

Studium Ekotoxikologie na PřF MU v Brně

Environmentální toxikologie
a *in vitro* toxikologie

RNDr. Pavel Babica, Ph.D.

Toxikologie

Studium škodlivých účinků chemických látek na živé organismy:

symptomy, mechanismy a léčba otrav, stanovení „bezpečné“ dávky

- ▣ Průmyslová toxikologie
- ▣ Farmaceutická toxikologie
- ▣ Toxikologie potravin
- ▣ Klinická toxikologie
- ▣ Soudní (forenzní) toxikologie
- ▣ Radiační toxikologie
- ▣ Vojenská toxikologie
- ▣ **Ekotoxikologie**
- ▣ **Toxikologie životního prostředí**
(environmentální toxikologie)

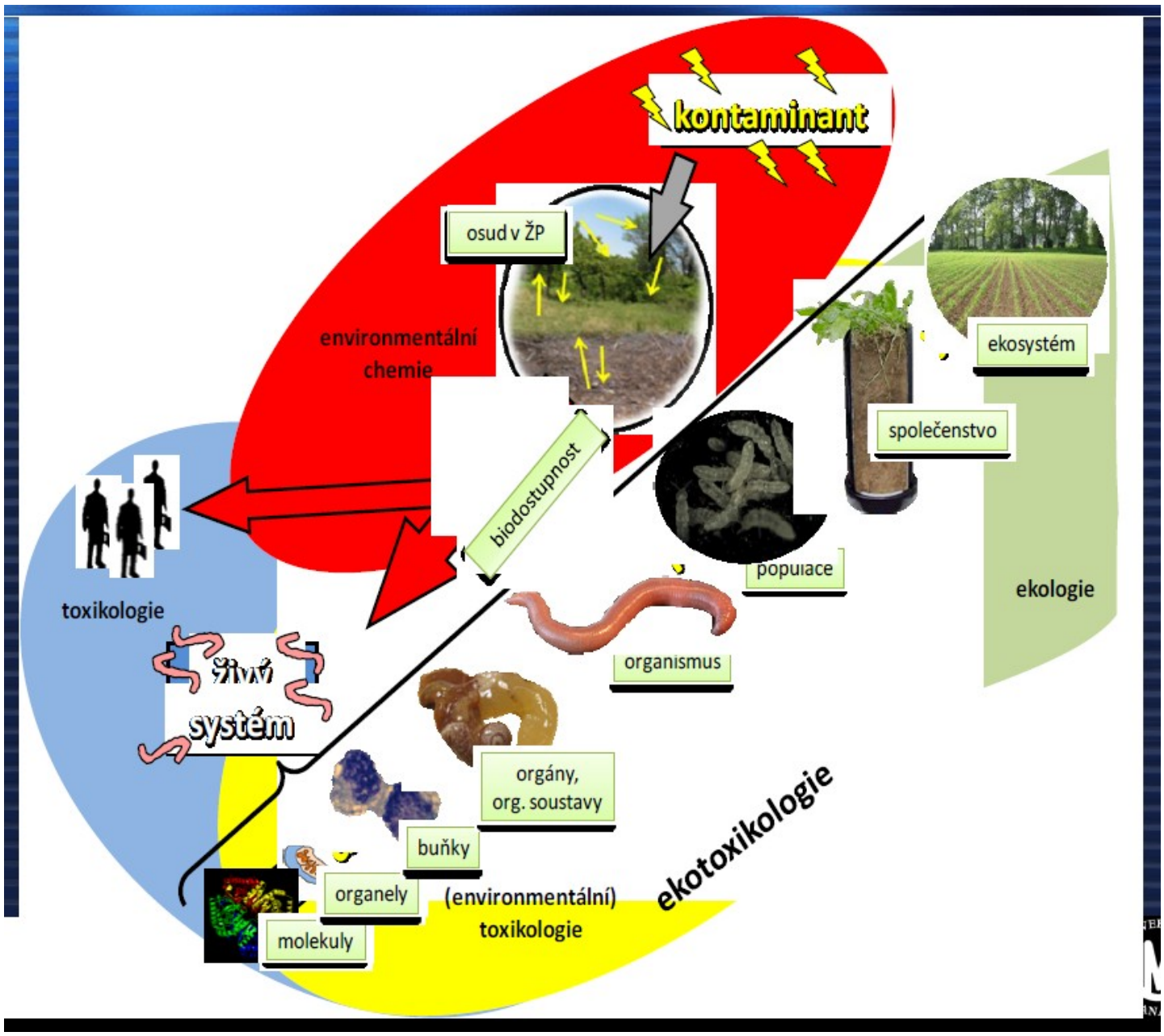


RECETOX, PŘF, MUNI

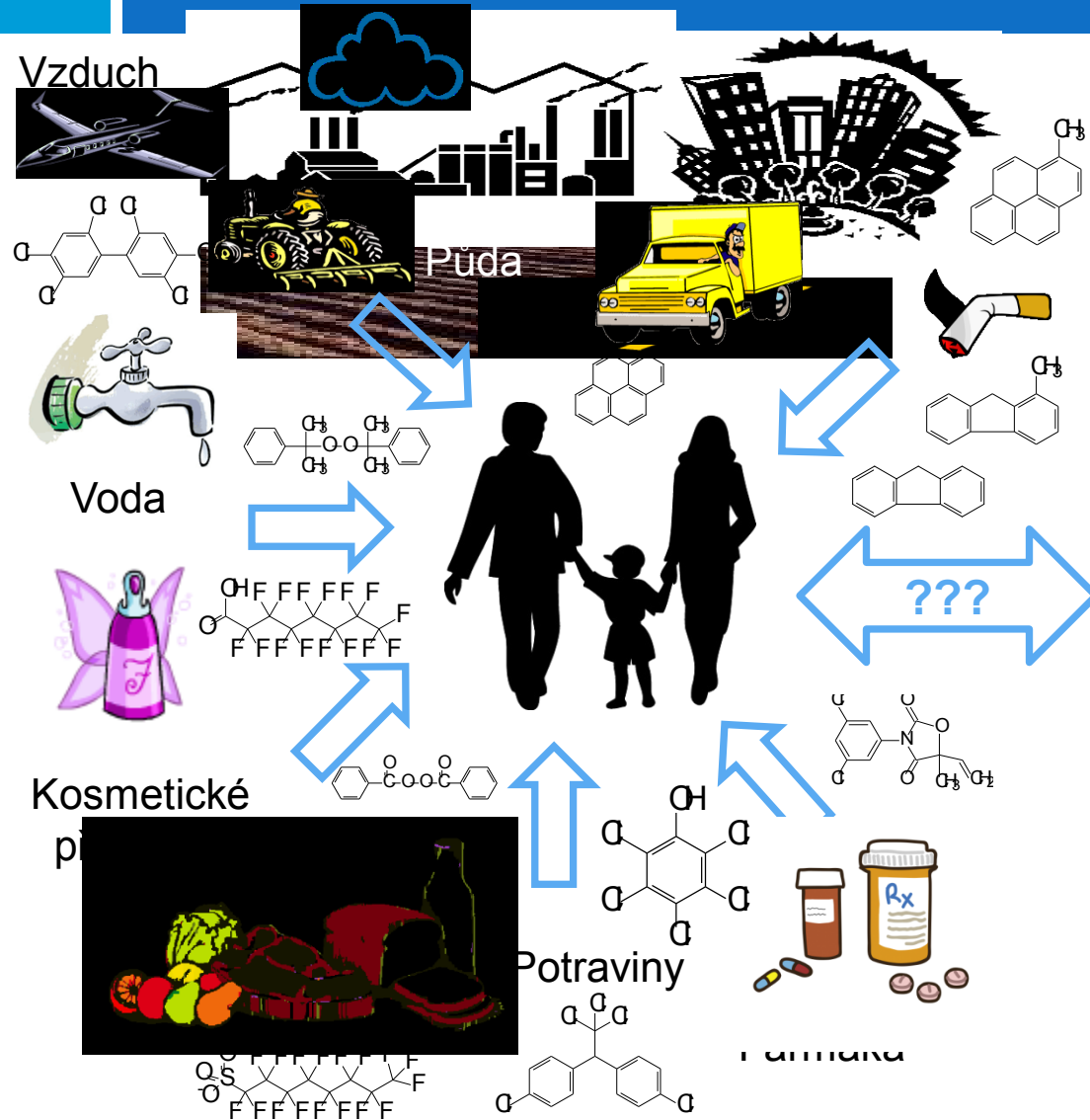


Research centre
for toxic compounds
in the environment

Bc. / Mgr. / Ph.D. Ekotoxikologie



Environmentální toxikologie



Akutní efekty



Chronická onemocnění

- Rakovina
- Chronická onemocnění dýchacího traktu
- Autoimunitní onemocnění
- Poruchy plodnosti
- Neurodegenerativní a neurovývojové

Metody výzkumu toxikologie

Pozorování



Experiment



Metody výzkumu toxikologie

Pozorování

Epidemiologické studie: **Case-control studies** (případ-kontrola)



Metody výzkumu toxikologie

Pozorování

Epidemiologické studie: **Longitudinal studies** (dlouhodobé opakované sledování)

Evropská longitudinální studie těhotenství a dětství **ELSPAC**
(European Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood)

- 6 evropských zemí, v ČR sledováno od poč. 90 let 5 738 dětí narozených v Brně a 1 851 dětí narozených ve Znojmě od těhot. matky do dospělosti

CELSPAC: TNG - The Next Generation

- Těhotné ženy/matky - děti
- Životní styl, kouření, výživa, socioekonomické faktory
- Interní a externí expozice
- Zdravotní stav (odběry krve, tkání – BioBanka)

EHBMI: European Human Biomonitoring Initiative



www.elspac.cz



Research centre
for toxic compounds
in the environment

Metody výzkumu toxikologie

Pozorování



Experiment



Metody výzkumu toxikologie

Experiment účinky na člověka – experimenty na lidech?



Relevantní,
cílový
Organismus



Dnes Eticky
nepřijatelné

Toxikologické experimenty na lidech

- ▣ Historicky – objevování jedů – lov, travičství
 - Starověká Indie, Řím – ochutnávači => testování toxicity
 - Kleopatra – služebnictvo: rulík, blín, nebo kulčiba (strychnin)
- ▣ Vězni, chudina, nemocní, postižení, minority
- ▣ 2. svět. válka: Německo, Japonsko (Unit 731)
- ▣ USA
 - Vanderbilt Experiment (1944-1974) – těhotné a radioaktivní železo
 - Armádní pokusy ve 40. tých letech – lewisit, hořčičný plyn, radioaktivita (1944-1962)
 - Operation Whitecoat (1954-1973) – účinky chemických a biol. zbraní
 - CIA projekt MK-ULTRA (1947-1973) – vliv LSD na psychiku
 - Holmesburg prison, PA (60. léta) – testování léků, dioxinů
- ▣ SSSR, Severní Korea

Toxikologické experimenty na lidech

Norimberský protokol 1947

- ▣ Pouze pokusy nedosažitelné jinými metodami
- ▣ Nezpůsobovat zbytečné **utrpení a zranění**
- ▣ Nezpůsobovat smrt nebo dlouhodobém **zranění či nemoc**
- ▣ Pokus by měl být ukončen pokud hrozí **zranění, zmrzačení či smrt**



WHO - Helsinská deklarace 1964, USA – Belmontský report 1978

XXX

Toxikologie – zkoumá škodlivé účinky, schopnost látek poškozovat zdraví organismu

Experimentální toxikologie

Experimentální metody (prediktivní)

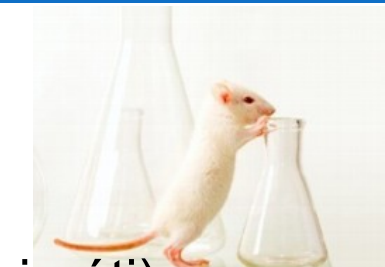
- Experimenty s živými organismy – ***in vivo***
 - Člověku blízké druhy – savci (hlodavci, prasata, primáti)
- Experimenty s částmi živých organismů
 - ***ex vivo & in vitro & in chemico***
 - Izolované orgány
 - Tkáňové kultury
 - Buněčné organely a extrakty
 - Purifikované biomakromolekuly
- Počítačové simulace a modelování – ***in silico***

Experimentální toxikologie

Experimentální metody (prediktivní)

■ Experimenty s živými organismy – *in vivo*

- Člověku blízké druhy – savci (hlodavci, pra



IN VIVO

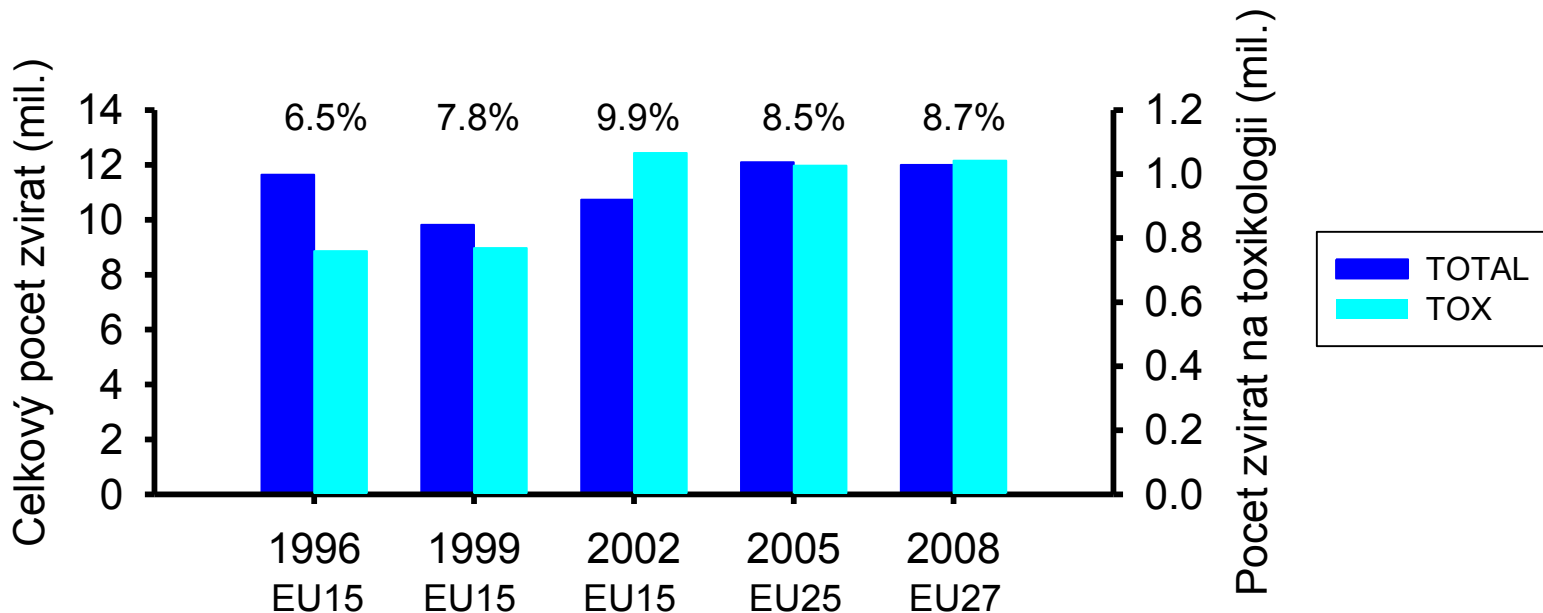
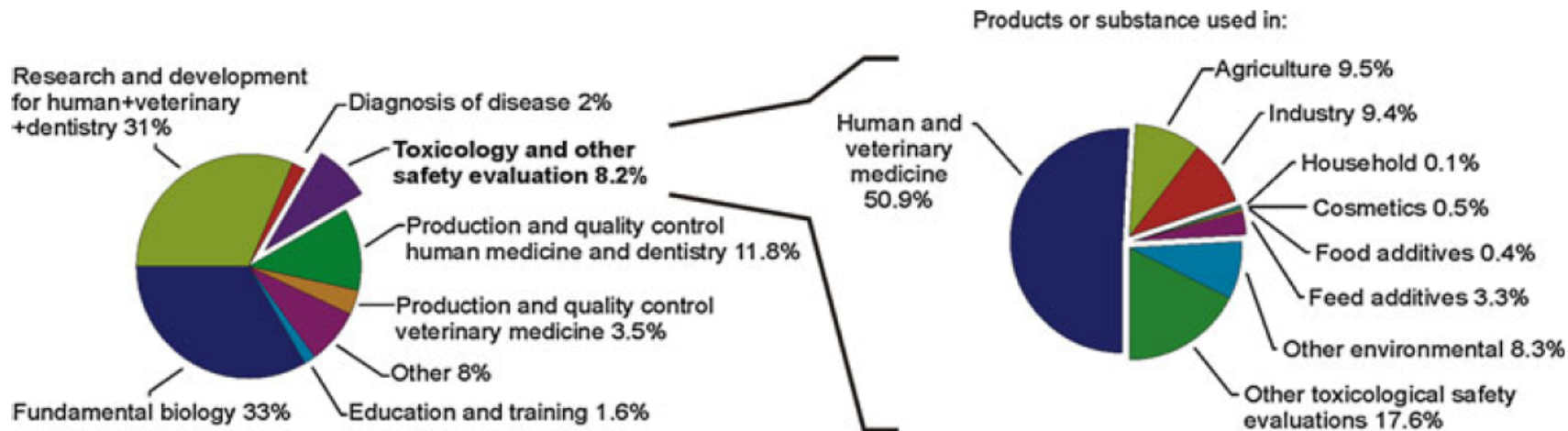
Etické důvody

