 73:411–421. doi: 10.1111/j.1365-2125.2011.04093.x
47. Zhao S, Nishimura T, Chen Y, Azeloglu EU, i in.(2013) Systems pharmacology of adverse event mitigation by drug combinations. *Sci Transl Med* 5:206ra140. doi: 10.1126/scitranslmed.3006548
48. Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, i in. (2003) Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 58:32–45.
49. Hancox JC, McPate MJ, El Harchi A, Zhang YH (2008) The hERG potassium channel and hERG screening for drug-induced torsades de pointes. *Pharmacol Ther* 119:118–132. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.05.009
50. Curtis LH, Ostbye T, Sendersky V, Hutchison S, i in. (2003) Prescription of QT-prolonging drugs in a cohort of about 5 million outpatients. *Am J Med* 114:135–141.

51. Vicente J, Zusterzeel R, Johannesen L, Mason J, i in. (2018) Mechanistic Model-Informed Proarrhythmic Risk Assessment of Drugs: Review of the “CiPA” Initiative and Design of a Prospective Clinical Validation Study. *Clin Pharmacol Ther* 103:54–66. doi: 10.1002/cpt.896
52. Colatsky T, Fermini B, Gintant G, Pierson JB, i in. (2016) The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative — Update on progress. *J Pharmacol Toxicol Methods*. doi: 10.1016/j.vascn.2016.06.002
53. Vicente J, Stockbridge N, Strauss DG (2016) Evolving regulatory paradigm for proarrhythmic risk assessment for new drugs. *J Electrocardiol* 49:837–842. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2016.07.017
54. FDA (2012) Guidance for Industry. Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations.
55. Hinder M (2010) Pharmacodynamic Drug-Drug Interactions. In: Vogel HG, Maas J, Gebauer A (eds) *Drug Discovery and Evaluation: Methods in Clinical Pharmacology*. Springer Science & Business Media, pp 367–376.
56. EMA (2015) Guideline on the investigation of drug interactions. European Medicines Agency.
57. Androulakis IP (2016) Quantitative Systems Pharmacology: A Framework for Context. *Curr Pharmacol Rep* 2:152–160. doi: 10.1007/s40495-016-0058-x
58. FDA Center for Drug Evaluation and Research Clinical Pharmacology (2013) Review for Natpara (rhPTH[1-84]) for injection. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/125511Orig1s000ClinPharmR.pdf
59. Sorger PK, Allerheiligen SR, Abernethy DR, Altman RB, i in. (2011) Quantitative and systems pharmacology in the post-genomic era: new approaches to discovering drugs and understanding therapeutic mechanisms. NIH Bethesda, pp 1–48
60. EMA CHMP (2017) ICH E11 (R1) guideline on clinical investigation of medicinal products in the pediatric population, EMA/CPMP/ICH/2711/1999
61. EMA CHMP (2016) Guideline on the qualification and reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation. Draft. London, UK
62. FDA Voice (2017) How FDA Plans to Help Consumers Capitalize on Advances in Science.
63. Gobburu JVS, Lesko LJ (2009) Quantitative disease, drug, and trial models. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:291–301. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145613
64. Raschi E, Ceccarini L, De Ponti F, Recanatini M (2009) hERG-related drug toxicity and models for predicting hERG liability and QT prolongation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:1005–1021. doi: 10.1517/17425250903055070
65. Jing Y, Easter A, Peters D, Kim N, Enyedy IJ (2015) In silico prediction of hERG inhibition. *Future Med Chem* 7:571–586. doi: 10.4155/fmc.15.18
66. Polak S, Wiśniowska B, Glinka A, Polak M (2012) Tox-database.net: a curated resource for data describing chemical triggered in vitro cardiac ion channels inhibition. *BMC Pharmacol Toxicol* 13:6-6511-13–6. doi: 10.1186/2050-6511-13-6
67. Polak S, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, i in. (2011) The open-access dataset for insilico cardiotoxicity prediction system. *Bioinformatics* 6:244–245.
68. Wiśniowska B, Mendyk A, Polak M, Szlek J, Polak S (2010) RandomForest based assessment of the hERG channel inhibition potential for the early drug cardiotoxicity testing. *Bio-Algorithms Med-Syst* 6:131–136.

69. Polak S, Wiśniowska B, Ahamadi M, Mendyk A (2011) Prediction of the hERG potassium channel inhibition potential with use of Artificial Neural Networks. *Appl Soft Comput* 11:2611–2617.
