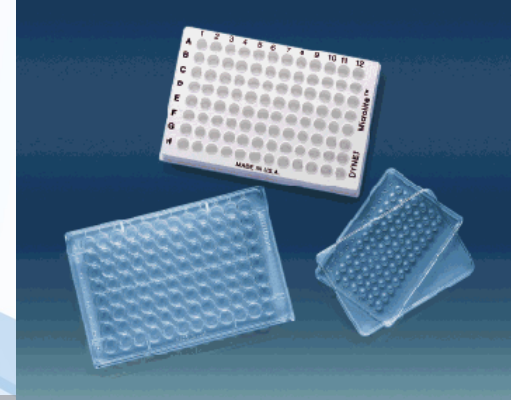


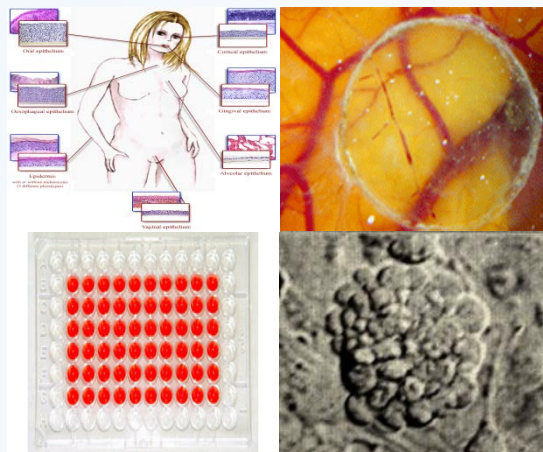


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Alternativy *in vivo* testů

in – vitro



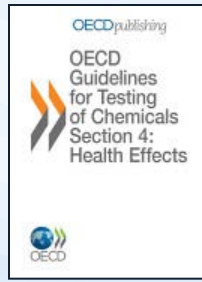
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

- regulatorní toxikologie – od 20. století založena primárně na *in vivo* metodách
- OECD Test Guidelines
- řada metod vyvinuta před 30 - 60 léty



OECD TG / Description

OECD TG / Description	Reason for In Vitro Preference
401 Acute eye irritation	Etické důvody
402 Skin sensitisation	
403 Repeat dose oral toxicity (28 days), rodents	Relevance a spolehlivost
404 Repeat dose oral toxicity (90 days), rodents	
405 Repeat dose dermal toxicity (90 days), rodents	Pokrok v technologiích
406 Repeat dose inhalation toxicity (28 days), rodents	
407 Prenatal developmental toxicity (rodents)	Ekonomická a časová náročnost
408 One generation reproduction toxicity (rodents)	
409 Two generation reproduction toxicity (rodents)	
410 Toxicokinetics (acute)	
411 Delayed toxicity (acute)	
412 Genotoxicity (acute)	
413 Genotoxicity (in vitro)	
414 Genotoxicity (in vivo)	
415 Genotoxicity (in vitro)	
416 Genotoxicity (in vivo)	
417 Genotoxicity (in vitro)	
418 Genotoxicity (in vivo)	
419 Genotoxicity (in vitro)	
420 Genotoxicity (in vivo)	
421 Genotoxicity (in vitro)	
422 Genotoxicity (in vivo)	
423 Genotoxicity (in vitro)	
424 Genotoxicity (in vivo)	
425 Genotoxicity (in vitro)	
426 Genotoxicity (in vivo)	
427 Genotoxicity (in vitro)	
428 Genotoxicity (in vivo)	
429 Genotoxicity (in vitro)	
430 Genotoxicity (in vivo)	
431 Genotoxicity (in vitro)	
432 Genotoxicity (in vivo)	
433 Genotoxicity (in vitro)	
434 Genotoxicity (in vivo)	
435 Genotoxicity (in vitro)	
436 Genotoxicity (in vivo)	
437 Genotoxicity (in vitro)	
438 Genotoxicity (in vivo)	
439 Genotoxicity (in vitro)	
440 Genotoxicity (in vivo)	
441 Genotoxicity (in vitro)	
442 Genotoxicity (in vivo)	
443 Genotoxicity (in vitro)	
444 Genotoxicity (in vivo)	
445 Genotoxicity (in vitro)	
446 Genotoxicity (in vivo)	
447 Genotoxicity (in vitro)	
448 Genotoxicity (in vivo)	
449 Genotoxicity (in vitro)	
450 Genotoxicity (in vivo)	

IN VITRO

IN VITRO





TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

- Eticky diskutabilní - tlak odborné i laické veřejnosti
- 1959: Russel & Burch: **“3Rs principle”**
- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely
aktivní podpora vývoje, validace a zavádění metod v souladu s 3R principem
- „Cosmetic Directive“ 76/768/EEC
platí zákaz testování kosmetických produktů a přísad na zvířatech a zákaz marketingu takových produktů v EU
- USA – zákony na státní úrovni (California, New Jersey, New York)
- Validace alternativních metod - OECD
- ECVAM JRC European Centre for Validation of Alternative Methods, Joint research Centre, EU, Ispra, Itálie



Rok	TG	EU	Název	3R akce
1992	420	B1	Acute oral toxicity, fixed dose method	2001: Animal test (reduction and refinement method in comparison with the conventional TG 401), less suffering, smaller number of animals
1995	421		Reproduction / developmental toxicity screening study	Animal test (reduction method compared to original TGs), new screening test provides essential information with a minimum number of animals
1996	422		Combined repeat dose with reproduction / developmental screening	Animal test (reduction method compared to the individual TGs), combines the new screening test on reproduction toxicity with TG 407, and further reduces the number of animals to an absolute minimum for these combined endpoints
1996	423	B1	Acute oral toxicity, toxic class method	2001 Animal test (reduction method compared to the conventional TG 401), much smaller number of animals (10% of that required for TG 401)
1998	425		Acute oral toxicity, up and down method	2001: Animal test (reduction method compared to the conventional TG 401), smaller number of animals, provides a closer estimate of the LD50 than TGs 420 and 423
2004	428		Skin absorption: In vitro method	In vitro alternative to the in vivo method (TG 427)
2002	429		Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay	Animal test (reduction and refinement method compared to TG 406), provides more information and causes less suffering
2004	430		In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)	In vitro test method (ex vivo test) for the corrosion part of TG 404
2004	431		In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test	In vitro test method for the corrosion part of TG 404
2004	432		In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test	In vitro test method (no OECD TG existed for an animal test)
2006	435		In Vitro Skin Corrosivity	In vitro test method for the corrosion part of TG 404 (for specific applications, only applicable to acids and bases)
2009	436		Acute Inhalation Toxicity: Acute Toxic Class (ATC) Method	Animal test introducing reduction in animal usage compared to TG 403, and refinement by applying humane endpoints.
2009	437		Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP)	Animal test introducing reduction in animal usage compared to TG 403, and refinement by applying humane endpoints.
2009	438		Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method	An in vitro screening test for identifying potential ocular corrosives and severe irritants in a tiered-testing strategy, as part of a weight-of-evidence approach.
2009	455		Stably Transfected Human Estrogen Receptor-α Transcriptional Activation Assay (STTA)	In vitro test (could possibly introduce reduction if used in a testing strategy for detection of endocrine disrupting chemicals).



TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

- Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Regulation EC No. 1907/2006) – **REACH**
 - chemikálie s produkcí více než 1 t / rok -> hodnocení toxicity
 - odhadem cca **30000** chemických látek během **15ti let**
 - s použitím současných metod odhadováno **9 – 54 mil. pokusných zvířat** (*Rovida 2009, Altex 26*)
 - nejen **etický**, ale i **ekonomický a časový aspekt**
 - **Annex XI:** pravidla pro standardní testování zahrnují možnost interpretace výsledků z *in vitro* testů:
 - Validované testy
 - „Vhodné“ (suitable) testy – dostatečně vyvinuté z hlediska mezinárodně uznávaných kritérií pro zahájení pre-validačního procesu (ECHA)





TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

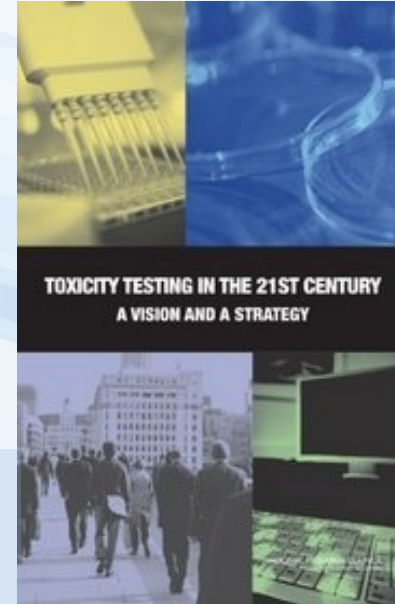
- 2007: Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy
(US National Research Council/NAS)

- Mezdruhové rozdíly
- Vysoké dávky, krátké doby expozice
- Hodnocené parametry (smrt, nádor)
 - **Předpoklady a extrapolace, faktory nejistoty**
- Nespolehlivost a nerelevantnost tradičních *in vivo* metod

Farmakologie a farmaceutická toxikologie:

- Pouze **43% shoda** výsledků z testů na hlodavcích s výsledky klinických studií (ECVAM)
- V klinické fázi testování selhává až **92% potenciálních léčiv** (Pampaloni 2009, *Rec Patents on Biotech 3*)

- Ekonomická a časová náročnost, zastaralost, etické problémy



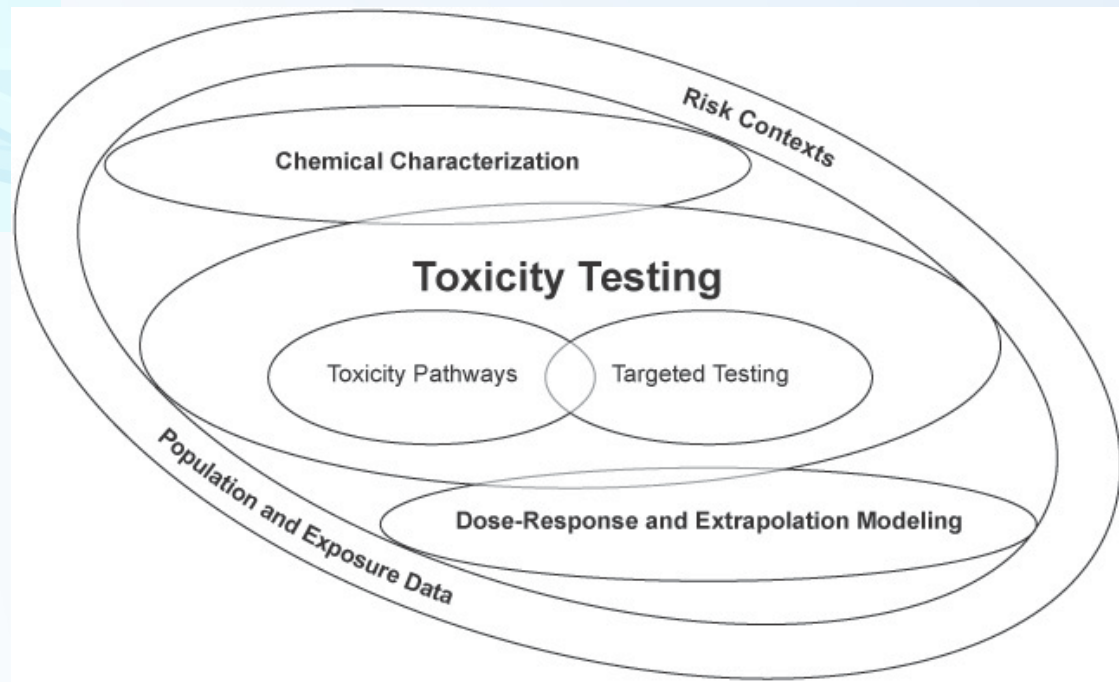
Samostudium – seznámení s dokumentem Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy – ve studijních materiálech k předmětu



TOXICITY TESTING IN THE 21ST CENTURY: A VISION AND A STRATEGY

nově připravená strategie vycházející z aktuálních poznatků a nejmodernějších technologií s cílem:

- 1) Zvýšit počet testovaných látek
- 2) Snížit náklady
- 3) Zlepšit výpovědní hodnotu výsledků vzhledem k predikci zdravotních rizik a environmentálním koncentracím



- Primárně **lidské buňky a tkáňové kultury *in vitro***
- Vlivy na **biologické procesy (toxicity pathways)** – mechanismy buněčné odpovědi, jejichž narušení v organismu vede ke škodlivým účinkům
- **Cílené testování (Targeted testing)** x Testy na celých organismech (Whole-animal testing)
- Počítačové **modelování závislosti dávka-odpověď** pro narušování toxických drah, **modelování pro účely extrapolací** – interpretace informací z buněčných systémů směrem k *in vivo* toxicitě
- **Informace o expozici - biomonitoring** – hladiny chemických látek v krvi, vlasech či dalších tkáních
- Hodnocení rizik - **minimalizace narušování toxických drah v exponované populaci**

Animal experiments

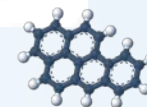
Ethics?

Reliability?

Costs & Throughput?

Alternative (non-animal) methods and models

- ▣ Experiments with parts of living organisms
 - Isolated organs and tissues - *Ex vivo*
 - Isolated cells and cell cultures – *In Vitro*
 - Isolated cell organelles and cell extracts
 - Purified or synthetic biomolecules – *In chemico*
- ▣ Computer simulations and modelling – *In silico*



Alternativní testy

- Musí projít validačním řízením
- Dle **ECVAM** (the European Centre for the Validation of Alternative Methods) v současnosti uznávána sada vědecky ověřených alternativních metod (zejména testování fototoxicity, kožní dráždivosti, embryotoxicity).
- **EURL-ECVAM** = European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (since 2011)
- <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
- Podporuje vývoj a uplatňování alternativních metod a přístupů, aplikace v průmyslu a akceptaci regulačními orgány
- Výzkumné organizace mohou zaslat alternativní metody, které vyvinuly, na odbornou validaci do **EURL ECVAM**
- 3R: změny v testování toxicity xenobiotik: redukce počtu zvířat, není třeba úhyn, špatný stav dostatečným projevem toxicity



Speciální eko-toxikologické 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

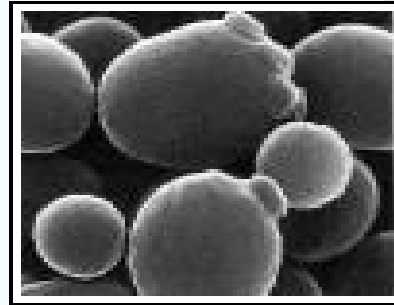
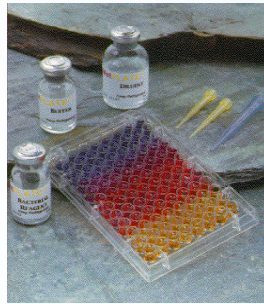
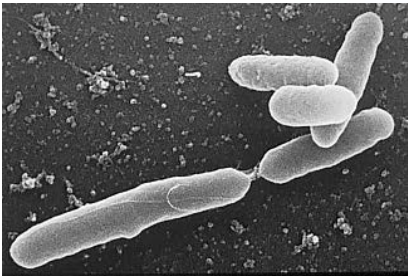
- Testování čistých látek (environmentální polutanty)
modelových směsí
komplexních environmentálních extraktů



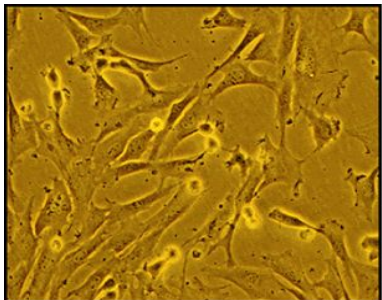
In vitro toxikologie

- Testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických či eukaryotických buňkách
- využívány zejména pro teoretické objasnění účinku toxického agens
 - i pro rutinní provádění testů toxicity

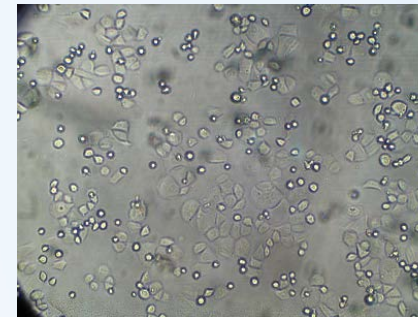
BAKTERIÁLNÍ TESTY, KVASINKOVÉ TESTY



TESTY NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH



- testy in vitro: tkáňové explantáty, bílé krvinky, jaterní buňky, tkáňové kultury



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

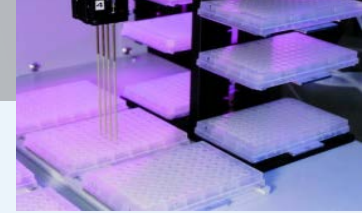
Výhody TK: výrazné snížení množství zvířat použitých v experimentu

- 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



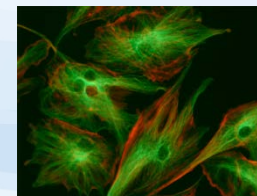
- **primární buněčné kultury x stabilní buněčné kultury x kmenové buňky**
- různé typy buněčných kultur – řada dostupných v buněčných bankách, respektive Sbírkách buněčných kultur.
- podle předepsaných podmínek (výživa, teplota, vlhkost apod.) lze danou buněčnou kulturu rozpěstovat a použít v toxikologickém 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.)
 - zvířecí: mezidruhová variabilita, etické problémy
 - lidské: limitovaná dostupnost, heterogenita



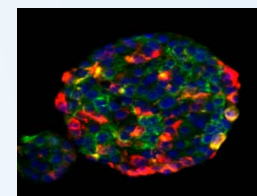
Permanentní linie - (kontinuální) ⇒ nádorové nebo imortalizované

- například stabilizované linie kožních buněk, nervových buněk, buněk srdečního svalu, buněk odvozených od tkání ledvin a pod.
- často nádorového původu – geneticky nebo epigeneticky abnormální, abnormální genotyp a fenotyp – Relevance?
- 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.
- lidské: 1951 – HeLa (cervikální karcinom)



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



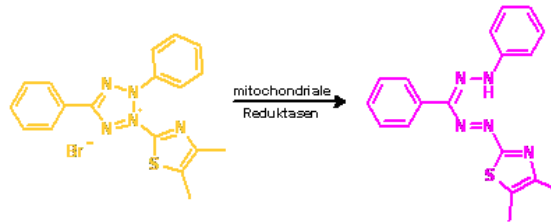
	Primary Cells	hTERT-Immortalized	Onco, Viral-Immortalized	Continuous
Mimic <i>in vivo</i> Tissue Phenotype	++++	+++	++	+
Karyotypic Stability	Diploid	Diploid/ Pseudodiploid	Pseudodiploid/ Aneuploid	Aneuploid
Proliferative Capacity	+	+++	+++	+++
Supply	+	+++	+++	+++
Inter-Experimental Reproducibility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

Testy kožní dráždivosti a leptavosti



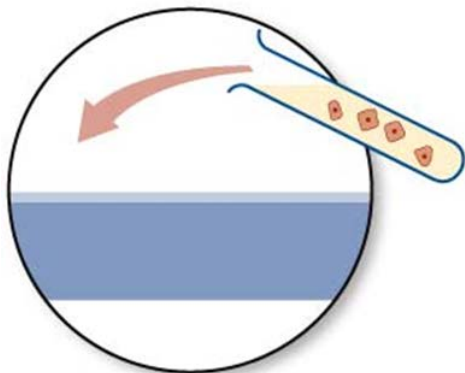
In vitro – Modely lidské kůže EpiDerm a Episkin

- trojrozměrný model lidské kůže - rekonstruované epidermis s funkční stratum corneum - účinek testované látky na životnost buněk
- cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy
- testovaná látka je umístěna na stratum corneum epidermálního modelu, expozice ukončena omytím fosfátovým pufrům. Pak tkáň inkubována s MTT (žlutá tetrazoliová sůl). Pokud jsou buňky živé, MTT je v mitochondriích redukován sukcinát dehydrogenázou na modrý formazanový precipitát. Ten je přes noc z buněk vyextrahován okyseleným izopropanolem a kvantifikován spektrofotometricky.

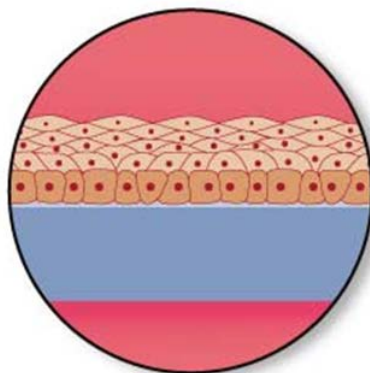


EPISKIN FROM SCRATCH

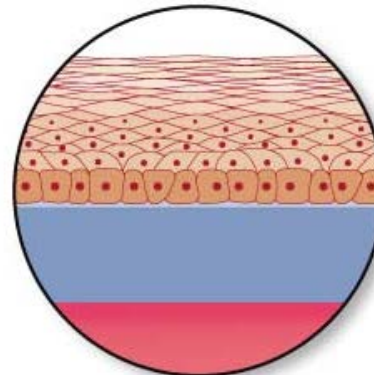
Adult skin cells are cultured and added to a dish containing a layer of collagen gel. Skin cells taken from donors of different races will produce ethnically diverse Episkin samples



The sample is completely immersed in a medium containing water, sugar and amino acids for 3 days. The cells begin to grow

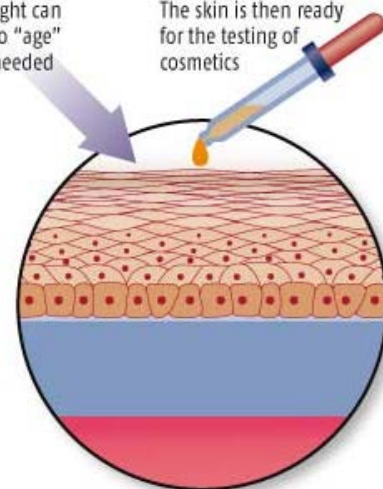


After 3 days the top of the skin is exposed to the air for 10 days, allowing it to dry and creating a rough layer similar to real skin



Intense UV light can be applied to "age" the skin, if needed

The skin is then ready for the testing of cosmetics



Testy oční dráždivosti a leptavosti

stanovení dráždivých a leptavých účinků na oči po jednorázové aplikaci testované látky do oka

1. In silico
2. In vitro – modely EpiOcular
3. Ex vivo – metoda BCOP – test na hovězí rohovce - použití tkání z poraženého dobytka
4. In vivo – pokusné zvíře - albinotický králík

In-vitro – Modely lidské kůže EpiOcular

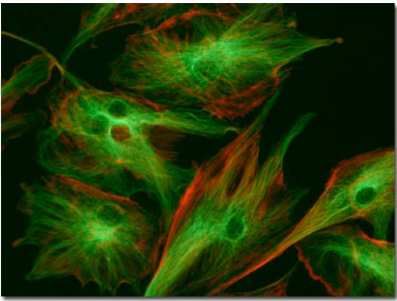
trojrozměrný model umělé tkáně EpiOcular™ z lidských keratinocytů kultivovaných do podoby vrstevnatého dlaždicovitého epitelu podobného lidské rohovce

zjišťuje se účinek látky na životnost buněk, cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy

testovaná látka je umístěna na povrch modelu ve 3 expozičních časech

inkubace v 37°C, 5%CO₂ inkubátoru v intervalech – 3 min., 30 min., a 60 min

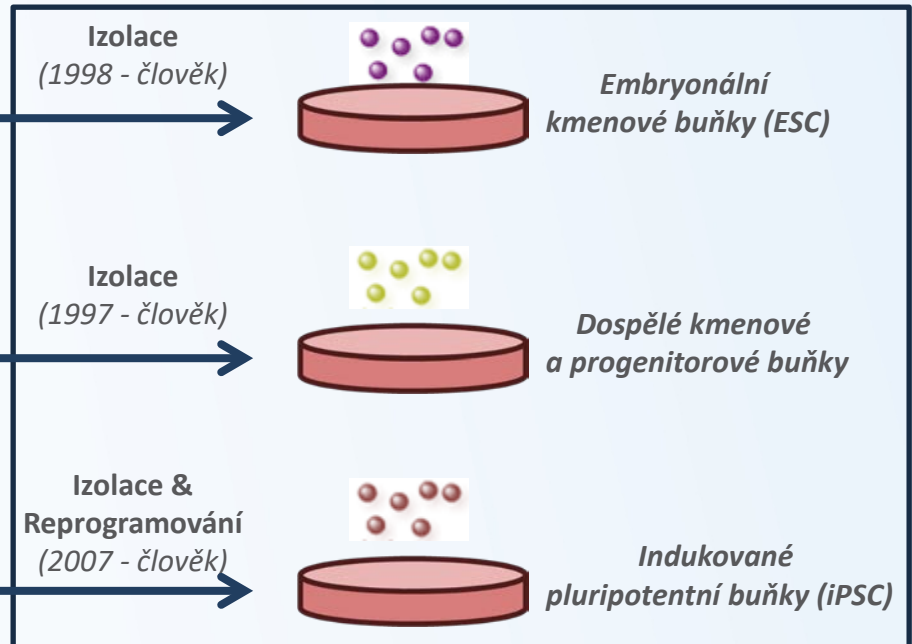
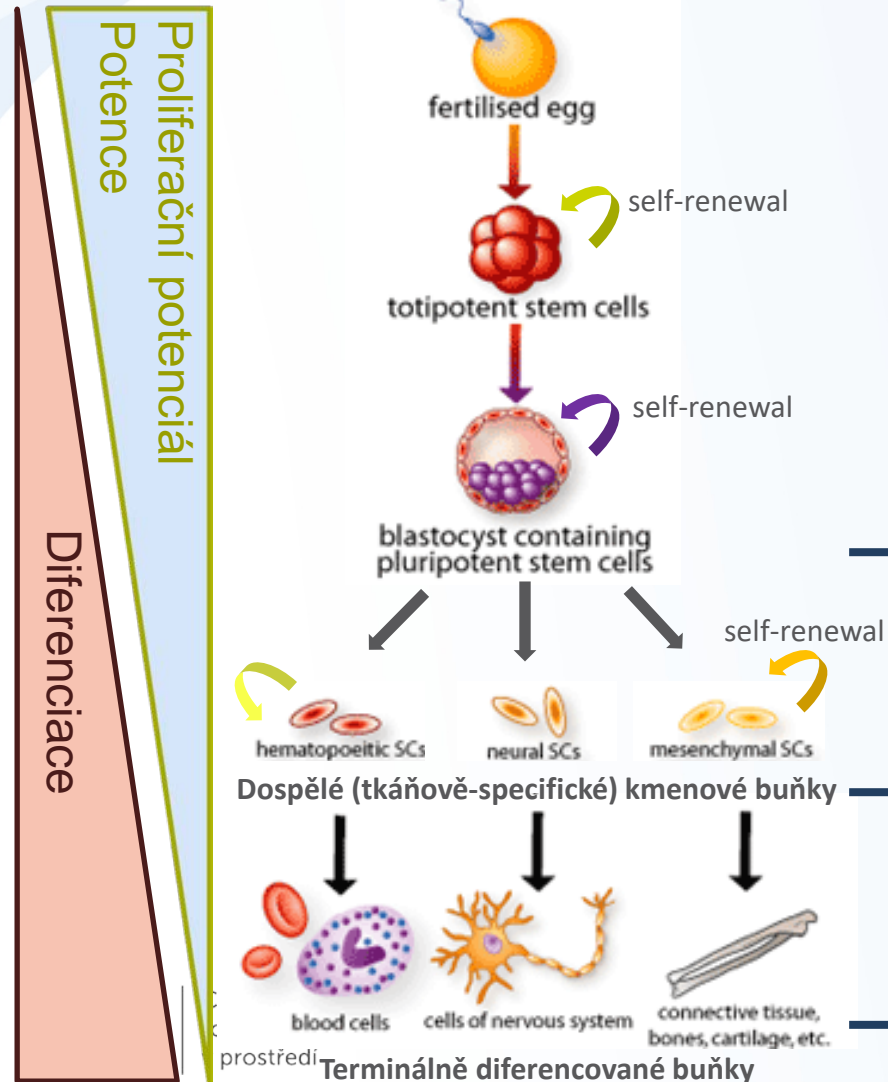




KMENOVÉ BUŇKY A Z NICH DIFERENCOVANÉ BUŇKY

– NOVĚ VYVÍJENÉ MODELY

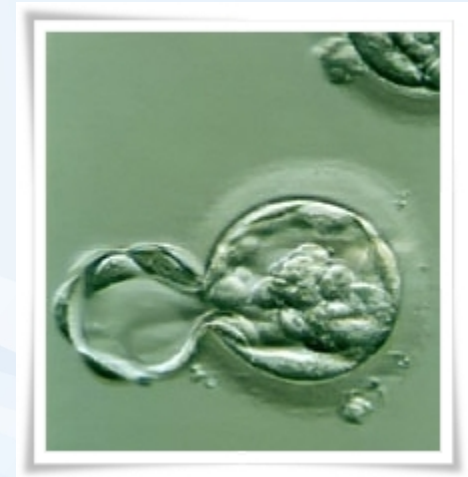
- Normální nenádorové buňky organismu
- Symetrické (self-renewal) a asymetrické dělení (diferenciace)
- Proliferační potenciál a potence
- Vývoj protokolů pro jejich *in vitro* diferenciaci do požadovaných typů buněk



