

Hodnocení toxicity *in vitro*

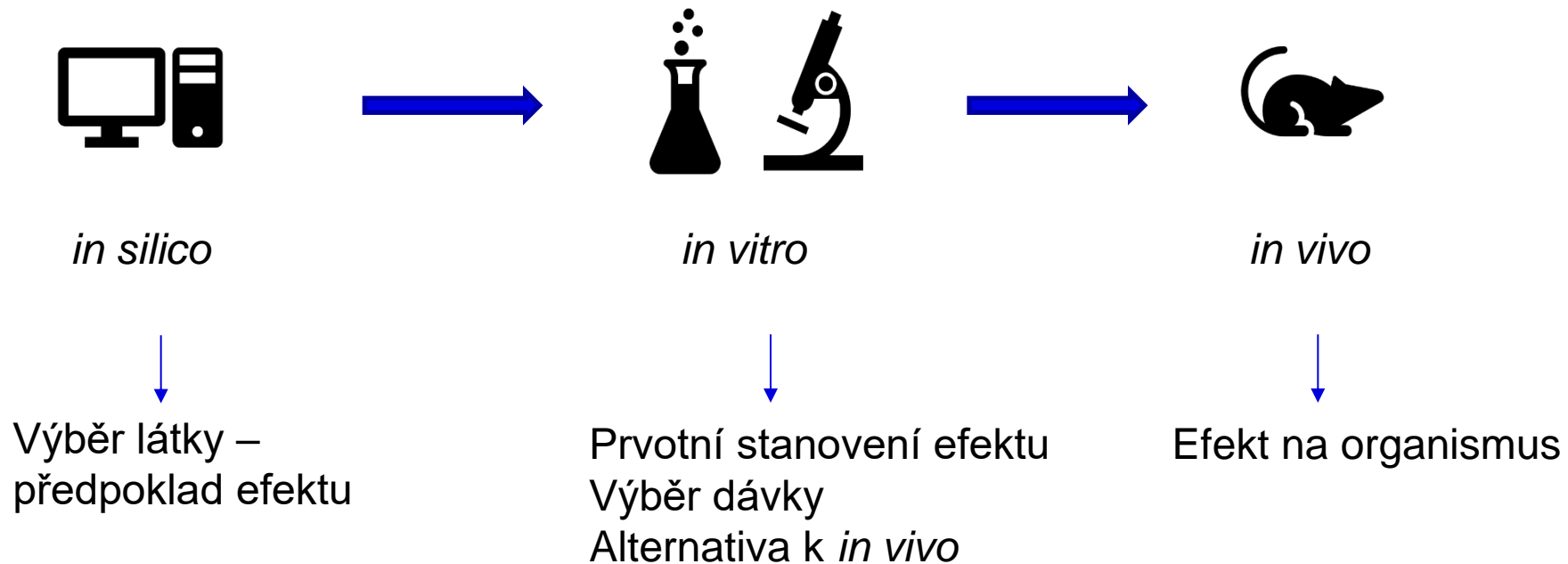
Toxikologie, Podzim 2024

ÚFTo FaF MUNI

Informace o duševním vlastnictví:

- Tento materiál je autorským dílem vytvořeným zaměstnanci Masarykovy univerzity.
- Studenti kurzu/předmětu mají právo pořídit si kopii materiálu pro potřeby vlastního studia.

¹ • Jakékoliv další šíření prezentace nebo její části bez svolení Masarykovy univerzity je v rozporu se zákonem.





Příklad strategie testování – testy kožní dráždivosti a leptavosti

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

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

In vivo x in vitro modely

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

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.



Buněčné linie

= permanentní buněčné linie (imortalizované)

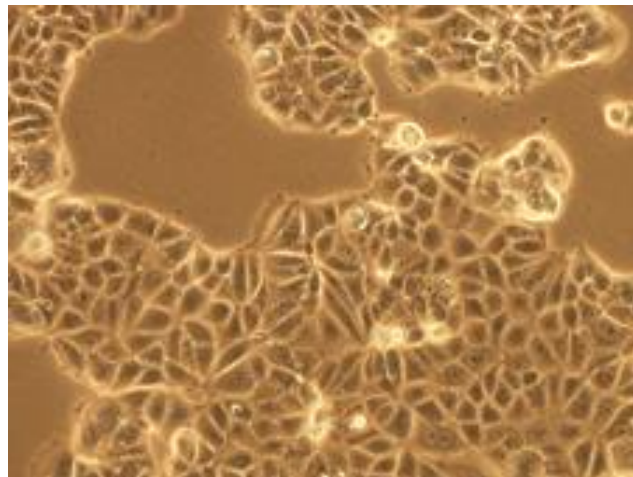
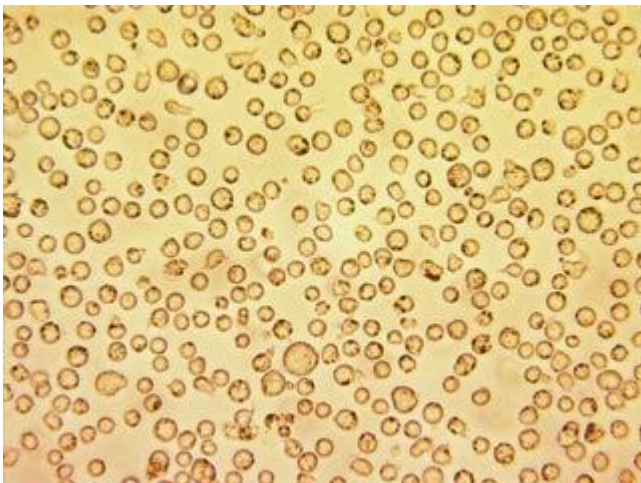
- Plně adaptovány na podmínky *in vitro*, neomezeně se dělí
- Získávají se z nádorových buněk anebo selekcí z primárních kultur pomocí fyzikálních či chemických mutagenů
- Zdroje buněčných linií:
 - ATCC (American Tissue and Cultures Collection)
 - ECACC (European Collection of Cell Cultures)

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

Suspensní

x

Adherentní



Kultivační podmínky

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



Kultivační podmínky

- Kultivační plasty



- Kultivační média



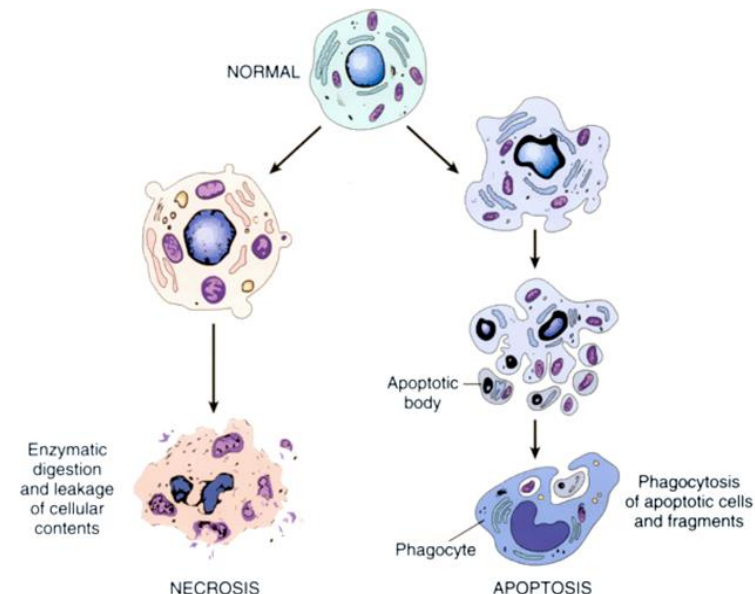
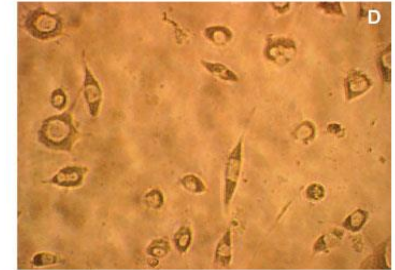
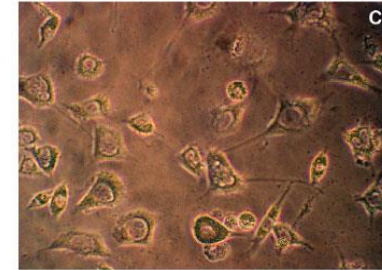
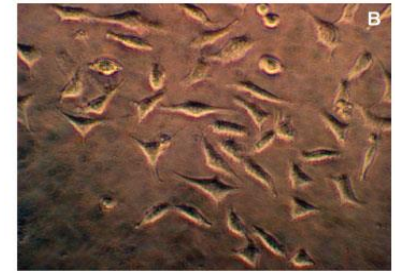
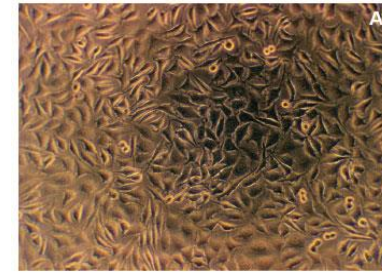
Hodnocení toxicity s využitím buněčných linií

- **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 !!



Působení toxikantu na buňku = Cytotoxicita

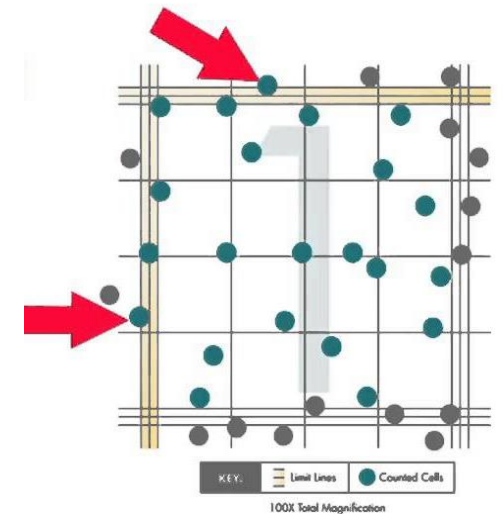
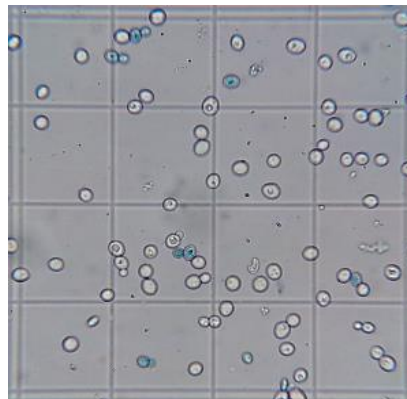
- Odpověď buňky na působení toxické látky
- **Cytotoxický x Cytostatický efekt**
 - **Změna morfologie** (velké buňky, mnohojaderné, granulace povrchu etc.)
 - **Metabolické změny**
 - **Útlum proliferace** (změny v průběhu buněčného cyklu etc.)
 - **Buněčná smrt** (apoptóza, autofagie, nekróza etc.)



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



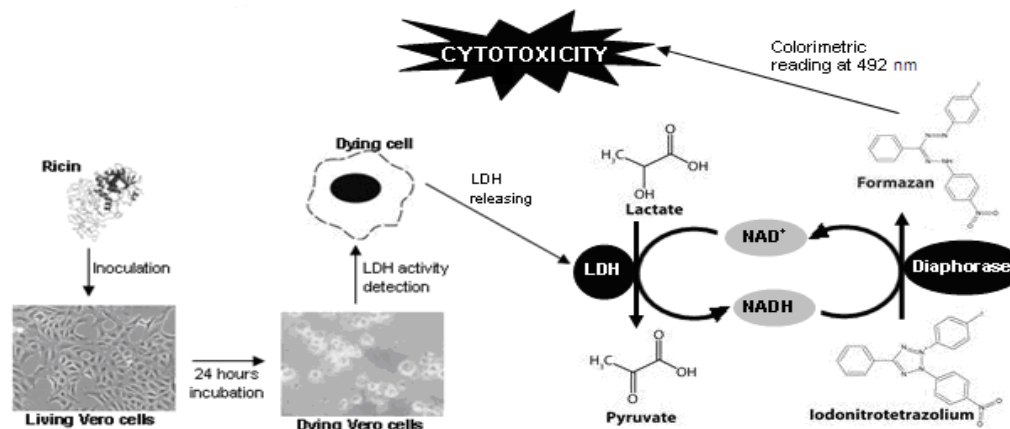
Buněčná viabilita

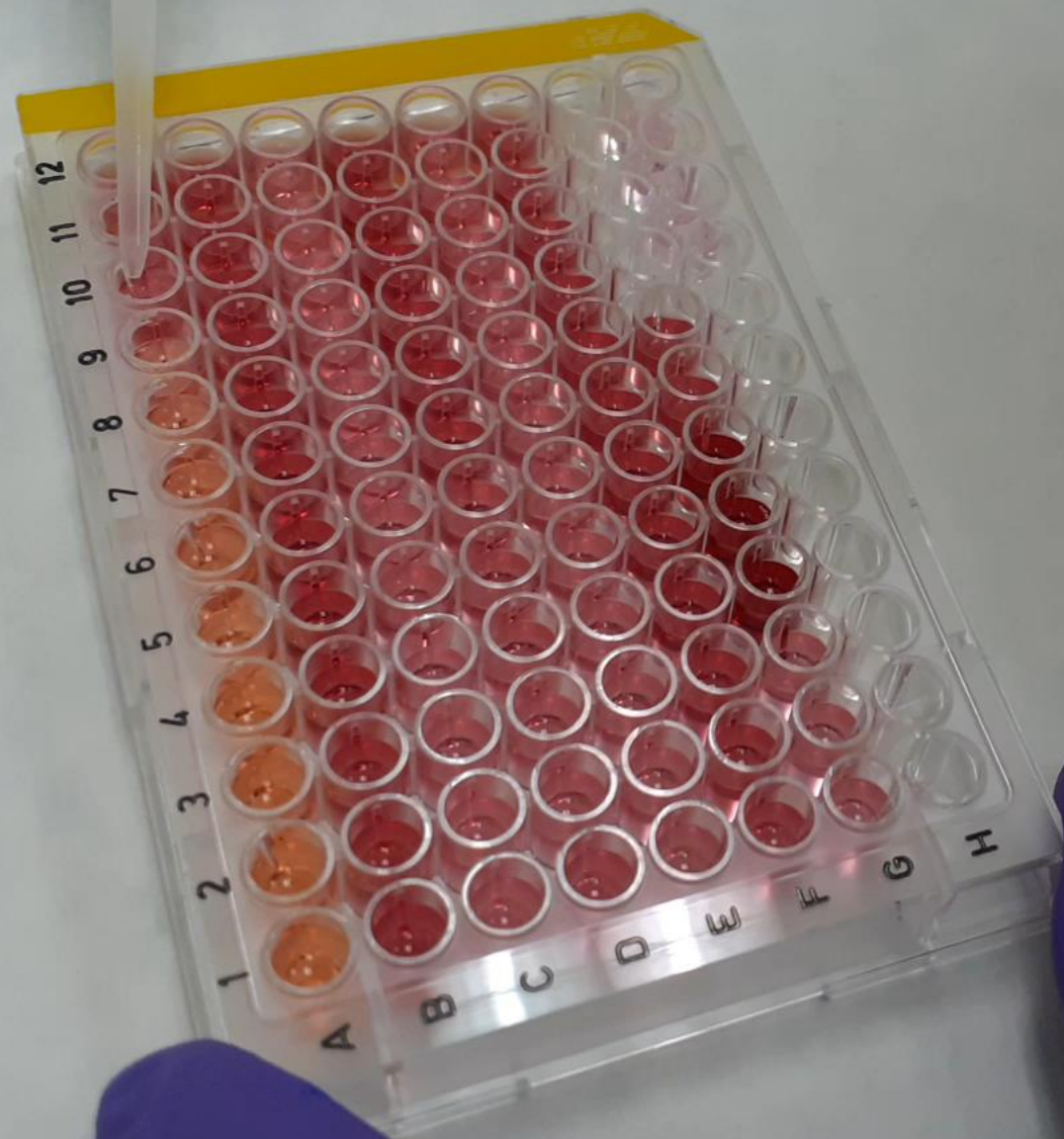


Další metody:

LDH analýza

- Porucha integrity membrány – uvolnění LDH – stanovení koncentrace LDH extracelulárně v médiu
- Využití tetrazoliových solí a jejich enzymatické redukce – stanovení změny zbarvení spektrofotometricky

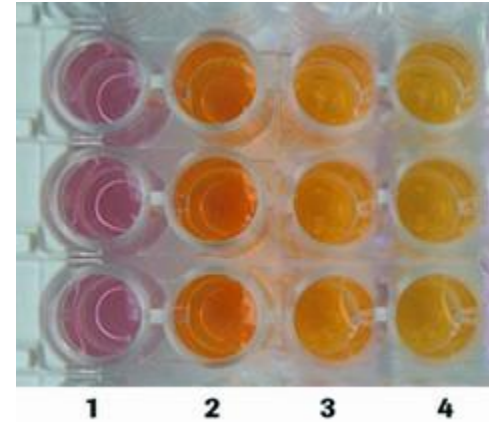




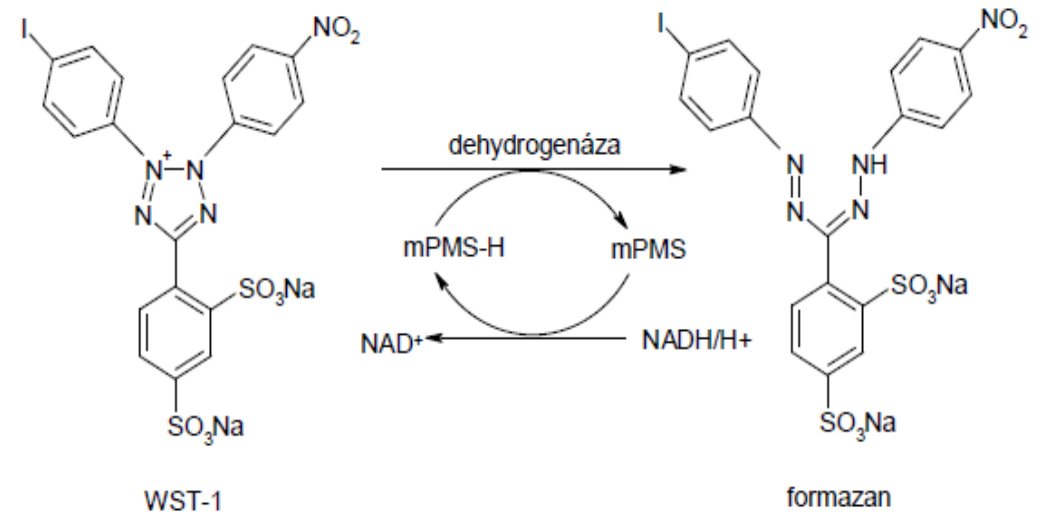
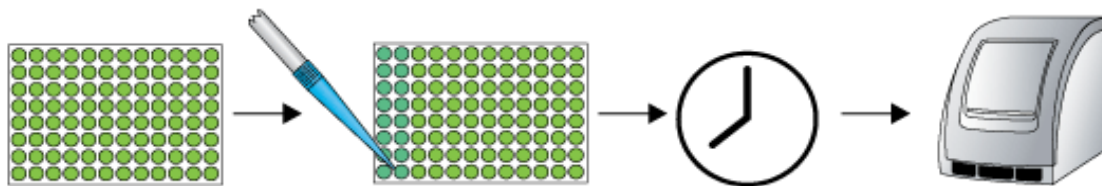
Buněčná viabilita a proliferace

– Tetrazoliové soli

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



– MTT; XTT; WST-1

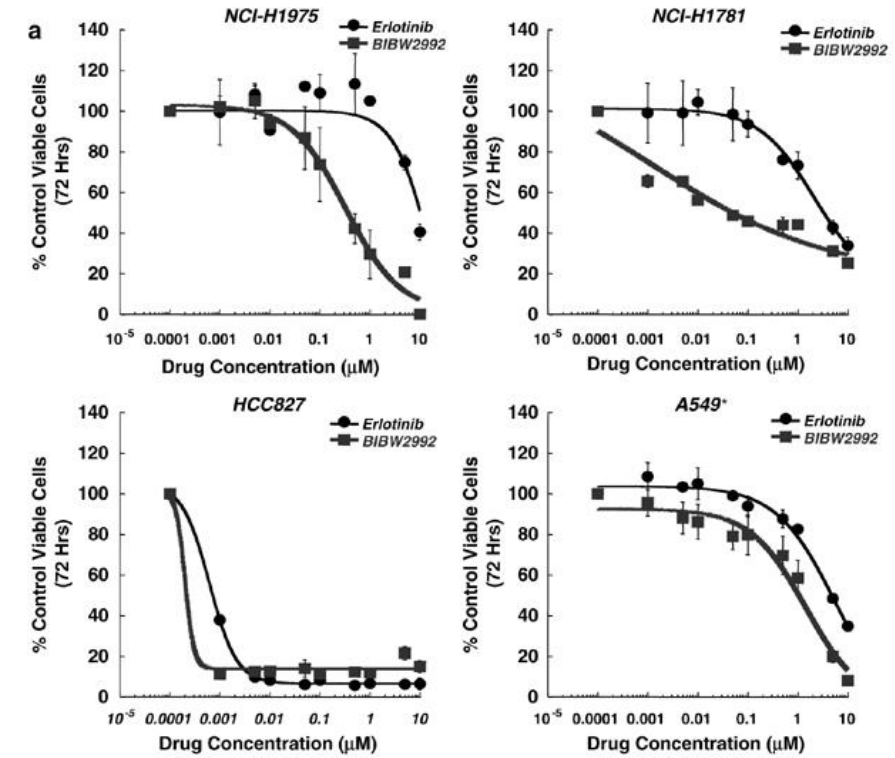
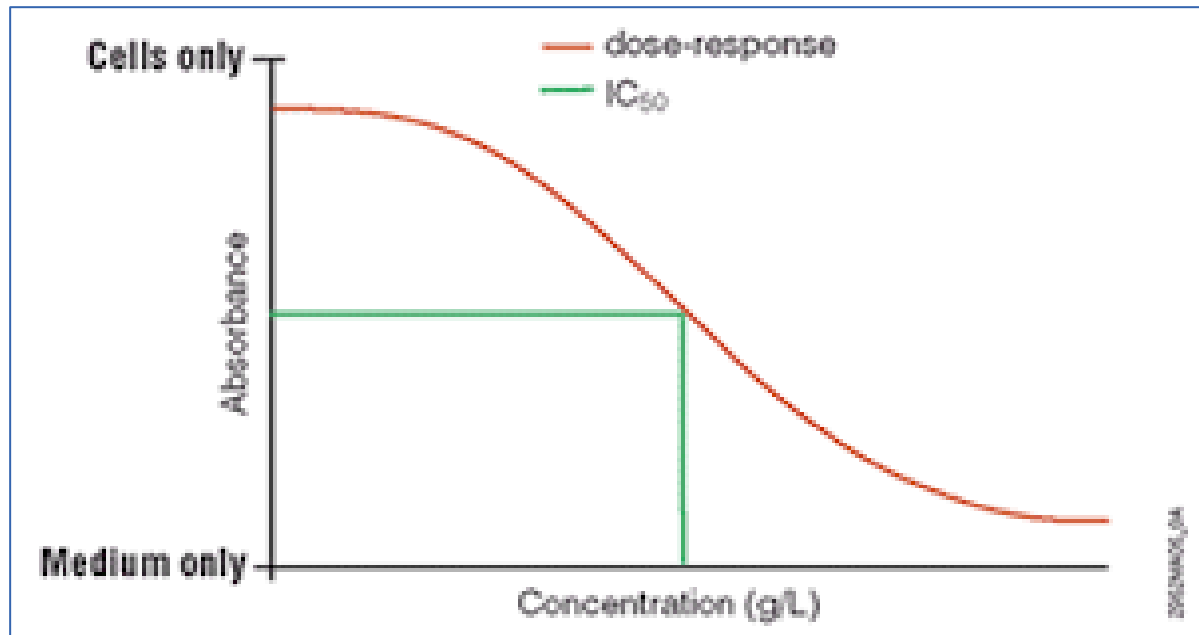


Výsledné parametry

	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

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

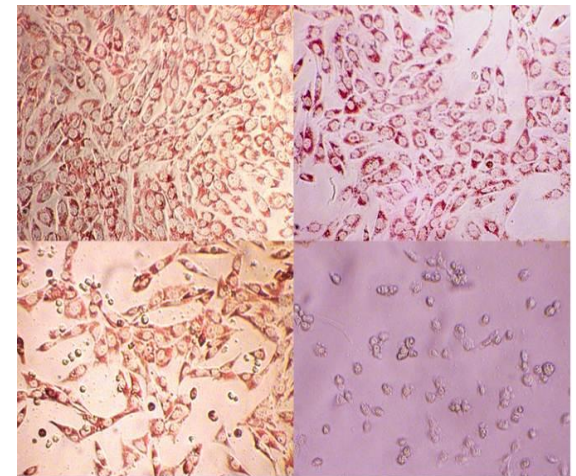
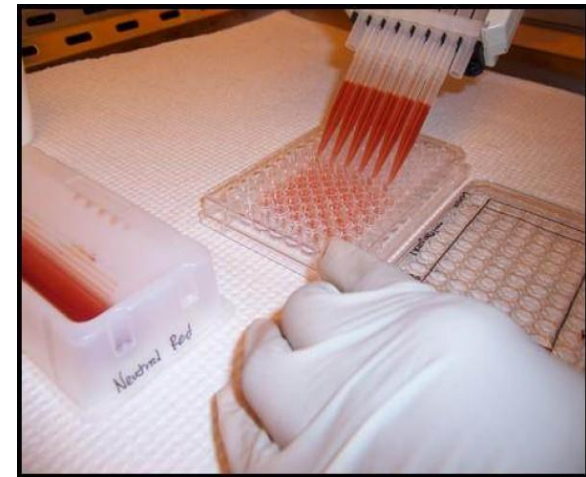
Cytotoxicita

- *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

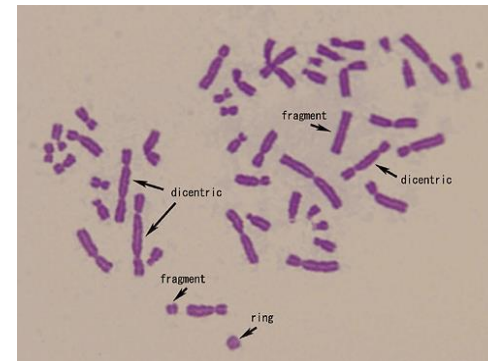


Genotoxicita

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

- OECD TG. 471 Mutagenita - test reverzních mutací u bakterií = **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*

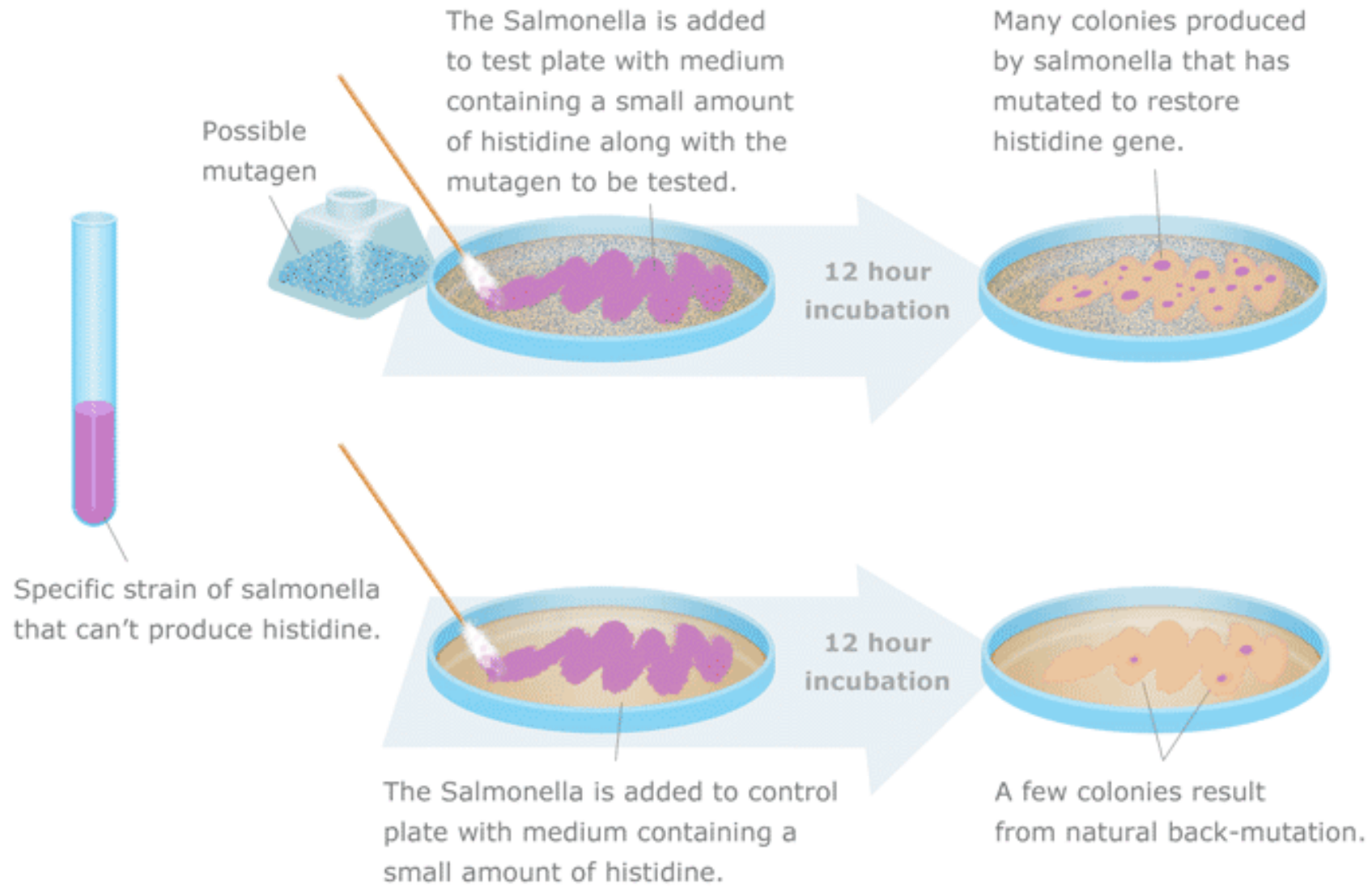
• ...



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

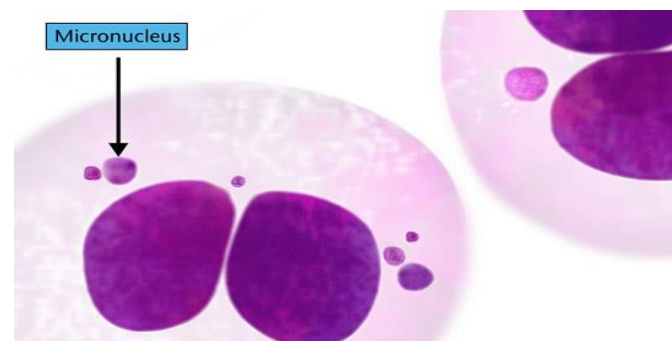
Ames Test



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 látky » detekce mikrojadérek po barvení pod mikroskopem
 - **Mikrojádře (micronucleus)**: fragment chromozómu (oddělený od jádra) v cytoplasmě



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, ...

In vitro

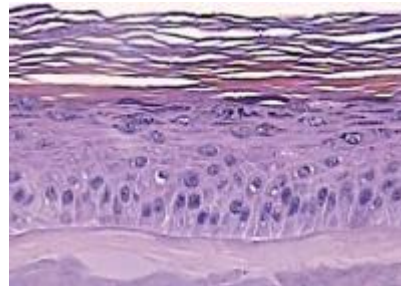
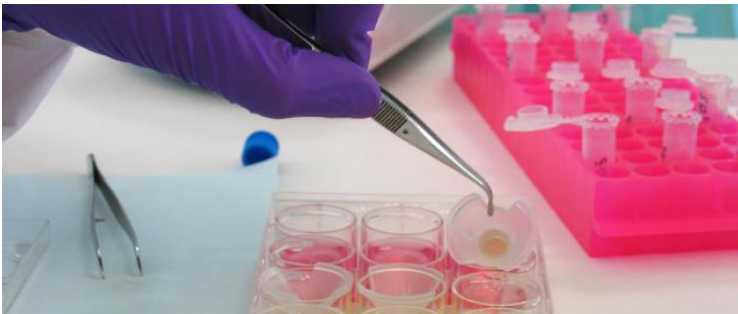
Test kožní leptavosti: model lidské kůže

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



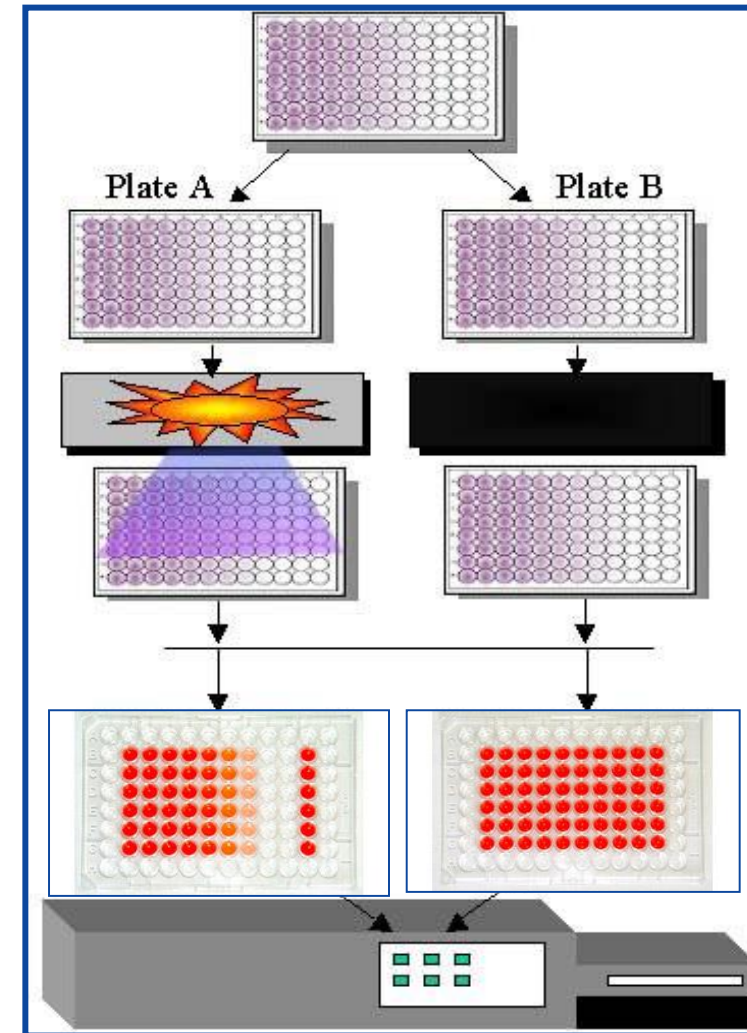
Testy fototoxicity

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



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