70. Obiol-Pardo C, Gomis-Tena J, Sanz F, Saiz J, Pastor M (2011) A multiscale simulation system for the prediction of drug-induced cardiotoxicity. *J Chem Inf Model* 51:483–492. doi: 10.1021/ci100423z
71. Polak S, Wiśniowska B, Brandys J (2009) Collation, assessment and analysis of literature in vitro data on hERG receptor blocking potency for subsequent modeling of drugs' cardiotoxic properties. *J Appl Toxicol JAT* 29:183–206. doi: 10.1002/jat.1395
72. Wiśniowska B, Polak S (2009) hERG in vitro interchange factors--development and verification. *Toxicol Mech Methods* 19:278–284. doi: 10.1080/15376510902777194
73. Witchel HJ, Milnes JT, Mitcheson JS, Hancox JC (2002) Troubleshooting problems with in vitro screening of drugs for QT interval prolongation using HERG K⁺ channels expressed in mammalian cell lines and *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 48:65–80. doi: 10.1016/S1056-8719(03)00041-8
74. Shah RR, Hondeghem LM (2005) Refining detection of drug-induced proarrhythmia: QT interval and TRLaD. *Heart Rhythm Off J Heart Rhythm Soc* 2:758–772. doi: S1547-5271(05)01445-1 [pii]
75. Ermondi G, Visentin S, Caron G (2009) GRIND-based 3D-QSAR and CoMFA to investigate topics dominated by hydrophobic interactions: the case of hERG K⁺ channel blockers. *Eur J Med Chem* 44:1926–1932. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.11.009
76. Thai KM, Ecker GF (2008) A binary QSAR model for classification of hERG potassium channel blockers. *Bioorg Med Chem* 16:4107–4119. doi: 10.1016/j.bmc.2008.01.017
77. Wang S, Li Y, Wang J, Chen L, i in. (2012) ADMET evaluation in drug discovery. 12. Development of binary classification models for prediction of hERG potassium channel blockage. *Mol Pharm* 9:996–1010. doi: 10.1021/mp300023x
78. Seierstad M, Agrafiotis DK (2006) A QSAR model of HERG binding using a large, diverse, and internally consistent training set. *Chem Biol Drug Des* 67:284–296. doi: 10.1111/j.1747-0285.2006.00379.x
79. Waring MJ, Johnstone C (2007) A quantitative assessment of hERG liability as a function of lipophilicity. *Bioorg Med Chem Lett* 17:1759–1764. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.12.061
80. Yap CW (2011) PaDEL-descriptor: an open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints. *J Comput Chem* 32:1466–1474. doi: 10.1002/jcc.21707
81. Bolton E, Wang Y, Thiessen P, Bryant S (2008) PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. In: Chapter 12 IN Annual Reports in Computational Chemistry. American Chemical Society, Washington, DC, USA
82. ChemAxon <https://chemaxon.com/>
83. Żurada JM, Malinowski A, Usui S Perturbation method for deleting redundant inputs of perceptron networks. *Neurocomputing* 14(2): 177-193.
84. Mendyk A, Kleinebudde P, Thommes M, Yoo A, i in. Analysis of pellet properties with use of artificial neural networks. *Eur J Pharm Sci.* 41(3-4):421-429.
85. Szlęk J, Paclawski A, Lau R, Jachowicz R, Mendyk A (2013) Heuristic modeling of macromolecule release from PLGA microspheres. *Int J Nanomedicine* 8:4601–4611.
86. Mendyk A, Jachowicz R (2005) Neural network as a decision support system in the development of pharmaceutical formulation—focus on solid dispersions. *Expert Syst Appl* 28:285–294. doi: 10.1016/j.eswa.2004.10.007

87. Cannon AJ monmlp: Monotone multi-layer perceptron neural network. <https://cran.r-project.org/web/packages/monmlp/monmlp.pdf>
88. Hall M, Frank E, Holmes G, Pfahringer B, i in. (2009) The WEKA data mining software: an update. *ACM SIGKDD Explor Newsl* 11:10. doi: 10.1145/1656274.1656278
89. Żurada JM (1992) *Introduction to Artificial Neural Systems*. ISBN 0314933913, 9780314933911, West, PWS Publishing Company.