Relevance a spolehlivost

Pokrok v technologiích

Ekonomická a časová náročnost

IN SILICO
IN VITRO



Toxicologie ale odpovídá až za 70% těch nejbolestivějších experimentů (dávky jedů způsobující smrt atd.)

In vivo experimenty a etika

- Eticky kontroverzní - tlak odborné i laické veřejnosti
- 1959: Russel & Burch: “**3Rs principle**”
- **Replacement**
nahrazení *in vivo* experimentů alternativními metodami
- **Reduction**
snížení počtu zvířat pro zjištění požadovaných informací
- **Refinement**
snížení utrpení - alternativní parametry vyhodnocení
- **Princip 3R silně akcentován v EU**
podpora výzkumu, validace a implementace alternativních metod



In vivo experimenty a etika

- Direktiva „On the protection of animals used for scientific purposes“ 86/609/EEC a 2010/63/EU
- „Cosmetic Directive“ 76/768/EEC a 1223/2009
- Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Regulation EC No. 1907/2006) – **REACH**
- Biocides Regulation 528/2012
- **ECVAM – European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM)**



In vivo experimenty a spolehlivost

Cca 20-40% léků testovaných na hlodavcích vykazuje nežádoucí toxické účinky v klinických

- **Clinical toxicity: rats and mice together 43% prediction only**

Olson et al., 2000, RTP 32, 56-67

- Lethal dose of endotoxin in humans to produce shock is a million-fold less than in mice -

McGonigle & Ruggeri, 2014, Bioch Pharm 87, 162-171

- No correlation between murine and human genetic responses to inflammation -

Leist & Hartung, 2013, Arch Tox 87, 563-567

Cca 50% léků testovaných na hlodavcích nevykazuje požadované účinky v klinických

- **Drug efficacy: animal studies only 37 to 55% reproducible in humans**

Hartung, 2013, ALTEX 30, 275-291

- Over 500 neuroprotective treatments for cerebral ischemia that worked in animals failed in man - van der Workp, 2010, Plos Med 7

- Inadequacies of animal studies in the area of mood disorders (depression, anxiety), contributed to the withdrawal of research in this area - McGonigle & Ruggeri, 2014,

Bioch Pharm 87, 162-171

Pouze 5% léčiv vstupujících do klinických studií se dostane na trh
Náklady na vývoj jednoho léku činí v průměru 4 miliardy dolarů

Hartung, 2013, Altex 30

Experimentální toxikologie – 21. století

Experimentální metody (prediktivní)

▣ Experimenty s živými organismy – *in vivo*

- Člověku blízké druhy – savci (hlodavci, prasata, primáti)

▣ Experimenty s částmi živých organismů

- ***ex vivo & in vitro & in chemico*** + použití moderních technologií

- Izolované orgány
- Tkáňové kultury
- Buněčné organely a extrakty
- Purifikované biomakromolekuly

- * Buněčná biologie
- * Tkáňové kultivace
- * Molekulární biologie
- * Omikové metody
- * Bioinformatika
- * Modelování
- * Miniaturizace
- * Robotizace

▣ Počítačové simulace a modelování – *in silico*

Experimentální toxikologie – 21. století

U.S. EPA + National Institute of Health et al.

- **Tox21** - <http://www.epa.gov/ncct/Tox21/>
 - ▣ 10 000 látek testováno v 50+ různých *in vitro* testech
- **ToxCast** - <http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>
 - ▣ cca 2000 látek
 - ▣ 700+ testů, 300 signálních drah



Experimentální toxikologie

Experimentální metody (prediktivní)

▣ Experimenty s živými organismy – *in vivo*

- ▣ Člověku blízké druhy – savci (hlodavci, prasata, primáti)

▣ Experimenty s částmi živých organismů

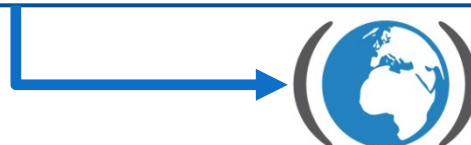
- *ex vivo & in vitro & in chemico*

- ▣ Izolované orgány
- ▣ Tkáňové kultury
- ▣ Buněčné organely a extrakty
- ▣ Purifikované biomakromolekuly

+ použití moderních technologií

- * Buněčná biologie
- * Tkáňové kultivace
- * Molekulární biologie
- * Omikové metody
- * Bioinformatika
- * Modelování
- * Miniaturizace
- * Robotizace

▣ Počítačové simulace a modelování – *in silico*



Research centre
for toxic compounds
in the environment



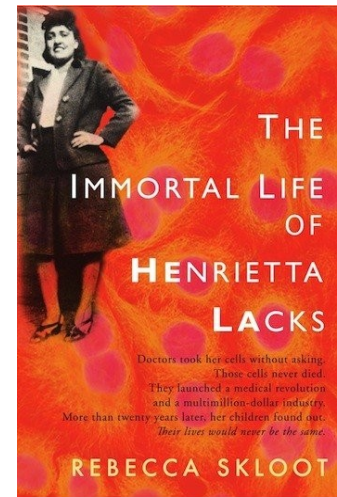
Primární buňky

- zvířecí: mezidruhová variabilita, Hayflick / senescence, etické problémy
- lidské: limitovaná dostupnost, heterogenita / nízká reprodukovatelnost

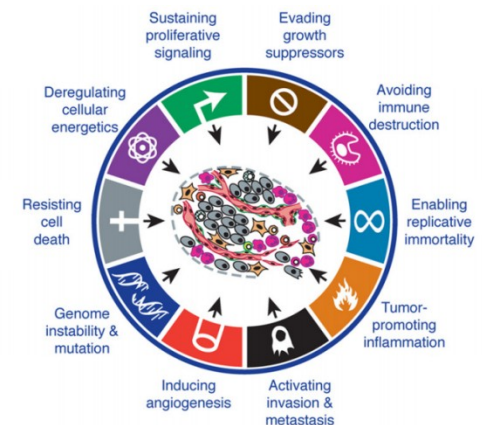
Permanentní buněčné linie

- lidské: 1951 – HeLa (cervikální karcinom)
- dnes dostupné desítky linií z různých orgánů
- většinou **nádorového původu** – genetické a epigenetické změny, abnormální vlastnosti – abnormální odezva?

?Relevance pro normální tkáň a orgány?



rebeccaskloot.com



Alternativy?

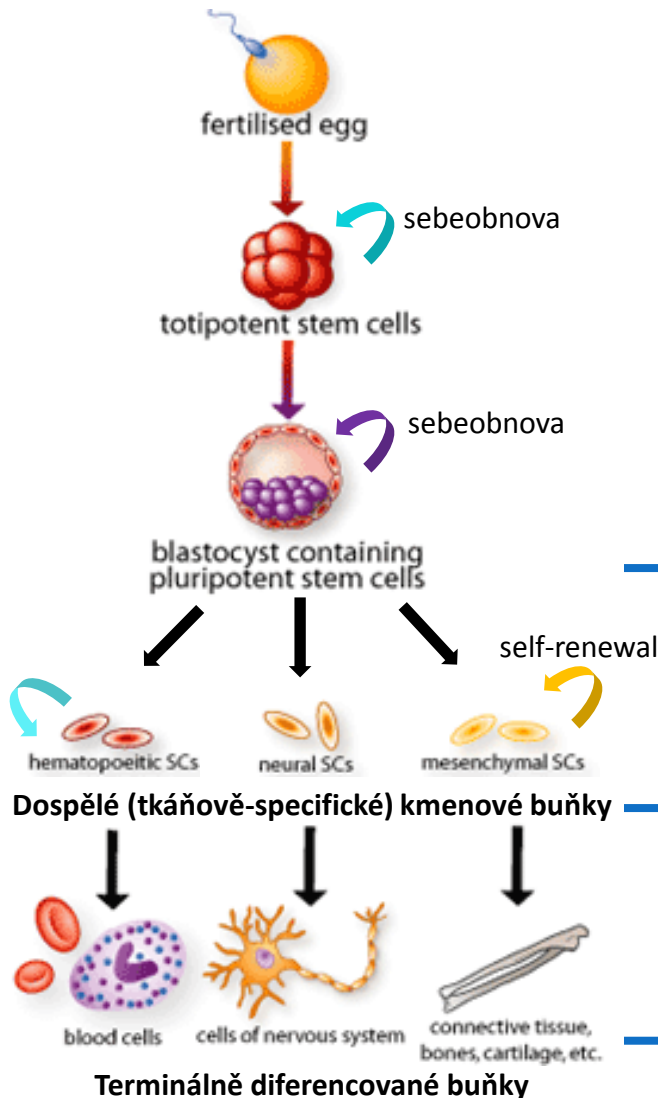
Buněčná *in vitro* toxikolog



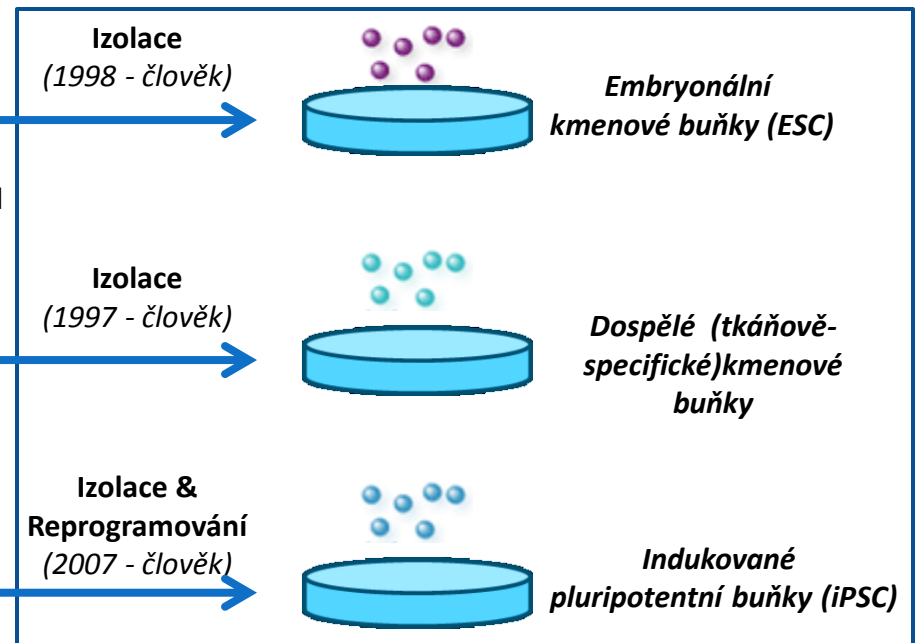
Research centre
for toxic compounds
in the environment

Proliferační potenciál
Potence

Diferenciace

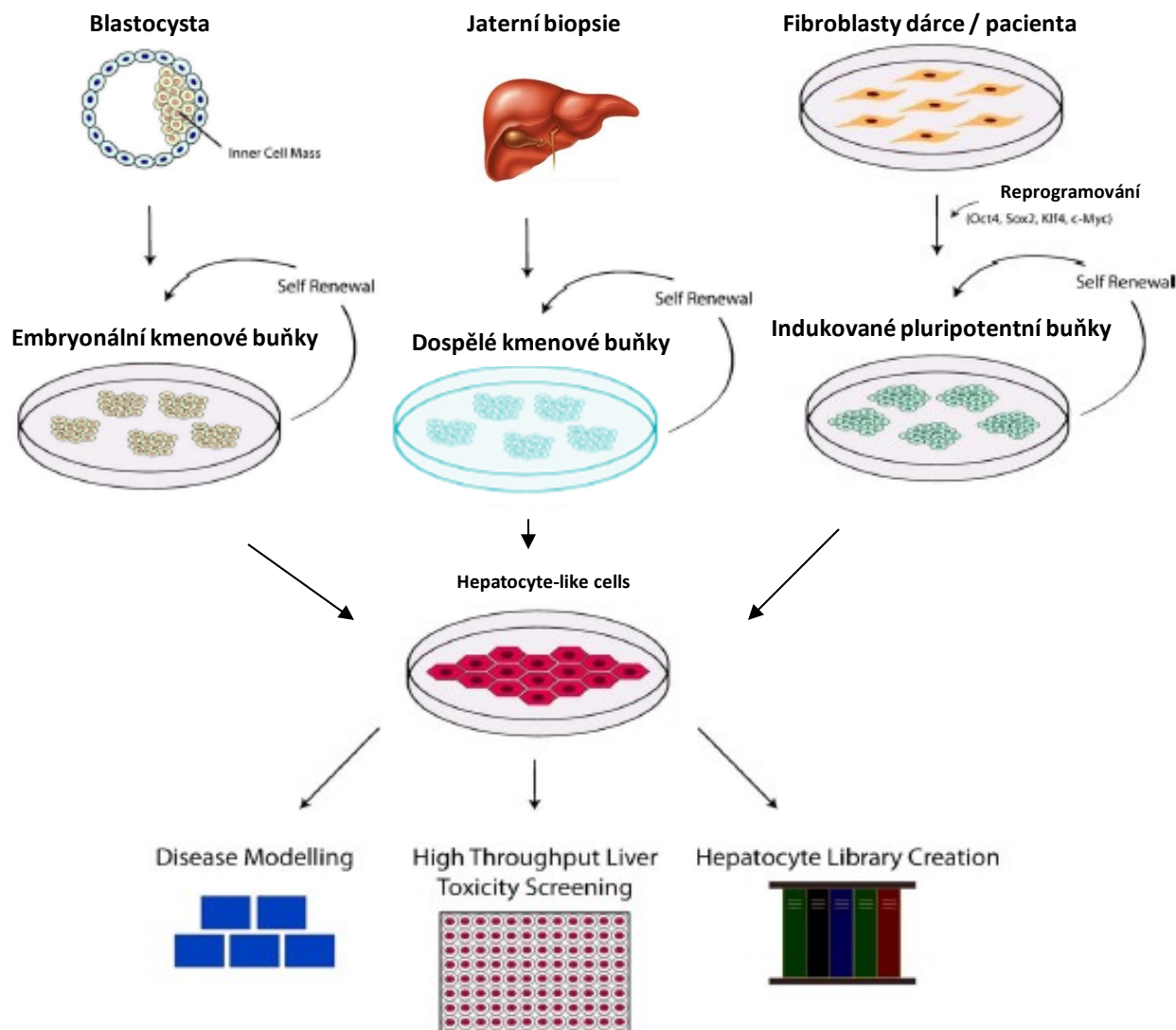


- Normální nenádorové buňky organismu
- Symetrické (**sebeobnova**) a asymetrické dělení (**diferenciace**)
- Vysoký proliferační potenciál a potence
- Vývoj protokolů pro jejich *in vitro* diferenciaci do požadovaných typů buněk



Buněčná *in vitro* toxikologie

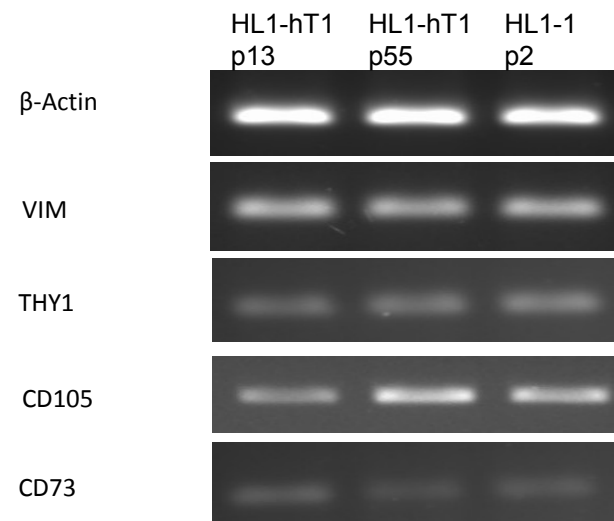
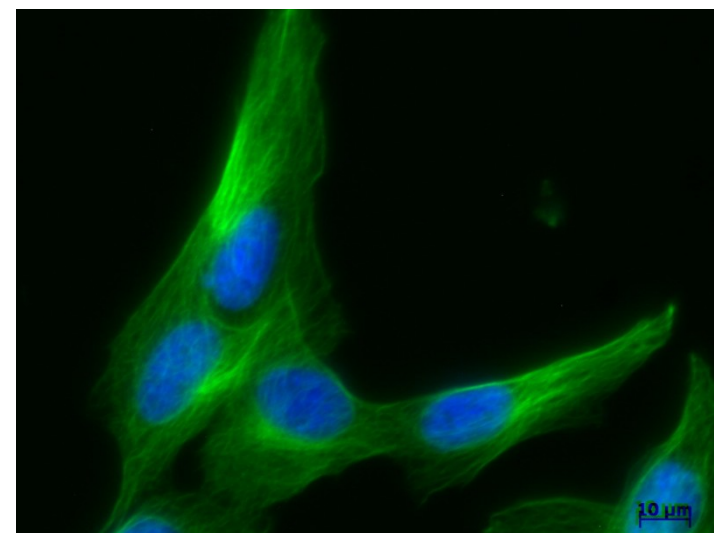
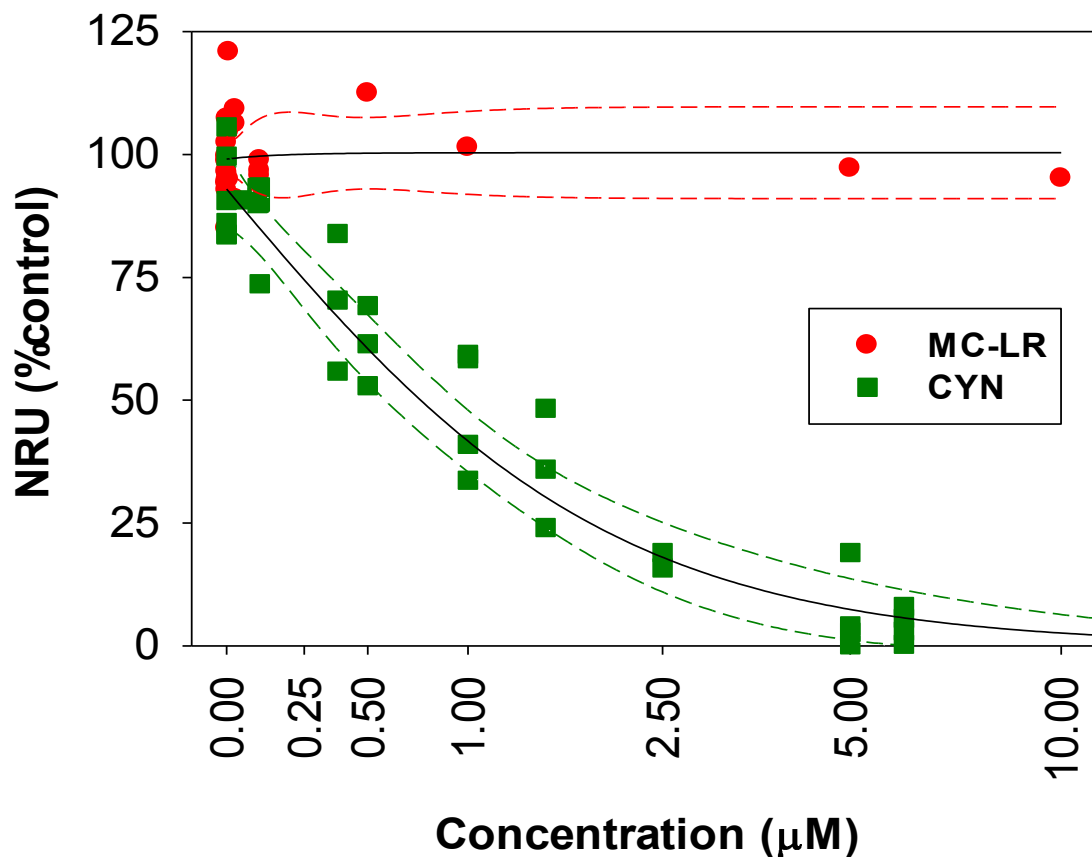
Research centre
for toxic compounds
in the environment



Upraveno dle
Greenhough
2010, Toxicology



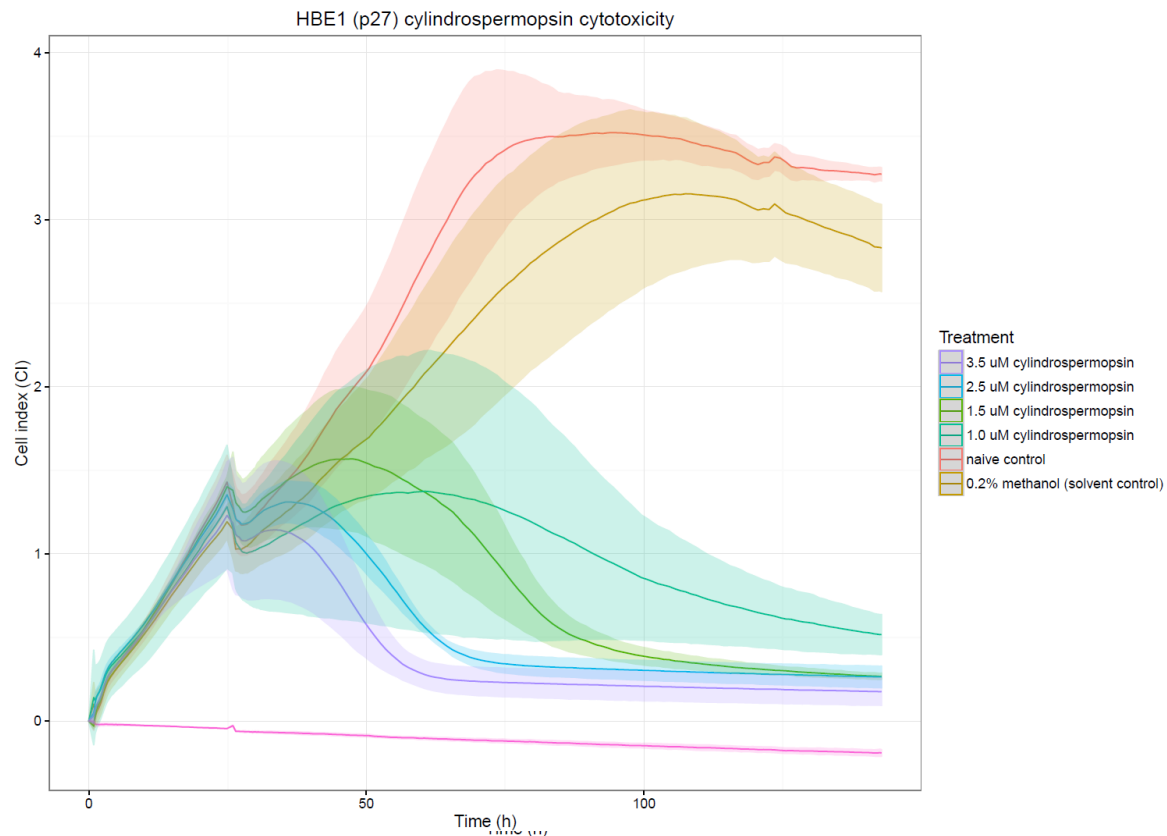
Lidské dospělé jaterní kmenové buňky HL1-1 & HL1-hT1





Sledování buněčných
odpovědí v reálném čase

**Real Time
Impedimetric Analysis**

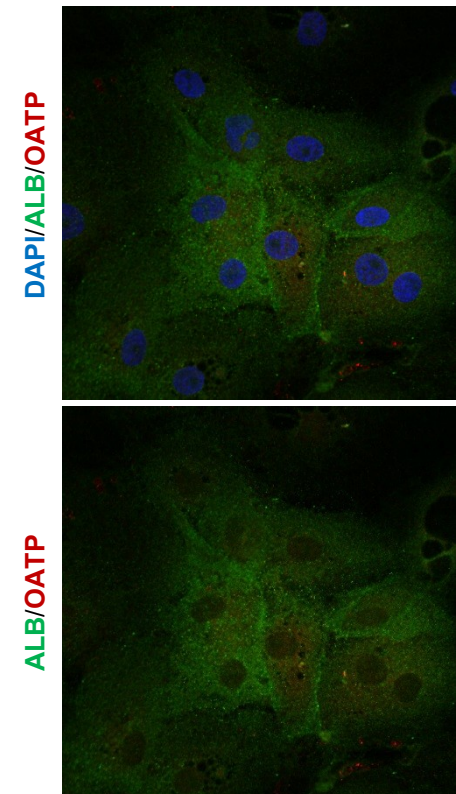
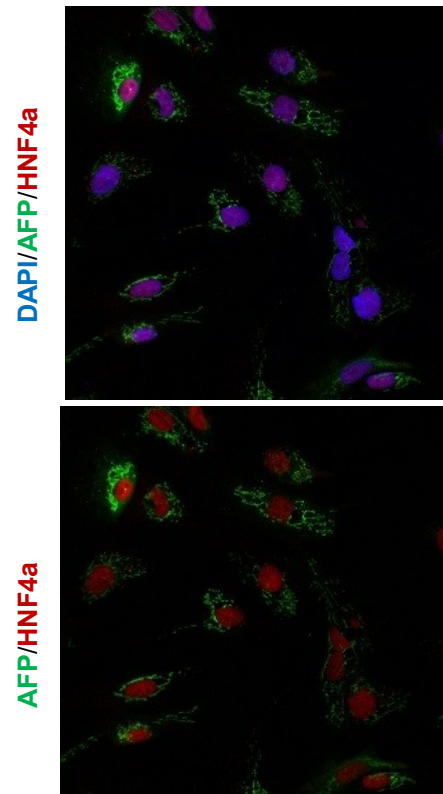
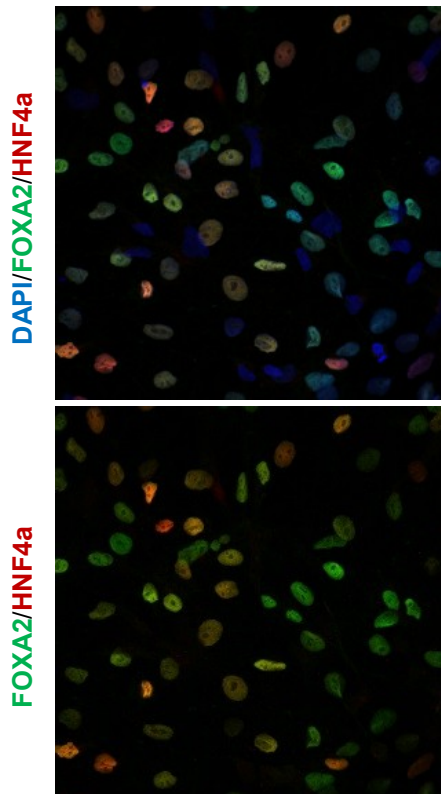
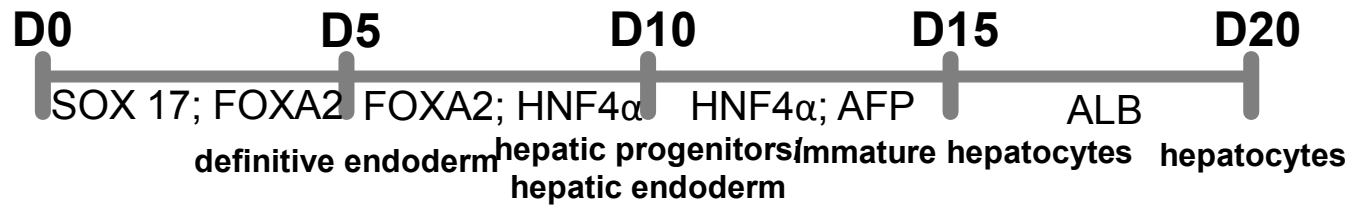


Buněčná *in vitro* toxikologie



Research centre
for toxic compounds
in the environment

Hepatocytární
diferenciace
hESCs
(spolupráce s
Lékařskou
fakultou)



Buněčná *in vitro* toxikolog



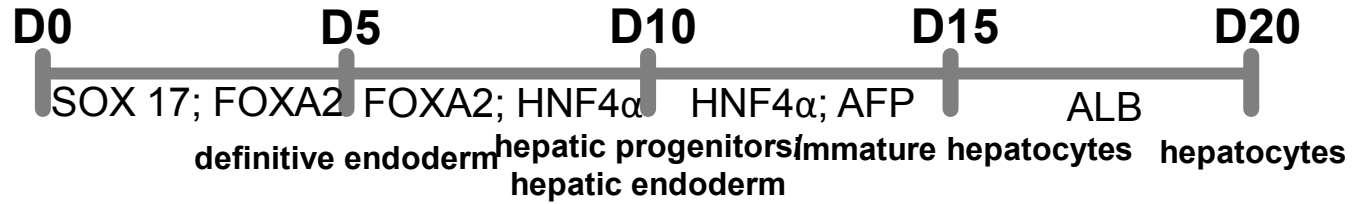
Research centre
for toxic compounds
in the environment

Hepatocytární diferenciace hESCs

(spolupráce s

Lékařskou CTRL

faku



D10

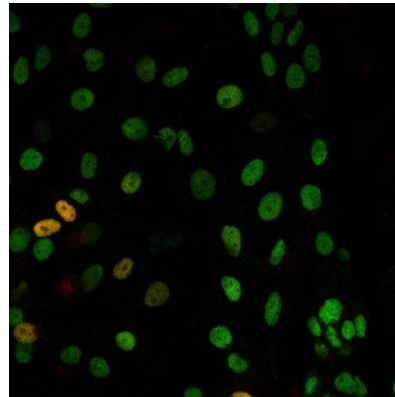
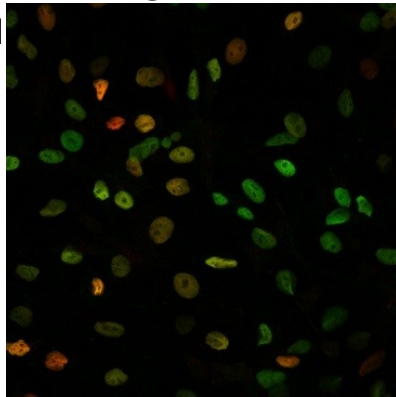
MC-LR 10uM

CTRL

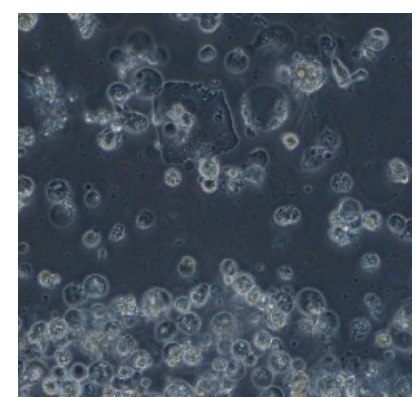
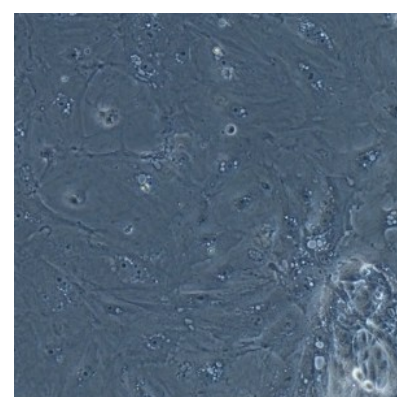
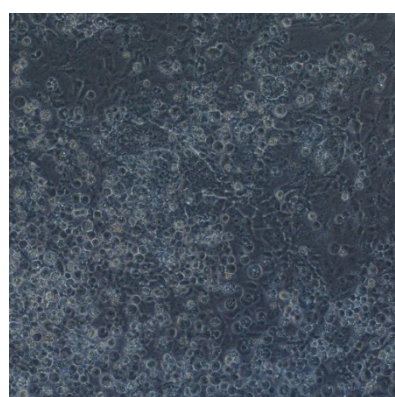
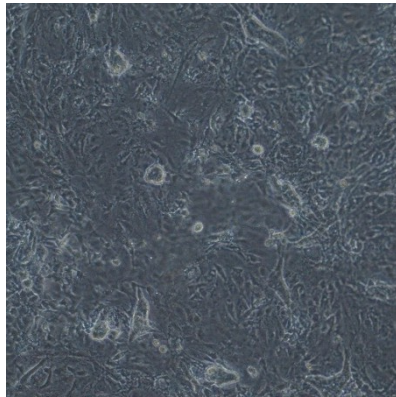
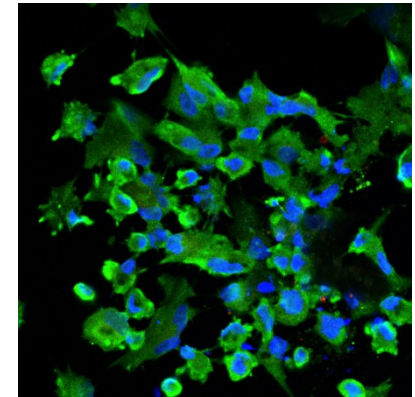
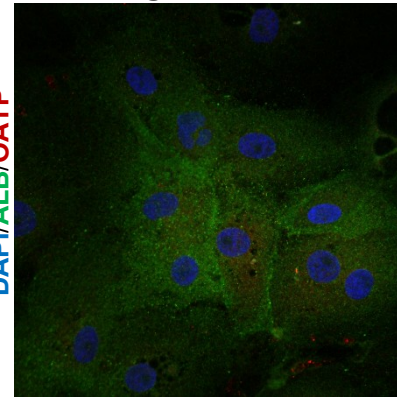
D20

MC-LR 10uM

FOXA2/HNF4a

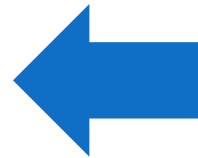
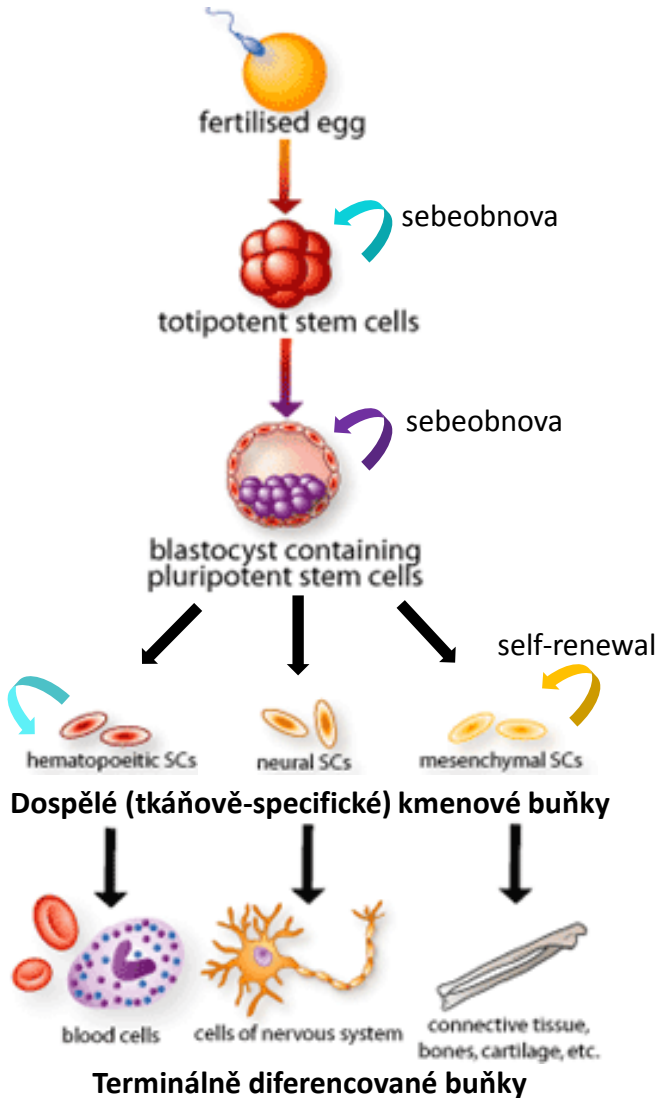
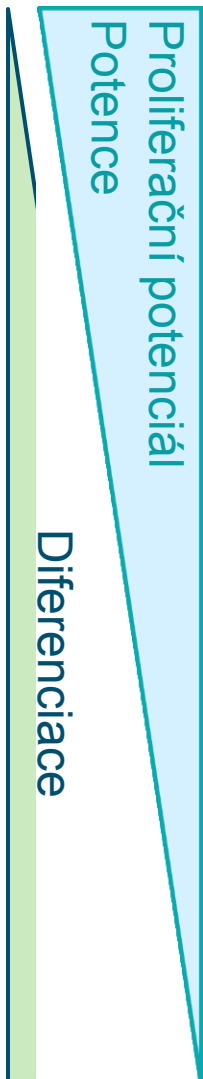


DAPI/ALB/OATP

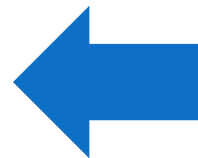


Buněčná *in vitro* toxikologie

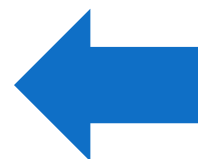
Research centre
for toxic compounds
in the environment



Efekty na kmenové buňky



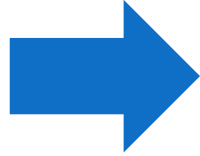
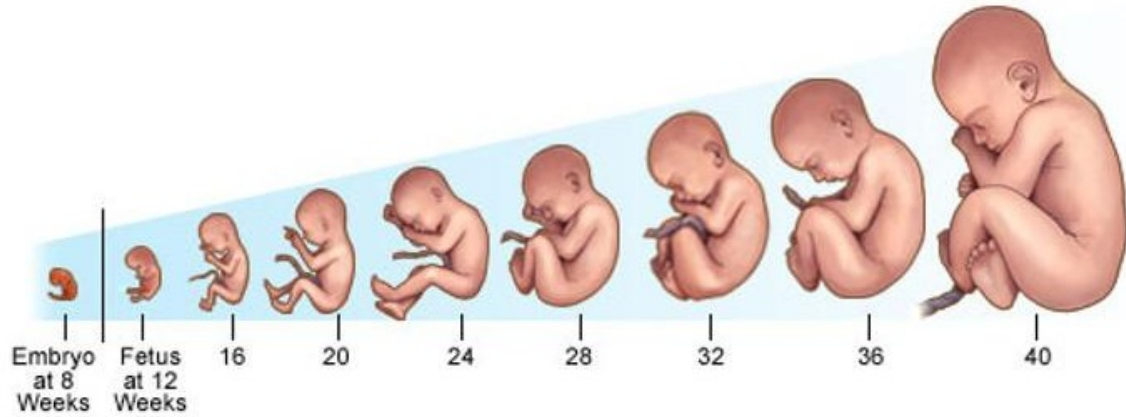
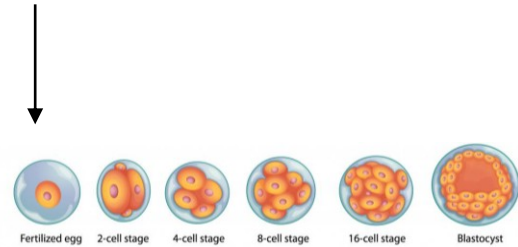
Efekty diferenciaci



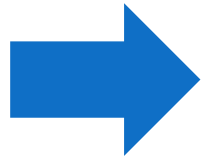
Efekty na diferencované buňky:
Hepatocyty
Neurony
Kardiomyocyty
...

Prenatal development

Single cell



Postnatal development



Healthy or Sick ?

- Diabetes
- Cardiovascular diseases
- Obesity
- Cancer
- Immune system disorders (Asthma, Allergies, IBDs)
- Pervasive Developmental Disorders
- Neurodegenerative disorders
- Male Infertility

200 cell types, 37.2×10^{12} cells

(Bianconi et al., 2013, *Annals of Human Biology* 40)

Kmenové buňky a tkáňová homeostáza v chronických onemocněních a toxicitě?



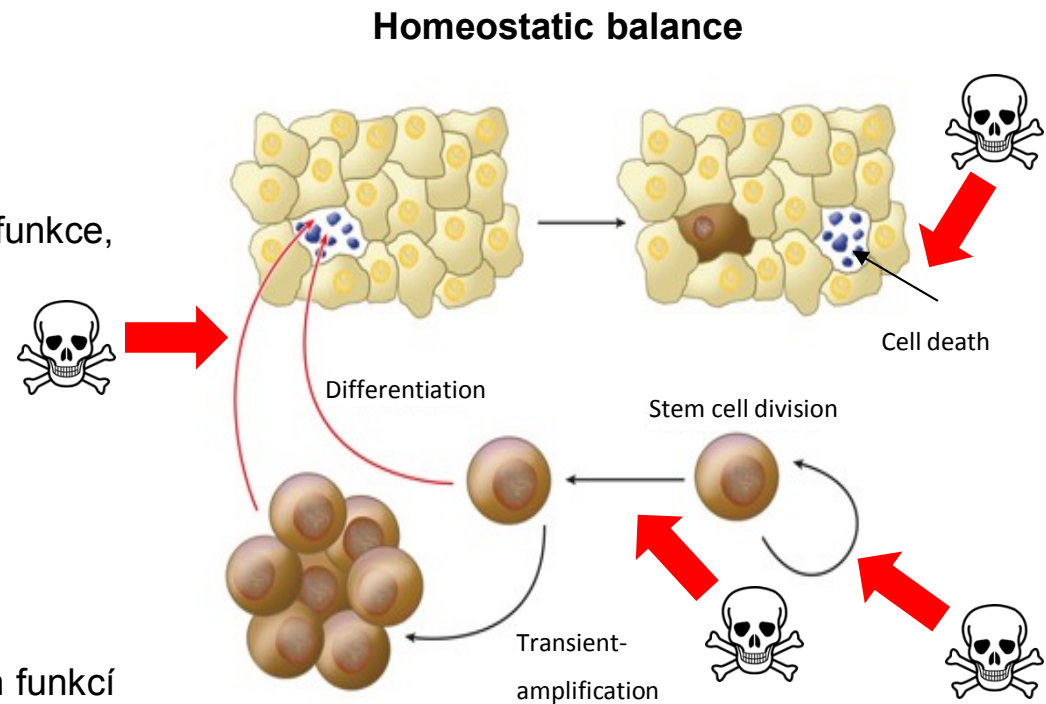
Research centre
for toxic compounds
in the environment

Postnatální vývoj a dospělost:

- Dospělé (somatické, tkáňově specifické) kmenové buňky - tvorba tkání, jejich vývoj, funkce, regenerace

Tkáňová homeostáza:

- Udržování ustáleného stavu uvnitř tkáně zahrnující kontrolu buněčné proliferace, diferenciace, smrti a kontrolu metabolických funkcí
- Dynamická kontrola aktivity dospělých (somatických) kmenových buněk



In humans ... it has been estimated that each of us eradicate and, in parallel, generate a mass of cells equal to almost our entire body weight each year.

Kmenové buňky a tkáňová homeostáza v chronických onemocněních a toxicitě?



