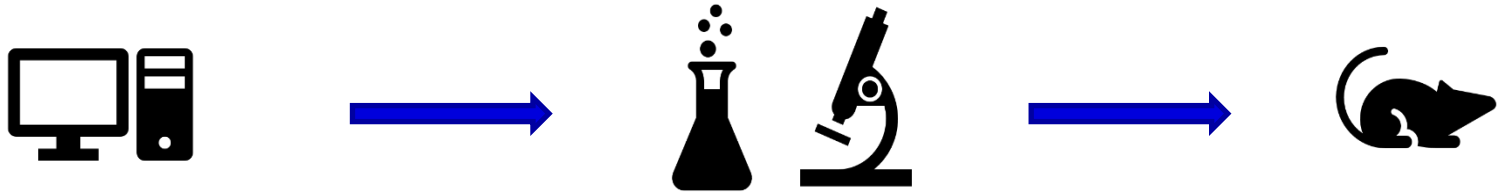
MUNI
PHARM

Hodnocení toxicity *in vitro*

Toxikologie, Podzim 2022
ÚFTo FaF MUNI



in silico → *in vitro* → *in vivo*

↓ Výběr látky – předpoklad efektu

↓ Prvotní stanovení efektu
Výběr dávky
Alternativa k *in vivo*

↓ Efekt na organismus

Příklad strategie testování – testy kožní dráždivosti a leptavosti

a. *in silico* + pH
b. *in vitro* – modely lidské kůže
c. *in vivo* – pokusné zvíře (albinotický králík)

Pozn. ne všechny *in vivo* metody mají alternativu nebo předhůdce v *in vitro*

\+ *ex vivo* modely

MUNI PHARM

In vitro modely

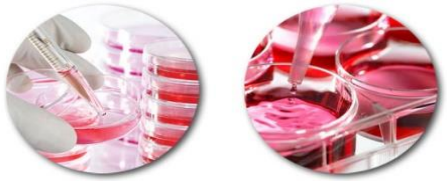
= živý systém zjednodušený ve srovnání s *in vivo* modelem

- modely na subcelulární úrovni
- **buněčné kultury**
- tkáňové kultury
- tkáňové řezy
- izolované orgány

- 2D vs. 3D modely
- Stem cells
- Bakterie, kvasinky, explantátové kultury etc.

MUNI PHARM

In vivo x *in vitro* modely

	++	--
In vitro 	**Nižší náklady** Testování **většího** počtu látek v **krátkém** časovém úseku Dostatek biologického materiálu Reprodukovatelnost Použití **lidských** buněčných kultur Možnost hodnocení **orgánově specifické** toxicity (př. hepatotoxicita, nefrotoxicita etc.)	Získaná data nevypovídají o **systémové regulaci** Pro náhradu *in vivo* modelu nutná **validace** metod Problém extrapolace dat Nelze všechny buněčné typy kultivovat *in vitro* Kultivace za nefyziologických podmínek (kultivační média, u buněčných linií absence tkáňového kontextu)
In vivo 	Testování systémové regulace Toxikokinetika → In vivo modely nelze eliminovat !!	**Finanční, časová náročnost** **Etické** hledisko **Interindividuální** rozdíly

MUNI PHARM

Buněčné linie

= permanentní buněčné linie (imortalizované)

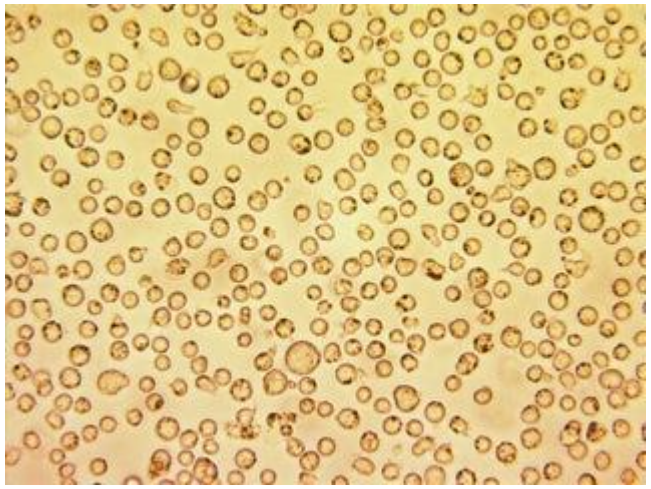
- Plně adaptovány na podmínky *in vitro*, neomezeně se dělí
- Získávají se z nádorových buněk anebo selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních či chemických mutagenů

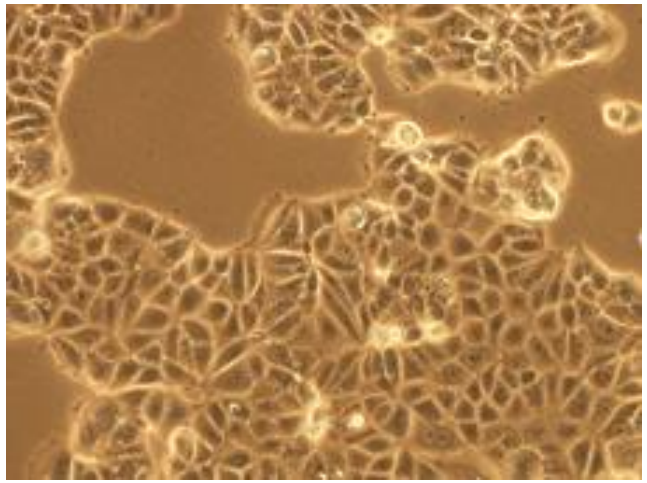
- Zdroje buněčných linií:
  - ATCC (American Tissue and Cultures Collection)
  - ECACC (European Collection of Cell Cultures)