90. Bilski J (2000) The backpropagation learning with logarithmic transfer function. *Proceedings of the Fifth Conference Neural Networks and Soft Computing*. Zakopane, Poland, pp 71–77.
91. Zhang H, Zhang Z (1999) Feedforward networks with monotone constraints. *Proceedings of the IEEE-INNS-ENNS International Joint Conference on Neural Networks*, vol. 3, 1820–1823.
92. *Essentials of Fuzzy Modeling and Control* (1994) Ronald R. Yager, Dimitar P. Filev: 9780471017615: Wiley-Interscience New York, USA
93. Shevade S, Keerthi S, Bhattacharyya, Murthy KRK (1999) Improvements to SMO algorithm for SVM regression. *Control Division Department of Mechanical and Production Engineering, National University of Singapore. IEEE Transactions On Neural Networks* 11(5).
94. Smola A, Scholkopf B (1998) A tutorial on support vector regression. *Statistics and Computing* 14(3):199–222.
95. Breiman L (2001) Random Forests. *Mach Learn* 45:5–32. doi: 10.1023/A:1010933404324
96. Kramer J, Obejero-Paz CA, Myatt G, Kuryshev YA, i in. (2013) MICE models: superior to the HERG model in predicting Torsade de Pointes. *Sci Rep* 3:2100. doi: 10.1038/srep02100
97. Fridericia LS (2003) The duration of systole in an electrocardiogram in normal humans and in patients with heart disease. 1920. *Ann Noninvasive Electrocardiol Off J Int Soc Holter Noninvasive Electrocardiol Inc* 8:343–351.
98. Brennan TP, Fink M, Stokeley D, Rodriguez B, Tarassenko L (2007) Modelling effects of sotalol on T-wave morphology. *Computers in Cardiology*. 34:249–25.
99. Gima K, Rudy Y (2002) Ionic current basis of electrocardiographic waveforms: a model study. *Circ Res* 90:889–896.
100. ten Tusscher KH, Noble D, Noble PJ, Panfilov AV (2004) A model for human ventricular tissue. *Am J Physiol Circ Physiol* 286:H1573–H1589. doi: 10.1152/ajpheart.00794.2003
101. Fuhr U, Müller-Peltzer H, Kern R, Lopez-Rojas P, i in. (2002) Effects of grapefruit juice and smoking on verapamil concentrations in steady state. *Eur J Clin Pharmacol* 58:45–53. doi: 10.1007/s00228-002-0436-7
102. Polak S, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, i in. (2012) ToxComp #x2214; In vitro-in vivo extrapolation system for drug proarrhythmic potency assessment. *Computing in Cardiology* 39:789-793.
103. De Bruin ML, Langendijk PN, Koopmans RP, Wilde AA, i in. (2007) In-hospital cardiac arrest is associated with use of non-antiarrhythmic QTc-prolonging drugs. *Br J Clin Pharmacol* 63:216–223. doi: BCP2722 [pii]
104. Haugaa KH, Bos JM, Tarrell RF, Morlan BW, i in. (2013) Institution-wide QT alert system identifies patients with a high risk of mortality. *Mayo Clin Proc* 88:315–325. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.01.013
105. Tisdale JE, Jaynes HA, Kingery JR, Mourad NA, i in. (2013) Development and validation of a risk score to predict QT interval prolongation in hospitalized patients. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 6:479–487. doi: 10.1161/CIRCOUTCOMES.113.000152

106. Bulusu KC, Guha R, Mason DJ, Lewis RPI, i in. (2016) Modelling of compound combination effects and applications to efficacy and toxicity: state-of-the-art, challenges and perspectives. *Drug Discov Today* 21:225–238. doi: 10.1016/j.drudis.2015.09.003
107. Gottlieb A, Stein GY, Oron Y, Ruppin E, Sharan R (2012) INDI: a computational framework for inferring drug interactions and their associated recommendations. *Mol Syst Biol* 8:592. doi: 10.1038/msb.2012.26
108. Luo H, Zhang P, Huang H, Huang J, i in. (2014) DDI-CPI, a server that predicts drug-drug interactions through implementing the chemical-protein interactome. *Nucleic Acids Res* 42:W46-52. doi: 10.1093/nar/gku433
109. Park K, Kim D, Ha S, Lee D (2015) Predicting Pharmacodynamic Drug-Drug Interactions through Signaling Propagation Interference on Protein-Protein Interaction Networks. *PLOS ONE* 10:e0140816. doi: 10.1371/journal.pone.0140816