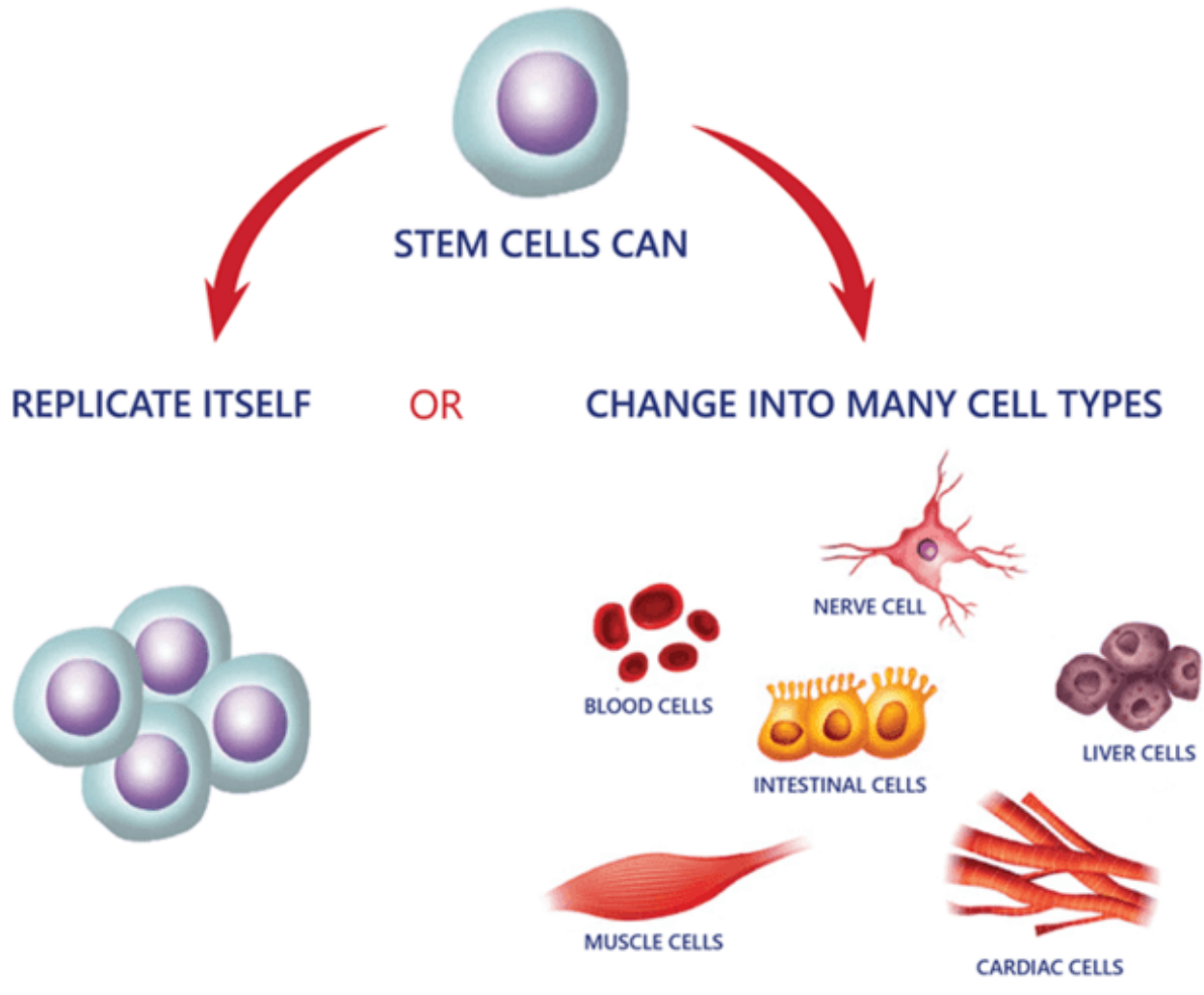
Kmenové buňky

EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ESC)

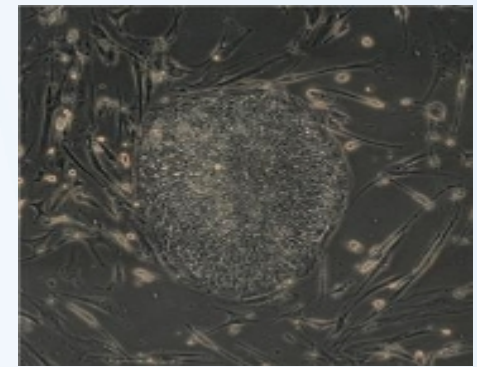
DOSPĚLÉ KMENOVÉ BUŇKY (ASC)



Blastocysta.



INDUKOVANÉ
PLURIPOTENTNÍ
BUŇKY (iPSC)

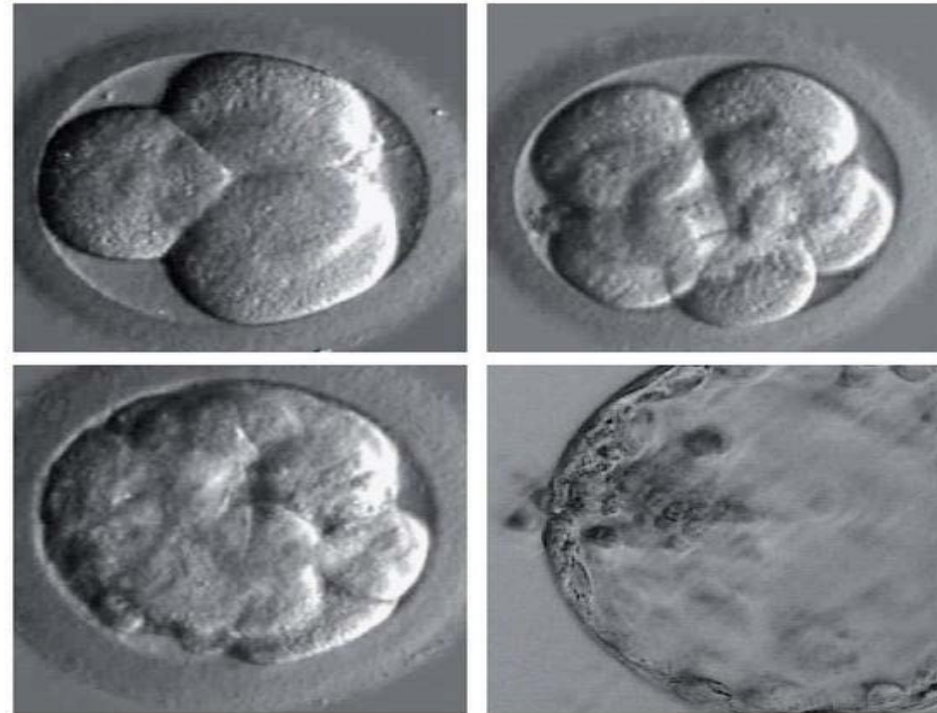
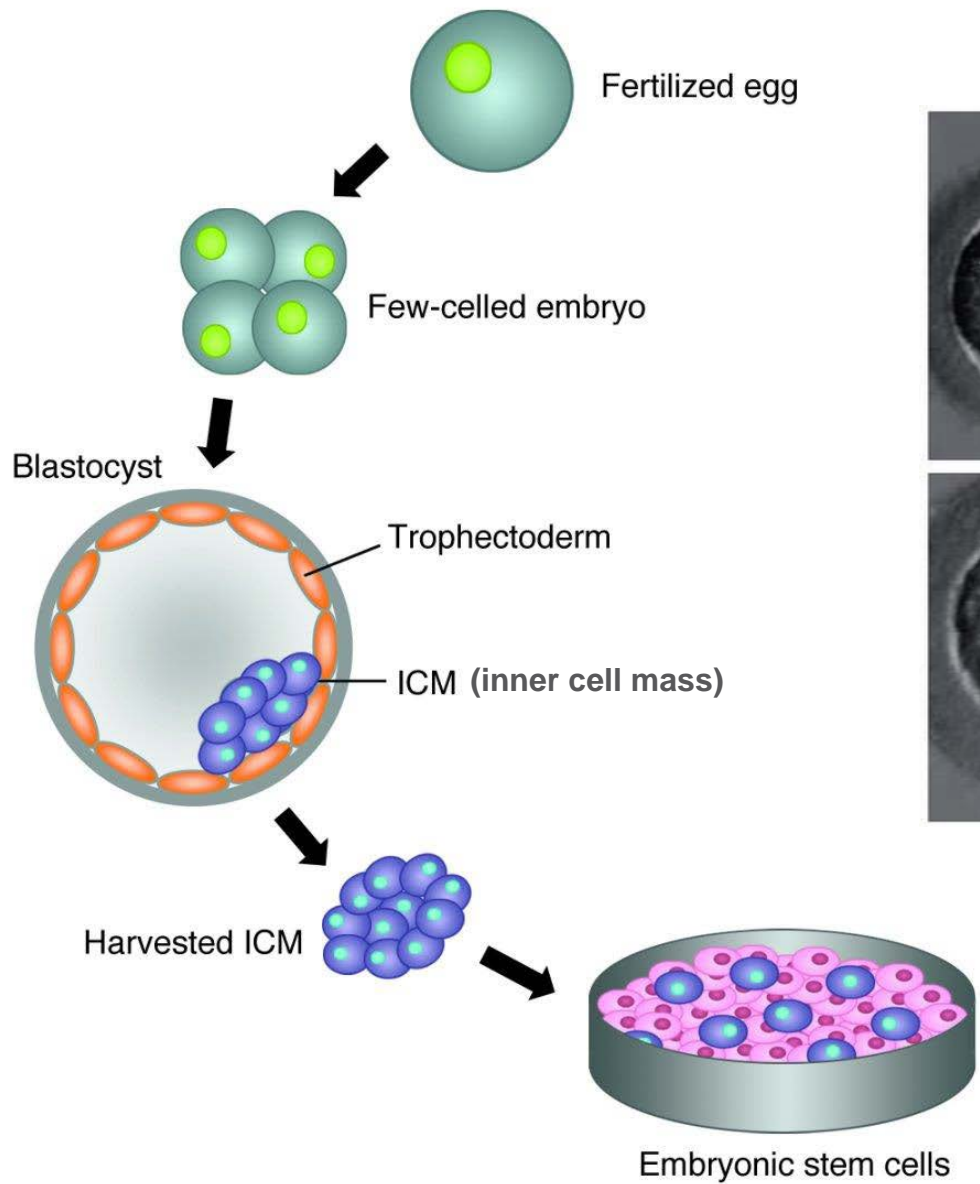


EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY (ESC – embryonic stem cells)

- celý organismus se vyvíjí z jediné **totipotentní** buňky (zygoty), která vzniká po oplození vajíčka spermií
- totipotentní buňka má schopnost dát vznik jakémukoli typu tkáně včetně tkáně embryonální, obsahuje kompletní genetickou informaci pro celý organismus
- v průběhu embryonálního dělení se schopnost totipotence ztrácí
- buňky vznikající na počátku embryonálního vývoje jsou pluripotentní, mohou se tedy diferencovat v jakoukoliv buňku embrya, ať už se jedná o buňku ektodermálního, endodermálního či mezodermálního původu
- pokud se ESC vyjmou z embryonálního prostředí a kultivují se in vitro mohou dát vznik buňkám nervovým, plicním, krevním nebo pohlavním buňkám navíc se schopností zachovat stabilní karyotyp
- z etických důvodů je problém se studii s ESC



Izolace ESC



Vývoj embrya, stadium 4, 8 buněk, morula, blastocysta

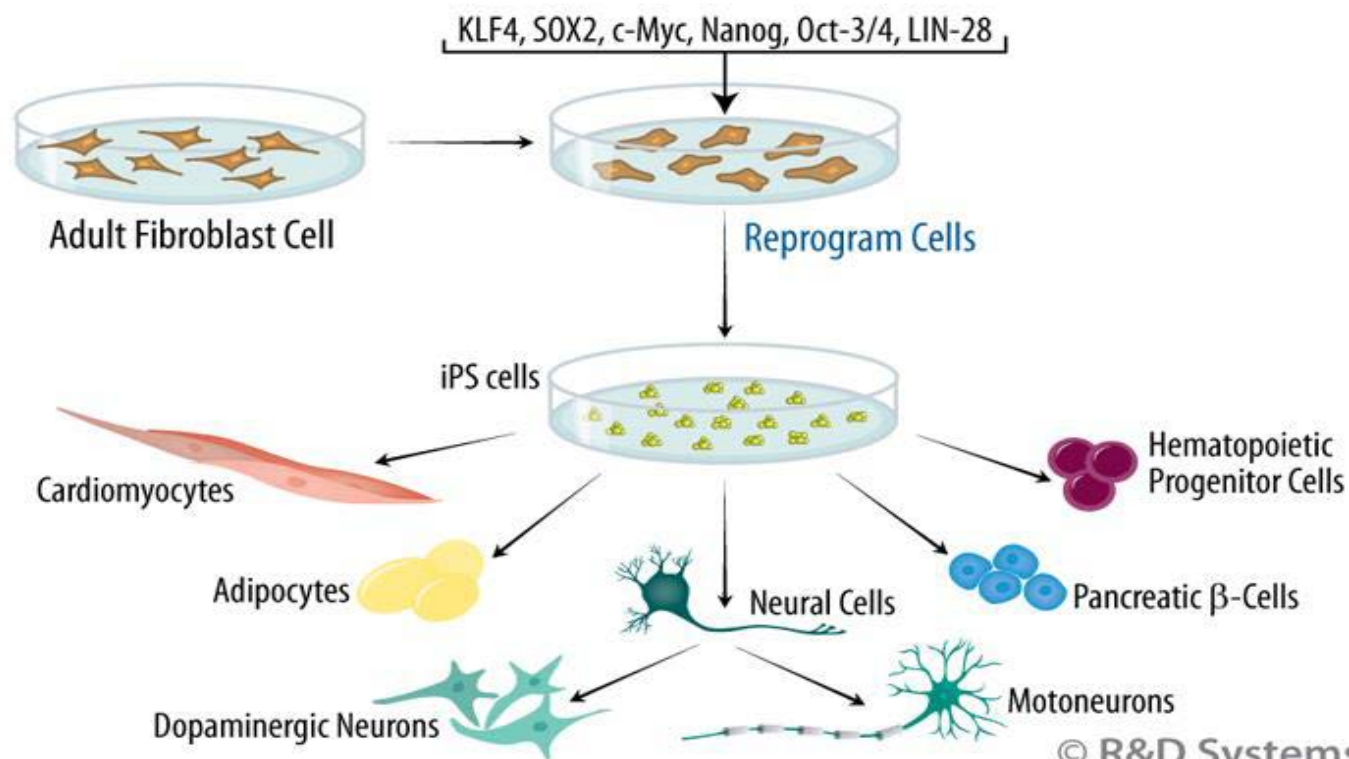
DOSPĚLÉ KMENOVÉ BUŇKY (ASC- adult stem cells)