Typ	**zdroj**	**Tkáň/buňky**
HeLa	člověk	děložní hrdlo
CaCO-2	člověk	tlusté střevo
THP-1	člověk	leukocyty
MCF-7	člověk	prsní tkáň
HEK293	člověk	lediny
NIH-3T3	myš	fibroblasty

MUNI PHARM

Suspenzní x Adherentní





MUNI PHARM

Kultivační podmínky

- !! sterilní podmínky !! riziko kontaminace
- Nákladné vybavení laboratoře
  - inkubátor, flowbox etc.

MUNI PHARM

Kultivační podmínky

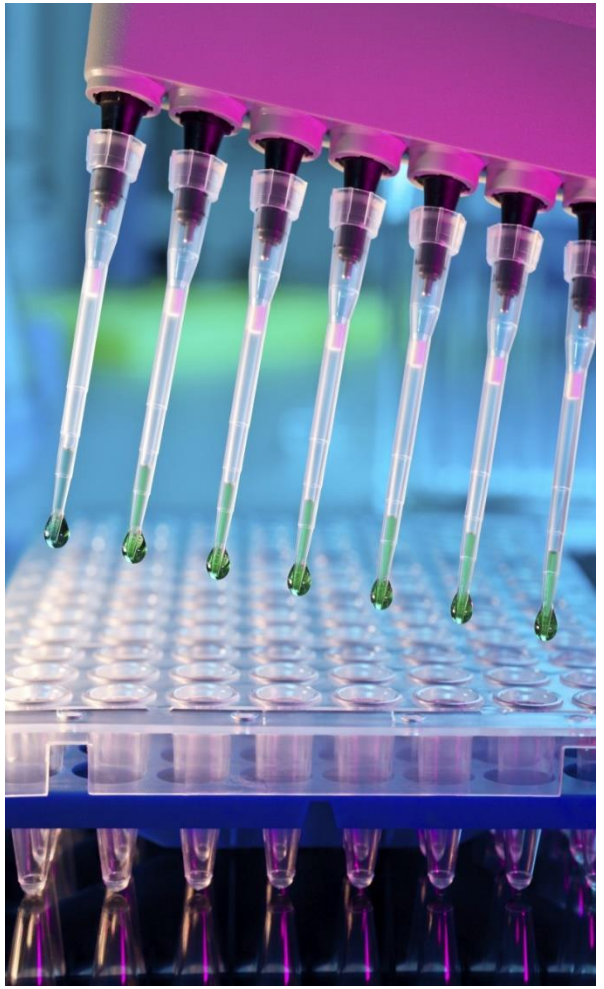
- Kultivační plasty

- Kultivační média

MUNI PHARM

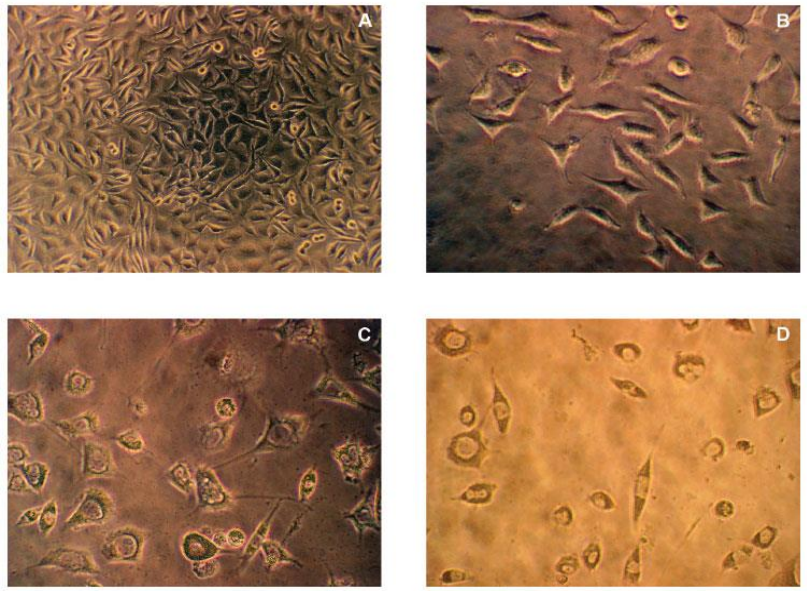
Hodnocení toxicity s využitím buněčných linií

- **Jediný buněčný typ**
- Přesně definované **homogenní vlastnosti** za dodržení kultivačních podmínek
- Možnost sledovat vliv toxikantu přímo na cílovou strukturu – **mechanistická toxikologie**
- Výsledky odpovídají vlivu látky na samotné buňky bez interakce s jinými orgány nebo buněčnými typy !!



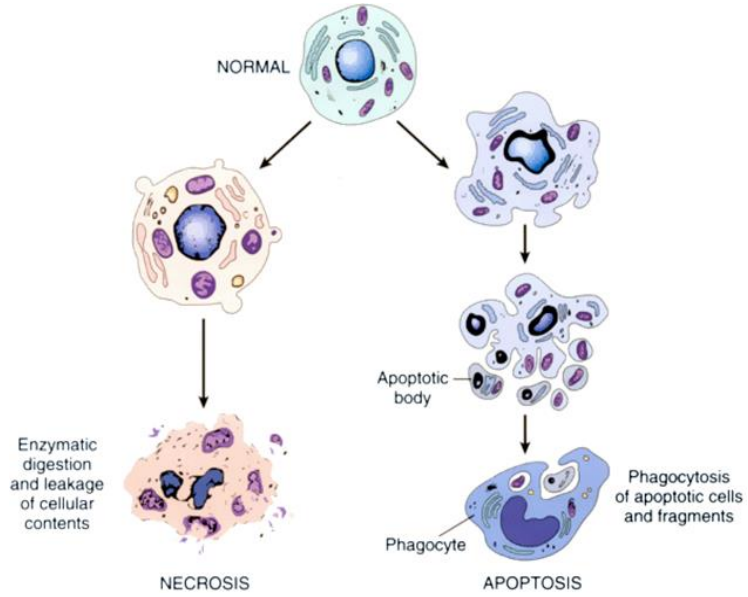
MUNI PHARM

Působení toxikantu na buňku = Cytotoxicita



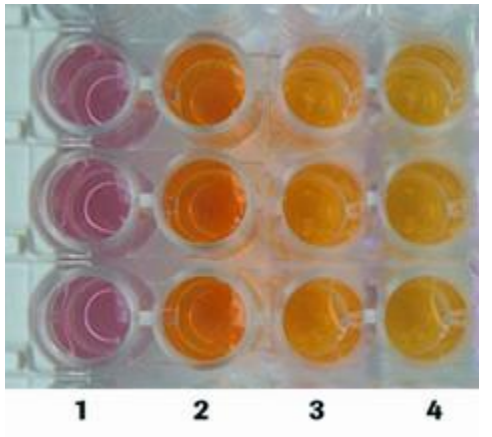
- Odpověď buňky na působení toxické látky
- **Cytotoxický x Cytostatický efekt**

  - **Změna morfologie** (velké buňky, mnohojaderné, granulace povrchu etc.)
  - **Metabolické změny**
  - **Útlum proliferace** (změny v průběhu buněčného cyklu etc.)
  - **Buněčná smrt** (apoptóza, autofagie, nekróza etc.)



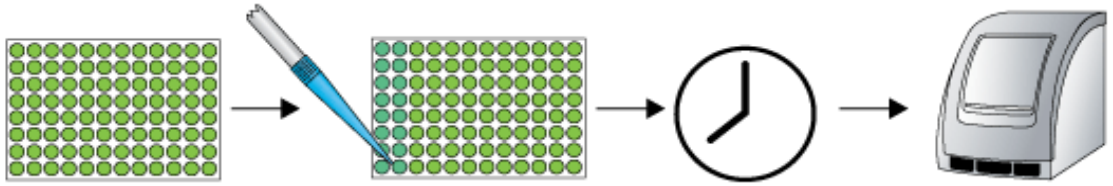
MUNI PHARM

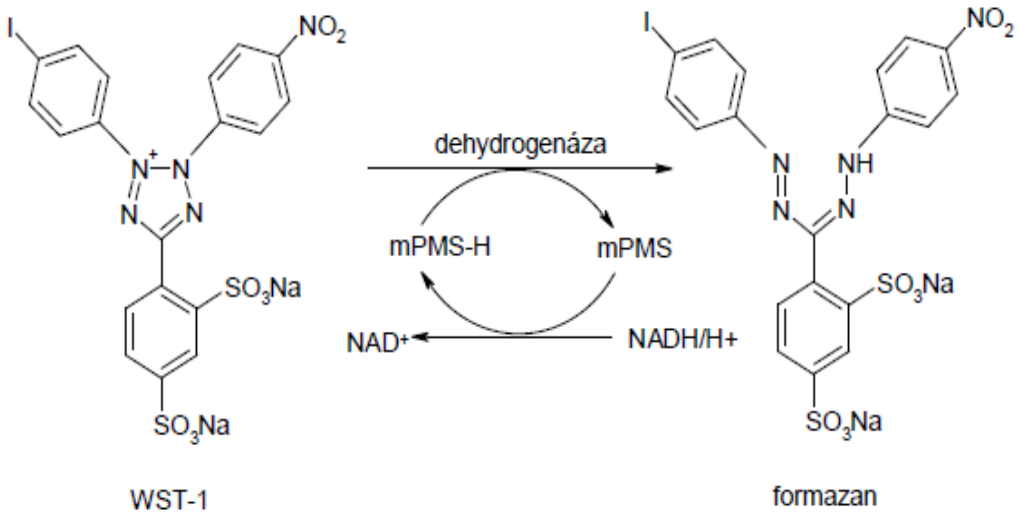
Buněčná viabilita a proliferace



- **Tetrazoliové soli**
  - enzymatická redukce TS (změna barvy)
  - intenzita změny zbarvení vzorku odpovídá míře jeho metabolické aktivity

- MTT; XTT; WST-1

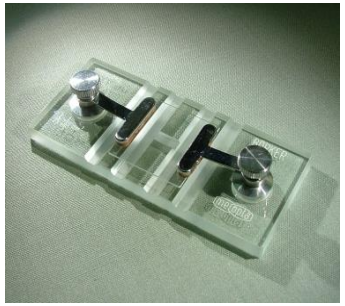


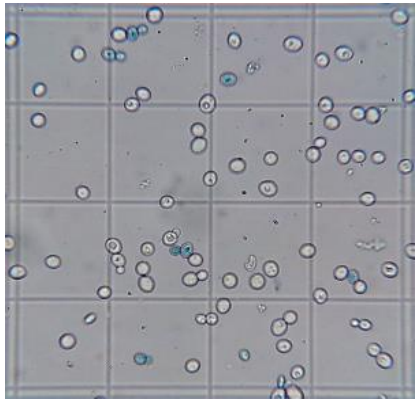


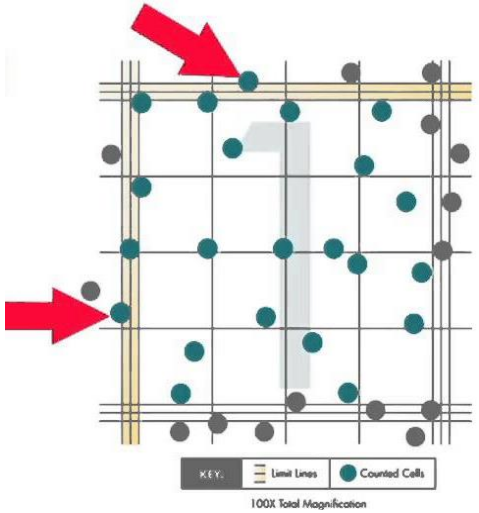
MUNI PHARM

Buněčná viabilita Dye-exclusion test

- Stanovení buněčné viability pomocí barvení buněk **vitálními barvivy**
- Erythrosin B, tryptanová modř
- Živé neobarvené x mrtvé obarvené
  - průnik barviva přes poškozenou membránu
- Hemocytometr (př. Bürkerova komůrka) + mikroskop







MUNI PHARM

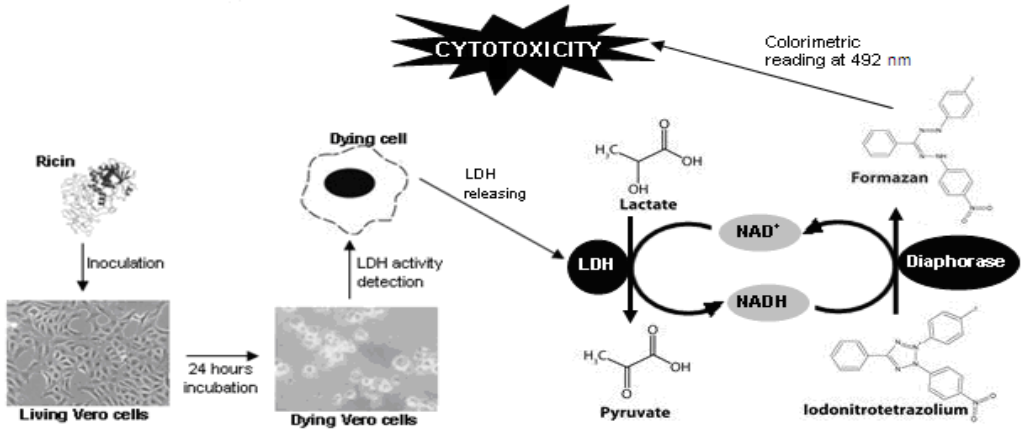
Buněčná viabilita

Další metody:

LDH analýza

- Porucha integrity membrány – uvolnění LDH – stanovení koncentrace LDH extracelulárně v médiu

- Využití tetrazoliových solí a jejich enzymatické redukce – stanovení změny zbarvení spektrofotometricky



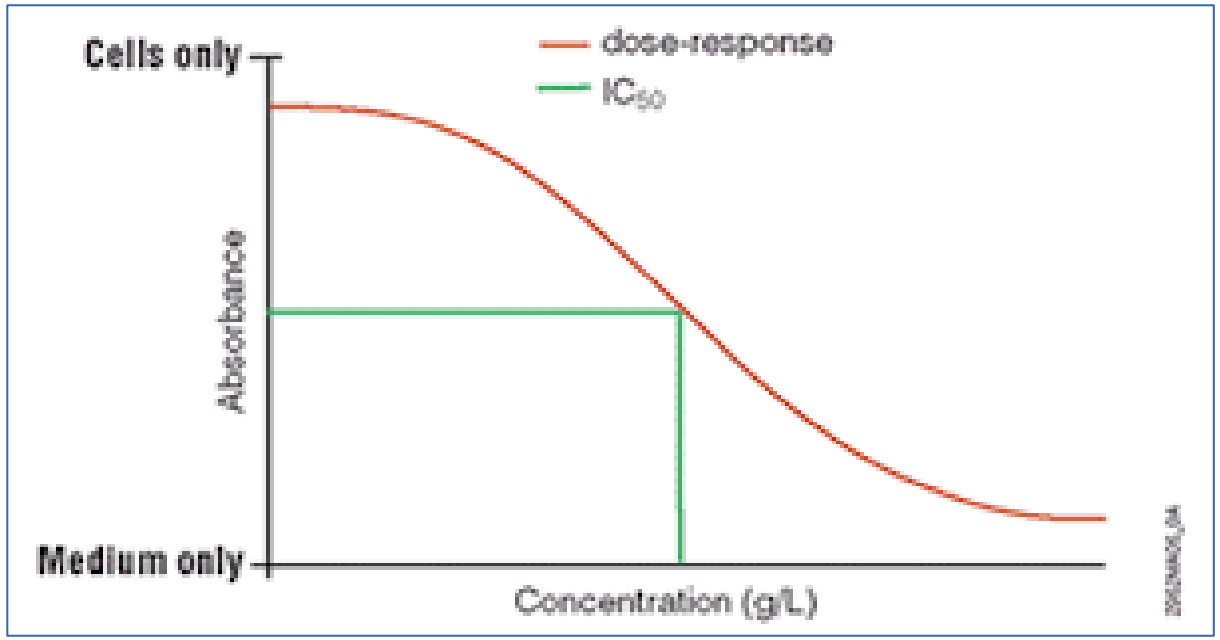
MUNI PHARM

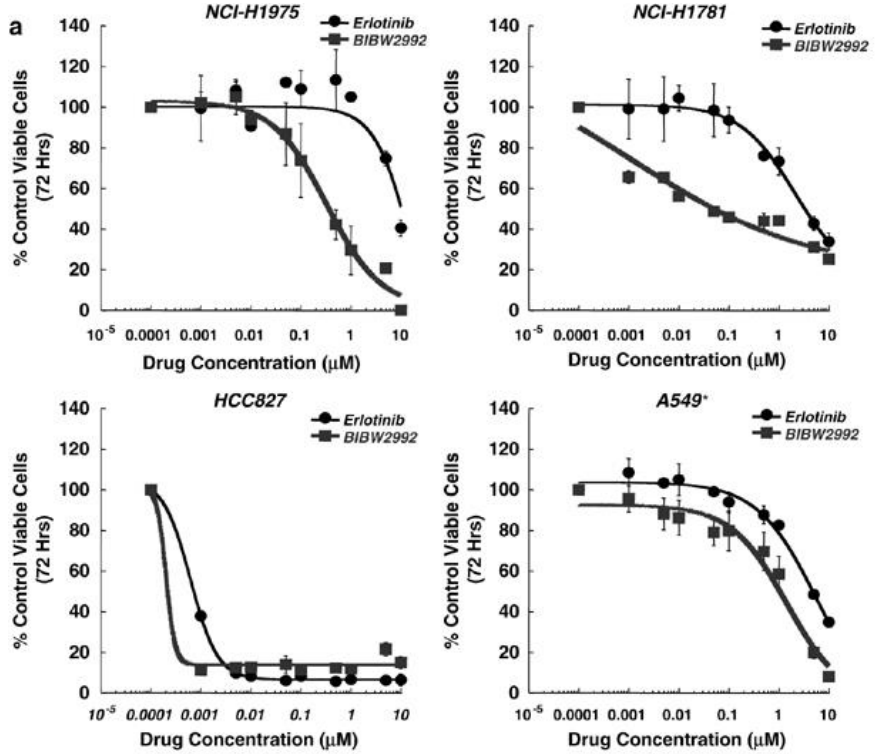
Výsledné parametry

	Inhibiční koncentrace	Letální koncentrace	Efektivní koncentrace	Toxická koncentrace
U 10 % populace	IC_{10}	LC_{10}	EC_{10}	TC_{10}
U 50 % populace	IC_{50}	LC_{50}	EC_{50}	TC_{50}
U 90 % populace	IC_{90}	LC_{90}	EC_{90}	TC_{90}

- Umožňují vzájemné srovnání efektu testovaných látek
- !! doba expozice, model etc.
- Hodnocení na základě tzv. ***dose-response curve***

Dose-response curve





b

	H1666	H3255	NCI 1975	Targets	Inhibition
BIBW2992	60	0.7	99	EGFR/HER2	irreversible
lapatinib	534	63	> 4000	EGFR/HER2	reversible
canertinib	198	1	101	EGFR/HER2	irreversible
gefitinib	157	5	> 4000	EGFR	reversible
erlotinib	110	40	> 4000	EGFR	reversible

MUNI PHARM

Validované *in vitro* testy toxicity

Validované - normované metody **OECD** (Organisation for Economic Co-operation and Development)

- Cytotoxicita
- Genotoxicita
- Oční dráždivost
- Fototoxicita

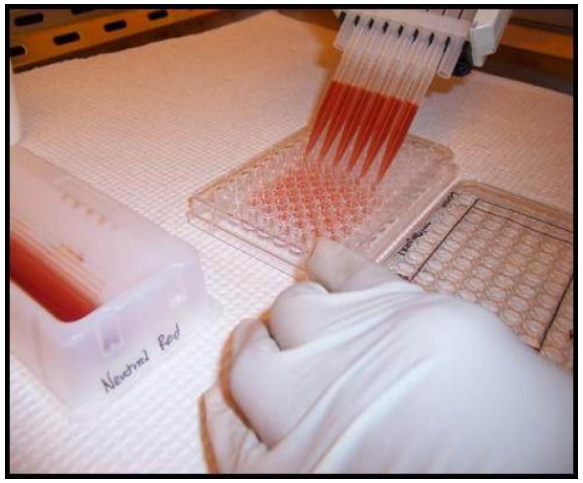
- Kardiotoxicita
- Nefrotoxicita
- Hepatotoxicita
- Endokrinní toxicita
- Respirační toxicita

- Reprodukční toxicita

- Ekotoxicita

MUNI PHARM

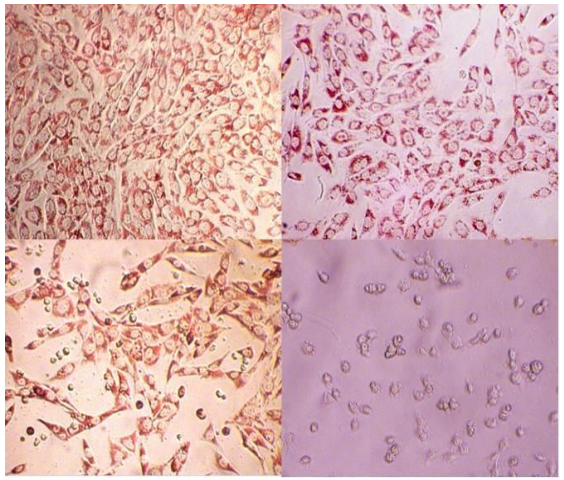
Cytotoxicita



- *In Vitro* Oral Acute Toxicity Test (OECD 129)

Neutral Red Uptake (NRU) test with human/rodent cells (NHK/3T3 NRU assay)
- výsledná data predikují dávku pro testy systémové toxicity *in vivo*

- Biologické hodnocení zdravotnických prostředků



Dle evropské normy: Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro* (ČSN EN ISO 10993-5, ČSN EN ISO 10993-12)

Buněčná linie myších fibroblastů 3T3/ lidských epidermálních keratinocytů NHK

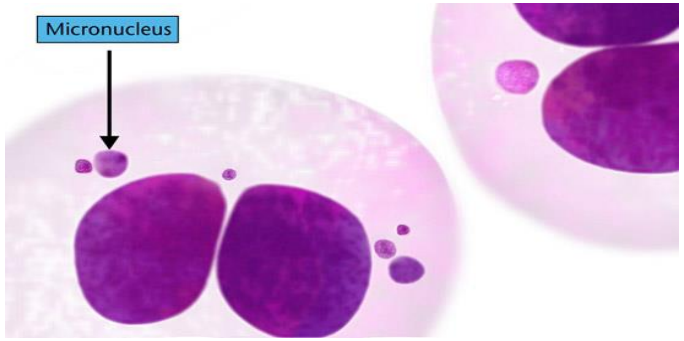
Inkorporace NR do lysozomů živých buněk – stanovení míry zbarvené spektrofotometricky

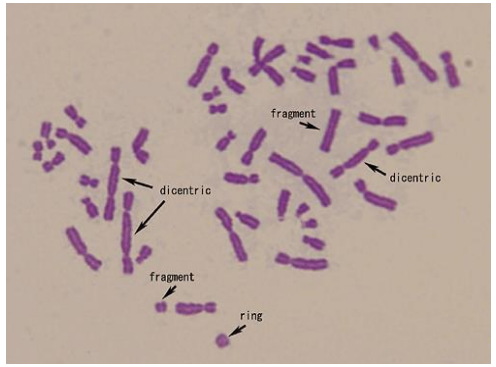
MUNI PHARM

Genotoxicita

Princip: zjišťování mutace – poškození DNA (změna genetického materiálu)

- OECD TG. 471 Mutagenita - test reverzních mutací u baktérií = **Amesův test**
- OECD TG. 473 Mutagenita - test chromozómových aberací u savčích buněk *in vitro*
- OECD TG. 487 Mutagenita - in vitro mikronukleus test v savčích buňkách
- OECD TG. 476 Mutagenita - test genových mutací v savčích buňkách *in vitro*
- OECD TG. 482 Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňky *in vitro*
- OECD TG. 479 SCE - výměna sesterských chromatid *in vitro*
- ...



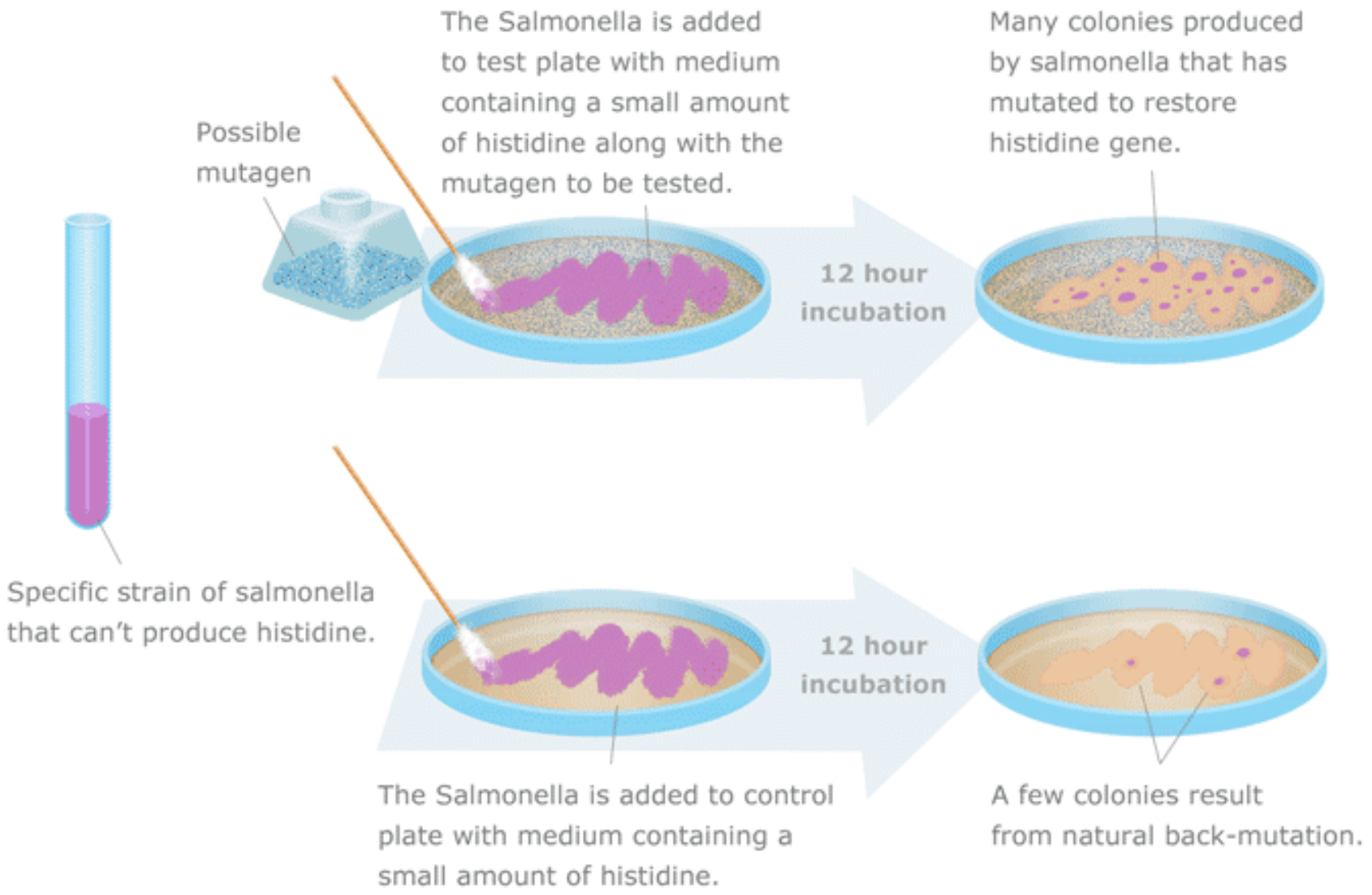


MUNI PHARM

Amesův test

- Slouží ke stanovení mutagenního a karcinogenního potenciálu chemických sloučenin
- Několik kmenů bakterie Salmonella – mutace v genech účastnících se syntézy aminokyseliny histidinu – vyžadují tedy externí zdroj histidinu
- Sleduje se schopnost testované látky způsobit reverzní mutaci a obnovit růst bakterie v mediu bez přídavku histidinu

Ames Test

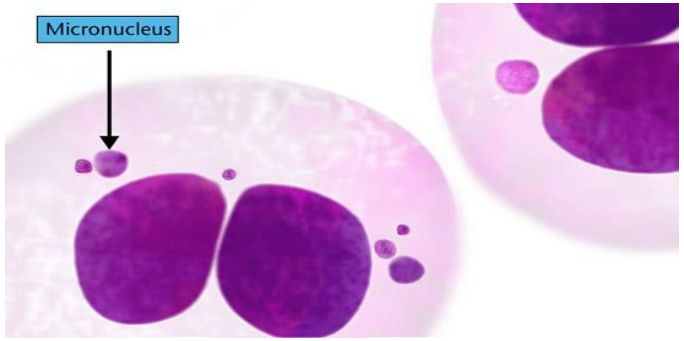


MUNI PHARM

Mutagenita
In vitro mikronukleus test v savčích buňkách

- Test validován ECVAM (2006) jako alternativa k MNT testu *in vivo*

- Princip testu:
- expozice kultury savčích lymfocytů periferní krve testované látce » detekce mikrojader po barvení pod mikroskopem
- **Mikrojádro (micronucleus):** fragment chromozómu (oddělený od jádra) v cytoplasmě



MUNI PHARM

Oční dráždivost/leptavost

Testovací metody pro identifikaci látek leptavých a silně dráždivých pro oko – *ex vivo*

BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability)

OECD TG. 437 Opacita a permeabilita hovězí rohovky

ICE (isolated chicken eye) test

OECD TG. 438 Izolované kuřecí oko

HET-CAM (Hen´s Egg Test - Chorioallantoic Membrane)

Fertilizovaná vejce - aplikace látek na membránu - sledování změn: hemoragie, lýza, koagulace, …

MUNI PHARM

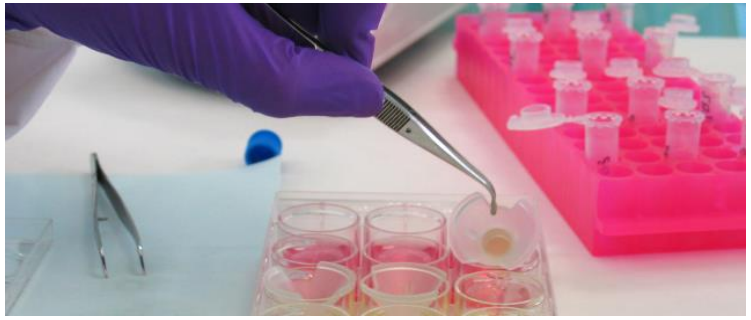
In vitro
Test kožní leptavosti: model lidské kůže

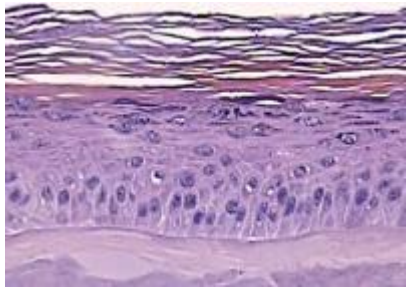
Validovaný kožní model:

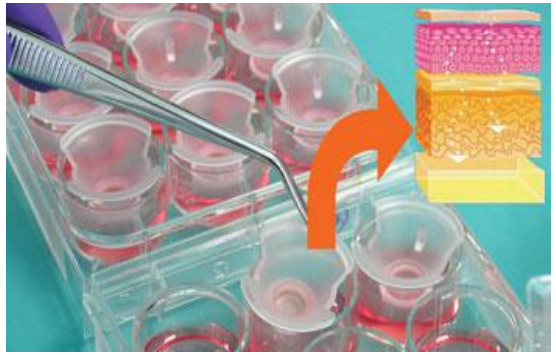
- Episkin, Epiderm, SkinEthic....
- (rekonstruovaná epidermis - lidské keratinocyty - s funkční stratum corneum)

Princip:

- nanesení testované látky na povrch trojrozměrného modelu lidské kůže - MTT analýza– detekce vlivu látky na buněčnou viabilitu







MUNI PHARM

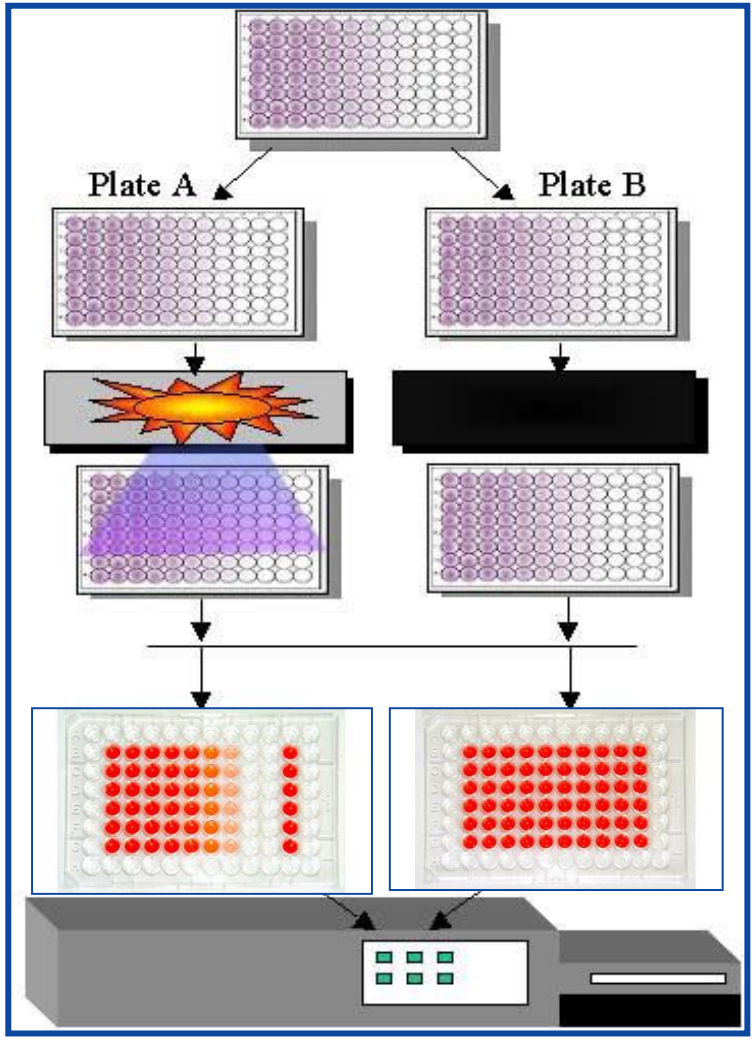
Testy fototoxicity

Zkouška fototoxicity **3T3 NRU *in vitro***

Fotoaktivní látka + světlo = toxicita

3T3 buněčná linie – myší embryonální fibroblasty

Cytotoxický efekt látky hodnocen v přítomnosti a bez vystavení netoxické dávce UVA světla



MUNI PHARM

Reprodukční toxicita

Embryonic Stem Cell test (EST test)

= hodnocení embryotoxického potenciálu testovaných látek

Průkaz se provádí stanovením inhibice diferenciace embryonálních kmenových buněk (ESC) a inhibice růstu ESC a 3T3 buněk

MUNI
PHARM

Děkuji za pozornost