110. Vilar S, Harpaz R, Uriarte E, Santana L, i in. (2012) Drug-drug interaction through molecular structure similarity analysis. *J Am Med Inform Assoc JAMIA* 19:1066–1074. doi: 10.1136/amiajnl-2012-000935
111. Zhang L, Zhang Y (Derek), Zhao P, Huang S-M (2009) Predicting Drug–Drug Interactions: An FDA Perspective. *AAPS J* 11:300–306. doi: 10.1208/s12248-009-9106-3
112. Zhang P, Wang F, Hu J, Sorrentino R (2015) Label Propagation Prediction of Drug-Drug Interactions Based on Clinical Side Effects. *Sci Rep* 5:12339. doi: 10.1038/srep12339
113. Peters MF, Scott CW, Ochalski R, Dragan YP (2012) Evaluation of cellular impedance measures of cardiomyocyte cultures for drug screening applications. *Assay Drug Dev Technol* 10:525–532. doi: 10.1089/adt.2011.442
114. Machatha SG, Yalkowsky SH (2005) Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP, ACDlogP and KowWin to experimentally determined values. *Int J Pharm* 294:185–192. doi: S0378-5173(05)00092-X [pii]
115. Al Omari MM, Zughul MB, Davies JED, Badwan AA (2007) Effect of buffer species on the complexation of basic drug terfenadine with β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 58:227–235.
116. Brittain HG (2002) Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. *Anal Profiles Drug Subst Excip* 29:1–5.
117. Slater JW, Zechnich AD, Haxby DG (1999) Second-generation antihistamines: a comparative review. *Drugs* 57:31–47.
118. Skolnik S, Lin X, Wang J, Chen X, He T, Zhang B (2010) Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *J Pharm Sci* 99:3246–3265.
119. Berezhkovskiy LM (2004) Volume of distribution at steady state for a linear pharmacokinetic system with peripheral elimination. *J Pharm Sci* 93:1628–1640. doi: 10.1002/jps.20073
120. Jones BC, Hyland R, Ackland M, Tyman CA, Smith DA (1998) Interaction of terfenadine and its primary metabolites with cytochrome P450 2D6. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 26:875–882.
121. Gertz M, Houston JB, Galetin A (2011) Physiologically based pharmacokinetic modeling of intestinal first-pass metabolism of CYP3A substrates with high intestinal extraction. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* 39:1633–1642. doi: 10.1124/dmd.111.039248
122. Bergstrom RF, Goldberg MJ, Cerimele BJ, Hatcher BL (1997) Assessment of the potential for a pharmacokinetic interaction between fluoxetine and terfenadine. *Clin Pharmacol Ther* 62:643–651. doi: S0009-9236(97)90084-9 [pii]

123. Honig PK, Woosley RL, Zamani K, Conner DP, Cantilena LR Jr (1992) Changes in the pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine with concomitant administration of erythromycin. *Clin Pharmacol Ther* 52:231–238.
124. Honig PK, Worham DC, Zamani K, Mullin JC, i in. (1993) The effect of fluconazole on the steady-state pharmacokinetics and electrocardiographic pharmacodynamics of terfenadine in humans. *Clin Pharmacol Ther* 53:630–636.
125. Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Cantilena LR (1994) Comparison of the effect of the macrolide antibiotics erythromycin, clarithromycin and azithromycin on terfenadine steady-state pharmacokinetics and electrocardiographic parameters. *Drug Investig* 7:148–156.
126. Martin D, Zussman B, Everitt D, Benincosa L, i in. (1997) Paroxetine Does Not Affect the Cardiac Safety and Pharmacokinetics of Terfenadine in Healthy Adult Men. *J Clin Psychopharmacol* 17:451–459.
127. Honig PK, Wortham DC, Hull R, Zamani K, i in. (1993) Itraconazole affects single-dose terfenadine pharmacokinetics and cardiac repolarization pharmacodynamics. *J Clin Pharmacol* 33:1201–1206.
128. Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC, Cantilena LR (1993) Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA* 269:1513–1518.
129. Polak S, Fijorek K (2012) Inter-individual variability in the pre-clinical drug cardiotoxic safety assessment—analysis of the age-cardiomyocytes electric capacitance dependence. *J Cardiovasc Transl Res* 5:321–332. doi: 10.1007/s12265-012-9357-8
130. Polak S, Fijorek K, Glinka A, Wiśniowska B, Mendyk A (2012) Virtual population generator for human cardiomyocytes parameters: in silico drug cardiotoxicity assessment. *Toxicol Mech Methods* 22:31–40. doi: 10.3109/15376516.2011.585477
131. Fijorek K, Patel N, Klima L, Stolarz-Skrzypek K, i in. (2013) Age and gender dependent heart rate circadian model development and performance verification on the proarrhythmic drug case study. *Theor Biol Med Model* 10:7. doi: 10.1186/1742-4682-10-7
132. Fijorek K, Püsküllüoğlu M, Tomaszewska D, Tomaszewski R, i in. (2014) Serum potassium, sodium and calcium levels in healthy individuals - literature review and data analysis. *Folia Med Cracov* 54:53–70.
133. Sennels HP, Jørgensen HL, Goetze JP, Fahrenkrug J (2012) Rhythmic 24-hour variations of frequently used clinical biochemical parameters in healthy young males – The Bispebjerg study of diurnal variations. *Scand J Clin Lab Invest* 72:287–295. doi: 10.3109/00365513.2012.662281
134. Fouquier J, Guedj M (2015) Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacol Res Perspect* 3(3): e00149. doi: 10.1002/prp2.149
135. Tang J, Wennerberg K, Aittokallio T (2015) What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. *Front Pharmacol* 6:181. doi: 10.3389/fphar.2015.00181
136. Loewe S (1953) The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung* 3:285–290.
137. Bliss CI (1939) The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol* 26:585–615.
138. Goldoni M, Johansson C (2007) A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. *Toxicol In Vitro* 21:759–769. doi: 10.1016/j.tiv.2007.03.003
139. Bazett H (1997) An analysis of the time-relations of electrocardiograms. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2:177–194.

140. Franjic L, Hoouse S, Vitkovitsky I, Halcomb E (2012) QTc prolongation is associated with hypokalemia and hypocalcemia in emergency department patients. Conference Abstracts and Posters. Paper 12. http://digitalcommons.wustl.edu/em_conf/12
141. Huang TC, Cecchin FC, Mahoney P, Portman MA (2000) Corrected QT interval (QTc) prolongation and syncope associated with pseudohypoparathyroidism and hypocalcemia. *J Pediatr* 136:404–407. doi: 10.1067/mpd.2000.103447
142. Kallergis EM, Goudis CA, Simantirakis EN, Kochiadakis GE, Vardas PE (2012) Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: a comprehensive review. *ScientificWorldJournal* 2012:212178. doi: 10.1100/2012/212178
143. Efstratiadis G, Sarigianni M, Gougourelas I (2006) Hypomagnesemia and cardiovascular system. *Hippokratia* 10:147–152.
144. Clifton GD, Hunt BA, Patel RC, Burki NK (1990) Effects of sequential doses of parenteral terbutaline on plasma levels of potassium and related cardiopulmonary responses. *Am Rev Respir Dis* 141:575–579. doi: 10.1164/ajrccm/141.3.575
145. Lecaillon JB, Kaiser G, Palmisano M, Morgan J, i in. (1999) Pharmacokinetics and tolerability of formoterol in healthy volunteers after a single high dose of Foradil dry powder inhalation via Aerolizer. *Eur J Clin Pharmacol* 55:131–138.
146. Tveskov C, Djurhuus MS, Klitgaard NA, Egstrup K (1994) Potassium and magnesium distribution, ECG changes, and ventricular ectopic beats during beta 2-adrenergic stimulation with terbutaline in healthy subjects. *Chest* 106:1654–1659.
147. Kuusela TA, Jartti TT, Tahvanainen KU, Kaila TJ (2005) Prolongation of QT interval by terbutaline in healthy subjects. *J Cardiovasc Pharmacol* 45:175–181. doi: 00005344-200502000-00011 [pii]
148. Karjalainen J, Viitasalo M, Mänttari M, Manninen V (1994) Relation between QT intervals and heart rates from 40 to 120 beats/min in rest electrocardiograms of men and a simple method to adjust QT interval values. *J Am Coll Cardiol* 23:1547–1553.
149. Rouse R, Kruhlak N, Weaver J, Burkhart K, i in. (2018) Translating New Science Into the Drug Review Process: The US FDA's Division of Applied Regulatory Science. *Ther Innov Regul Sci* 52:244–255. doi: 10.1177/2168479017720249
150. FDA. FY 2015-2016: Regulatory Science Progress Report. 58 <https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-afda-gen/documents/document/ucm549408.pdf>
151. Suryawanshi S, Zhang L, Pfister M, Meibohm B (2010) The current role of model-based drug development. *Expert Opin Drug Discov* 5:311–321. doi: 10.1517/17460441003713470
152. Shebley M, Sandhu P, Emami AR, Jamei M, i in. (2018) Physiologically Based Pharmacokinetic Model Qualification and Reporting Procedures for Regulatory Submissions: A Consortium Perspective. *Clin Pharmacol Ther*. doi: 10.1002/cpt.1013
153. Hartung T, FitzGerald RE, Jennings P, Mirams GR, i in. (2017) Systems Toxicology: Real World Applications and Opportunities. *Chem Res Toxicol* 30:870–882. doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00003
154. Wiśniowska B (2008) Ciągła infuzja insuliny – osobiste pompy insulinowe. W: APTEKA PLUS PACJENT Farmaceuta jako profesjonalny doradca, Brandys J. (red.). Dr Josef Raabe Spółka Wydawnicza, Warszawa
155. Wiśniowska B (2008) Leki przeciwbiegunkowe. W: APTEKA PLUS PACJENT Farmaceuta jako profesjonalny doradca, Brandys J. (red.). Dr Josef Raabe Spółka Wydawnicza, Warszawa

156. Wiśniowska B (2007) Stosowanie środków zobojętniających kwas żołądkowy. W: APTEKA PLUS PACJENT Farmaceuta jako profesjonalny doradca, Brandys J. (red.). Dr Josef Raabe Spółka Wydawnicza, Warszawa
157. Wiśniowska B (2011) Leki przeciwbiegunkowe. W: Pielęgniarska Opieka nad osobami starszymi. Dr Josef Raabe Spółka Wydawnicza, Warszawa
158. Dziurda D, Polak S, Bielska (Wiśniowska) B, Kosińska K (2007) Optymalizacja antybiotykoterapii szpitalnej – rola farmaceuty klinicznego i zastosowanie zaawansowanych technik edukacji. XX Naukowy Zjazd PTFarm, 25-28.09.2007, Katowice, Polska
159. Skowron A, Bielska (Wiśniowska) B, Brandys J (2007) Wpływ zmian w wykazach leków refundowanych na wydatki pacjenta. XX Naukowy Zjazd PTFarm, 25-28.09.2007, Katowice, Polska
160. Wiśniowska B, Skowron A (2011) Evaluation of patients' adherence to statins in Poland. *Curr Med Res Opin* 27:99–105. doi: 10.1185/03007995.2010.536745
161. Wiśniowska B, Skowron A (2009) Ocena przestrzegania zaleceń lekarskich w terapii hipercholesterolemii. *Farm Przegląd Nauk* 42–47.
162. Polak S, Skowron A, Turska W, Wiśniowska B (2010) Prowadzenie opieki farmaceutycznej i rozwiązywanie problemów lekowych na wybranych przykładach. Biblioteka naukowa Czasopisma Aptekarskiego. Farmapress, Warszawa
163. Wiśniowska B, Polak S, Brandys J (2008) Extrapolating factors for different in vitro hERG systems. *Acta Biochim Pol* 55:62.
164. Wiśniowska B, Polak S, Brandys J (2009) Bayesian classification methods for proarrhythmic liability prediction. 5th German-Polish symposium, "New Challenges for Pharmaceutical Sciences", 15-16.05.2009, Poznań, Polska
165. Polak S, Wiśniowska B, Brandys J (2009) Decision trees algorithms for the in silico prediction of hERG potassium channels inhibition (in polish). Polish Society of Toxicology Workshop "New trends in toxicology", 1-2.06.2009, Łódź, Polska
166. Wiśniowska B, Polak S (2009) Cardiotoxicity prediction algorithms. 1st International Workshop: Computational Pharmacy, 19.06.2009, Kraków, Polska
167. Polak S, Wiśniowska B, Ahamadi M, Mendyk A (2009) Prediction of the hERG potassium channel inhibition potential with use of the artificial neural networks. 14th Online World Conference on Soft Computing in Industrial Applications (WSC14), 17-29.11.2009, konferencja on-line
168. Wiśniowska B, Mendyk A, Polak M, Szlęk J, Polak S (2010) Wykorzystanie w badaniach nad lekiem algorytmu RandomForest do wczesnej ocena potencjału blokowania kanału potasowego kodowanego przez gen hERG. Modelowanie Cybernetyczne Systemów Biologicznych, 21-22.05.2010, Kraków, Polska
169. Wiśniowska B, Mendyk A, Polak M, Glinka A, Polak S (2010) System wczesnej oceny potencjału blokowania prądu potasowego I_{Kr} oparty o algorytm SVM. XXI Naukowy Zjazd PTFarm, Gdańsk, Polska
170. Wiśniowska B (2011) Cardiotoxicity assessment. On-line workshop, 3rd International Workshop - Computational Pharmacy; 22.09.2011, Kraków, Polska
171. Polak S, Wiśniowska B, Brandys J (2009) Modeling and simulation in the drug discovery, research and development. Toxicity prediction. 5th German-Polish symposium, "New Challenges for Pharmaceutical Sciences", 15-16.05.2009, Poznań, Polska
172. Polak S, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, i in. (2011) ToxComp - in silico platform for the cardiotoxicity assessment – in vitro-in vivo extrapolation. Applied Pharmaceutical Toxicology Workshop, 18-20.05.2011, San Francisco, CA, USA

173. Mendyk A, Wiśniowska B, Polak M, Glinka A, Polak S (2010) System wczesnej oceny potencjału blokowania prądu potasowego I_{Kr} oparty na sztucznych sieciach neuronowych. XXI Naukowy Zjazd PTFarm, Gdańsk, Polska
174. Polak S, Glinka A, Wiśniowska B, Mendyk A (2011) Influence on the physiological parameters on the ADP90 value simulated by human ventricular tissue model. *Toxicol Lett* 205:97–98.
175. Fijorek K, Fijorek D, Wiśniowska B, Polak S (2011) BDTcomparator: a program for comparing binary classifiers. *Bioinforma Oxf Engl* 27:3439–3440. doi: 10.1093/bioinformatics/btr574
176. Polak S, Wiśniowska B (2010) Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem. Ekstrapolacja in vitro-in vivo – symulacja badań klinicznych. *Farm Pol* 66:68–75.
177. Polak S, Wiśniowska B (2009) Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – projektowanie i poszukiwanie cząstki aktywnej, ocena właściwości fizykochemicznych oraz aktywności biologicznej. *Farm Pol* 65:214–223.
178. Wiśniowska B, Polak S (2009) Modelowanie komputerowe w badaniach nad lekiem – przewidywanie potencjalnych działań toksycznych. *Farm Pol* 65:445–452.
179. Polak S, Wiśniowska B, Ahamadi M, Mendyk A (2010) Prediction of the hERG potassium channel inhibition potential with use of the artificial neural networks. *Soft Computing in Industrial Applications. Algorithms, Integration and Success Stories*. In: *Advances in Intelligent and Soft Computing*. vol. 75 Eds. Gao X-Z, Gaspar-Cunha A., Koeppen M., Schaefer G., Wang J. Springer, Berlin.
180. Wiśniowska B, Badyra B, Lisowski B, Polak S (2015) To sum or not to sum - how to assess torsadogenic potential of combination of drugs and their active metabolites. In vitro assessment with loratadine and desloratadine as the exemplary drugs. Safety Pharmacology Society, Annual Meeting, 28.09-1.10.2015, Praga, Czechy
181. Badyra B, Lisowski B, Kulig M, Piotrowski R, i in. (2016) Interakcje antazoliny z kanałami kodowanymi przez gen hERG. *Kardiologia Polska/Polish Heart Journal*, 74, suppl.4; 374-375.
182. Badyra B, Lisowski B, Polak S, Kudolo J, Wiśniowska B (2015) How in vitro influences in silico utilized for the prediction of in vivo — pilot study of the drug-induced pro-arrhythmic potency prediction. *Acta Medica Cracoviensia* LV:5–19.
183. Polak S, Lisowski B, Badyra B, Piotrowski R, i in. (2016) Old Dog, New Tricks In Silico Characterization of Antazoline Cardiac Safety. Safety Pharmacology Society, Annual Meeting, 18–21.09 2016, Vancouver BC, Kanada
184. Wiśniowska B, Szlęk J, Mendyk A, Polak S (2016) Quantitative assessment of the physiological parameters influencing QT interval response to medication - simulation study. Safety Pharmacology Society, Annual Meeting, 18–21.09 2016, Vancouver BC, Kanada
185. Polak S, Wiśniowska B, Mendyk A, Paclawski A, Szlęk J (2018) Quantitative Assessment of the Physiological Parameters Influencing QT Interval Response to Medication: Application of Computational Intelligence Tools. *Comput Math Methods Med* <https://www.hindawi.com/journals/cmml/2018/3719703/>.
186. Polak S, Wiśniowska B, Mendyk A (2012) Drugs inhibiting slow delayed rectifying potassium current (I_{Ks}) extended QSAR predictive model development. The 16th Online World Conference on Soft Computing in Industrial Applications (WSC16); 5-1612.2012; Special Session on Soft Computing Methods in Pharmaceutical and Medical Sciences, konferencja on-line.
187. Polak S, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, i in. (2012) In silico prediction of the drug overdose consequences at the heart electrophysiology level. *Computing in Cardiology* 39:889-893.
188. Polak S, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, i in. (2012) Modeling and simulation approach for assessing proarrhythmic potency of the non-cardiological drugs. *Computing in Cardiology* 39: 761–764.

189. Mendyk A, Wiśniowska B, Fijorek K, Glinka A, i in. (2012) Empirical modeling of the sodium channel inhibition caused by drugs. *Computing in Cardiology*; 9-12.10.2012, Kraków, Polska
190. Polak S, Wiśniowska B, Polak M, Szlęć J, i in. (2012) ToxComp 1.2 – an Open Source *in vitro* *in vivo* extrapolation (IVIVE) system for cardiotoxicity prediction with Marvin plugins embedded. ChemAxon UGM 22-23.05.2012, Budapeszt, Węgry
191. Glinka A, Wiśniowska B (2013) hERG channel trafficking mutations – their role in the drug triggered arrhythmia. Simulation study. BSTP 28th Annual Scientific Meeting held jointly with the Safety Pharmacology Society. 14-15.11.2013, Alderley Park, Cheshire, Wielka Brytania
192. Glinka A, Wiśniowska B (2015) hERG channel trafficking mutations — Their role in the drug triggered arrhythmia — Simulation study. *J Pharmacol Toxicol Methods* 76:96.
193. Wiśniowska B (2015) Evaluation of the ability of computational IVIV extrapolation to assess pharmacokinetic (C_{max}/AUC) and pharmacodynamic (QTc) consequences of drug-drug interactions with cisapride and clarithromycin as exemplary drugs. EUFEPS Annual Meeting 2015 - System Approaches for Better Medicines and Health. 15-17.06.2015, Genewa, Szwajcaria
194. Wiśniowska B, Badyra B, Lisowski B, Polak S, Glinka A (2015) Systems pharmacology based approach utilized for prediction of the cardiac consequences of drug-drug interactions. Safety Pharmacology Society, Annual Meeting, 28.09-1.10.2015, Praga, Czechy
195. Wiśniowska B, Szlęć J, Mendyk A, Polak S (2016) Various Mathematical Models Towards Assessment of the Cardiac Consequences of Drug Combinations and Multiple-currents Inhibition: In Silico Study to Predict In Vivo Effects. Safety Pharmacology Society, Annual Meeting, 18–21.09 2016, Vancouver BC, Kanada
196. Tylutki Z, Polak S, Wiśniowska B (2016) Top-down, Bottom-up and Middle-out Strategies for Drug Cardiac Safety Assessment via Modeling and Simulations. *Curr Pharmacol Rep* 2:171–177. doi: 10.1007/s40495-016-0060-3
197. Wiśniowska B, Tylutki Z, Polak S (2017) Humans Vary, So Cardiac Models Should Account for That Too! *Front Physiol* 8:700. doi: 10.3389/fphys.2017.00700
198. Wiśniowska B, Polak S (2016) Am I or am I not proarrhythmic? Comparison of various classifications of drug TdP propensity. *Drug Discov Today* 22(1):10-16. doi: 10.1016/j.drudis.2016.09.027
199. Wiśniowska B, Tylutki Z, Polak S (2017) Thorough QT (TQT) studies: concordance with torsadogenesis and an evolving cardiac safety testing paradigm. *Drug Discov Today* 22:1460–1465. doi: 10.1016/j.drudis.2017.04.017

Barbara Wiśniowska