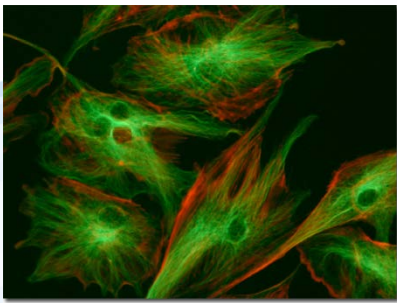
- nediferencované buňky, přetrvávají i v již vyvinutých a fungujících tkáních
- patří mezi buňky **multipotentní**
- na základě různých signálů se mohou přeměnit pouze na **některé buněčné typy** - umožňují průběžnou údržbu celého těla
- každý orgán a každá tkáň v dospělosti obsahuje malou subpopulaci buněk schopných sebeobnovy
- nepostradatelné pro hojení poškozených částí těla, pro procesy obnovení jejich funkce a pro správný průběh imunitních reakcí organismu
- ASC lze rozdělit na buňky **somatické** (nacházejí se kdekoli v těle) a **germinální** (tvoří gamety a vyskytují se v pohlavních orgánech)



INDUKOVANÉ PLURIPOTENTNÍ BUŇKY (iPSC)

- indukované pluripotentní kmenové buňky (Induced Pluripotent Stem Cells, iPSC) jsou kmenové buňky **uměle vytvořené** z dospělých buněk těla
- v podstatě z jakékoliv buňky těla lze vytvořit iPSC
- dospělé nepluripotentní buňky lze změnit v iPSC např. fúzí somatické buňky s některou ze stávajících linií ESC, inzercí některých genů, kdy se pomocí virových vektorů do buněk vloží geny, které regulují přepis genetické informace v buňce a způsobí, že se buňka promění v buňku kmenovou





IN VITRO TOXIKOLOGIE & KMENOVÉ BUŇKY

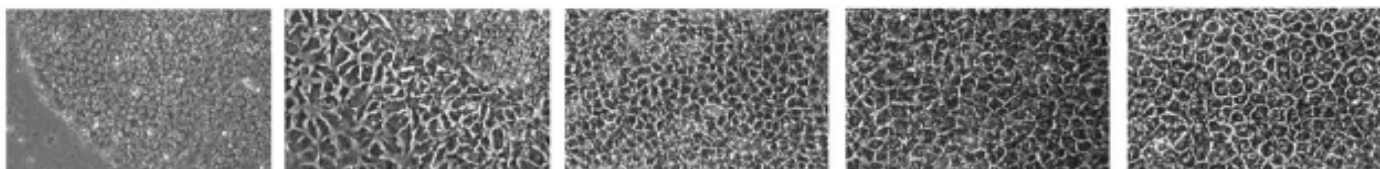
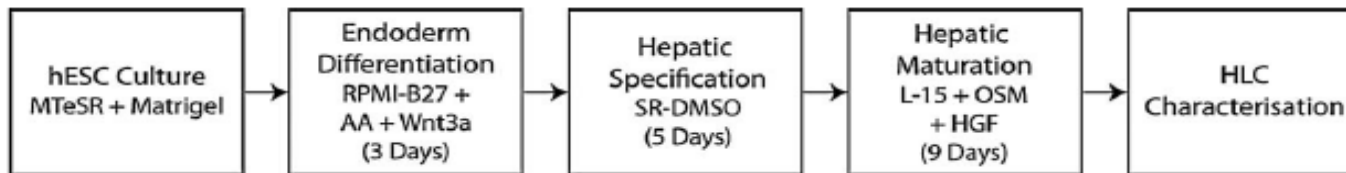
Příklad: Hepatotoxicita

- 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

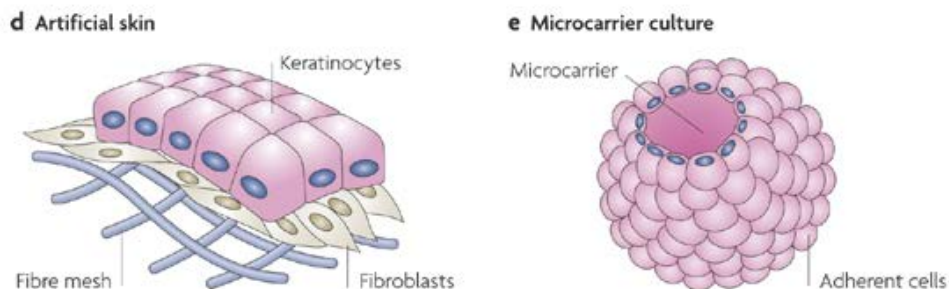
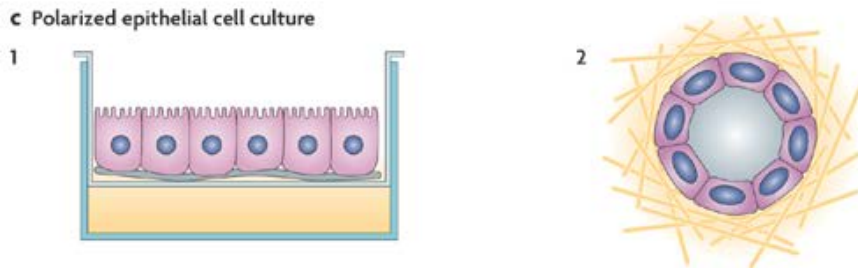
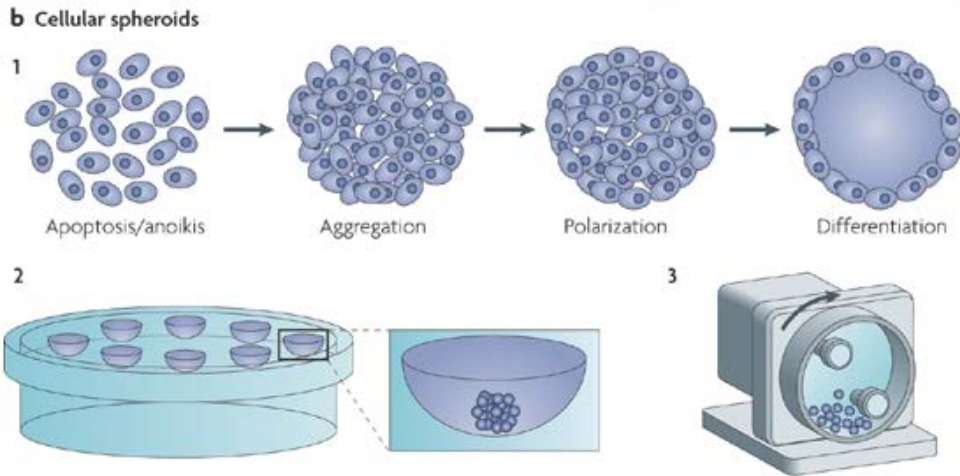
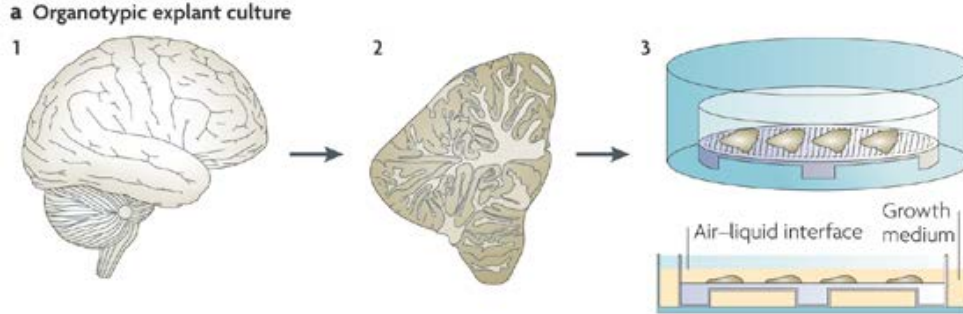
Day 6

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

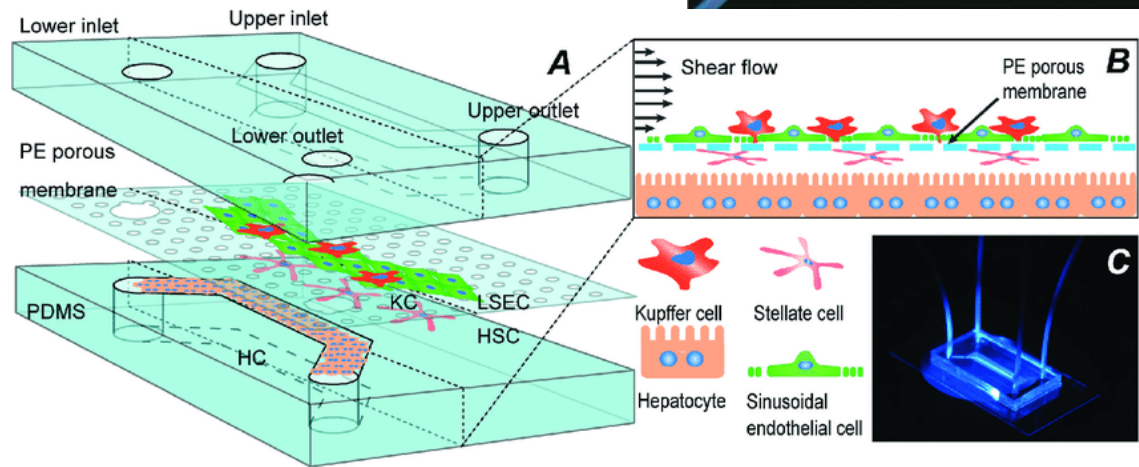
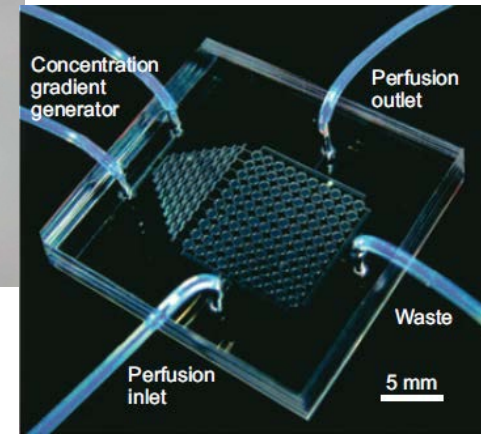
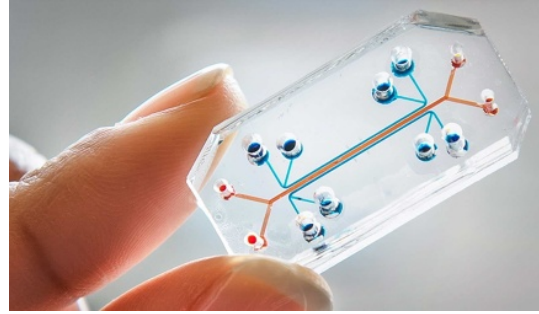
Feeder-layer

- Myší fibroblasty
- Podklad pro růst jiných b.

Bioreaktory, mikrofluidní systémy

Organ-on-chip

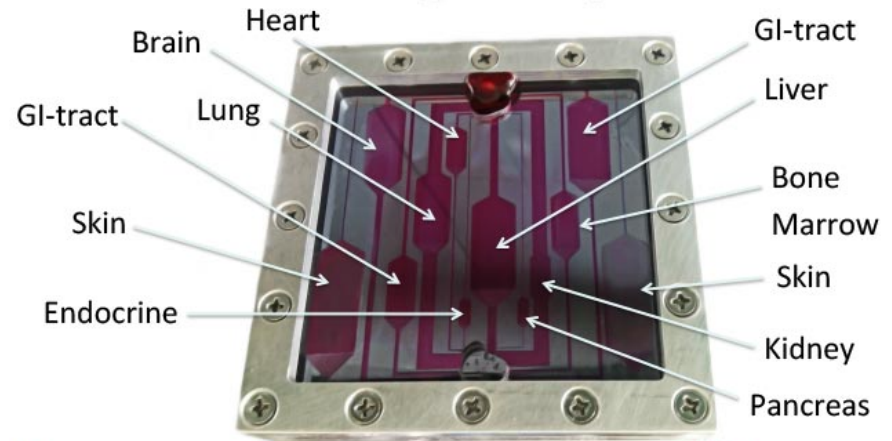
- 3D microenvironment
- Multiple cell types
- Microfluidics



Human-on-chip

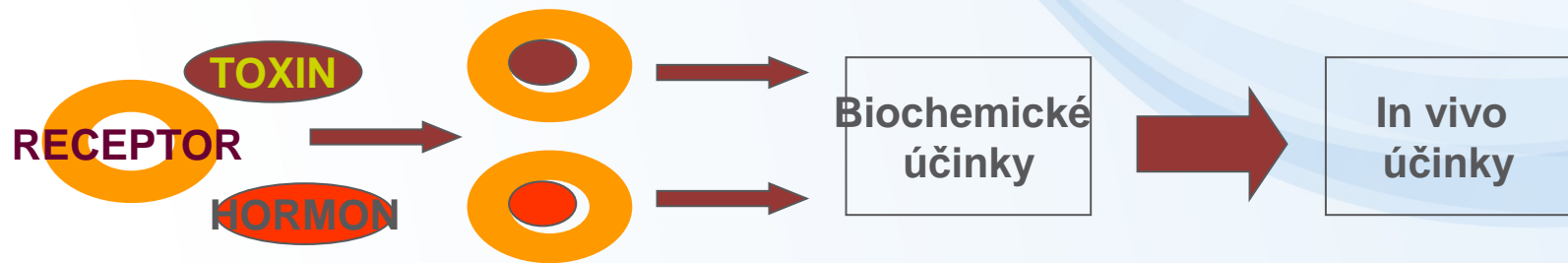
- 3D microenvironment
- Multiple modules representing different organs
- Microfluidics

10-Organ Chip



MECHANISMY chronické toxicity polutantů

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

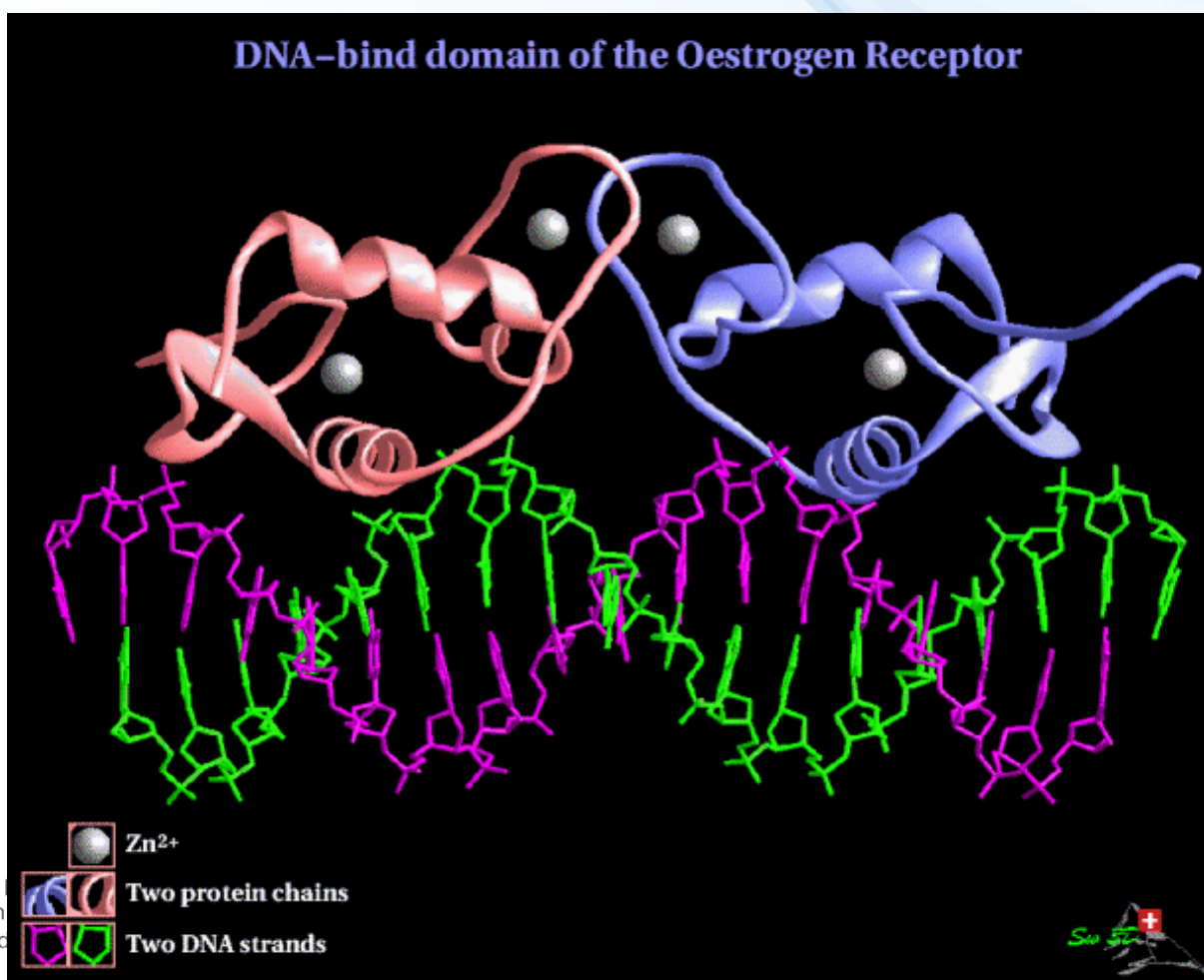


- zhodnocení *in vitro* účinků jednotlivých látek
 - Poznání zásadního mechanismu, predikce rizika
 - Možné testování většího množství látek a vzorků (HTS metody)
- využití pro hodnocení rizik a/nebo monitoring
 - Určení relativních potencí ("toxických ekvivalentů") -> RA
 - Biomarkery *in vitro* – přímá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

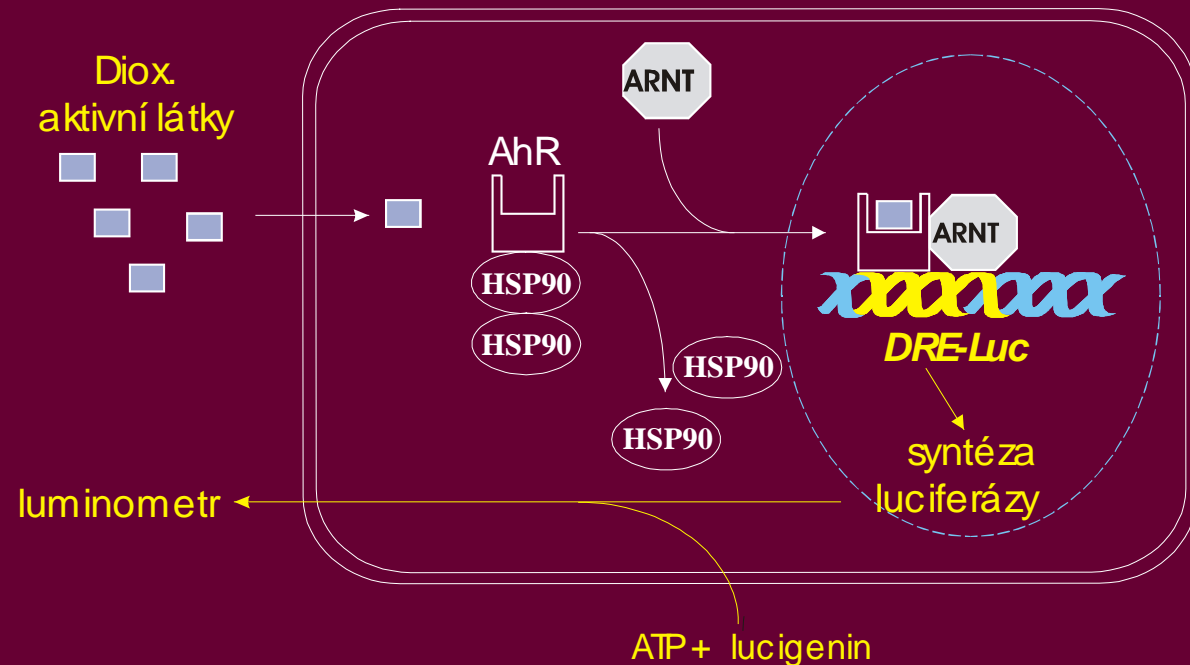
Anti/retinoidní aktivita

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



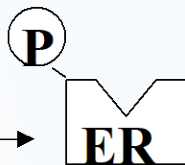
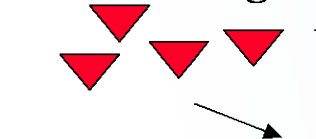
In vitro stanovení dioxinové toxicity

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

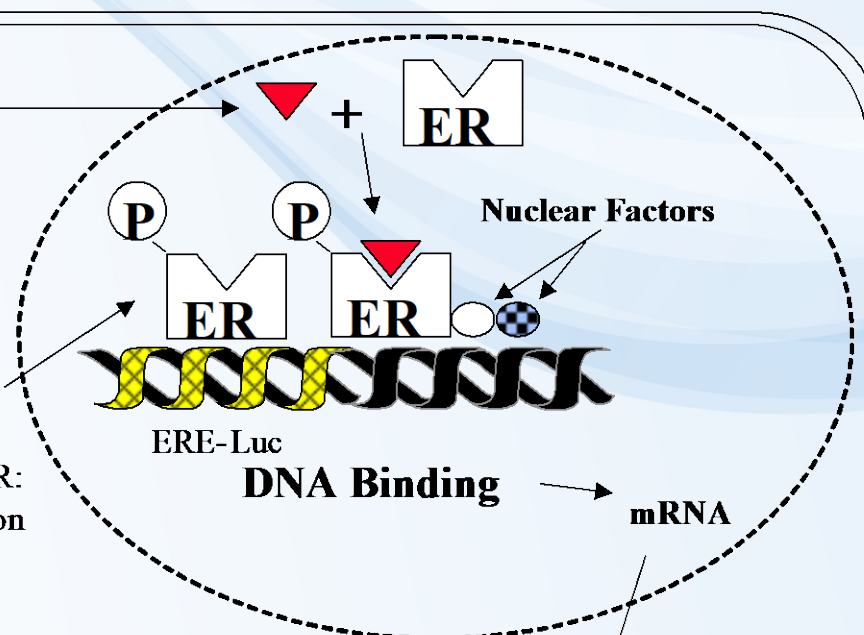


In vitro stanovení estrogenní aktivity

Estrogen
or xenoestrogen



Protein Phosphorylation of ER:
Ligand-Independent Activation



Luciferase

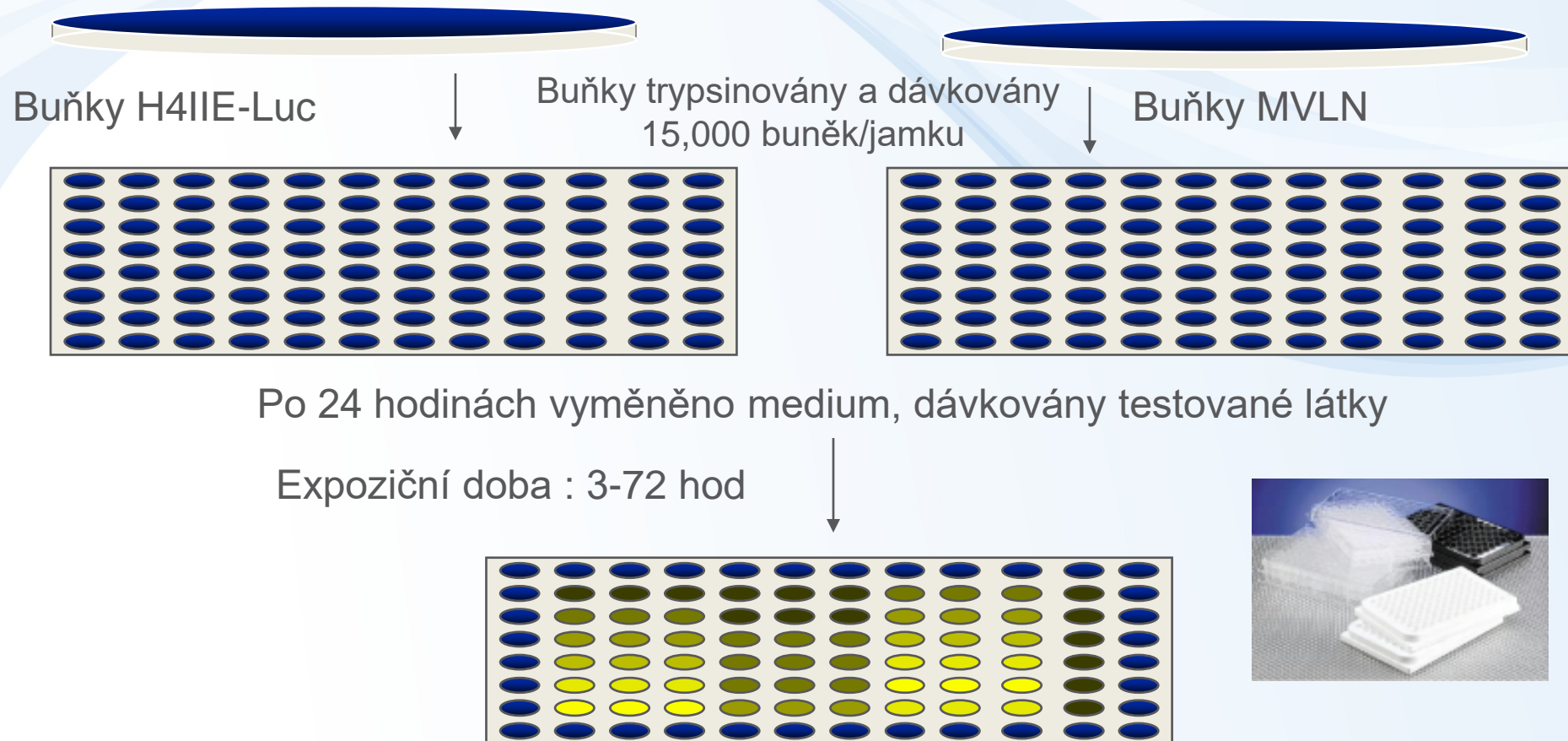


“Estrogenic Effects”

ER-Responsive Genes



In vitro biotesty k detekci dioxinové a estrogenní aktivity

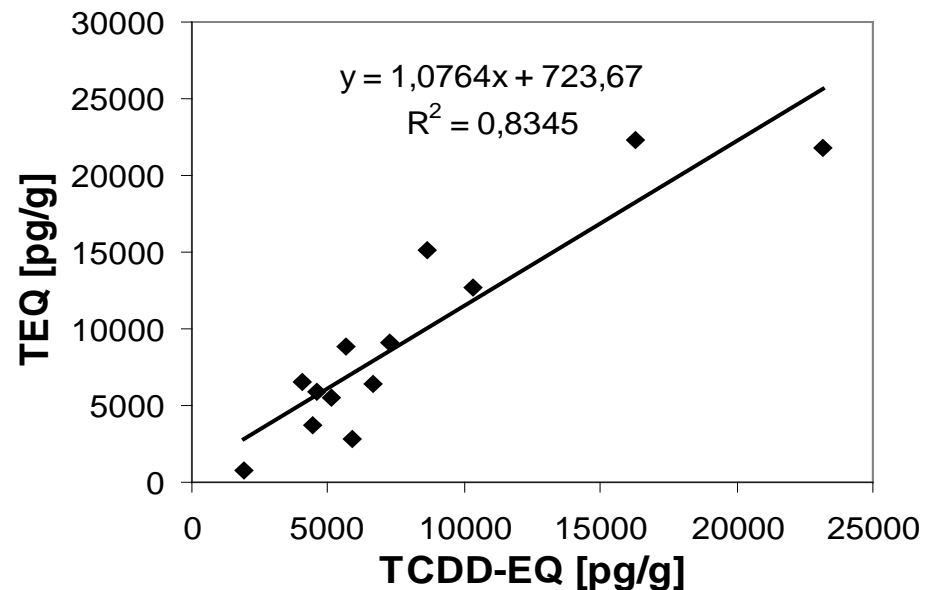
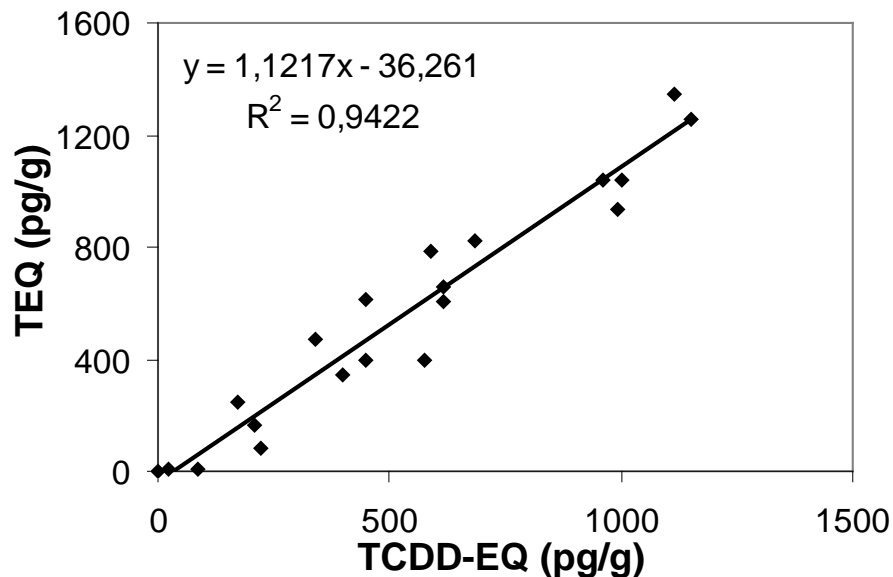


Po expozici odstraněno medium, buňky vymyty puřem a přidán LucLite reagent.
Po 20 minutách měřena aktivita luciferázy v destičkovém luminometru.

In vitro testy na buněčných liniích

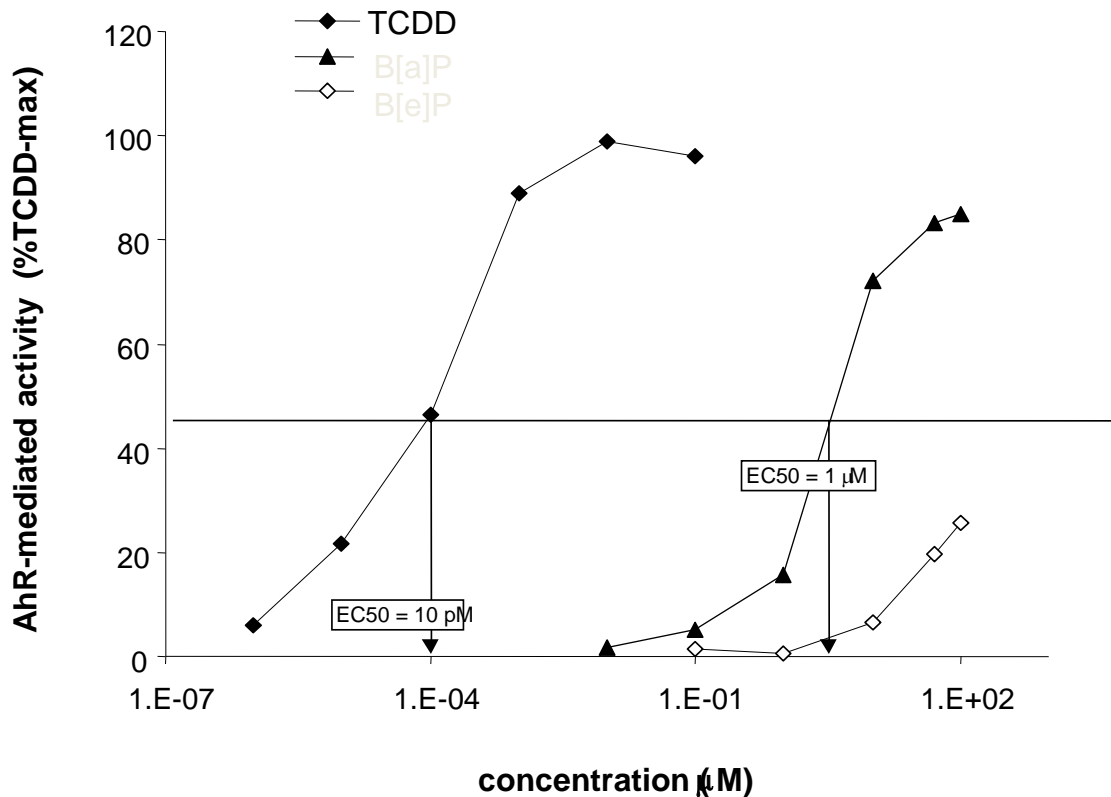
- hodnocení expozice látkami se specifickým mechanismem účinku (látky s dioxinovou, estrogenní aktivitou)
- reportérové buněčné linie transfekované genem luciferázy, který je indukován po navázání ligandu na receptor
- kalibrace odpovědi standardním ligandem (2,3,7,8-TCDD pro dioxinovou aktivitu, 17β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



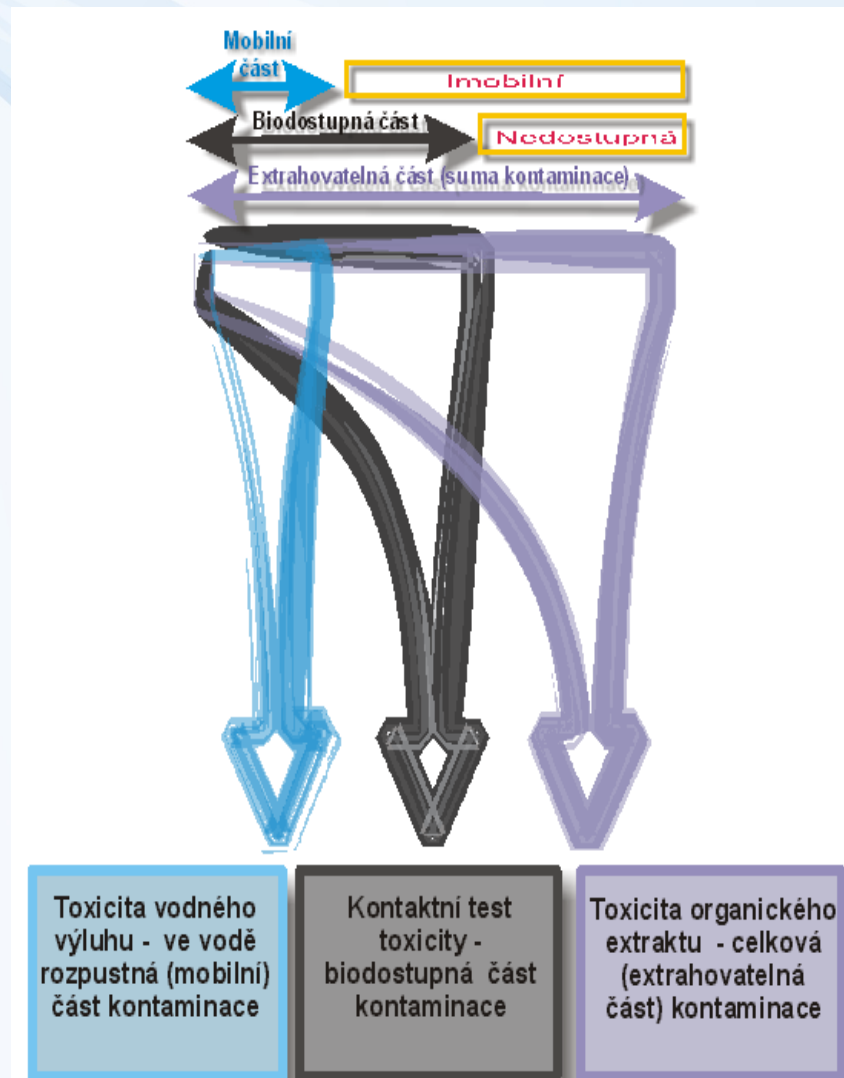
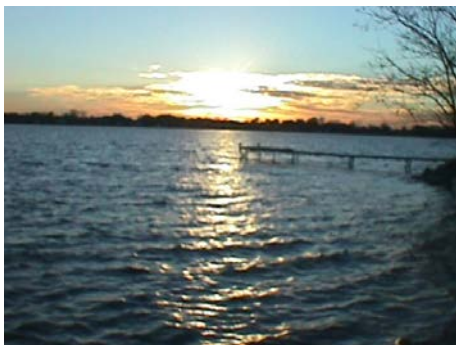
Testování komplexních vzorků ze životního prostředí

- 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

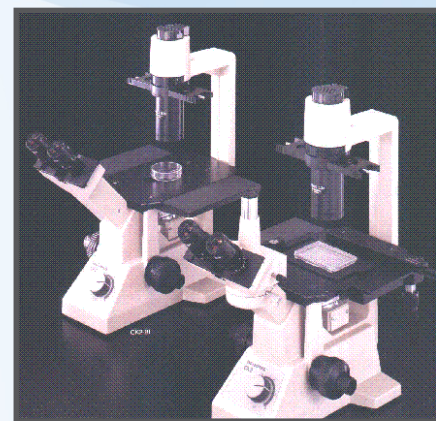


Výhody toxikologických *in vitro* testů

- 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

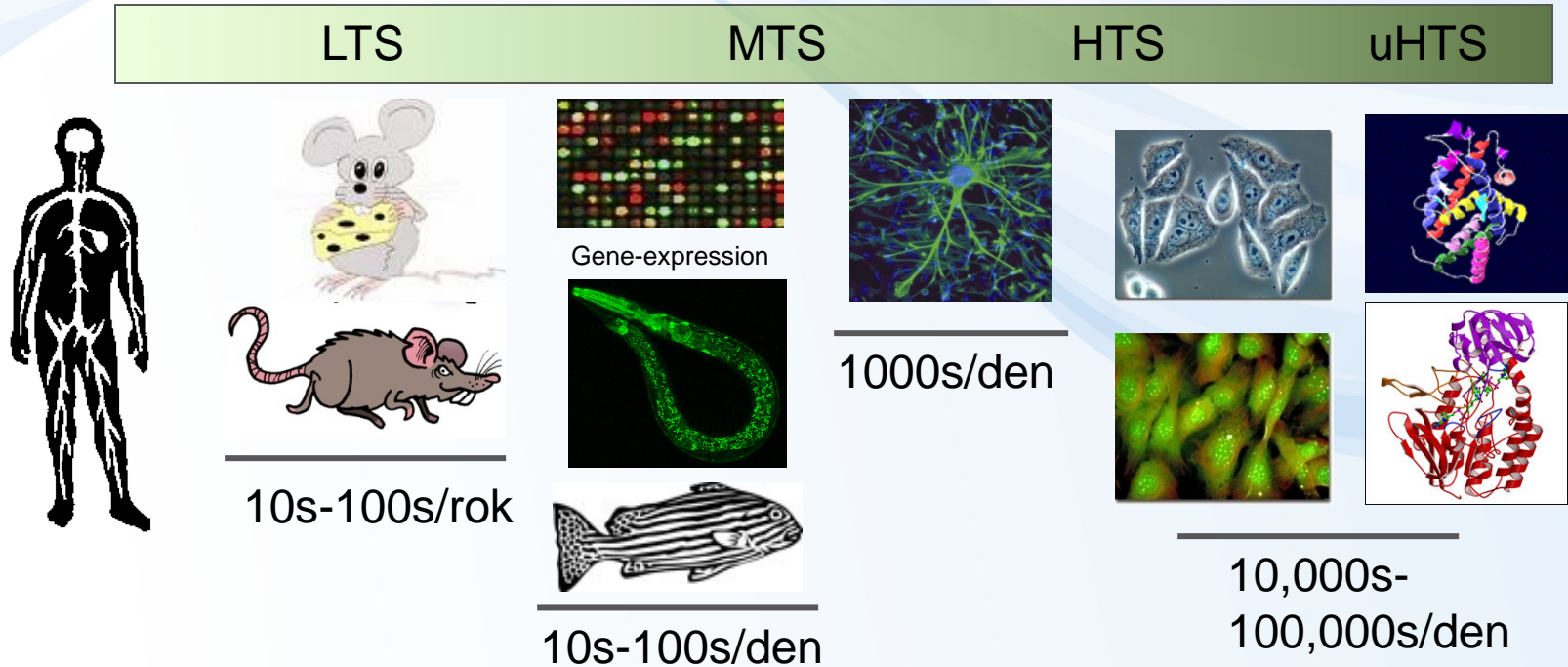
Nevýhody toxikologických *in vitro* testů

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



Vysokokapacitní skríníng High-Throughput Screening Assays

automatizované systémy



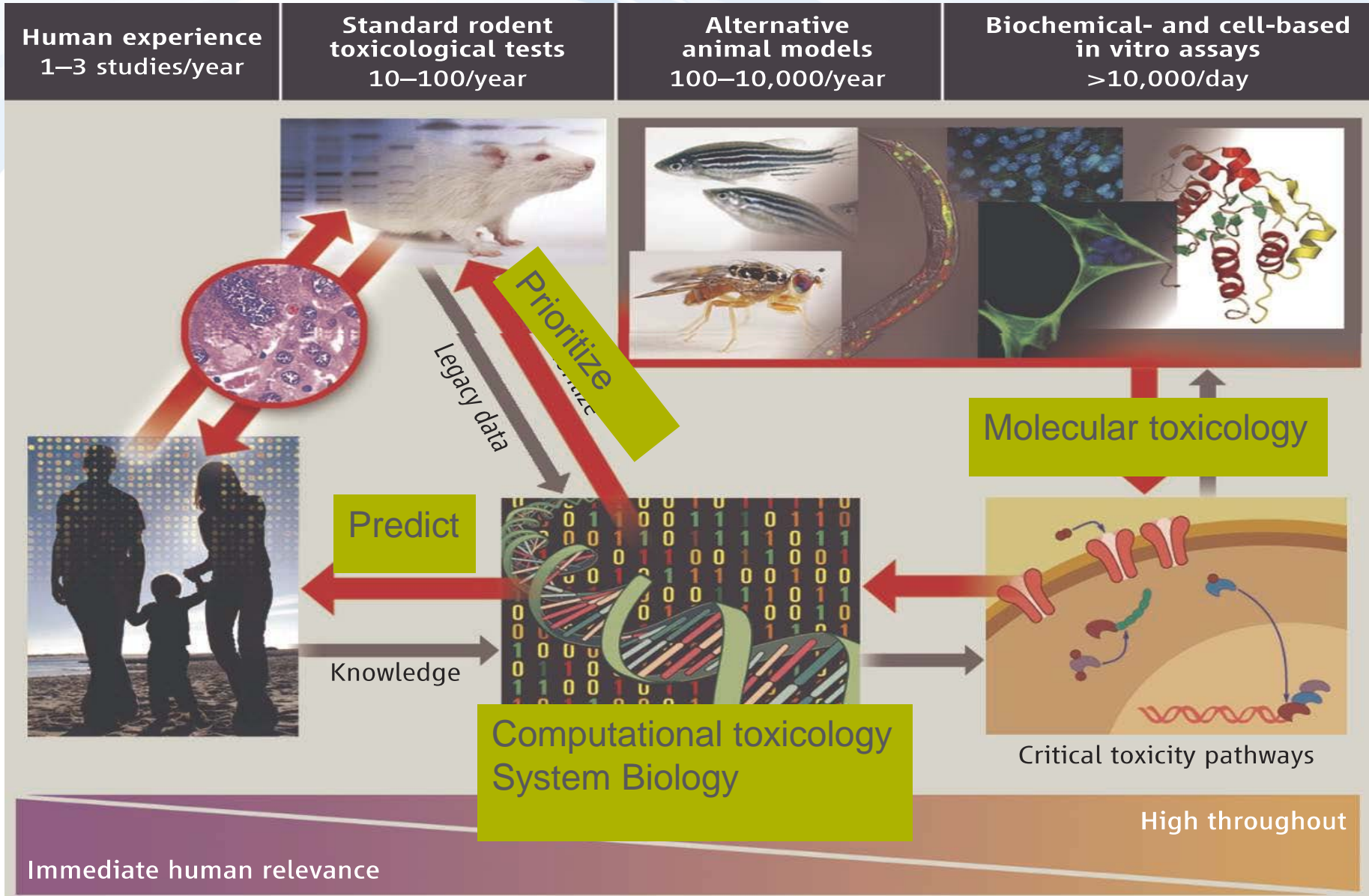
Relevance pro lidi/
Náklady/Komplexnost

Množství testů/
Jednoduchost



Paradigm Shift in Toxicity Testing : Tox21

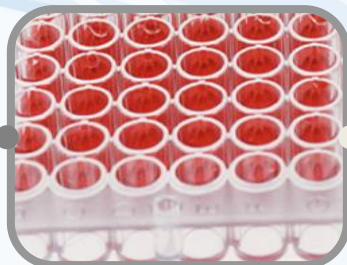
Balance between certainty and cost



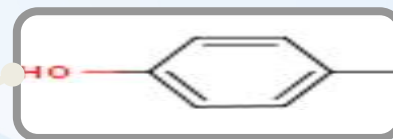
Vysokokapacitní skrínění (HTS)



HTS Robotic Platform



96-, 384-, 1536 Well Plates

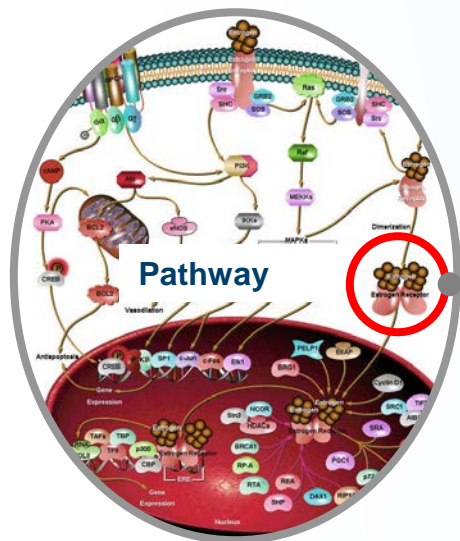


Chemical Exposure

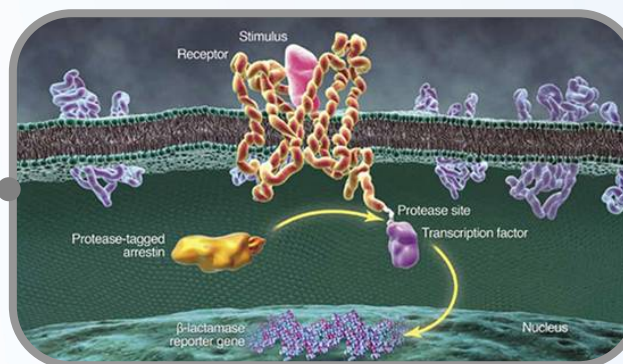


Cell Population

automatizované systémy



Pathway



Assay Target Biology
(e.g., Estrogen Receptor)

384, 1536 až 3456-
jamkové mikroděsky,
čipy

Charakterizace Bioaktivity (Bioactivity Profiling)

- biologicky relevantní charakterizace chemických látek
- vysoká kapacita testování
- nutný vývoj a validace



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

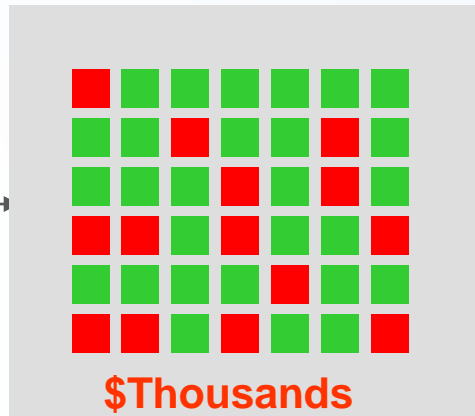
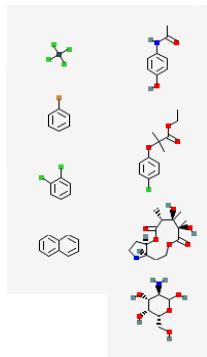


ToxCast

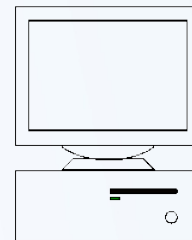
Budoucnost Testování Toxicity

in vitro testy

in silico analýzy



HTS
-omics



Bioinformatics/
Machine Learning

- ● Cancer
- ● ReproTox
- ● DevTox
- ● NeuroTox
- ● PulmonaryTox
- ● ImmunoTox



EPAs Contribution: The ToxCast Research Program



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

www.epa.gov/ncct/toxcast

ToxCast



> 600 assays,
> 8000 chemicals

- Research program of EPA's National Center for Computational Toxicology
- Addresses chemical screening and prioritization needs for pesticidal inerts, anti-microbials, HPVs and MPVs
- HTS technologies to generate biological fingerprints and predictive signatures



ToxCast HTS Assays

~500 Total Endpoints

Cellular Assays

Biochemical Assays

Protein families

- GPCR
- NR
- Kinase
- Phosphatase
- Protease
- Other enzyme
- Ion channel
- Transporter

Assay formats

- Radioligand binding
- Enzyme activity
- Co-activator recruitment

Cell lines

- HepG2 human hepatoblastoma
- A549 human lung carcinoma
- HEK 293 human embryonic kidney

Primary cells

- Human endothelial cells
- Human monocytes
- Human keratinocytes
- Human fibroblasts
- Human proximal tubule kidney cells
- Human small airway epithelial cells
- Rat hepatocytes
- Mouse embryonic stem cells (Sid Hunter)

Biotransformation competent cells

- Primary rat hepatocytes
- Primary human hepatocytes

Assay formats

- Cytotoxicity
- Reporter gene
- Gene expression
- Biomarker production
- High-content imaging for cellular phenotype

13

Primarily Human / Rat
Exception: Zebrafish development (Stephanie Padilla)

Office of Research and Development
Computational Toxicology Research Program



- 1536 well HTS
- 10,000 chemicals
- 25 assays per year



<https://www.youtube.com/watch?v=T4K-YrqtWZA>

Tox21 - <http://www.epa.gov/ncct/Tox21/>

Launched in 2008

10,000 chemicals

14 concentrations, 4 logs, 3 replicates

1536 well plates, 2-8 uL volumes

~70 assays



ToxCast - <http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>

- Launched in 2007

- App. 8000 chemicals

- 700+ assay endpoints (cellular and biochemical assays)

- 300 signaling pathways

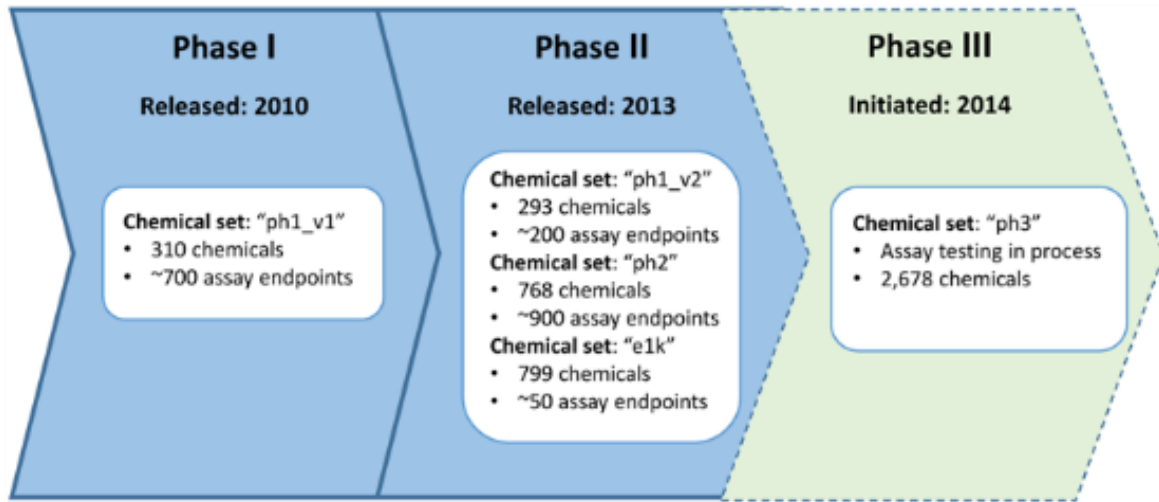


National Health and Human Services
U.S. Department of Health and Human Services

actor.epa.gov/dashboard/

Assay Endpoint	CASRN	Chemical Name	Activity Call	Q	ACTN	EMAX	logAC50	S	T	W	Data Type
WFS_PFD_Activator	53-86-1	3,6-Dichlorophenol	Active	equals	0.058	100	-1.23	10	91.7	1.02	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	15207-79-6	Dibofenac sodium	Active	equals	0.156	100	-0.808	4.29	101	1.17	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	6153-64-6	Oxotetracycline dhydrate	Active	equals	0.733	95.6	-0.135	10	96.4	2	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	54-62-6	4-Aminosalicylic acid	Active	equals	1.54	105	0.188	-0.0936	108	1.41	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	41481-66-7	4,4'-Sulfonylebis(2-prop-2-en-6-Thioquinone	Active	equals	1.65	66.7	0.219	-3.77	62.6	1	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	154-42-7	6-Thioquinone	Active	equals	1.86	93.5	0.269	3.67	94.9	1	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	105624-06-0	5889-33	Active	equals	1.96	97.4	0.292	1.94	98.2	1	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	59-09-2	Methotrexate	Active	equals	2.19	97	0.34	-1.19	102	1.09	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	41370-09-1	Methylopa succinylhydrate	Active	equals	2.23	100	0.349	7.05	104	1	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	122-66-7	1,2-Diphenylhydrazine	Active	equals	2.49	100	0.396	0.376	105	1.22	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	80-15-9	Cumene hydroperoxide	Active	equals	2.76	86.5	0.441	-3.98	89.9	1.08	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	1405-05-4	Tannic acid	Active	equals	2.89	101	0.461	-2.49	107	1.34	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	7487-94-7	Mercuric chloride	Active	equals	2.95	83.9	0.469	0.0811	81.5	1.78	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	27323-41-7	Dodecylbenzene sulfonate tri-	Active	equals	2.99	65.1	0.476	5.35	65.2	1	Percent Activity
WFS_PFD_Activator	1143-36-0	Atretalin	Active	equals	3.23	100	0.509	2.93	103	1.24	Percent Activity

Toxicity Forecaster (ToxCast™)



Computational toxicology research (CompTox) integrates advances in biology, biotechnology, chemistry, and computer science to identify important biological processes that may be disrupted by the chemicals and tracing those biological disruptions to a related dose and human exposure

The combined information - helps prioritize chemicals based on potential human health risks.

- **Phase I** (proof of concept, 2007-2009, released 2013)
 - **over 300 chemicals** well studied chemicals (primarily pesticides, well characterized in animal-based studies) **in over 500 HTS assays/endpoints**
 - https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical_lists/toxcast_phaseI
- **Phase II** (completed in 2010, released 2013):
 - ~ **1800 chemicals** from a broad range of sources including industrial and consumer products, food additives, and potentially "green" chemicals that could be safer alternatives to existing compounds) **in over in 700 HTS assays/endpoints** covering a range of high-level cell responses and approximately 300 signaling pathways ⇒ the EPA's Endocrine Disruption Screening Program (EDSP)
 - https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical_lists/toxcast_phaseII
- **Phase III** (from 2014)
 - ~ **4,500 chemicals** consisting of the major portion of the Phase II testing library + newly added ph3 ~ **2,600 chemicals** chemical subset (including EPA chemicals previously included in the Tox21 library - [TOX21SL](#) that were not part of Phases I or II of the ToxCast program) **up to 2000+ HTS assays/endpoints** ([description](#))
 - https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical_lists/toxcast_phaseIII

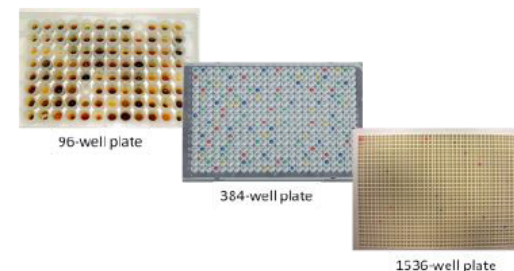
- **Chemistry Dashboard** - <https://comptox.epa.gov/dashboard>

ToxCast /Tox21 Overall Strategy

- Identify targets or pathways linked to toxicity (AOP focus)
- Identify/develop high-throughput assays for these targets or pathways
- Develop predictive systems models: in silico/in vitro → in vivo
- Use predictive models (qualitative):
 - Prioritize chemicals for targeted testing
 - Suggest / distinguish possible AOP / MOA for chemicals
- High-throughput Exposure Predictions (ExpoCast)
- High-throughput Risk Assessments (quantitative)



ToxCast Assays (>700 endpoints)



Assay Provider

ACEA
Apredica
Attagene
BioReliance
BioSeek
CeeTox
CellzDirect
Tox21/NCATS
NHEERL MESC
NHEERL Zebrafish
NovaScreen (Perkin Elmer)
Odyssey Thera
Vala Sciences

Biological Response

cell proliferation and death
cell differentiation
Enzymatic activity
mitochondrial depolarization
protein stabilization
oxidative phosphorylation
reporter gene activation
gene expression (qNPA)
receptor binding
receptor activity
steroidogenesis

Target Family

response Element
transporter
cytokines
kinases
nuclear receptor
CYP450 / ADME
cholinesterase
phosphatases
proteases
XME metabolism
GPCRs
ion channels

Assay Design

viability reporter
morphology reporter
conformation reporter
enzyme reporter
membrane potential reporter
binding reporter
inducible reporter

Readout Type

single
multiplexed
multiparametric

Species

human
rat
mouse
zebrafish
sheep
boar
rabbit
cattle
guinea pig

Tissue Source

Lung	Breast
Liver	Vascular
Skin	Kidney
Cervix	Testis
Uterus	Brain
Intestinal	Spleen
Bladder	Ovary
Pancreas	Prostate
Inflammatory	Bone

Cell Format

cell free
cell lines
primary cells
complex cultures
free embryos

Detection Technology

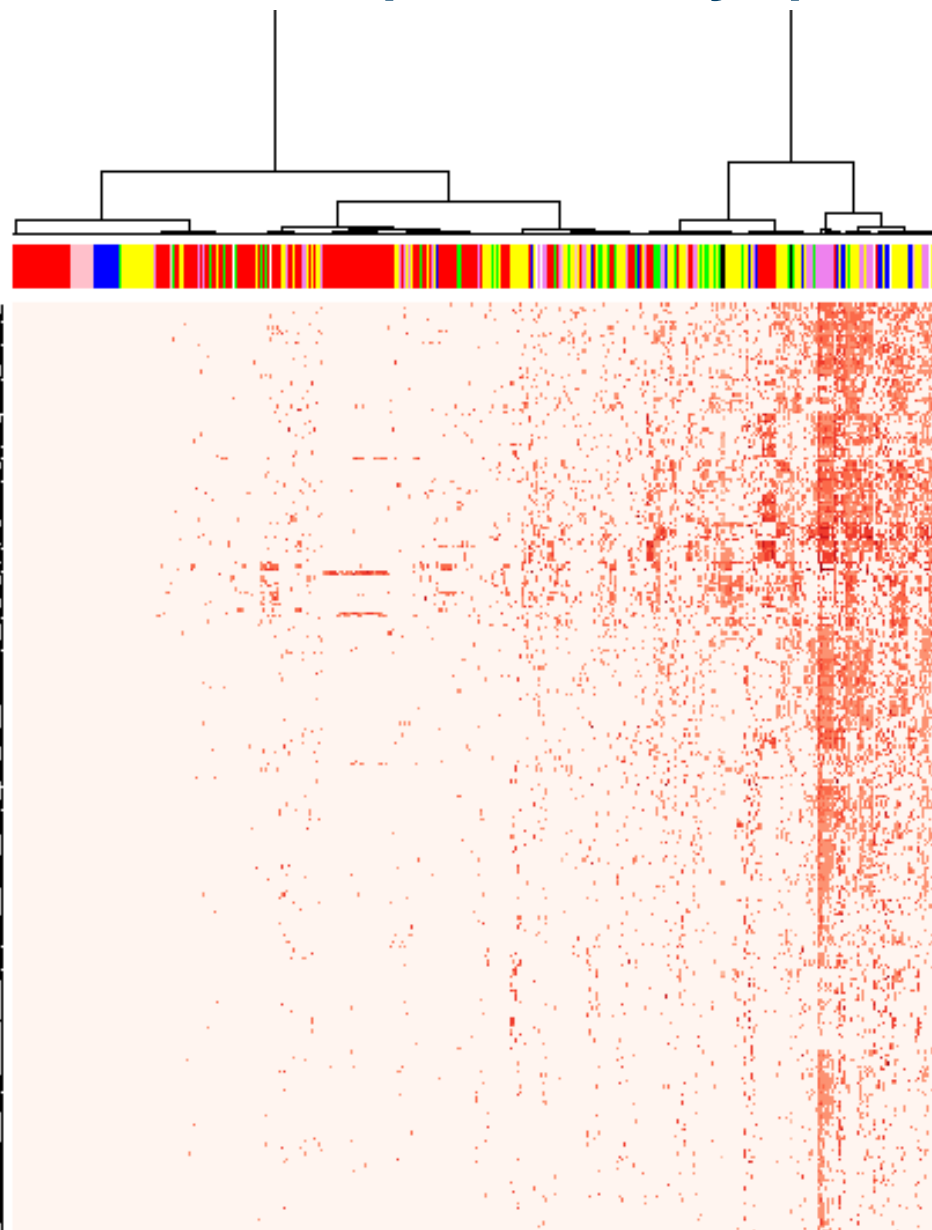
qNPA and ELISA
Fluorescence & Luminescence
Alamar Blue Reduction
Arraysan / Microscopy
Reporter gene activation
Spectrophotometry
Radioactivity
HPLC and HPEC
TR-FRET

List of assays and related information at: <http://www.epa.gov/ncct/>

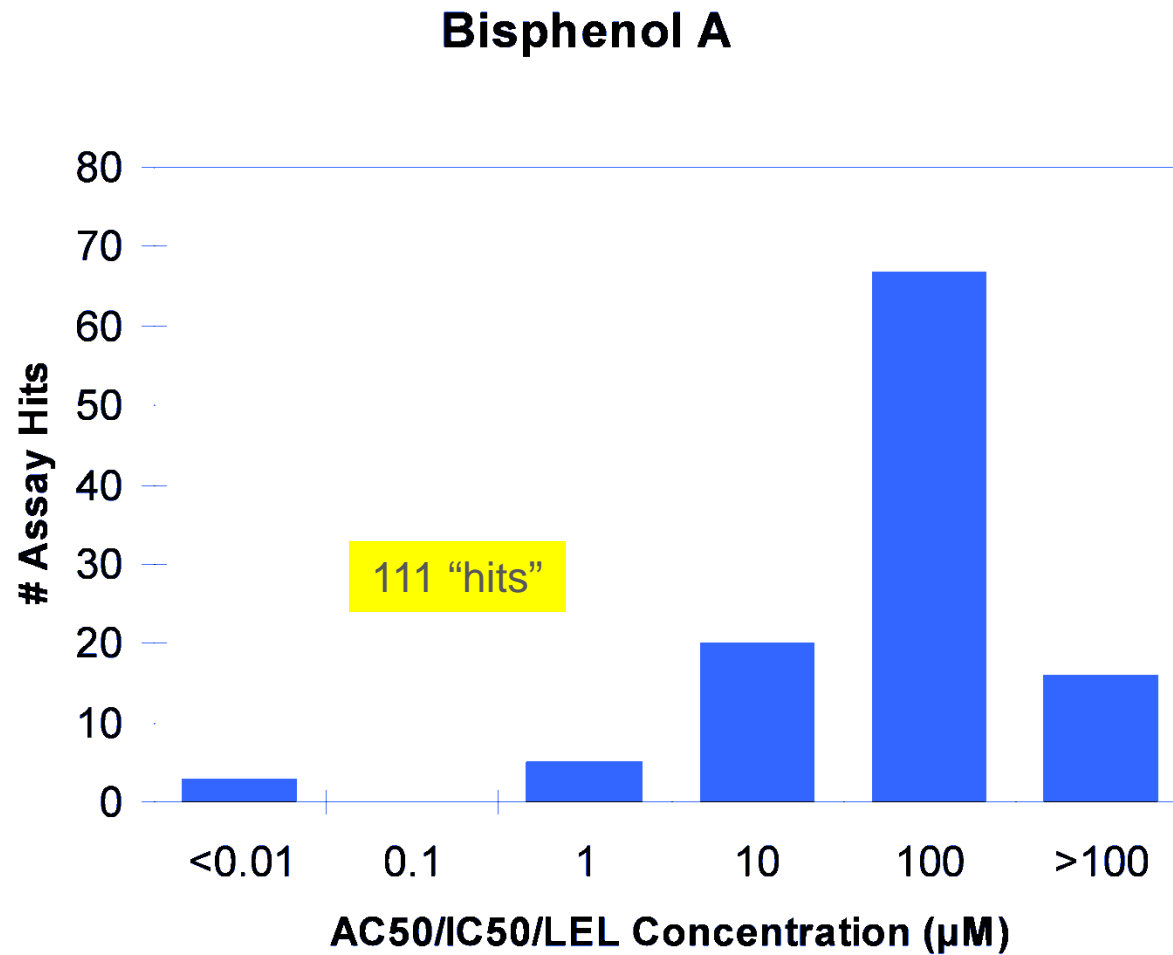
ToxCast In vitro data (467 assays)

- Cell Free HTS
- Multiplexed TF
- Human BioMap
- HCS
- qNPAs
- XMEs
- Impedance
- Genotoxicity

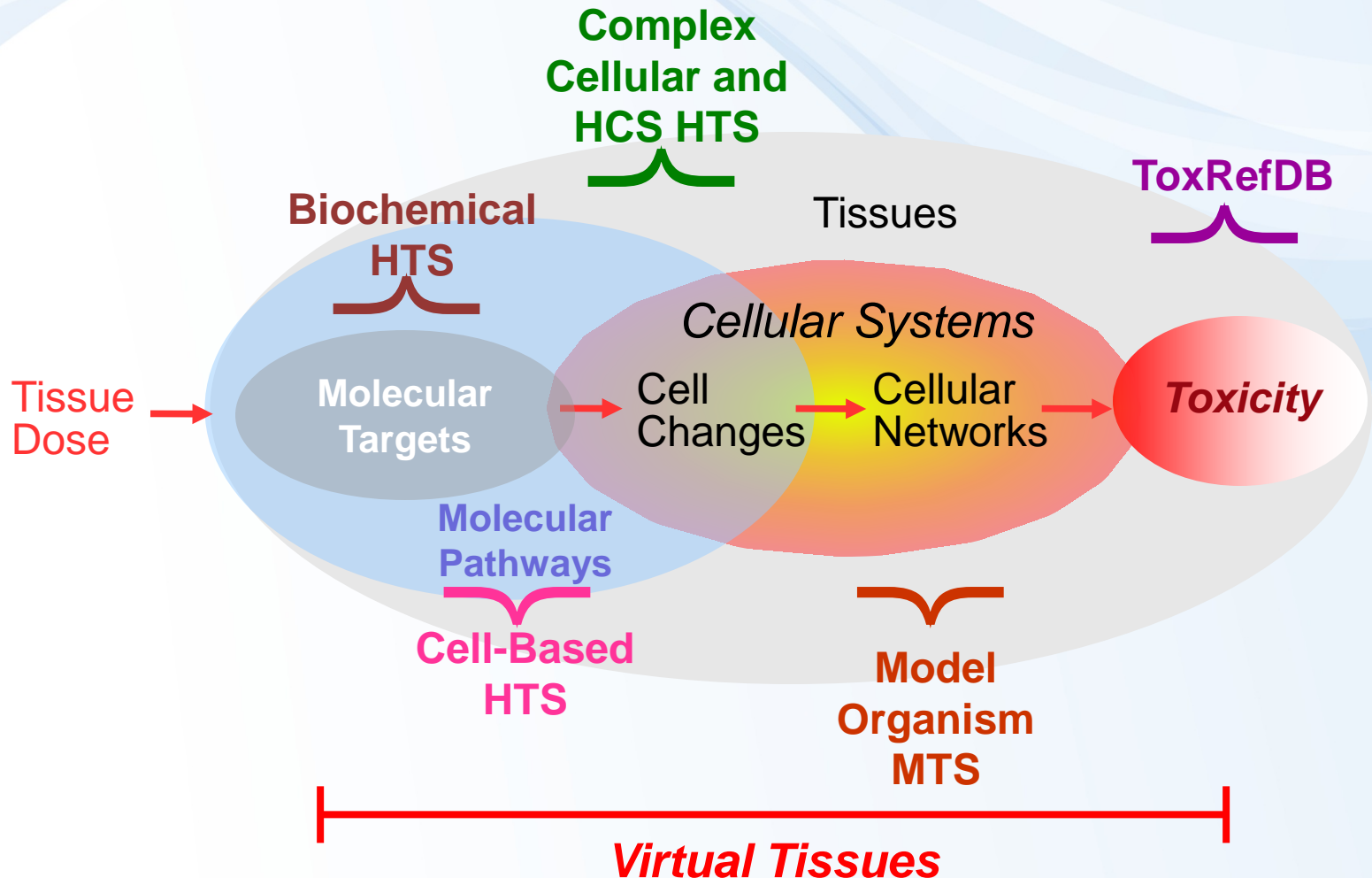
Chemicals



ToxCast In vitro data (467 assays)



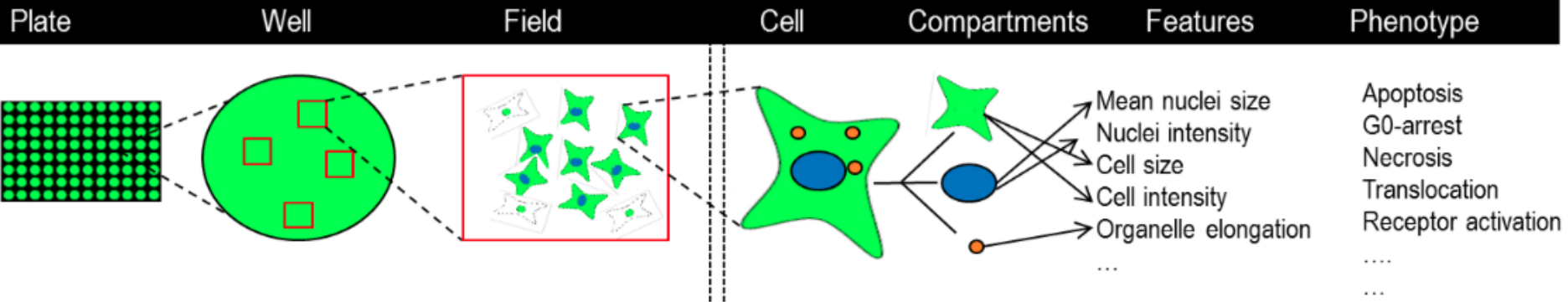
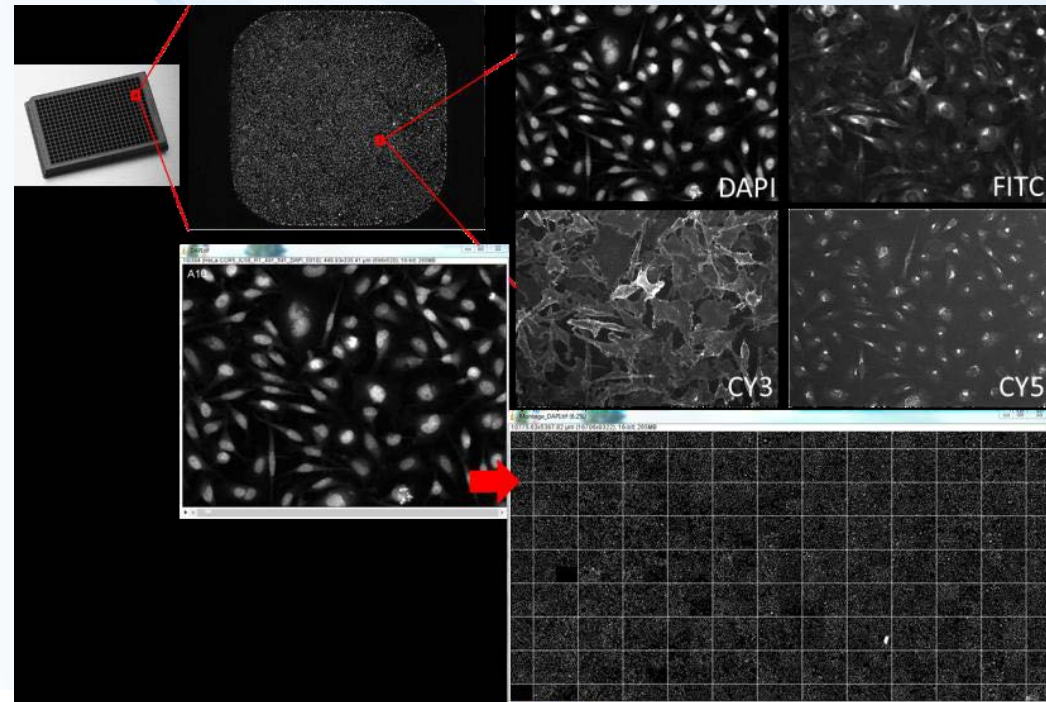
Predicting Human Toxicity: The Grand Challenge in Toxicology



High-content screening (HCS) = high-content analysis (HCA)

method used in biological research and drug discovery to identify substances such as small molecules or peptides that alter the phenotype of a cell.

- (1) Assay development.
- (2) Robotics for scaling up the screening process
- (3) Image acquisition
- (4) Image analyses – high content





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí