

IN VITRO TESTY



IN VITRO TESTY

- rychlé, citlivé a nenáročné testy
- možnost hodnocení environmentálních vzorků
 - abiotických: voda, sedimenty, ovzduší, půda
 - biotických
- testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických či eukaryotických buňkách
- modely bakteriální, kvasinkové či testy na živočišných a humánních tkáňových kulturách
- vhodné pro zkoumání endokrinní aktivity
 - čistých látek
 - modelových směsí
 - komplexních environmentálních extraktů
- hodnocení potenciálu xenobiotik pro endokrinní disrupci

IN VITRO TESTY

- nejčastěji testy s reportérovými geny vloženými do kvasinkových nebo savčích buněk
- sleduje se:
 - estrogenní aktivita
 - androgenní aktivita
 - aktivita dioxinového typu
 - (progesteronová aktivita, glukokortikoidní aktivita)
- dobrá reprodukovatelnost výsledků
- nezohledňují biodostupnost, vstup látky do organismu ani toxikinetické děje

PRINCIP TESTŮ S REPORTEROVÝMI GENY

- používají se geneticky modifikované linie kvasinkových buněk nebo buněk z tkání obratlovců (savců)
- buňky se transfekují reporterovým genem (přechodně, nastálo), který je pod kontrolou endogenního receptoru
- reportérový gen kóduje enzym luciferázu (β - galaktozidázu)
- testovaná látka \rightarrow buňka \rightarrow vazba na receptor \rightarrow aktivace \rightarrow vstup do jádra a vazba na DNA \rightarrow exprese reportérového genu \rightarrow produkce enzymu
- aktivita enzymu luciferázy se stanovuje luminiscenčně (β - galaktozidáza metabolizuje médium- změna barvy)

TESTY NA BUŇKÁCH SAVCŮ

- celý test trvá 48 h, je nutné pracovat ve sterilním prostředí
- **MVLN**
 - buňky lidského karcinomu prsu
 - luciferázový gen pod kontrolou estrogenního receptoru (ER)
 - měří se estrogenní a antiestrogenní aktivity, luminiscenčně
- **H4IIE- luc**
 - buňky krysího hepatomu
 - luciferázový gen pod kontrolou „aryl hydrocarbon“ receptoru (AhR)
 - měří se aktivity dioxinového typu, luminiscenčně
- ➔ **test s neutrální červení**
 - test cytotoxicity na buněčných kulturách
 - živé b. přijímají a váží v lyzozomech barvivo
 - stanovení spektrofotometricky
- testuje se také androgenní, progesteronová a glukokortikoidní aktivity

TESTY NA BUŇKÁCH SAVCŮ

PRACOVNÍ POSTUP

- kultivované buňky jsou nasazeny do jamek 96- jamkové mikrotitrační desky o určité koncentraci buněk na jamku
- inkubace 24 h při 37 °C a 5 % CO₂
- Expozice: testovanou látkou (rozpuštědlo- ethanol, DMSO)
 - negativní kontrolou (čisté rozpuštědlo)
 - pozitivní kontrolou (E2/ TCDD- 6 konc. kalibrační řada)
- každý vzorek ve 3 opakováních
- při testování antiestrogenní aktivity- přidán k testované látce E2
- inkubace 24 h při 37 °C a 5 % CO₂
- expoziční směs se odpipetuje, přidá se luciferázový kit
- po 10 min. třepání se luminometrem změní aktivita indukované luciferázy

KVASINKOVÉ TESTY

- geneticky modifikovaný kmen *Saccharomyces cerevisiae*
- celý test trvá cca 24 h, nutné pracovat ve sterilním prostředí
- **kmen kvasinkové kultury AR**
 - luciferázový gen pod kontrolou androgenního receptoru (AR)
 - měří se androgenní a antiandrogenní aktivita, luminiscenčně
- ➔ **kmen kvasinkové kultury LUC**
 - kontrolní kmen pro měření cytotoxicity
- testuje se také estrogenní, progesteronová a glukokortikoidní aktivita

KVASINKOVÉ TESTY

PRACOVNÍ POSTUP

- naočkujeme kvasinkovou pre- kulturu do minimálního média
- nárůst přes noc, za tmy, třepání, ve 30 °C
- změříme optickou denzitu při 660 nm, výpočet ředění
- naředěná kultura- inkubace 2 h při 30 °C za tmy při stálém třepání
- do mikrotitrační desky (96) pipetujeme do každé jamky kvas. kulturu + testovanou látku/ negativní kontrolu/ pozitivní kontrolu- testosteron (ve 100 % ethanolu nebo DMSO)
 - každý vzorek ve 3 opakováních
 - při testování antiandrogenní aktivity- přidán k testované látce T
- inkubace 2,5 h při 30 °C za tmy
- po inkubaci pipetujeme do každé jamky 1 mM roztok luciferinu (pomocí dispensoru v luminometru)
- krátce třepeme a ihned měříme luminometrem (vzorek je stálý pouze okolo 5 min.)

VYHODNOCENÍ

- odhad specifické aktivity environmentálního vzorku- nutné stanovit ekvivalent specifické aktivity porovnáním s referenční látkou
- Př. Ekvivalent estradiolu (EEQ)- vyjadřuje ekvivalentní množství E2 na množství vzorku, které by vyvolalo stejnou odpověď jako množství vzorku
- je vytvořena ředící řada vzorku, **EC₅₀ není koncentrace, ale zředění**, při kterém došlo k 50 % účinku
- $EEQ = EC_{50}(E2) / EC_{50}(\text{vzorku})$
- EEQ umožňuje kvantifikovat estrogenní aktivitu bez znalosti chemických látek působících estrogeně
- ekvivalenty specifické aktivity získáme pomocí křivky dávka- odpověď

DĚKUJI ZA POZORNOST