Research centre
for toxic compounds
in the environment

Cell Stem Cell
Review

Biogerontology (2013) 14:573–590
DOI 10.1007/s10522-013-9469-9

REVIEW ARTICLE

Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and Cancer

Peter D. Adams,^{1,4} Heinrich Jasper,^{2,4} and K. Lenhard Rudolph^{3,4,*}

¹University of Glasgow and Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow G61 1BD, UK

²Buck Institute for Research on Aging, 8001 Redwood Boulevard, Novato, CA 94945-1400, USA

³Leibniz Institute for Age Research - Fritz Lipmann Institute e.V. (FLI), Beutenbergstr. 11, 07745 Jena, Germany

⁴Co-senior author

*Correspondence: KLRudolph@FLI-Leibniz.de

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.002>

Tissue resident stem cells: till death do us part

Hadas Raveh-Amit · Sara Berzsenyi ·
Virag Vas · Danna Ye · Andras Dinnyes

STEM CELLS AND DEVELOPMENT
Volume 00, Number 00, 2015
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/scd.2015.0081

COMPREHENSIVE REVIEW

Role of Environmental Chemicals, Processed Food Derivatives, and Nutrients in the Induction of Carcinogenesis

Luca Persano,^{1,2} Dimitra Zagoura,³ Jochem Louisse,⁴ and Francesca Pistollato⁵

CANCER ETIOLOGY

Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions

Cristian Tomasetti^{1*} and Bert Vogelstein^{2*}

<http://www.eurostemcell.org/stem-cell-factsheets>

Mezibuněčná komunikace mezerovými spoji – klíčový mechanismus homeostatické kontroly

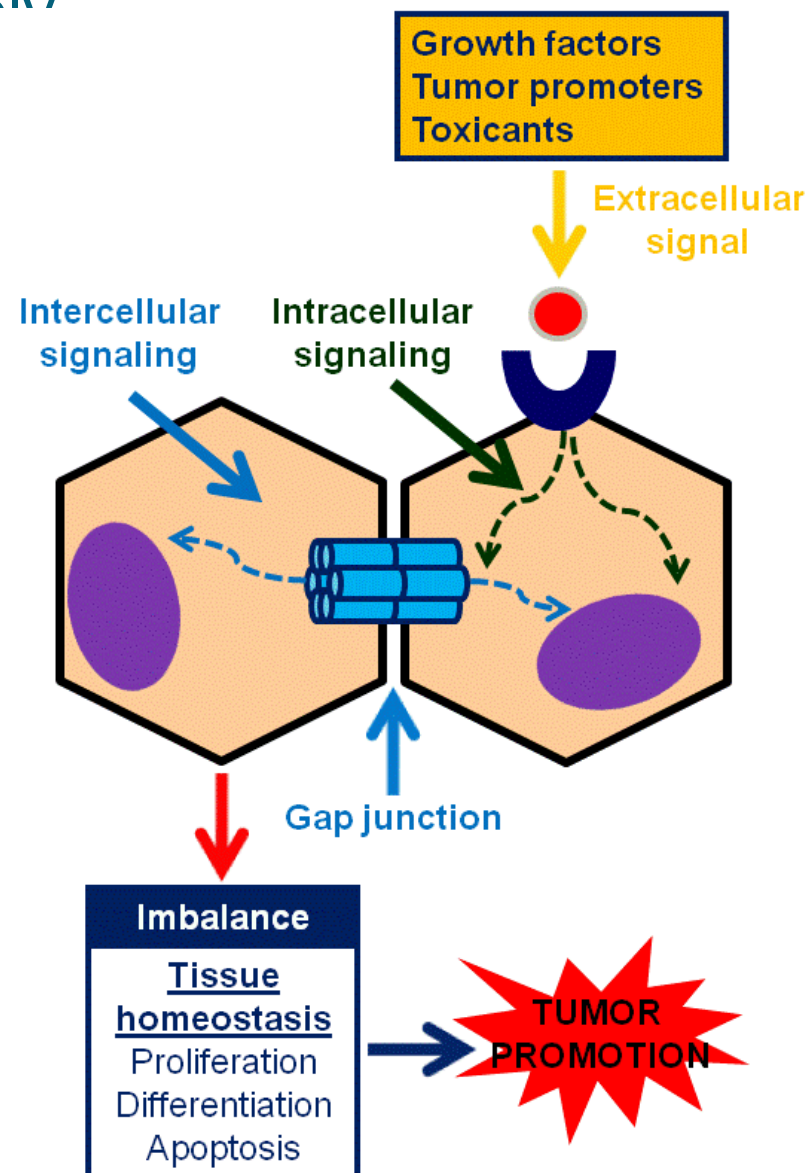


Research centre
for toxic compounds
in the environment

- Gap junction – mezerové spoje
- Propojení buněk ve tkáních a zajištění výměny metabolitů a signálních molekul:

GJIC – gap junctional intercellular communication

- Koordinované chování buněk a rovnováha proliferace / diferenciace / apoptózy
- Narušení GJIC → abnormální chování buněk → onemocnění

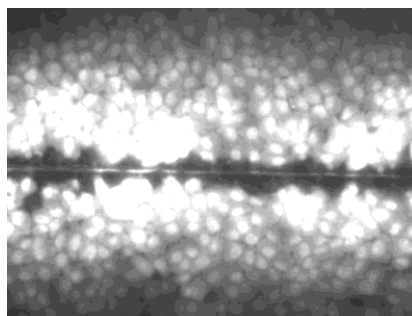


Mezibunecná komunikace mezerovými spoji – klíčový mechanismus homeostatické kontroly

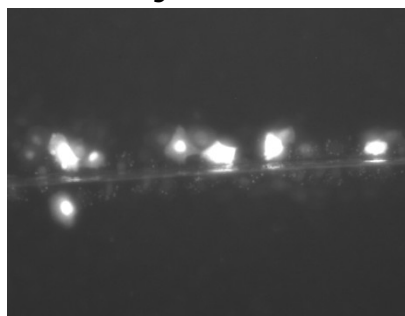


Research centre
for toxic compounds
in the environment

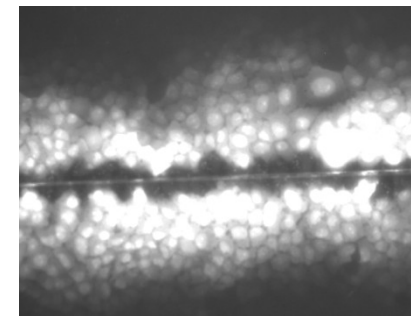
kontrola



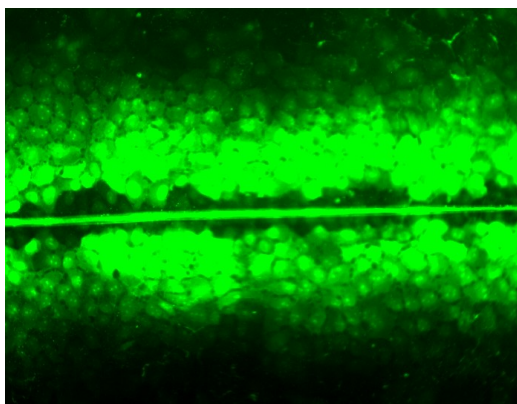
1-methylantracene



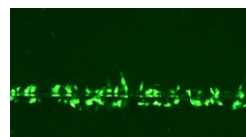
***Resveratrol+
1-methylantracene***



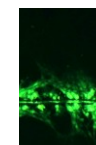
kontrola



Ras-onkogen



Ras-onkogen + Metformin



3D *in vitro* kultivace



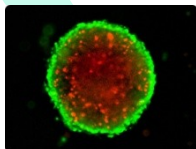
Research centre
for toxic compounds
in the environment

Animal models

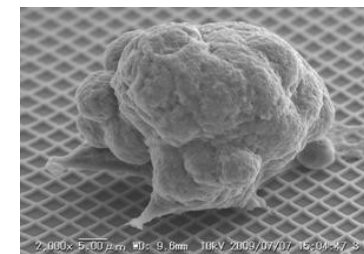


- Vysoce komplexní
- Limitovaná dostupnost (3R, efektivita, cena)
- Rozdílnost od lidského organismu

3D cell cultures



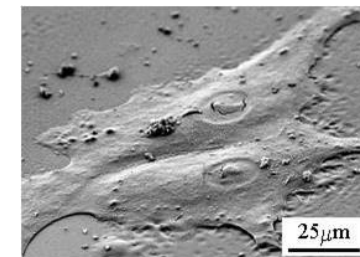
- Lépe napodobují *in vivo* mikroprostředí
 - Gradienty O₂/CO₂, živin, proliferace
 - 3D morfologie / polarizace buněk
 - Interakce buňka-buňka / buňka-ECM
 - Lépe napodobují funkce normálních tkání a orgánů
- => **Lepší fyziologická / *in vivo* relevance**



2D cell cultures

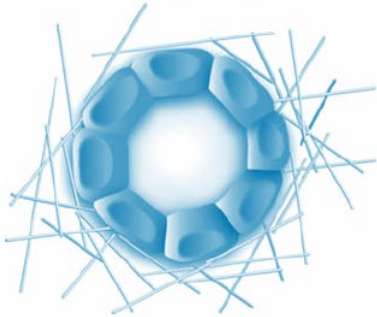


- Vysoká proliferační rychlost, uniformita
- Nefyziologická 3D cytoarchitektura
- Minimum interakcí buňka-buňka / buňka-ECM
- Nádorové buněčné linie
- Nedostatečně rekapitulují funkce

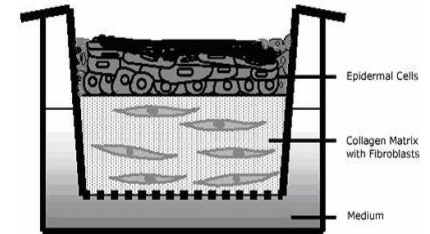
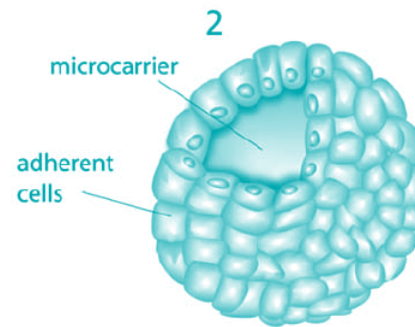
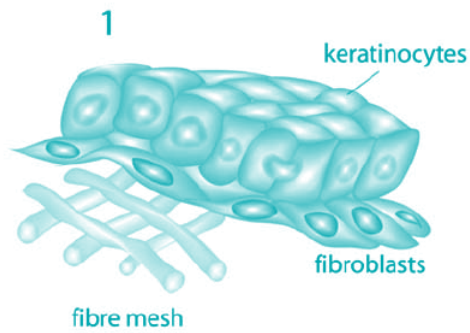


3D *in vitro* kultivace

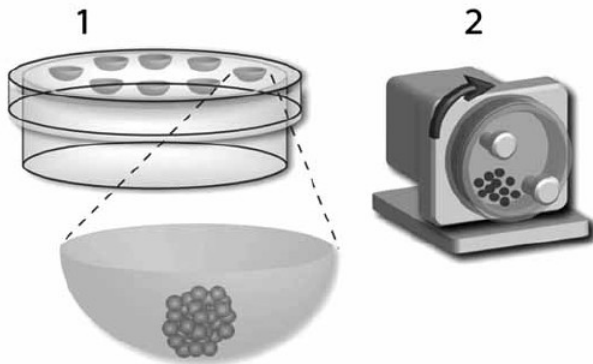
a) 3D cultures in ECM hydrogel



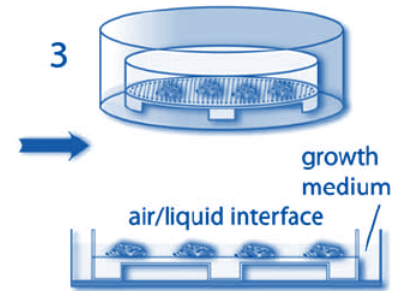
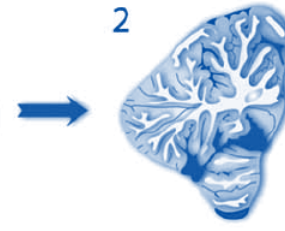
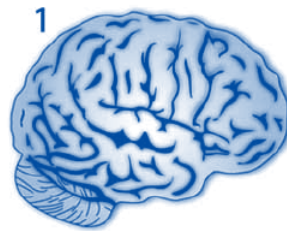
c - Cultures on microcarriers and on microstructured materials



b) Cellular spheroids

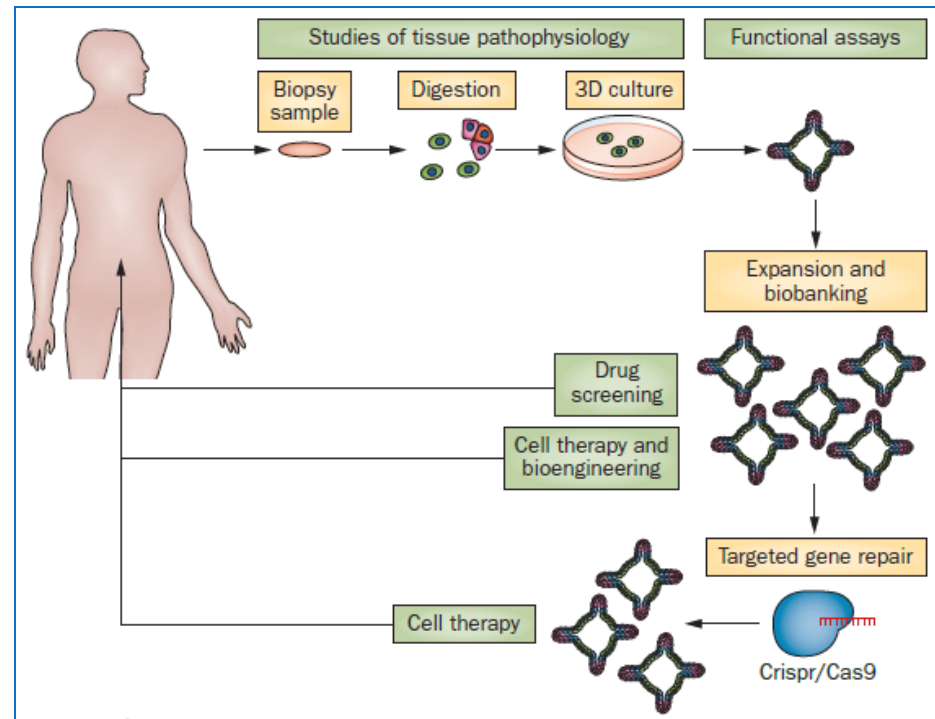
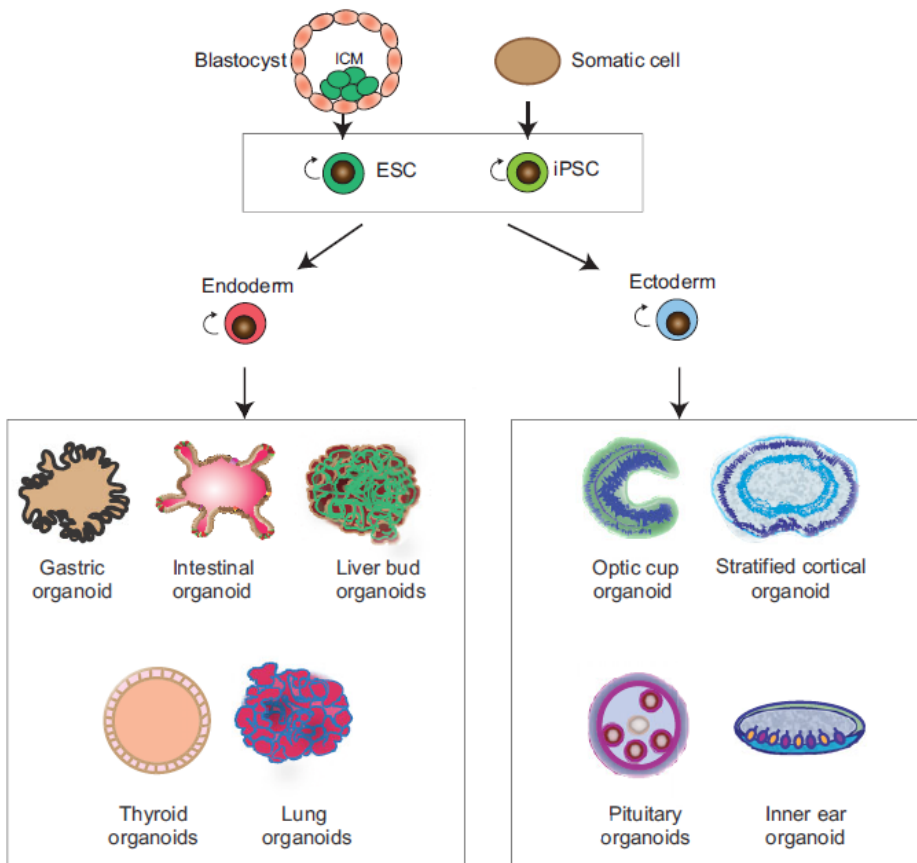


d - Organotypic slice cultures



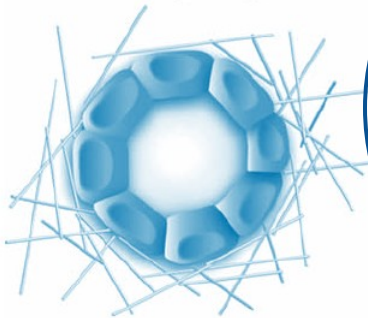
3D *in vitro* kultivace & kmenové buňky

In vitro kultury lidských organoidů

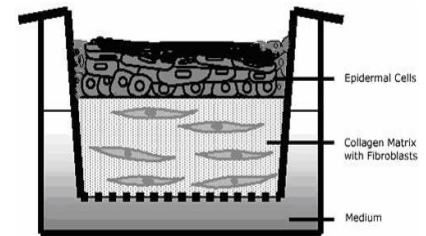
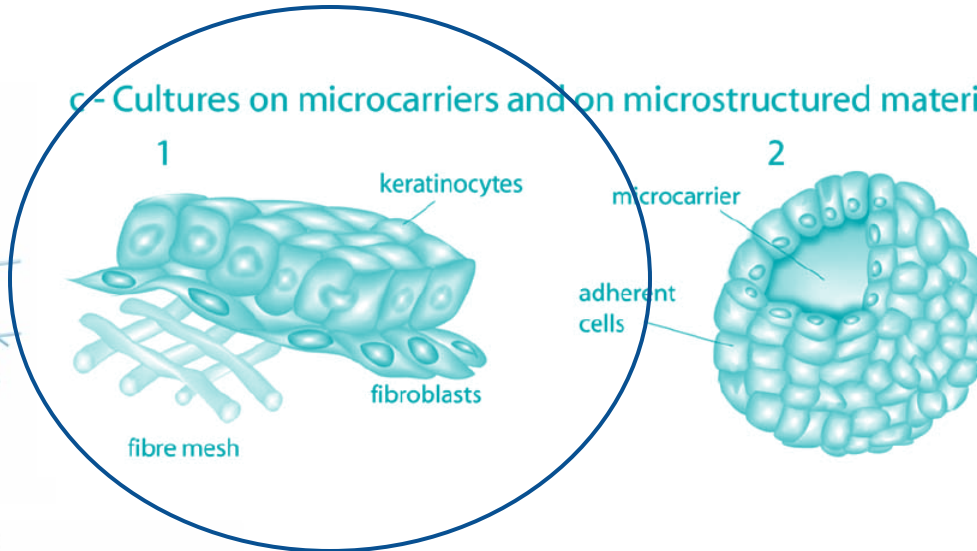


3D *in vitro* kultivace

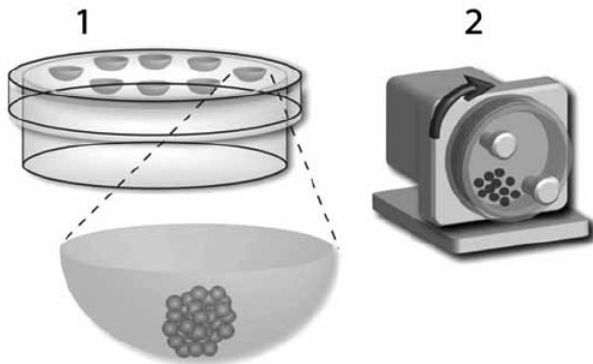
a) 3D cultures in ECM hydrogel



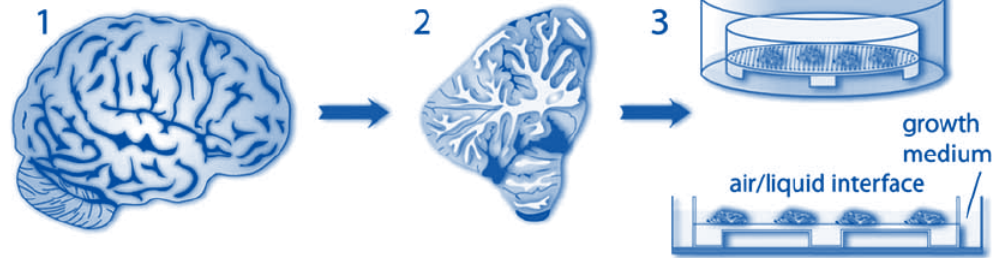
c- Cultures on microcarriers and on microstructured materials



b) Cellular spheroids



d - Organotypic slice cultures

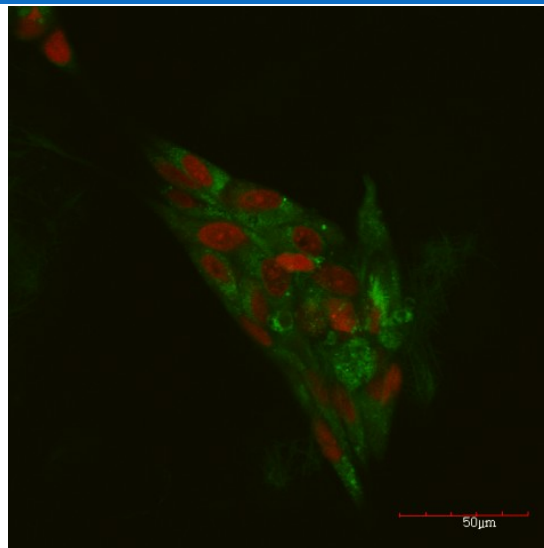


3D *in vitro* kultivace

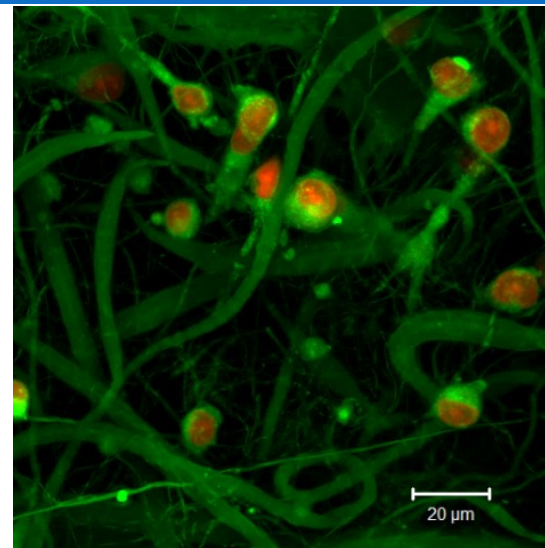


Research centre
for toxic compounds
in the environment

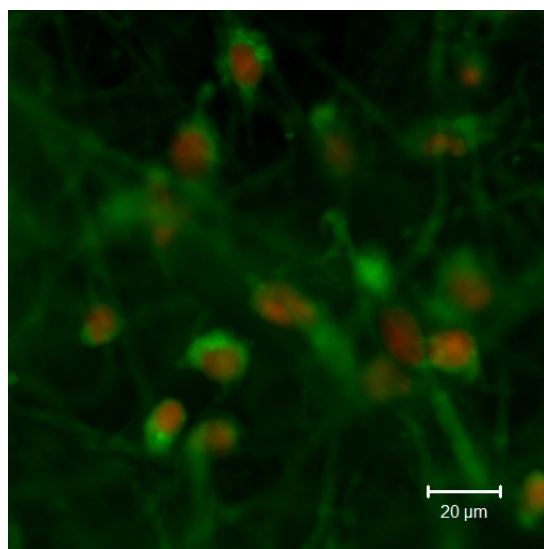
Lidské dospělé jaterní
kmenové buňky HL1-
hT1
a Inomatrix Scaffolds^{NF}



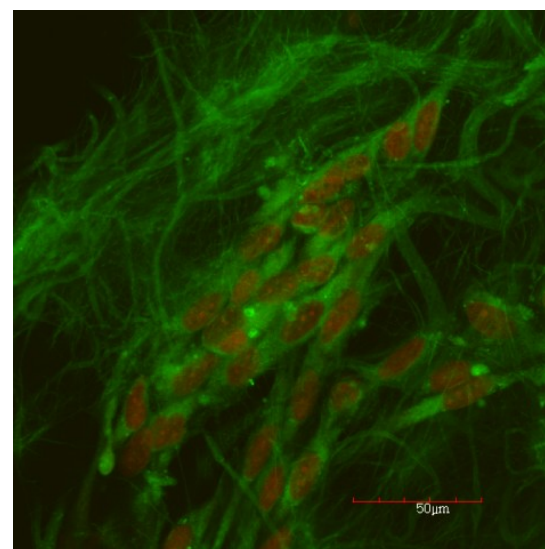
MF



NF/MF

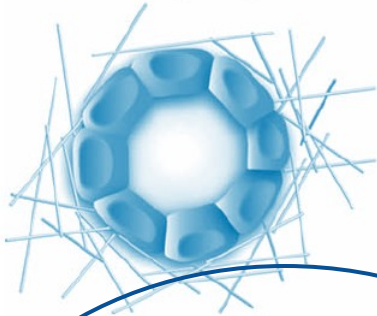


PF

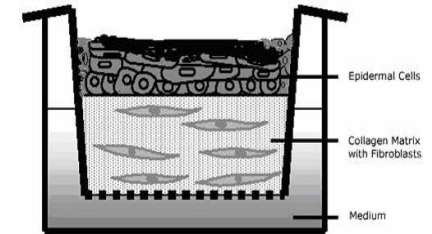
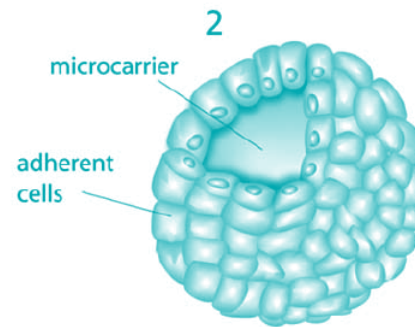
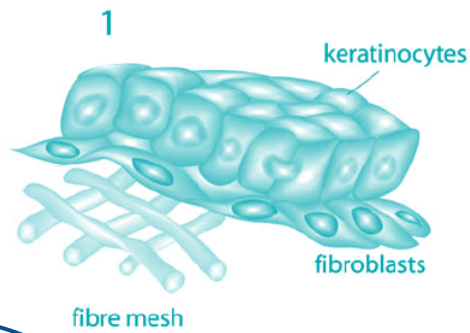


3D *in vitro* kultivace

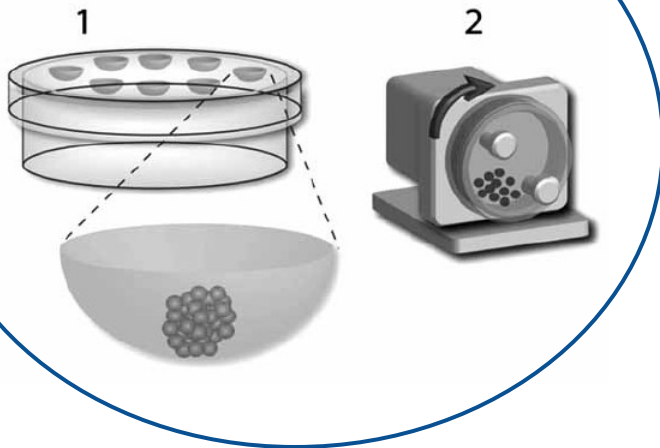
a) 3D cultures in ECM hydrogel



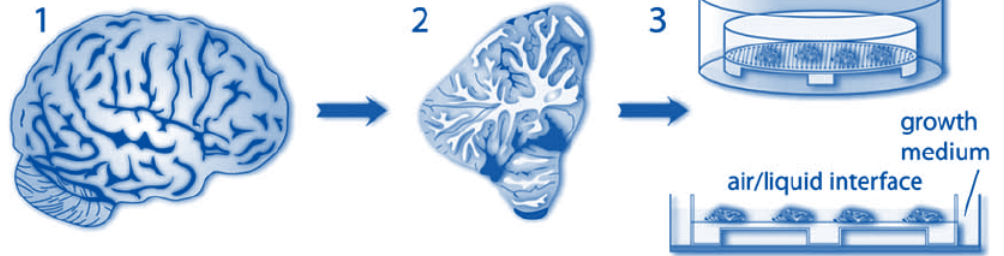
c - Cultures on microcarriers and on microstructured materials



b) Cellular spheroids



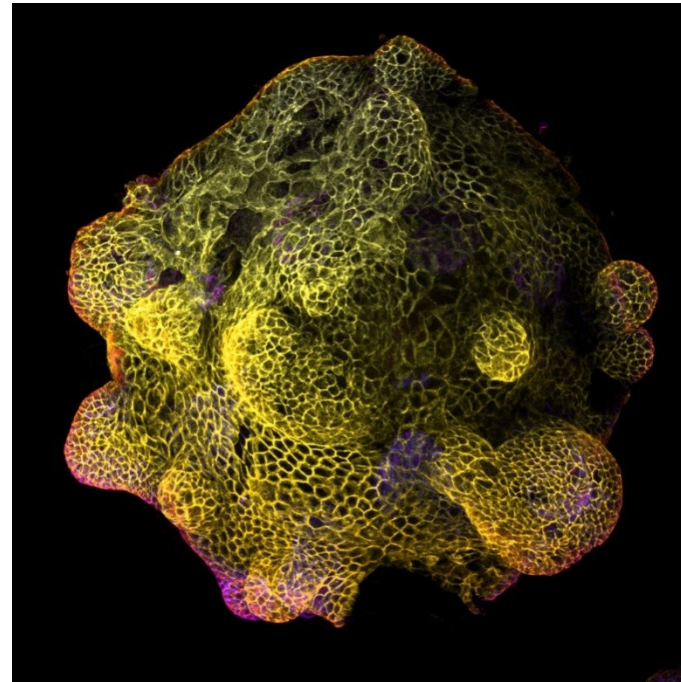
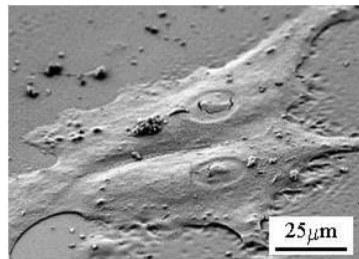
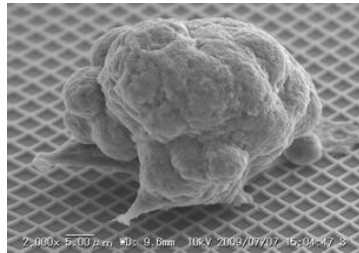
d - Organotypic slice cultures



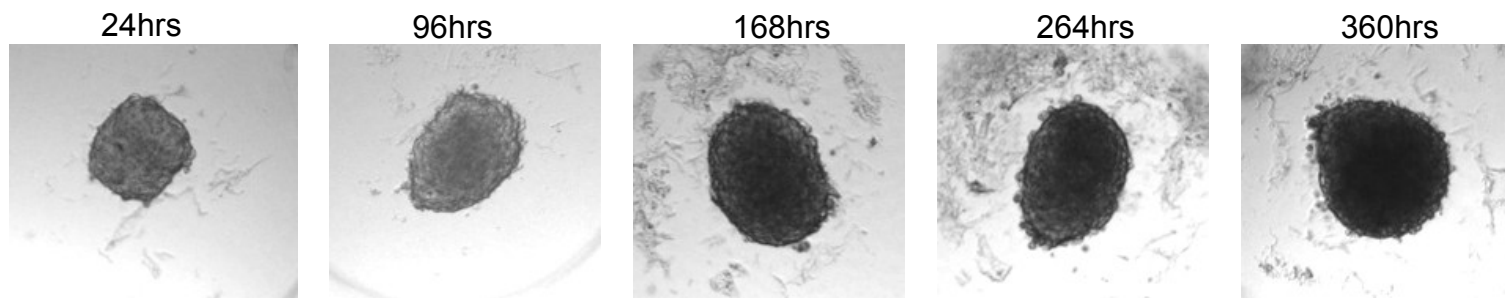
3D *in vitro* kultivace



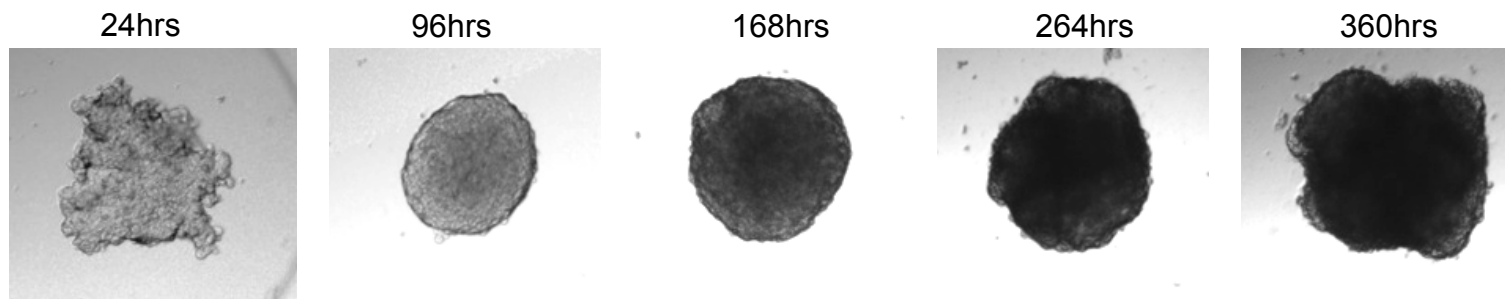
Research centre
for toxic compounds
in the environment



Dospělé lidské jaterní kmenové buňky HL1hT1



HepG2 lidský hepatocelulární karcinom

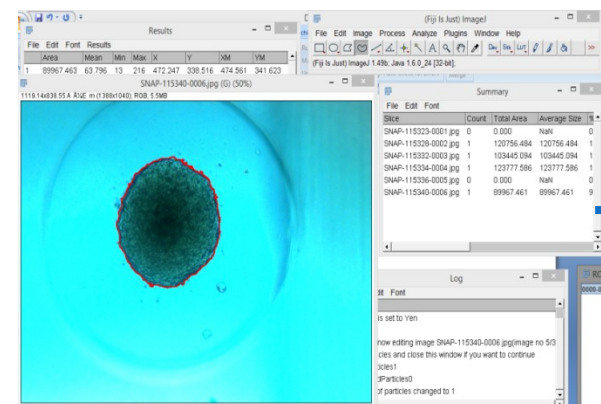
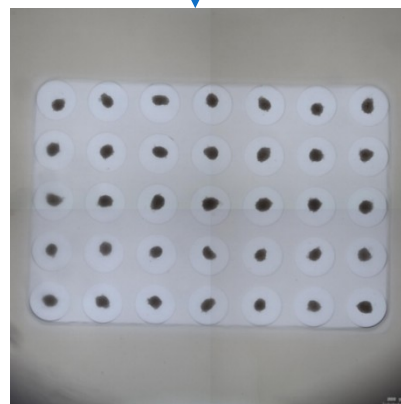
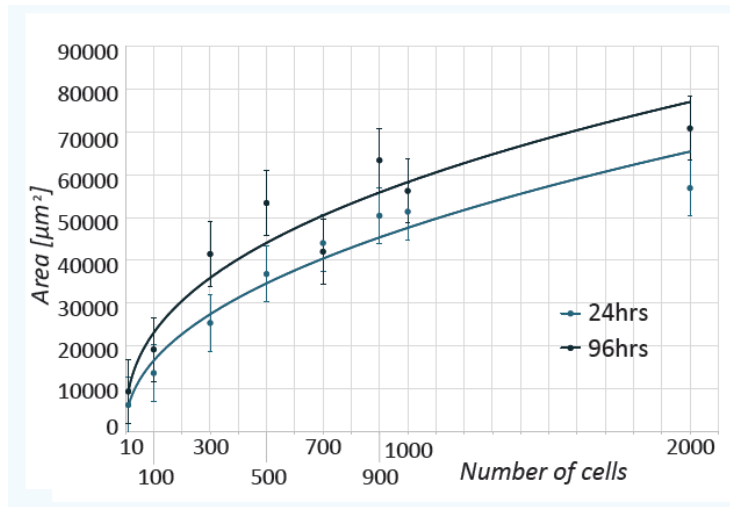


(2000 cells/spheroid)

3D *in vitro* kultivace



Research centre
for toxic compounds
in the environment

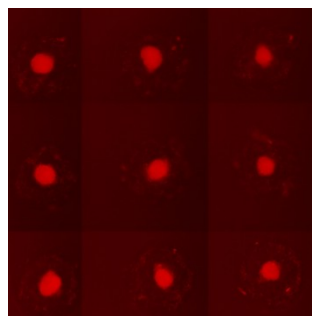


3D *in vitro* kultivace

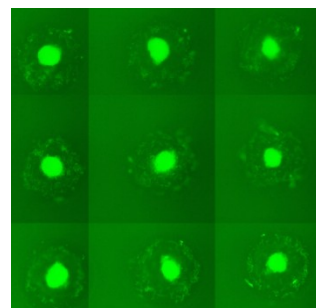


Research centre
for toxic compounds
in the environment

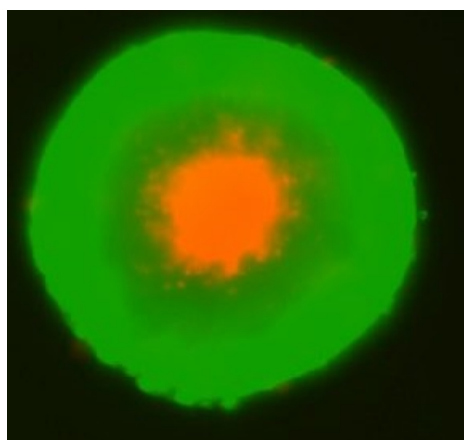
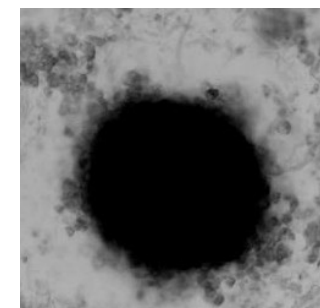
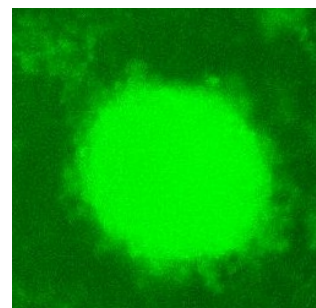
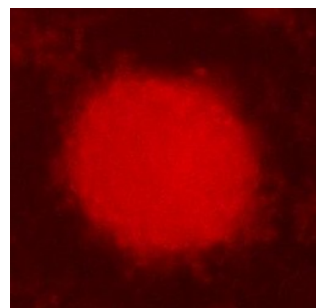
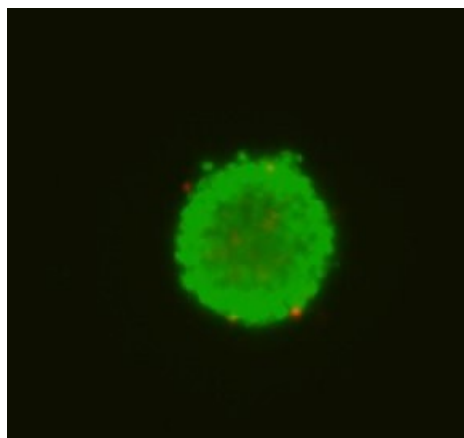
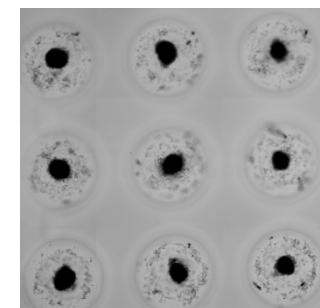
Alamar Blue



CFDA-AM



Brightfield



• Viabilita

- **Genová exprese** – PCR / qPCR

- **Aktivita proteinů** – Western blotting, ICC

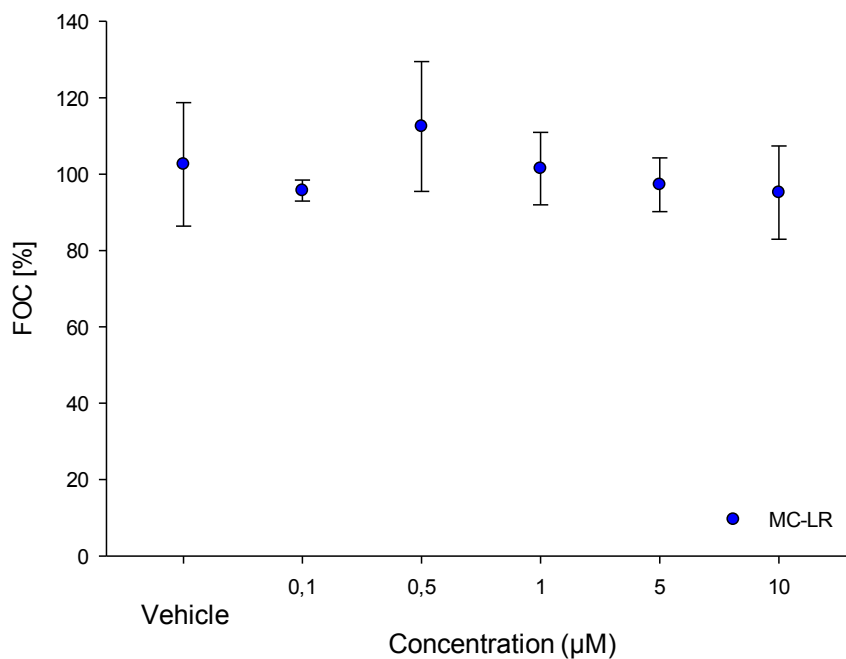
- **Metabolismus** – LC-MS

3D *in vitro* kultivace

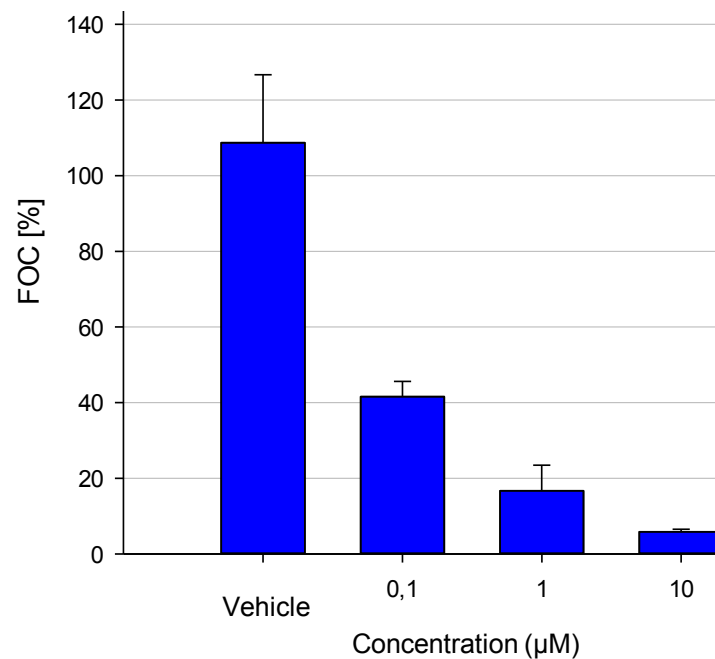


Research centre
for toxic compounds
in the environment

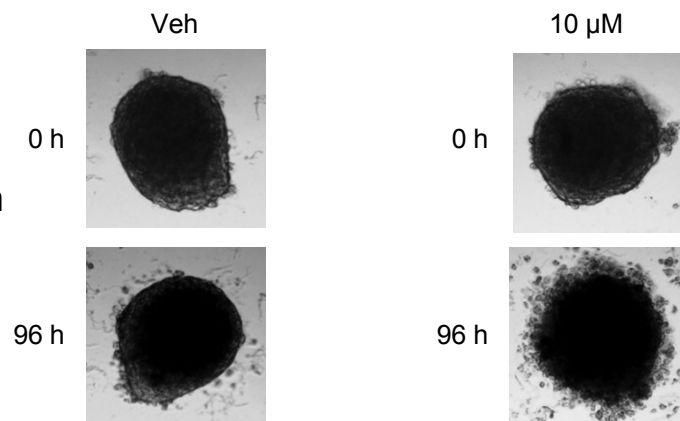
2D culture (NRU, 96 h)



3D spheroids (Alamar Blue, 96 h)

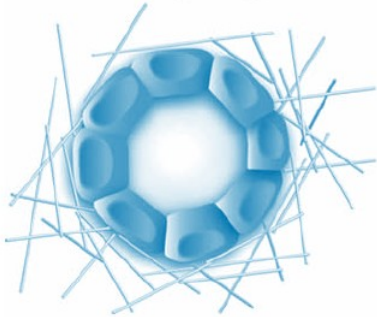


4000 cell/sph
168 h old

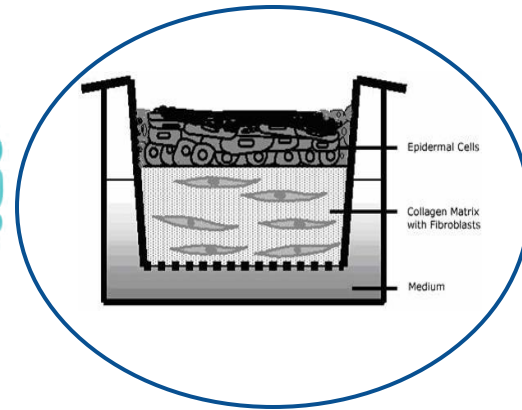
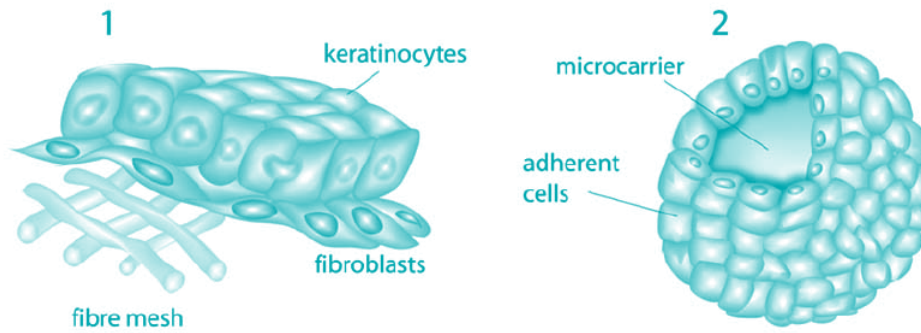


3D *in vitro* kultivace

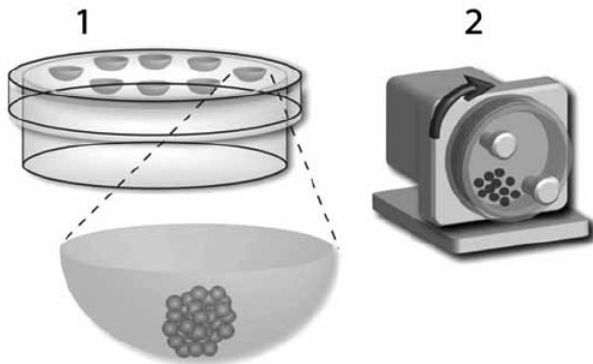
a) 3D cultures in ECM hydrogel



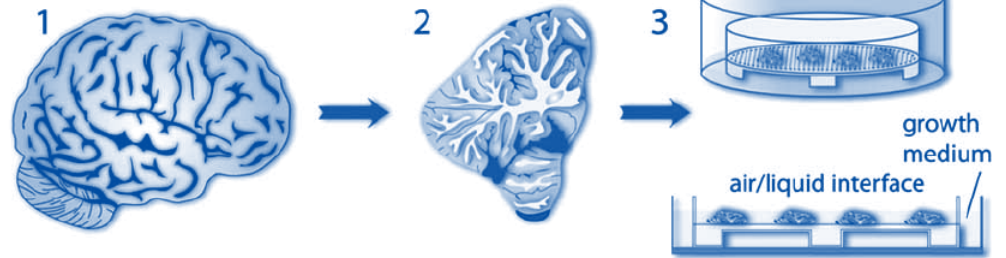
c - Cultures on microcarriers and on microstructured materials



b) Cellular spheroids



d - Organotypic slice cultures



3D *in vitro* kultivace



Research centre
for toxic compounds
in the environment

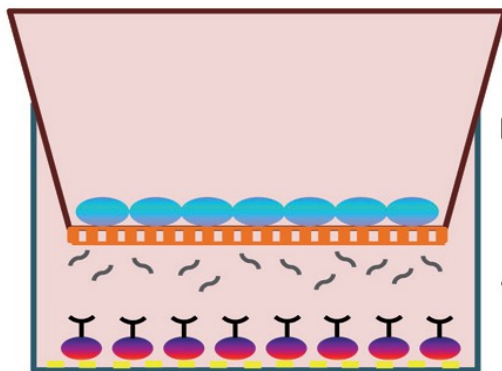
Polarizace buněk a tvorba epiteliálních vrstev

- střevo
- ledviny
- plíce

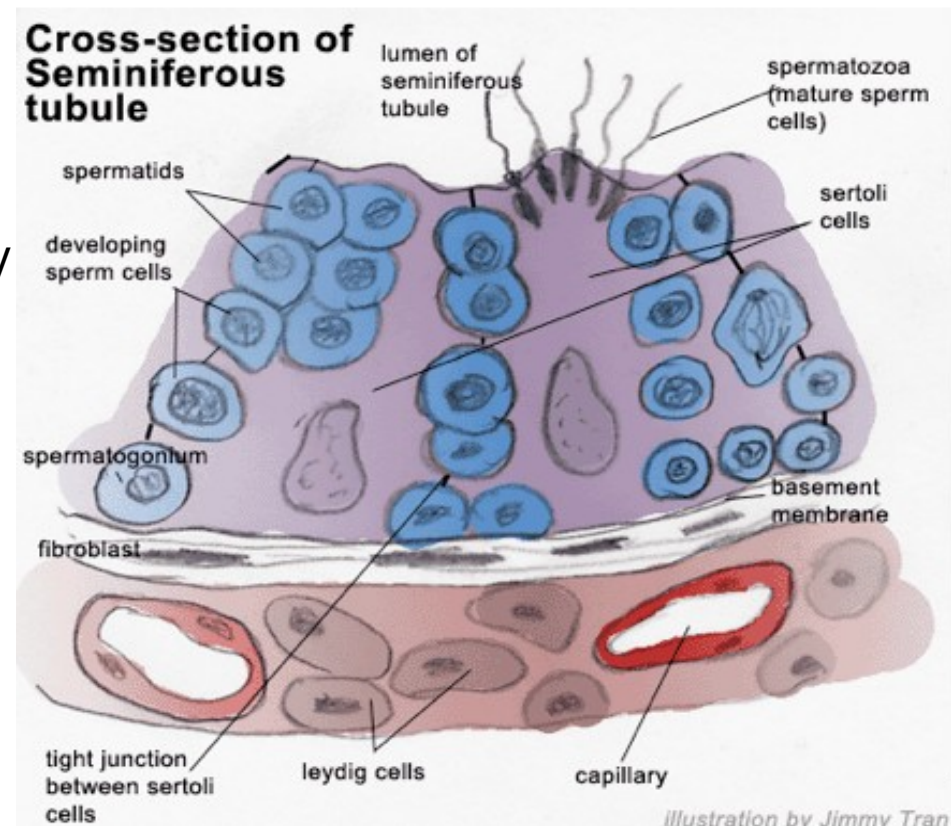
Kokultivace různých buněčných typů

- Epiteliální buňky a makrofágy
- Leydigovy a Sertoliho buňky

Insert: Effector Cells



Bottom: Target Cells

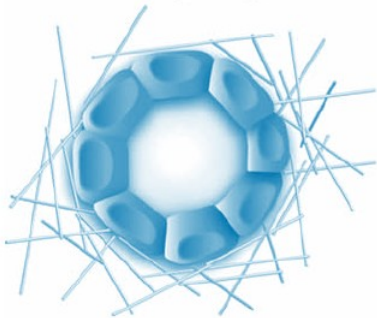


3D *in vitro* kultivace

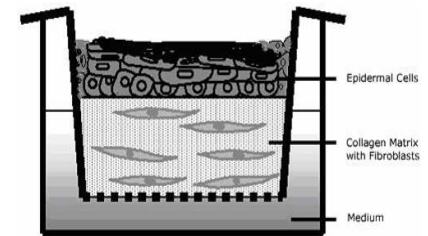
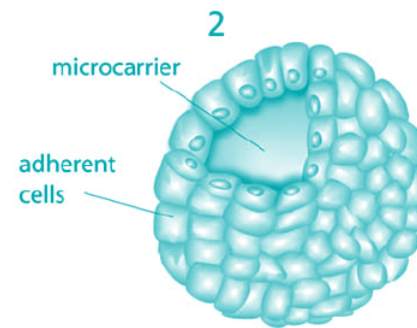
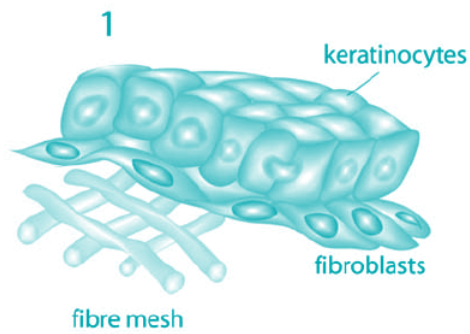


Research centre
for toxic compounds
in the environment

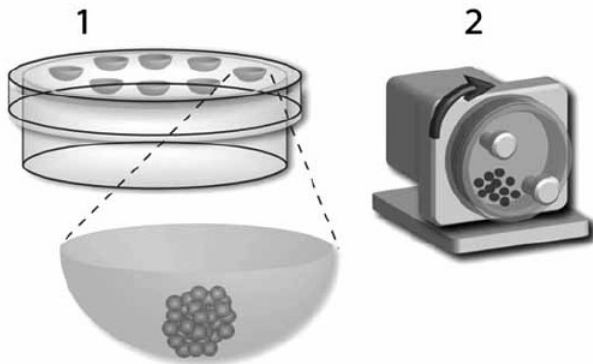
a) 3D cultures in
ECM hydrogel



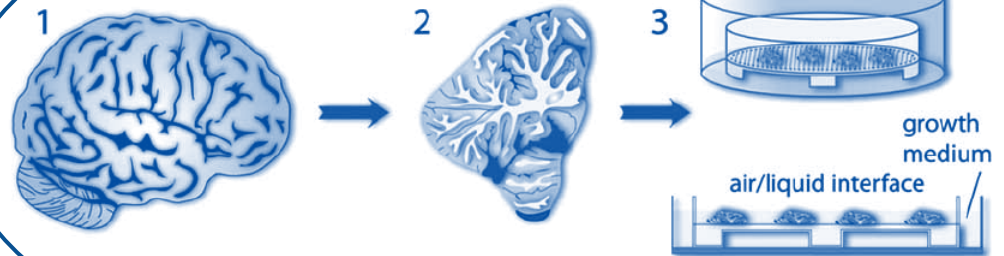
c - Cultures on microcarriers and on microstructured materials



b) Cellular spheroids



d - Organotypic slice cultures

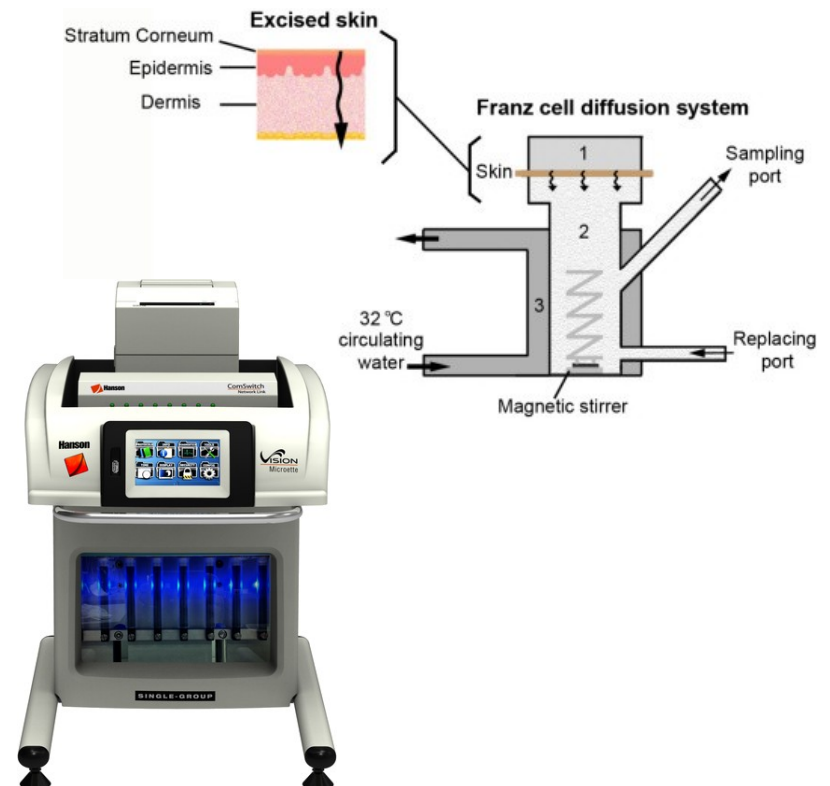


3D *in vitro* models



Research centre
for toxic compounds
in the environment

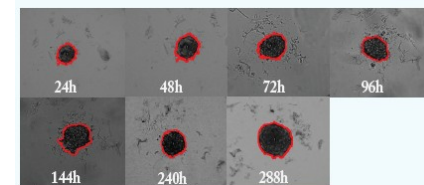
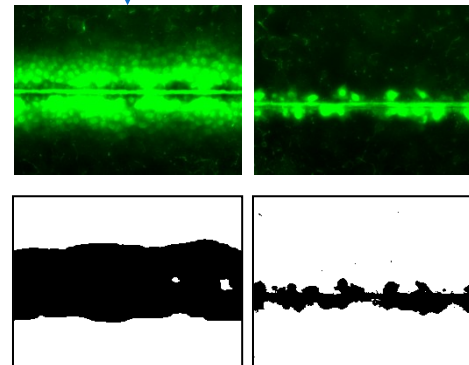
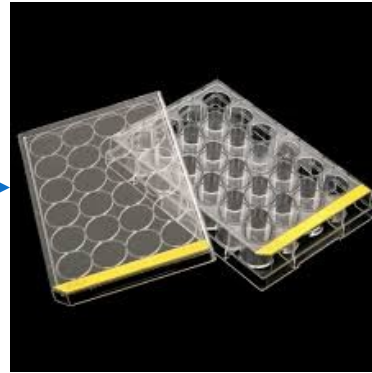
Elektrický dermatom na přípravu kožních štěpů Zařízení na měření prostupu látek přes kůži

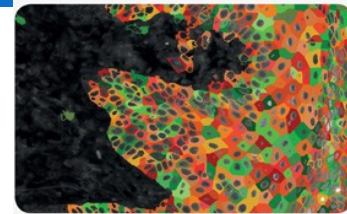
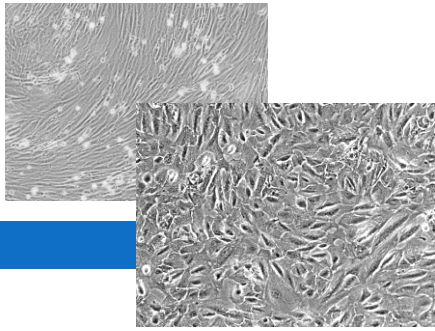


High-throughput / High content analysis



Research centre
for toxic compounds
in the environment





Stem cell-based models

Homeostasis relevant endpoints in HTS / HCA

<http://recetox.muni.cz>
<http://secantox.weebly.com>

Physiologically relevant *in vitro* models QIVIVE

Toxicity testing & drug screening

