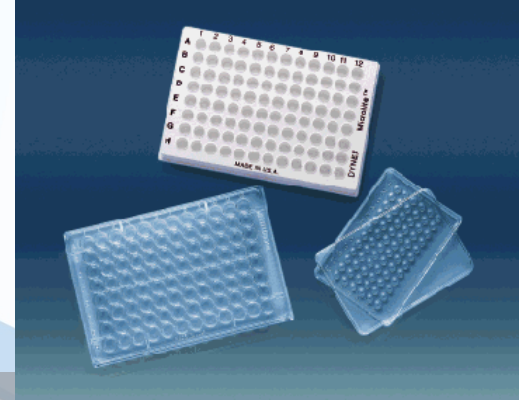




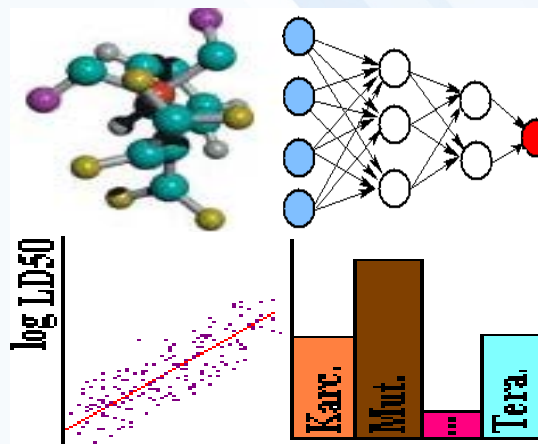
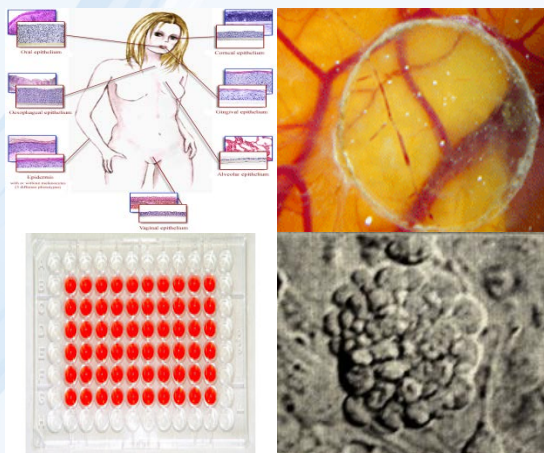
Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Alternativy klasických *in vivo* testů

in – vitro

in – silico



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Speciální ekotoxikologické biotesty – *in vitro*

- standardní testy (normy ISO, ČSN, USEPA)
- optimalizace/vývoj nových testů

- Toxicita
- Výzkum mechanismů působení látek
- Specifické mechanismy neletálních účinků
 - Genotoxicita
 - Dioxinová aktivita
 - Mechanismy endokrinní disrupce – estrogenita, androgenita
 - Immunotoxicita
 - Biochemická ekotoxicita

- Testování čistých látek (environmentální polutanty)
modelových směsí
komplexních environmentálních extraktů

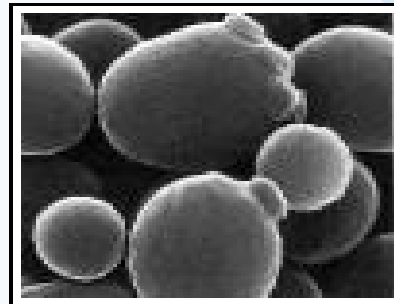
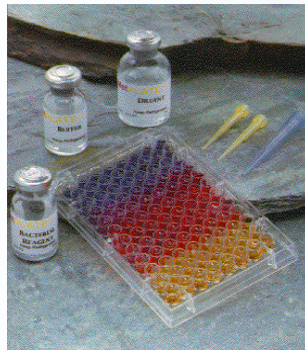
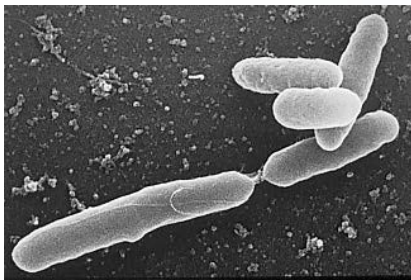


In vitro toxikologie

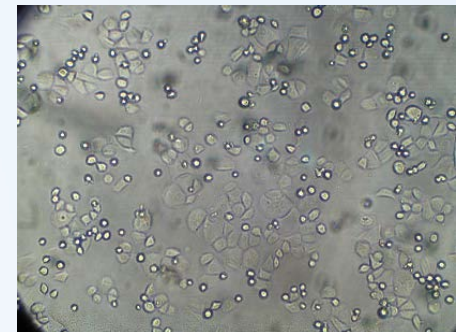
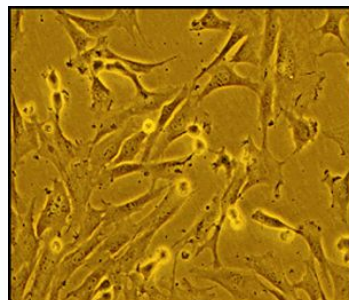
Testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických či eukaryotických buňkách

- využívány zejména pro teoretické objasnění účinku toxického agens
- v poslední době i pro rutinní provádění testů toxicity

BAKTERIÁLNÍ TESTY, KVASINKOVÉ TESTY



TESTY NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH



Využití tkáňových kultur (TK)



= Alternativní metoda k pokusům na živých organismech

Řada testů optimalizována na provedení v mikrodestičkách (high throughput testing)

- In vitro modely se dají kultivovat v laboratoři, některé rychle rostou a lze vytvořit mnoho vzorků menších kultur, ke kterým se přidávají do kultivačního prostředí chemické látky a zkoumá se charakter toxických účinků

Výhody TK: výrazné snížení množství zvířat použitých v experimentu

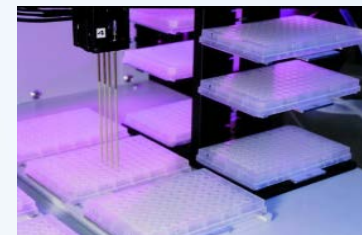
- zajištění vysokého počtu vzorků; původ kontrolních i experimentálních vzorků ze stejné tkáně, což minimalizuje variabilitu získaných výsledků.

Nevýhoda TK: možnost sledovat účinky testované látky pouze na konkrétním druhu tkáně, ze kterého byla TK připravena, tedy chybějící možnost posouzení zdravotního stavu a chování celého živočicha.



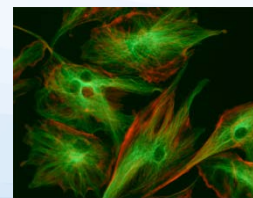
Testy na buněčných kulturách

- různé typy buněčných kultur – některé dostupné v buněčné bance, respektive Sběrce buněčných kultur.
- podle předepsaných podmínek (výživa, teplota, vlhkost apod.) lze danou buněčnou kulturu rozpěstovat a použít v toxikologickém testu.
- buňky se nasazují do speciálních nádob pro pěstování buněčných kultur, přidává se živné medium obohacené o antibiotika, případně antimykotika
- **Primární buněčné kultury** – buňky přímo získané z organismu/ od dárce
- omezená dostupnost - z tkání organismů, jsou nestandardní, variabilita a rozdíly mezi jedinci, což může významnou měrou ovlivnit výsledek testu toxicity (= nízká reprodukovatelnost)
- omezená doba života v kultuře (Hayflickův limit) – i přes optimální kultivační podmínky většina typů normálních (nenádorových) buněk prodělá pouze omezený, předem daný počet buněčných dělení
- nutná podrobná charakterizace zdrojové tkáně a postupu izolace (typ tkáně, věk a pohlaví dárce, způsob získání, počet pasáží od jejího stanovení, charakterizace fenotypu i genotypu atd.)



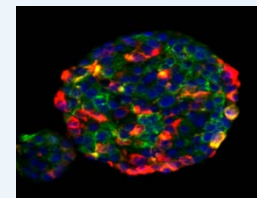
Permanentní linie - (kontinuální) ⇒ nádorové nebo imortalizované

- například stabilizované linie kožních buněk, nervových buněk, buněk srdečního svalu, buněk odvozených od tkání ledvin a pod.,
- často nádorového původu – geneticky nebo epigeneticky abnormální
- buněčný substrát pro založení kultury pochází z modelových druhů nebo se kdysi získal od lidského dárce (jako vedlejší materiál např. při operaci), pak byl stabilizován a uzpůsoben k neomezenému dělení a následné kultivaci.



Imortalizace:

- **Spontánně** (pomalé a málo účinné, někdy záměrná indukce mutagenese)
- **Cíleně** - transdukce virem –HPV, SV-40, mutageny, umělá exprese či inhibice klíčových molekul–např. telomerázy (hTERT), onkogeny
- možno získat stabilní buněčné linie z různých orgánů a z různých druhů organismů; tyto linie se velmi dobře přechovávají v hybernovaném stavu.
- v současné době dostupné stovky permanentních linií



Primární kultury

Heterogenní

Omezená životnost

Náročnější na kultivaci

Variabilita mezi izolacemi

Permanentní linie

Homogenní - klonální

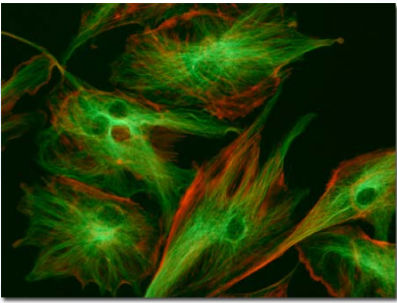
Nesmrtelné

Snadno kultivované

Genetická nestabilita



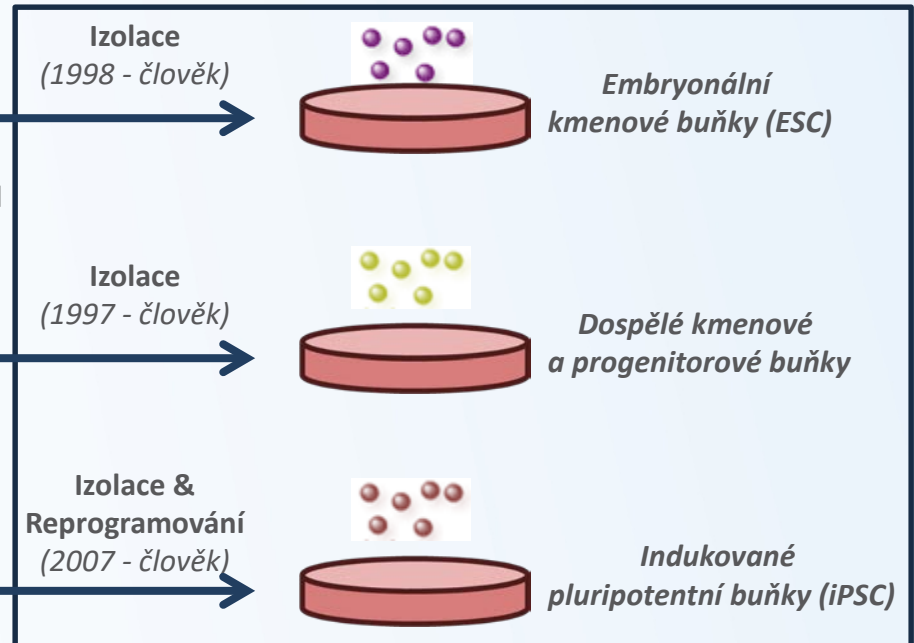
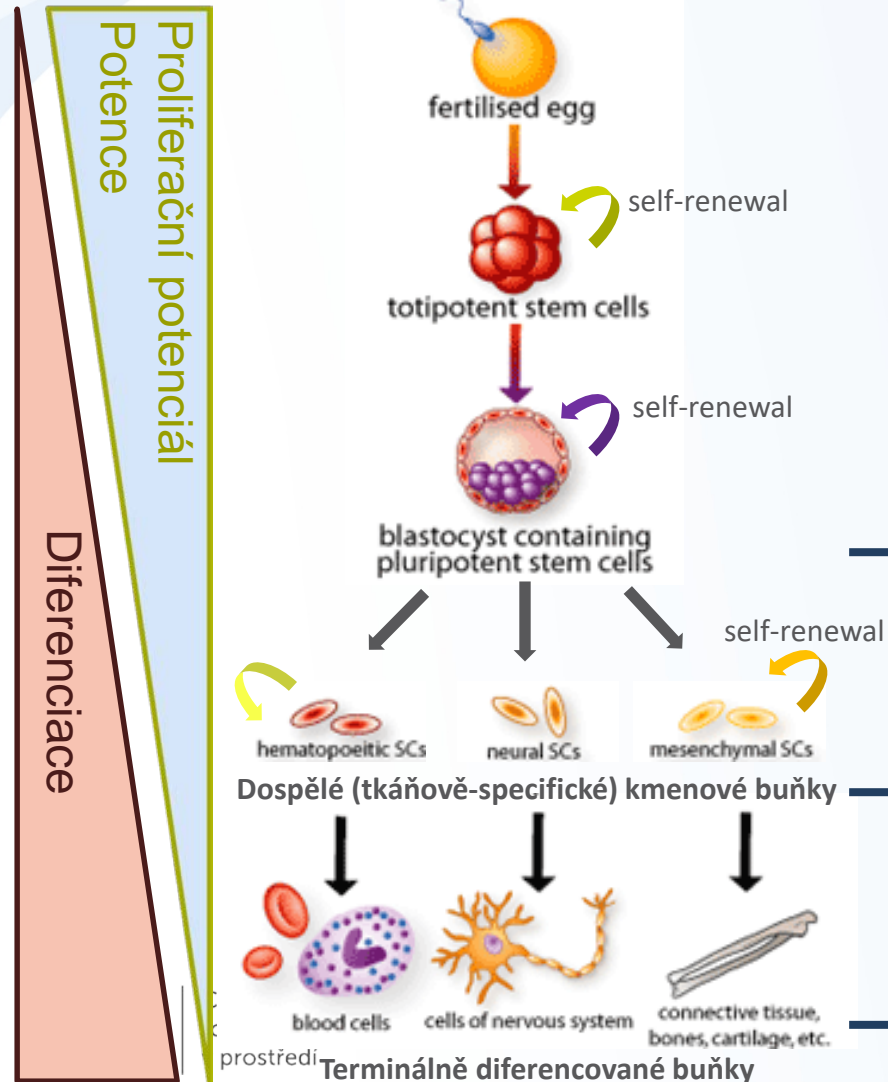
	Primary Cells	hTERT-Immortalized	Onco, Viral-Immortalized	Continuous
Mimic <i>in vivo</i> Tissue Phenotype	++++	+++	++	+
Karyotypic Stability	Diploid	Diploid/ Pseudodiploid	Pseudodiploid/ Aneuploid	Aneuploid
Proliferative Capacity	+	+++	+++	+++
Supply	+	+++	+++	+++
Inter-Experimental Reproducibility	Low	Good	Good	Good
Cost	High	Medium	Low	Low
Ease of Use	+	++	++	+++

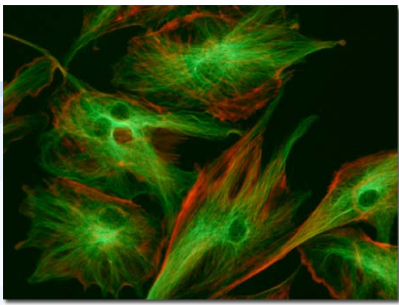


KMENOVÉ BUŇKY A Z NICH DIFERENCOVANÉ BUŇKY

– NOVĚ VYVÍJENÉ MODELY

- Normální nenádorové buňky organismu
- Symetrické (self-renewal) a asymetrické dělení (diferenciace)
- Proliferační potenciál a potence
- Vývoj protokolů pro jejich *in vitro* diferenciaci do požadovaných typů buněk





IN VITRO TOXIKOLOGIE & KMENOVÉ BUŇKY

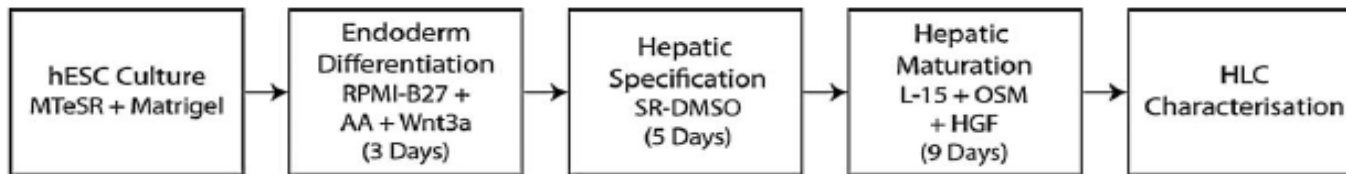
Příklad: Hepatotoxicita

- Játra – hlavní detoxikační orgán
- Biotransformace / bioaktivace toxických látek
- Permanentní jaterní linie (např. HepG2) – nízká aktivita detoxikačních enzymů – malá relevance

Gen	Genová exprese	
	Izol.hepa- tocyty	HepG2
CYP2B6	100	0.5
CYP2C9	100	0
CYP3A4	100	0
UTG1A1	100	5.2
AldB	100	0
Albumin	100	12.3

(Guillouzo 2010, Toxicology 270)

In vitro diferenciace hESC do „hepatocyte-like cells“



Day 0

Day 3

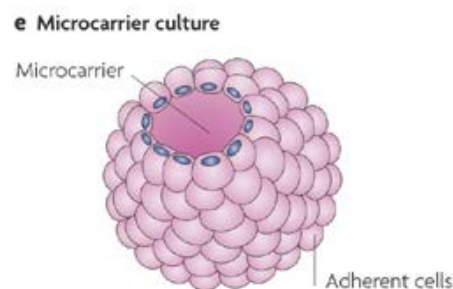
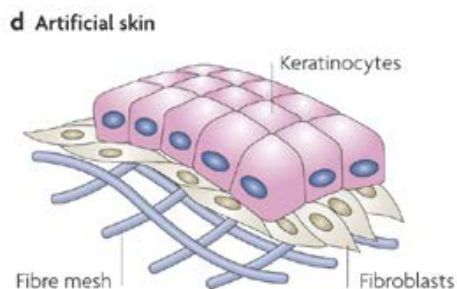
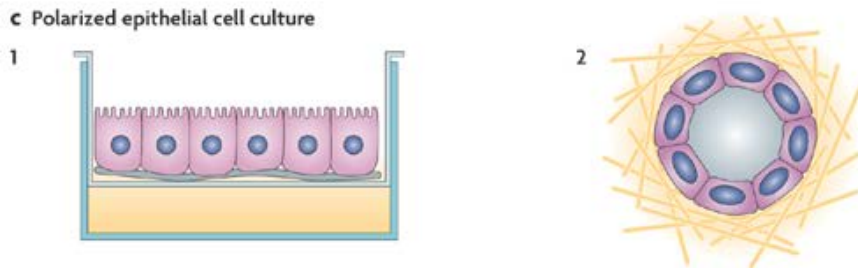
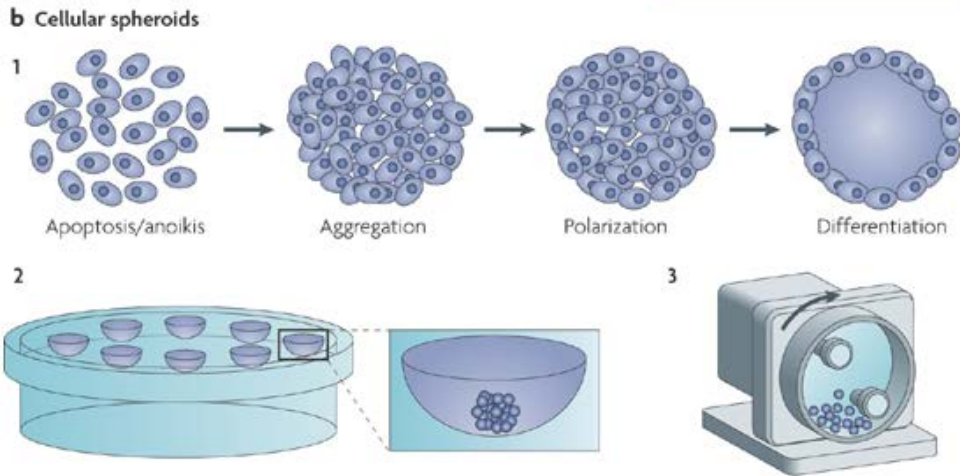
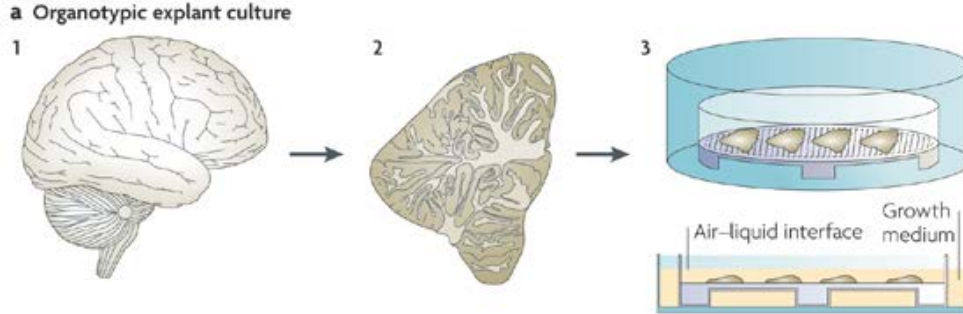
Day 6

Day 11

Day 17

(Greenhough 2010, Toxicology 278)

Vývoj nových modelů



3D modely

Kokultivace více typů buněk:

- Studium parakrinních účinků
- Strukturní a funkční buňky
- Odděleně membránami

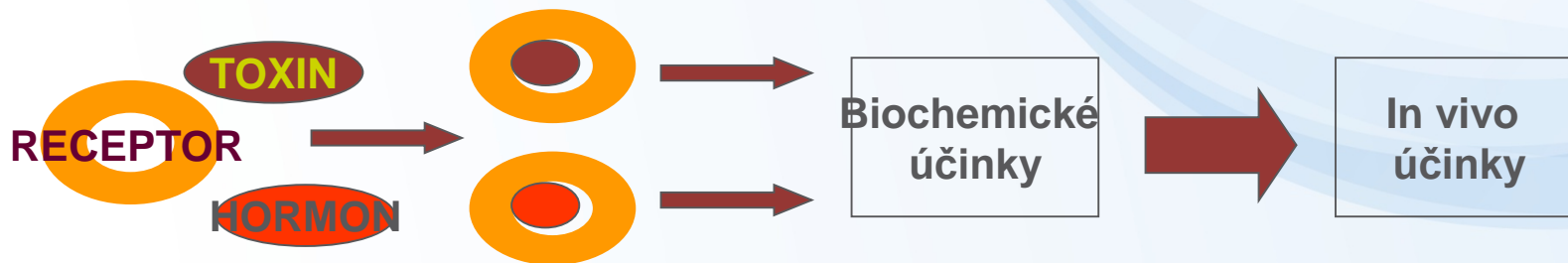
Feeder-layer

- Myší fibroblasty
- Podklad pro růst jiných b.

Bioreaktory, mikrofluidní systémy

MECHANISMY chronické toxicity polutantů

- Princip: různé chronické účinky chemické látky vycházejí ze společného biochemického mechanismu působení
 - Základní výsledky z mechanisticky založených *in vitro* testů

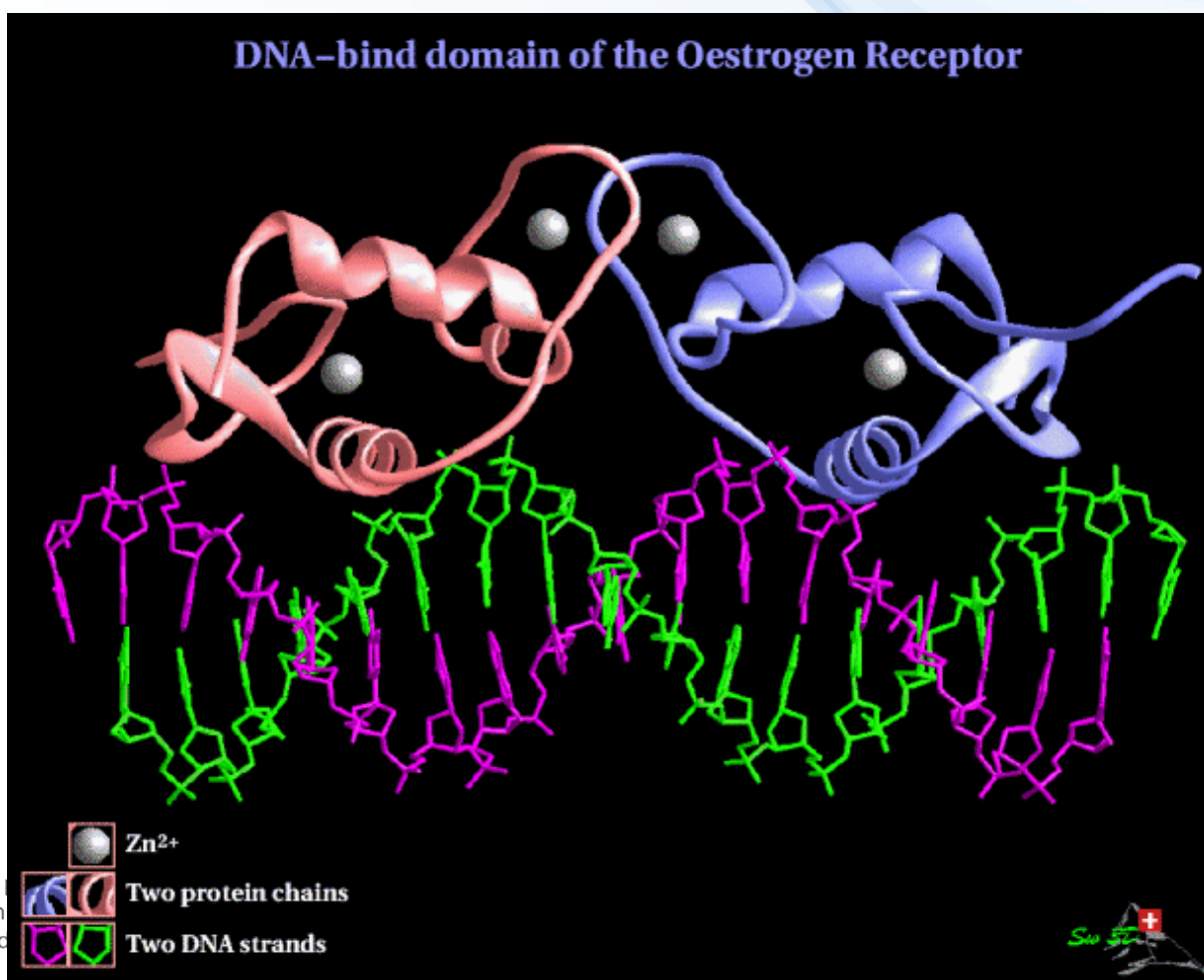


- zhodnocení *in vitro* účinků jednotlivých látek
 - Poznání zásadního mechanismu, predikce rizika
- využití pro hodnocení rizik a/nebo monitoring
 - Určení relativních potencí ("toxických ekvivalentů") -> RA
 - Biomarkery *in vitro* – přímá charakterizace komplexních vzorků



Receptorově-mediované mechanismy toxicity

ESTROGENNÍ RECEPTOR - ER



Testy receptorově-mediovaných mechanismů

- Jaderné receptory zahrnují několik rodin receptorů: Androgenní receptor (AR), **estrogenní receptor (ER)**, progesteronový receptor (PR), glukokortikoidní receptor (GR) a mineralokortikoidní receptor (MR) jsou hlavními představiteli rodiny steroidních receptorů
- **Aryl hydrokarbon receptor (AhR)** – umístěný v cytosolu
- Receptory slouží jako poslové mezi genomem a extracelulárními signály, na které musí buňka reagovat, aby přežila.
- Např. AhR regulují na základě interakce s xenobiotiky expresi enzymů I. a II. fáze biotransformace a některých detoxifikačních transportérů, které se přímo podílejí na biotransformaci nebo exkreci xenobiotik.

Princip testu: sledovaná aktivita reportérového enzymu odpovídá potenci látky či směsi pro interakci s receptorem

aktivita reporterového genu, např. luminometrie - indukce nebo inhibice reporterové luciferázy, nebo spektrofotometrie – indukce nebo inhibice reporterové β -galaktosidázy



Studované mechanismy účinku

Interakce s jadernými receptory

– důležité mechanismy chronické toxicity

Toxicita dioxinového typu

- Aryl hydrokarbonový receptor (AhR)
- indukce detoxikačních systémů
- narušení funkce jater, imunity a reprodukce, endokrinního a nervového systému, karcinogenita, embryotoxicita
- „cross-talk“ s jinými hormonálními signálními drahami

Anti/estrogenita

- Estrogenní receptor (ER)
- vývoj pohlaví, řízení reprodukce, karcinogeneze, ovlivňuje buněčnou proliferaci a diferenciaci, vývoj a homeostázu

Anti/androgenita

- Androgenní receptor (AR)
- vývoj pohlaví, zejména samčích pohlavních charakteristik, řízení reprodukce, karcinogeneze, ovlivňuje růst, spermatogenezi

Glukokortikoidní aktivita

- Glukokortikoidní receptor (GR)
- ovlivňuje vývoj, metabolismus, imunitní odpověď, reakci na stres

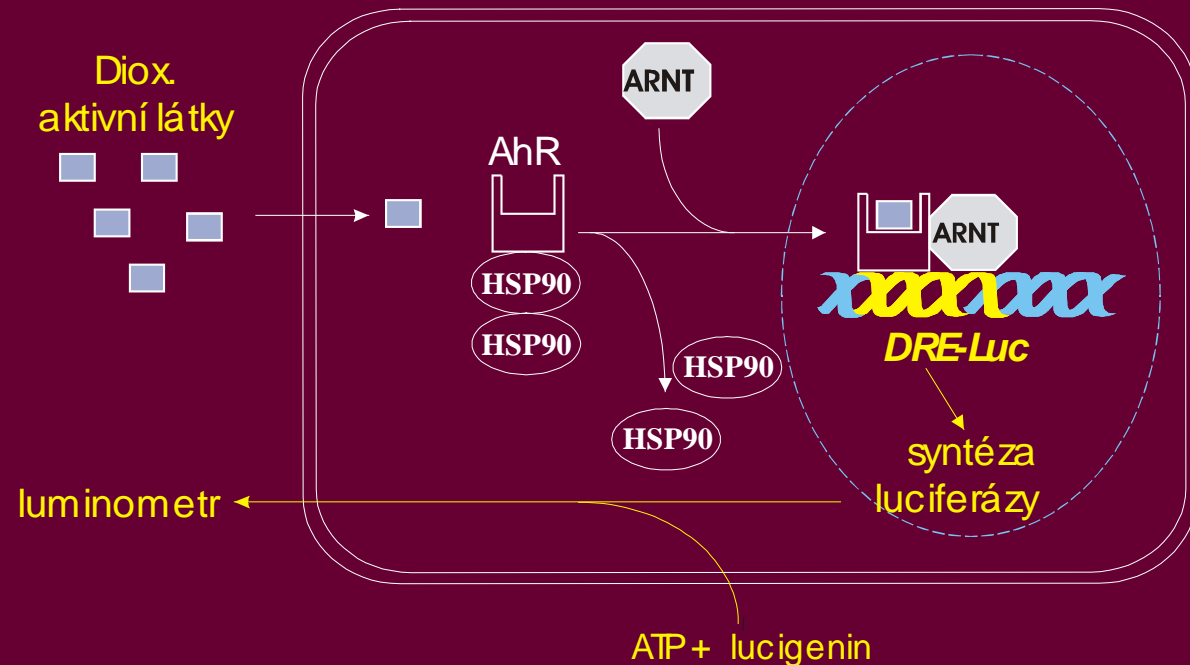
Anti/retinoidní aktivita

- Receptor kyseliny retinové (RAR)
- reguluje růst, morfogenezi, apoptozu a diferenciaci, ovlivňuje nervový a imunitní systém, vidění a embryonální vývoj



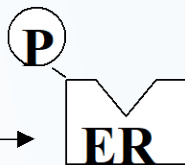
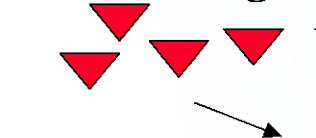
In vitro stanovení dioxinové toxicity

- Stanovení na buněčné linii krysího hepatomu H4IIE.luc
- Pod kontrolu AhR-responsivního elementu vložen gen pro luciferázu

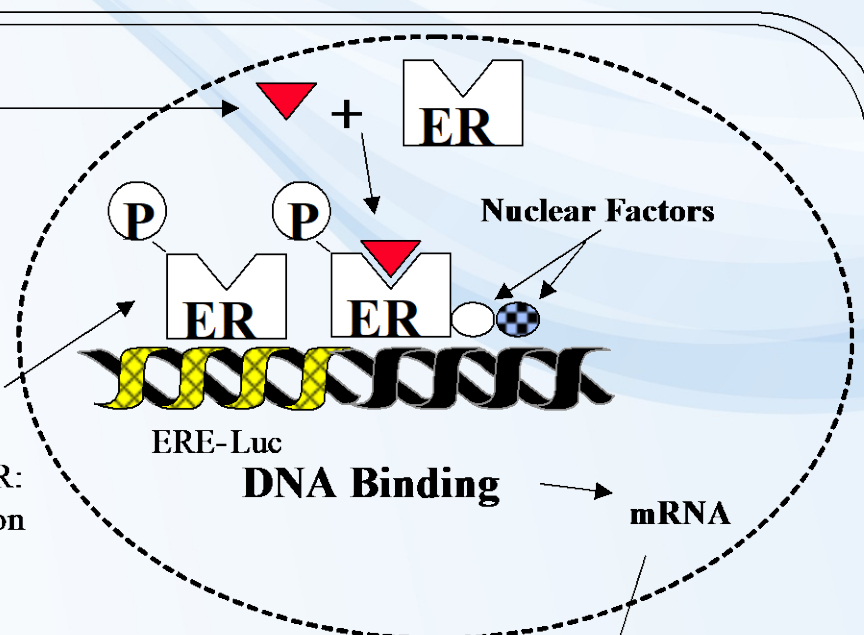


In vitro stanovení estrogenní aktivity

Estrogen
or xenoestrogen



Protein Phosphorylation of ER:
Ligand-Independent Activation



Luciferase



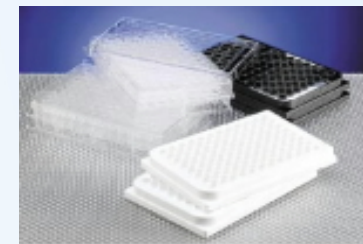
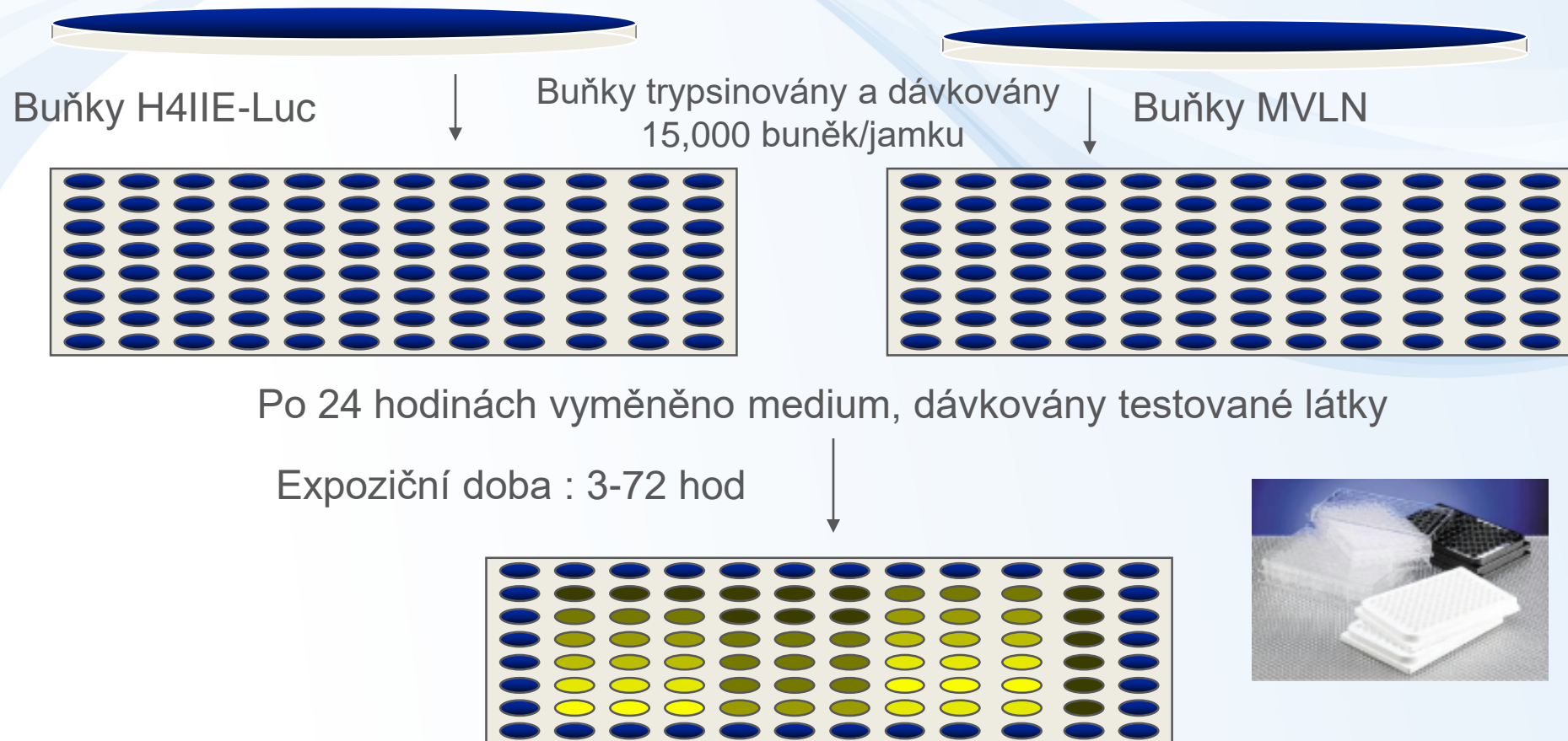
Light

“Estrogenic Effects”

ER-Responsive Genes



In vitro biotesty k detekci dioxinové a estrogenní aktivity

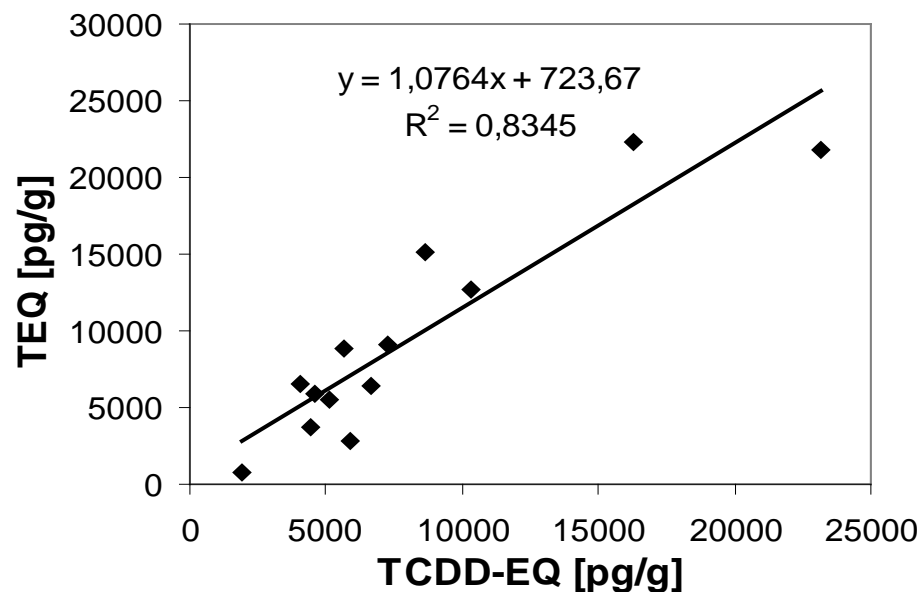
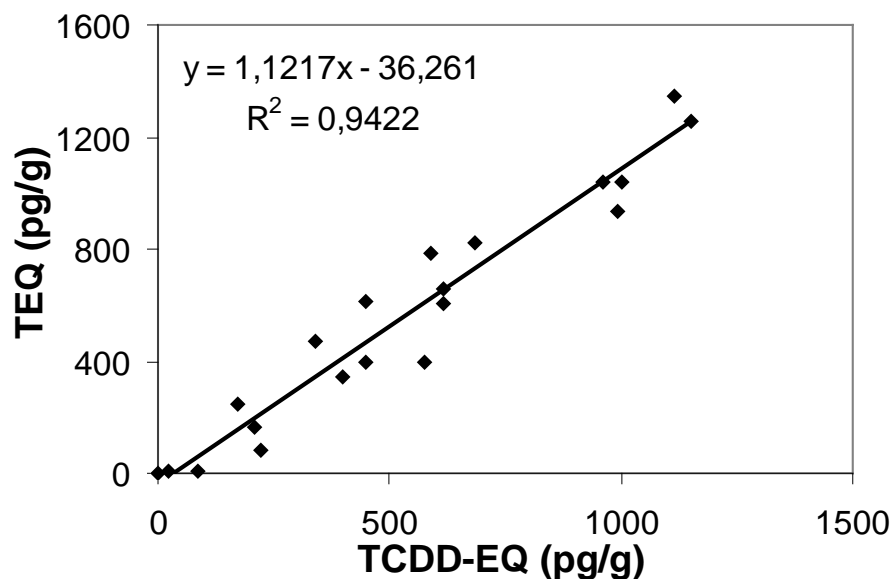


Po expozici odstraněno medium, buňky vymyty puřem a přidán LucLite reagent.
Po 20 minutách měřena aktivita luciferázy v destičkovém luminometru.

In vitro testy na buněčných liniích

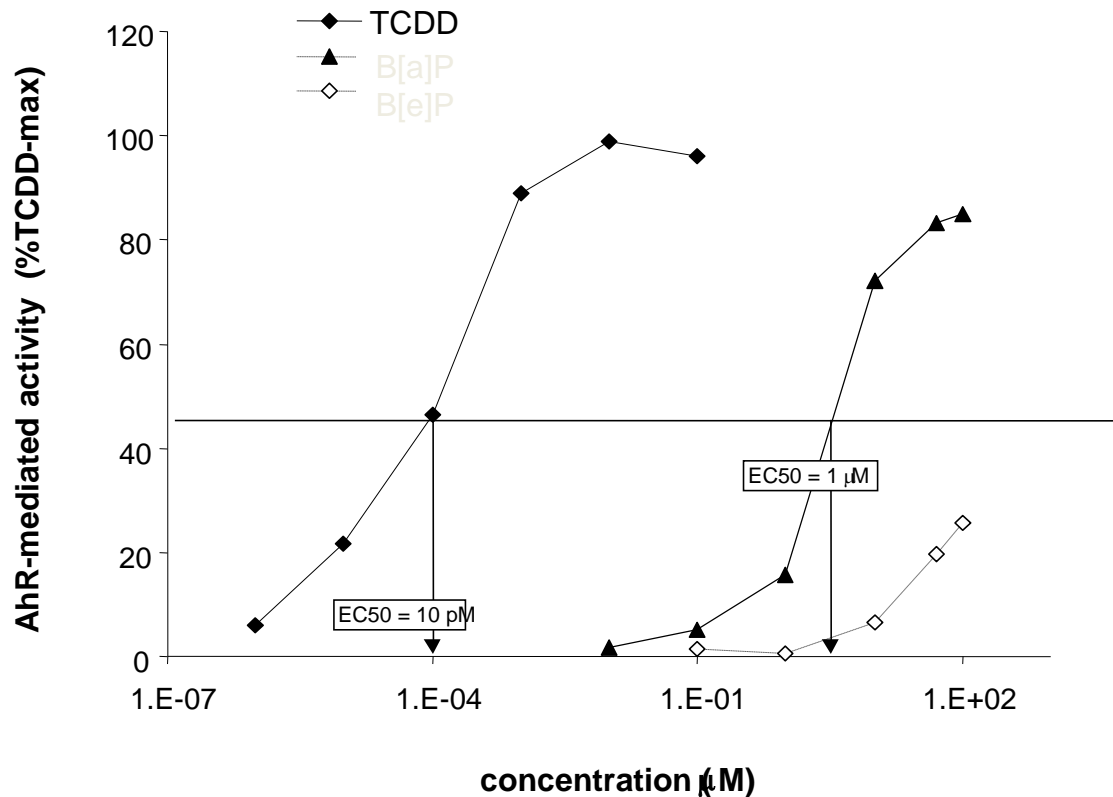
- hodnocení expozice látkami se specifickým mechanismem účinku (látky s dioxinovou, estrogenní aktivitou)
- reportérové buněčné linie transfekované genem luciferázy, který je indukován po navázání ligandu na receptor
- kalibrace odpovědi standardním ligandem (2,3,7,8-TCDD pro dioxinovou aktivitu, 17β -estradiol pro estrogenní aktivitu)

Vztah mezi dioxinovými toxickými ekvivalenty stanovenými v biotestu na buněčné linii (TCDD-EQ) a spočítanými z výsledků chemických analýz



Srovnání různých látek -> Použití v hodnocení rizik

- Kvantifikace účinků (EC_{50}) - relativní potence
- Srovnání s účinkem referenčního toxikantu (2,3,7,8-TCDD)
 - Vyjádření jako relativní potence/ Ekvivalenční Faktor (\sim REP/TEF)



TCDD: $EC_{50 \text{ TCDD}}$

PAH: $EC_{50 \text{ PAH}}$

Relativní potence

$$REP = EC_{50 \text{ TCDD}} / EC_{50 \text{ PAH}}$$

Kolikrát je ta látka slabší ligand než TCDD ?

Toxické equivalenční faktory pro PCDDs, PCDFs a PCBs:

Table 4. Toxic Equivalent Factors established by the WHO (WHO-TEFs) for dioxins and dioxin-like PCBs [4]

PCDD Congener	WHO-TEF	PCDF Congener	WHO-TEF	PCB Congener	WHO-TEF
2,3,7,8-TCDD	1	2,3,7,8-TCDF	0.1	<i>Non-ortho</i>	
12,3,7,8-PeCDD	1	12,3,7,8-PeCDF	0.05	PCB#81	0.0005
123478-HxCDD	0.1	23478-PeCDF	0.5	PCB#77	0.0005
123678-HxCDD	0.1	123478-HxCDF	0.01	PCB#126	0.1
12,3,7,89-HxCDD	0.1	123678-HxCDF	0.1	PCB#169	0.01
1234678-HpCDD	0.01	234678-HxCDF	0.1	<i>Mono-ortho</i>	
OCDD	0.0001	12,3,7,89-HxCDF	0.1	PCB#105	0.0001
		1234678-HpCDF	0.01	PCB#114	0.0005
		1234789-HpCDF	0.01	PCB#118	0.0001
		OCDF	0.0001	PCB#123	0.0001
				PCB#156	0.0005
				PCB#157	0.0005
				PCB#167	0.00001
				PCB#189	0.0001

Eljarrat & Barceló, Trends Anal. Chem.22: 655



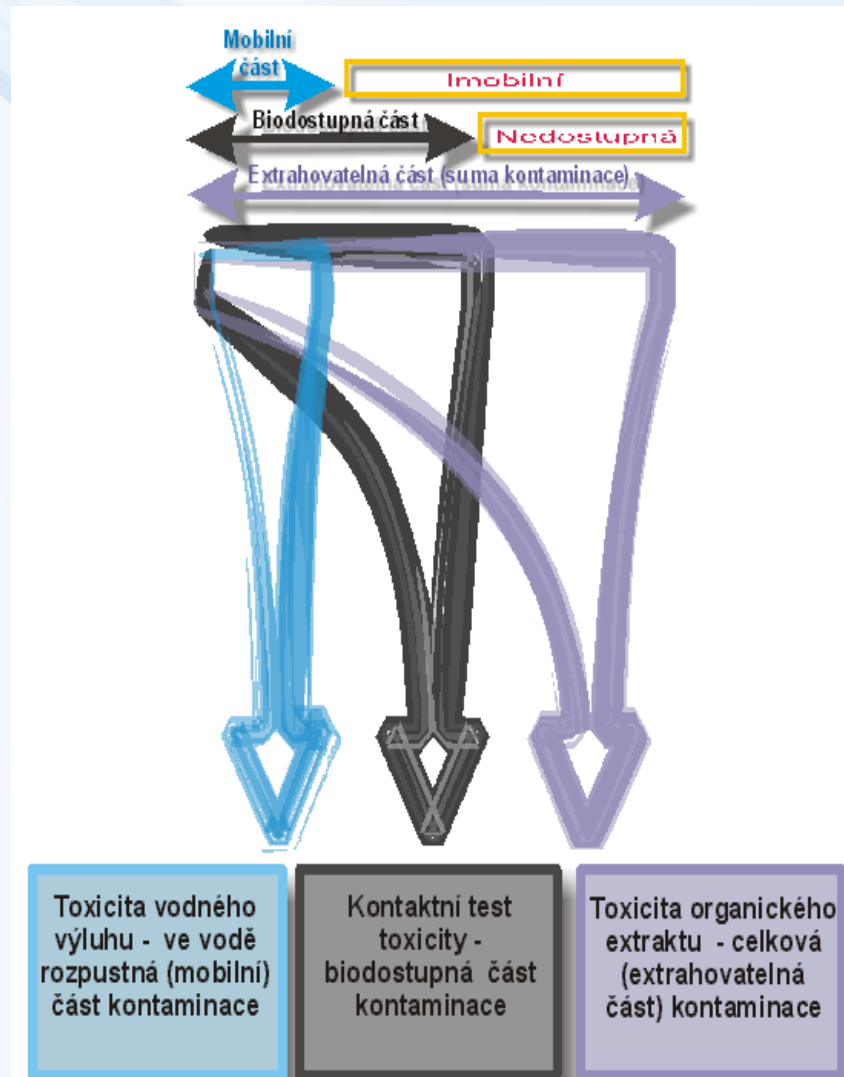
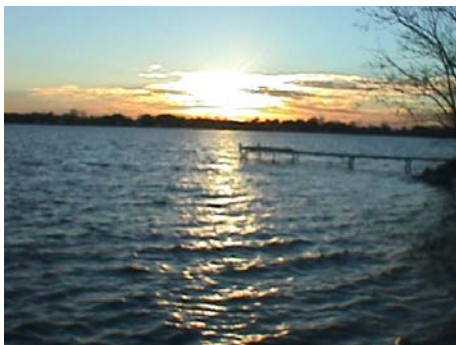
Testování komplexních vzorků ze životního prostředí

- vzorky vzduchu, sedimentů, půd
- rychlý screening znečištění
- hodnocení toxicita, genotoxicita, dioxinová a estrogenní aktivita
- **výběr vzorků pro podrobnější studium/analýzu**
- **spojení s analytickou chemií, frakcionace**

Problém reprezentativního vzorkování, uchovávání vzorku

„pseudopersistentní látky“

– kontinuální expozice nízkým dávkám

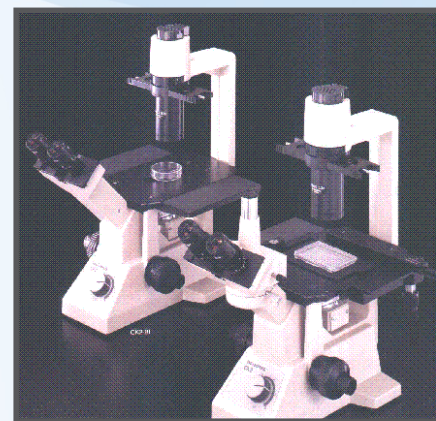


Výhody toxikologických *in vitro* testů

- rychlost, citlivost, reprodukovatelnost, snadnost provedení, menší náklady
- ukazují celkovou biologickou aktivitu látek, které působí specifickým mechanismem
- možnost provést screening velkého množství vzorků
- mohou poukázat na přítomnost toxikologicky významných látek, které nejsou běžně analyticky stanovovány
- sledují i možné interakce (jako synergismus či antagonismus) působení látek v komplexních směsích

Nevýhody toxikologických *in vitro* testů

- nezohledňují biotransformaci látek v organismu
- nemohou plně nahradit enzymaticko-imunitní reakci živého organismu
- neposkytují informaci o tom, které jednotlivé látky ze směsi vyvolaly odpověď
- poskytují informaci jen o celkové aktivitě látek působících určitým specifickým mechanismem



Závěr: Testy toxicity na buněčných kulturách jsou vhodný screening před provedením baterie testů na živých organismech.



OMICs

Toxikogenomika -- objasňuje, jak je celý genom zapojen v biologických odpovědích organismů na stresory

- studuje odpovědi/reakce genomu na stresory a toxické látky (Waters et al. 2003)

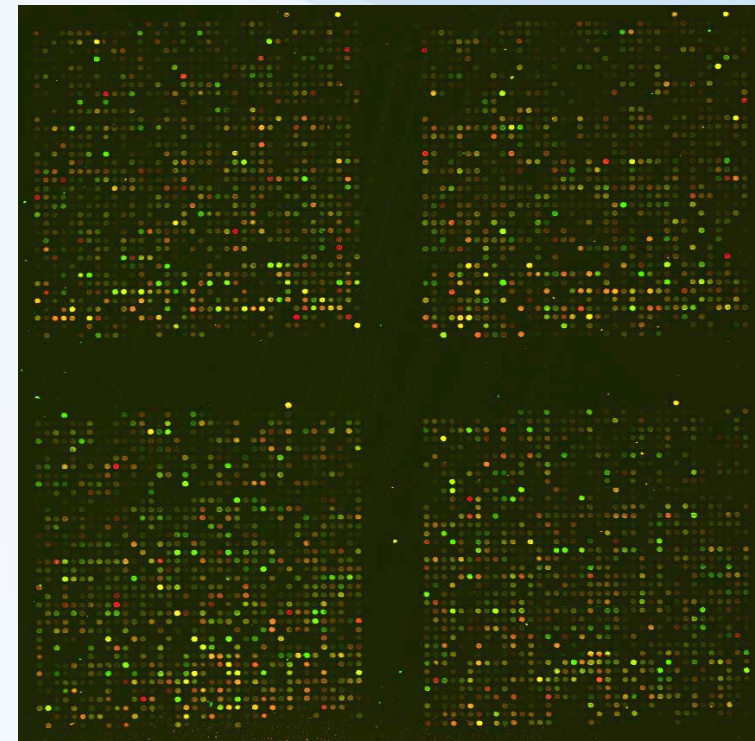
Transkriptomika – sledování exprese populací genů - hledání rozdílů v genové expresi (za různých podmínek, v různých stádiích vývoje, v různých orgánech, ...)

Proteomika - komplexní analýza proteinů organely, buňky, tkáně či extracelulárních tekutin

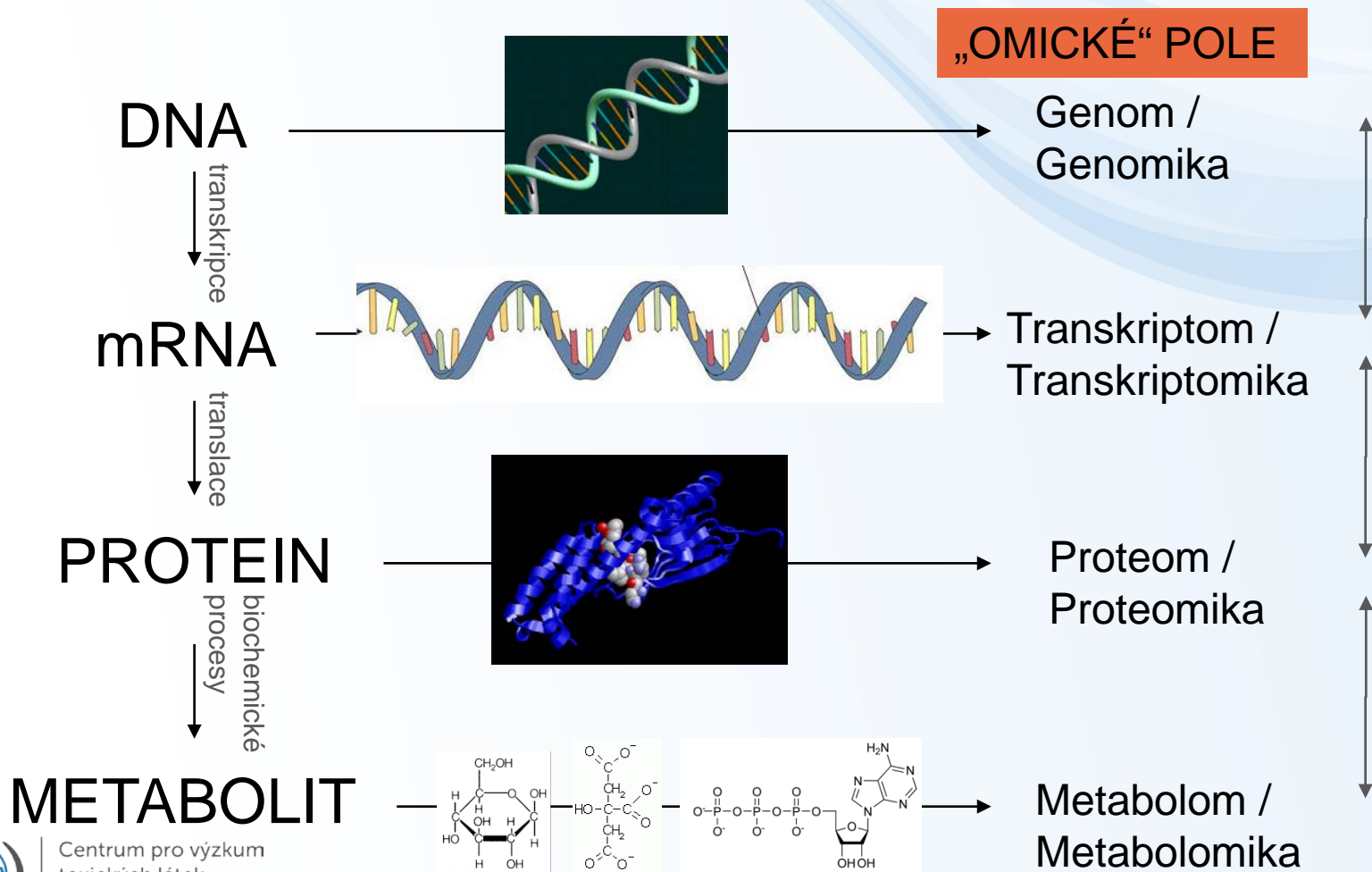
Metabolomika - kompletní identifikace a kvantifikace všech metabolitů v daném organismu nebo v buňce.

- kombinace genomiky - transkriptomiky, proteomiky, metabolomiky a bioinformatiky s klasickou toxikologií

- identifikace, kvantifikace potenciálních genetických rizik
- identifikace konkrétních genů, jejich produktů a procesů, kterými buňky reagují na environmentální toxikanty a stresory
- sledovat vedlejší účinky chemických látek na biologické systémy
- vytváření databází toxikologických, genetických a genomických informací



Studium procesů probíhajících v živých organismech - nové vědecké disciplíny





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem
České republiky



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí