

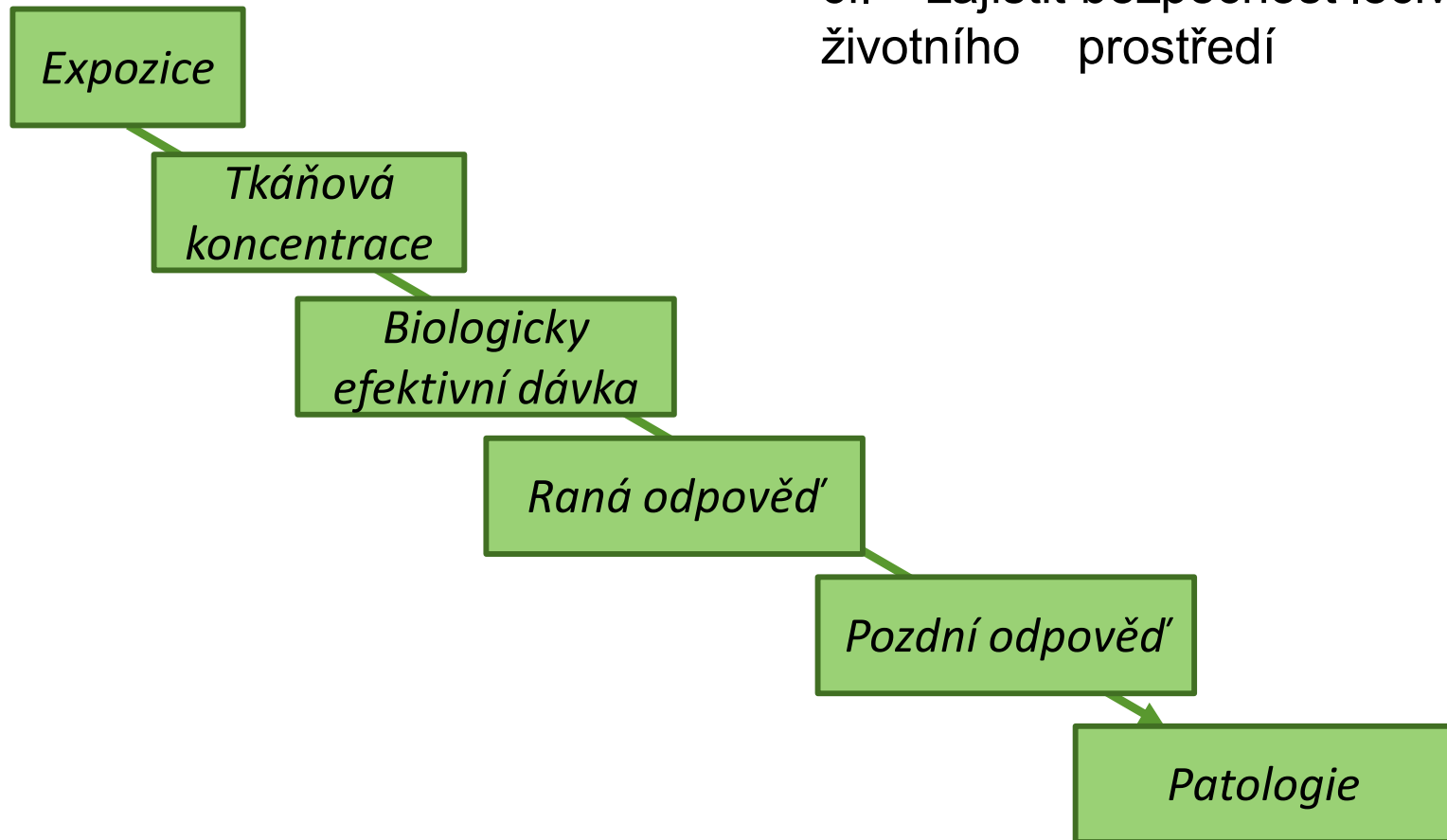


Moderní metody v toxikologii a jejich aplikace (18.3.24)

J. Procházková

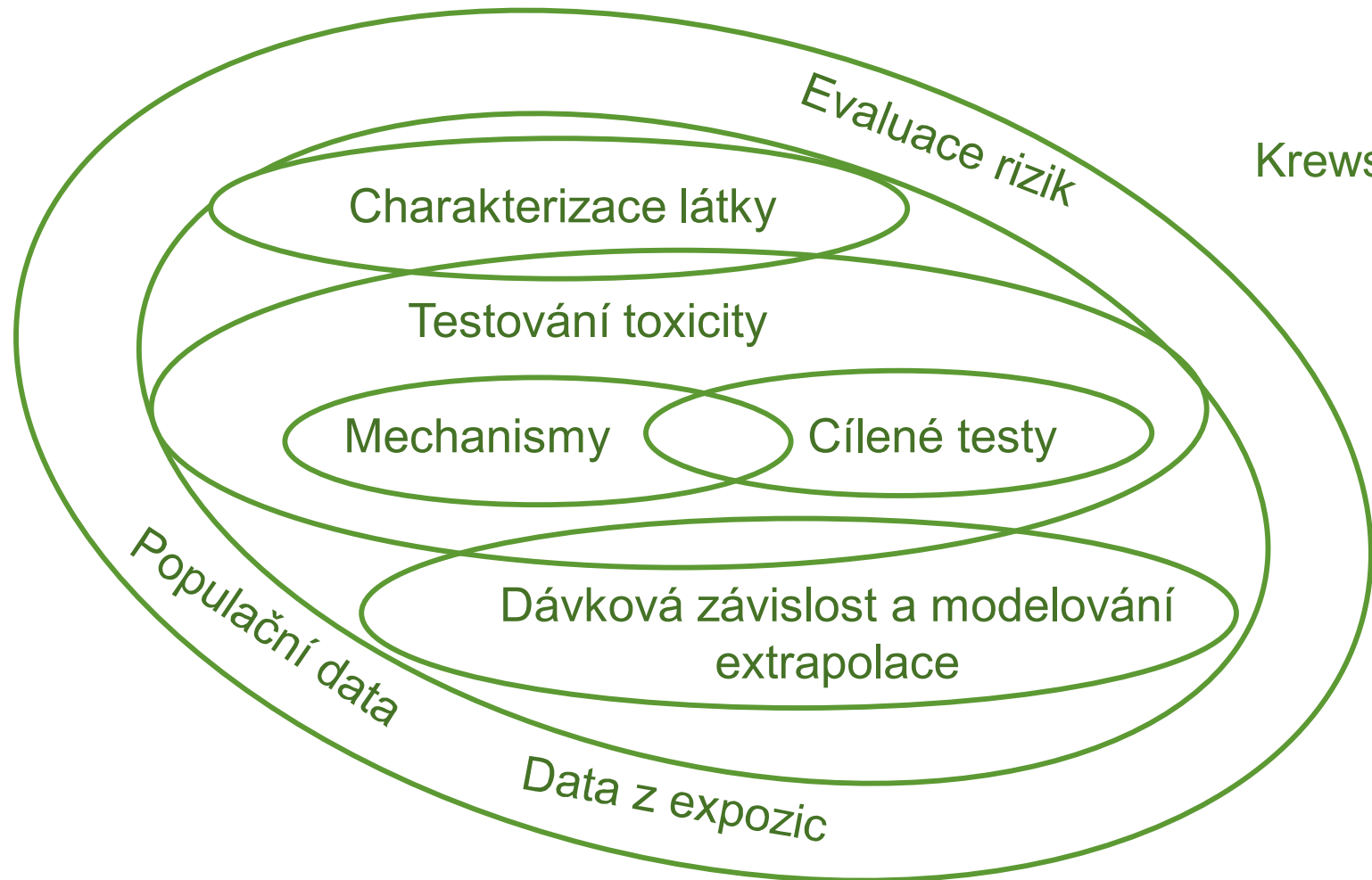
Zrození AOP konceptu a odpovídající metodologie

Původní schéma testování toxicity



- cíl – zajistit bezpečnost léčiv a životního prostředí

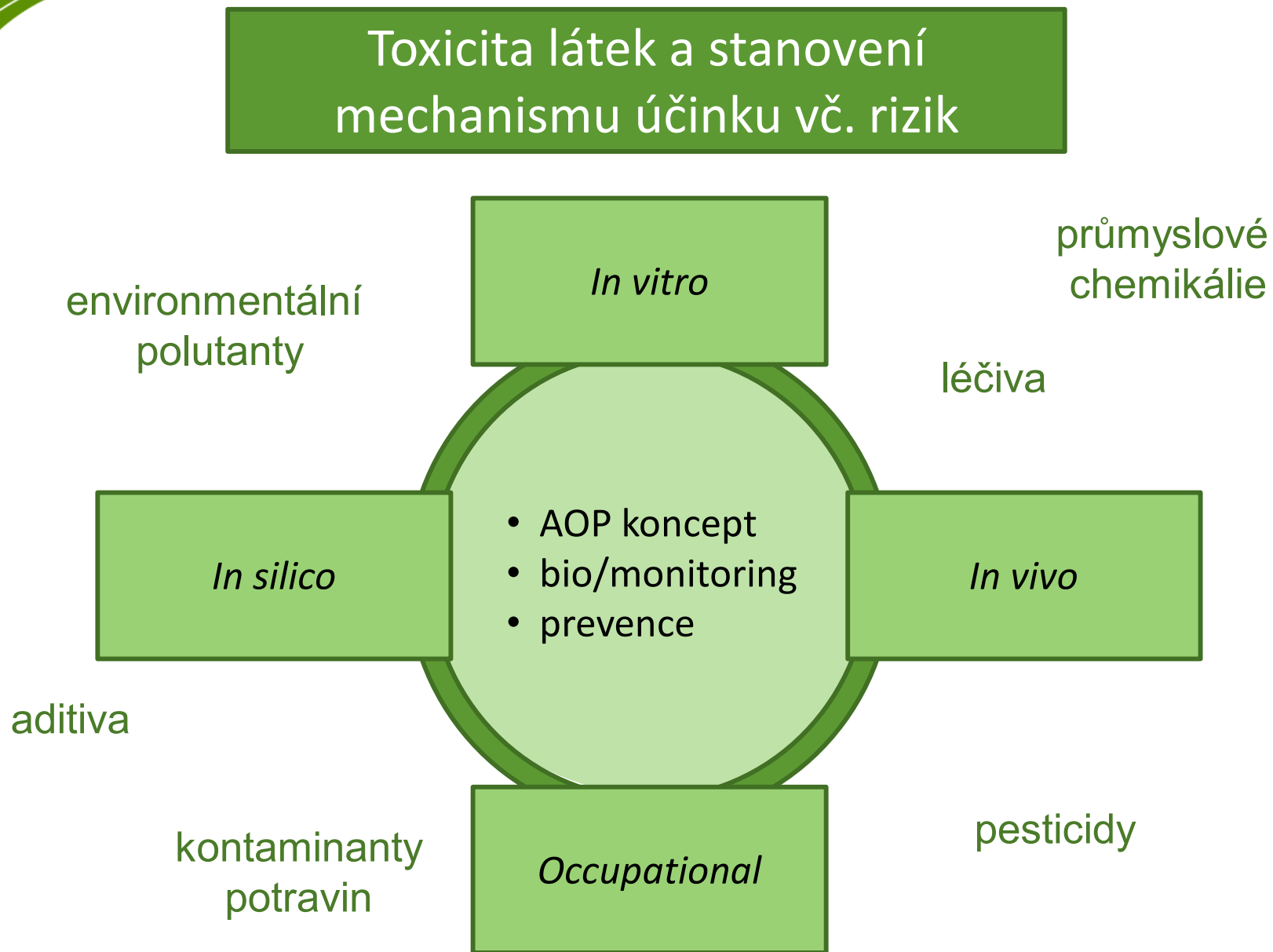
Testování toxicity ve 21. století



Krewski, 2010

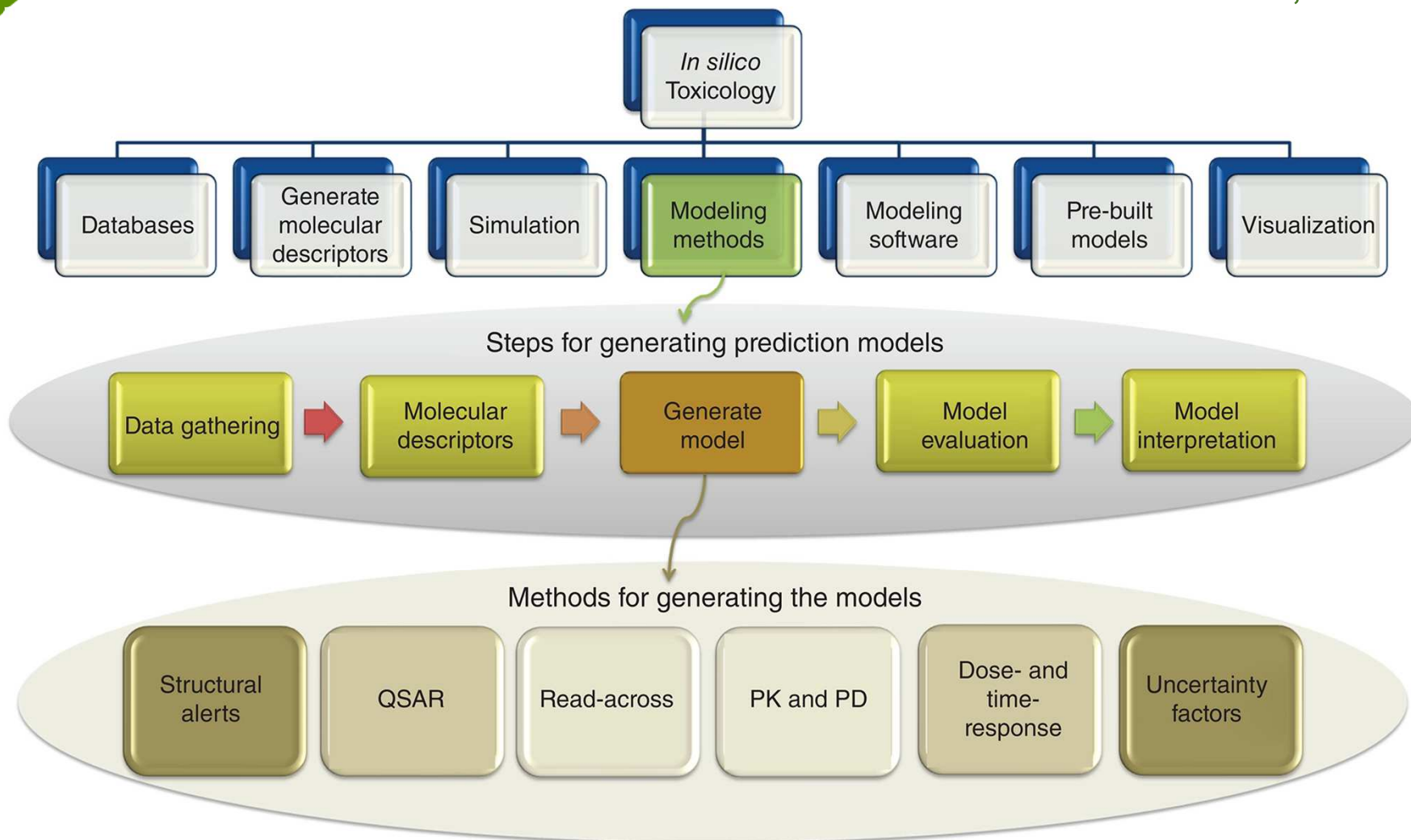
- cílem je přejít z testování terminální patologie ve zvířatech ke stanovení deregulace buněčných procesů v lidských modelech

Aspekty toxikologie pokryté Tox21 strategií



In silico toxikologie / machine learning

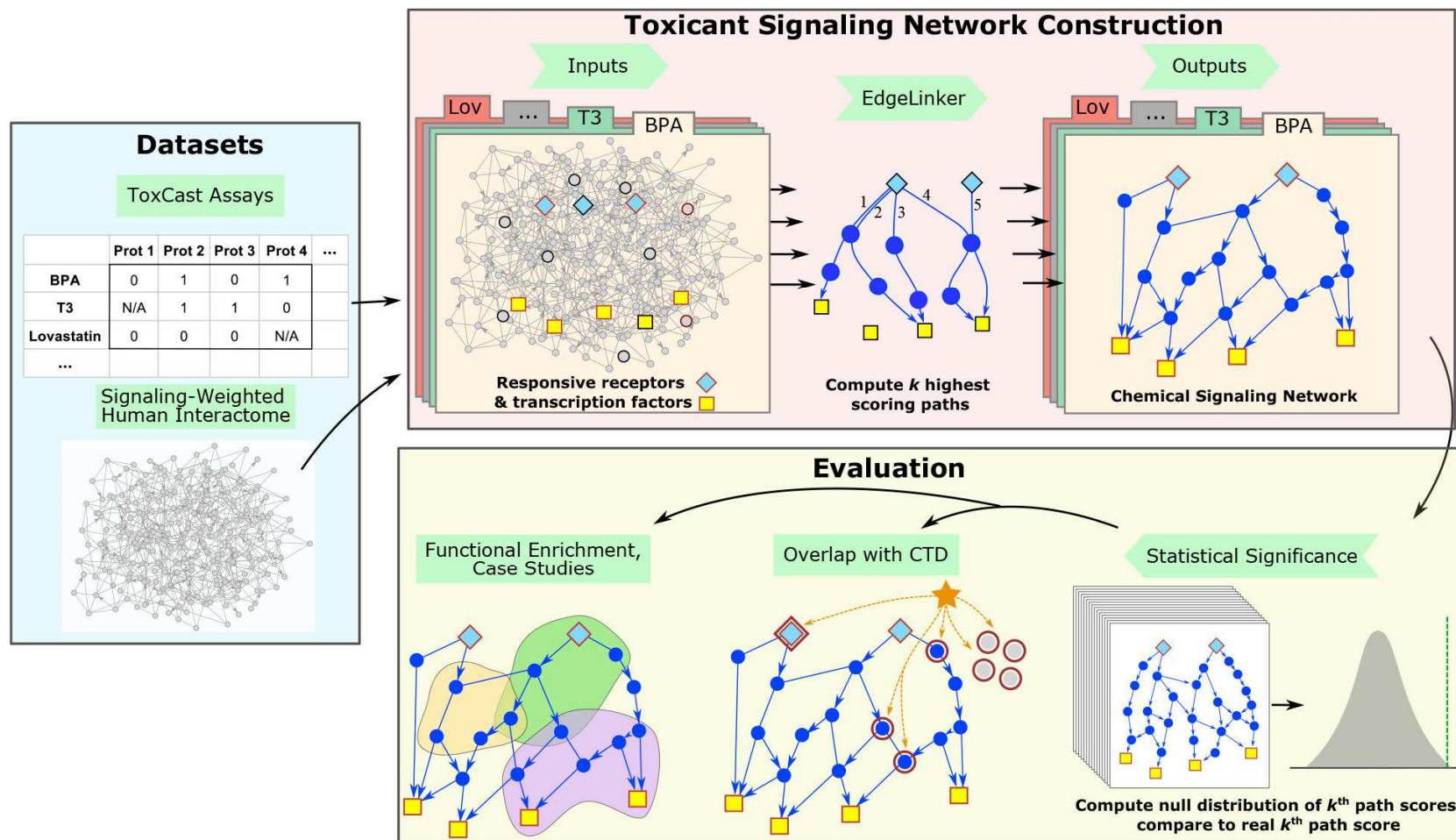
Raies, 2016



- predikce a modelování na základě struktury látky
- srovnávání s databázemi látek, kde je znám vztah struktura-toxicita

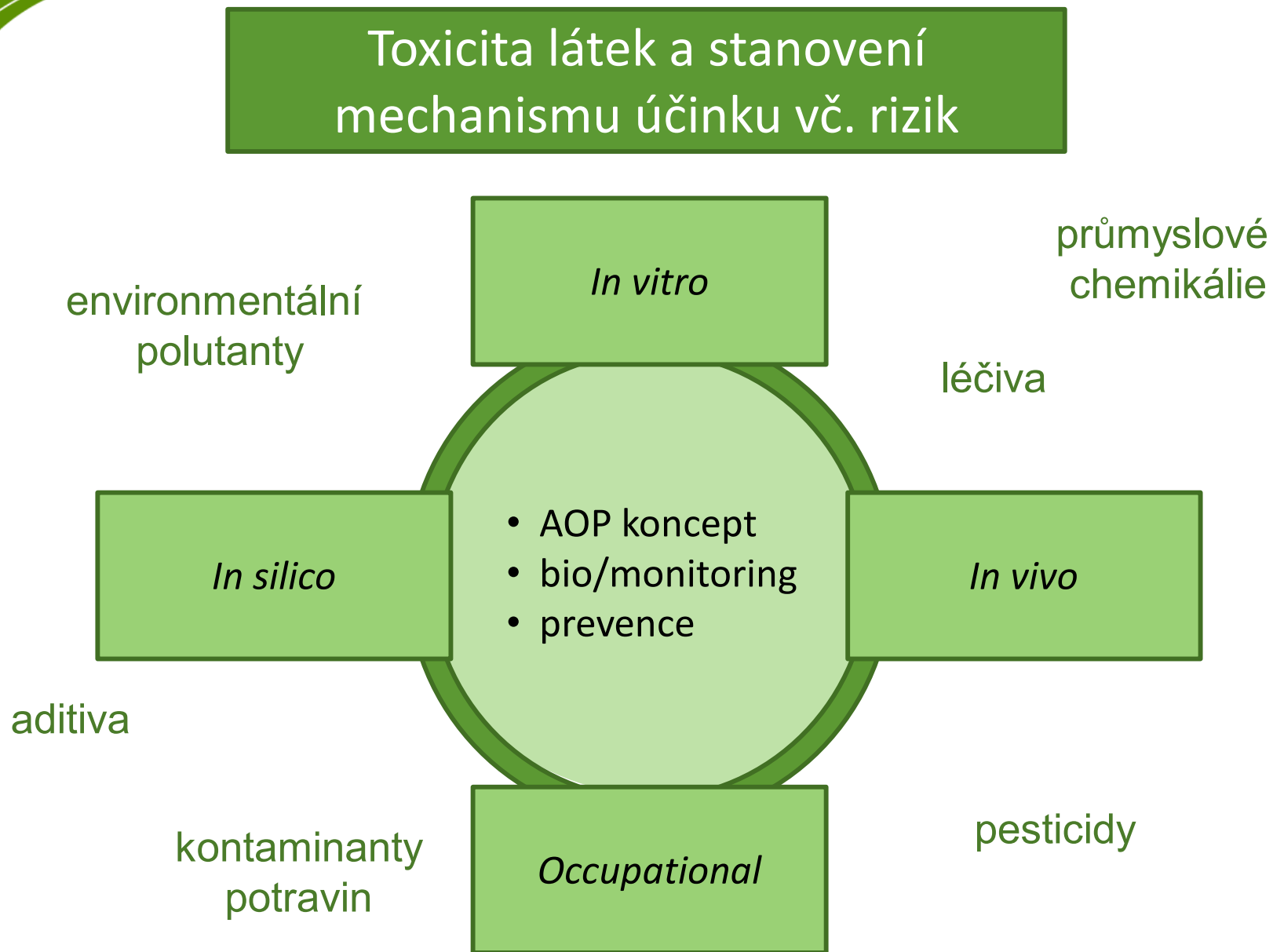
Komputační toxikologie – modelování drah

Law, 2023



- modelování signálních složek
- kombinace ToxCast a CTD (databáze interakcí „látka-gen“) dat s databází lidského interaktomu

Aspekty toxikologie pokryté Tox21 strategií



In vivo

vs.

In vitro

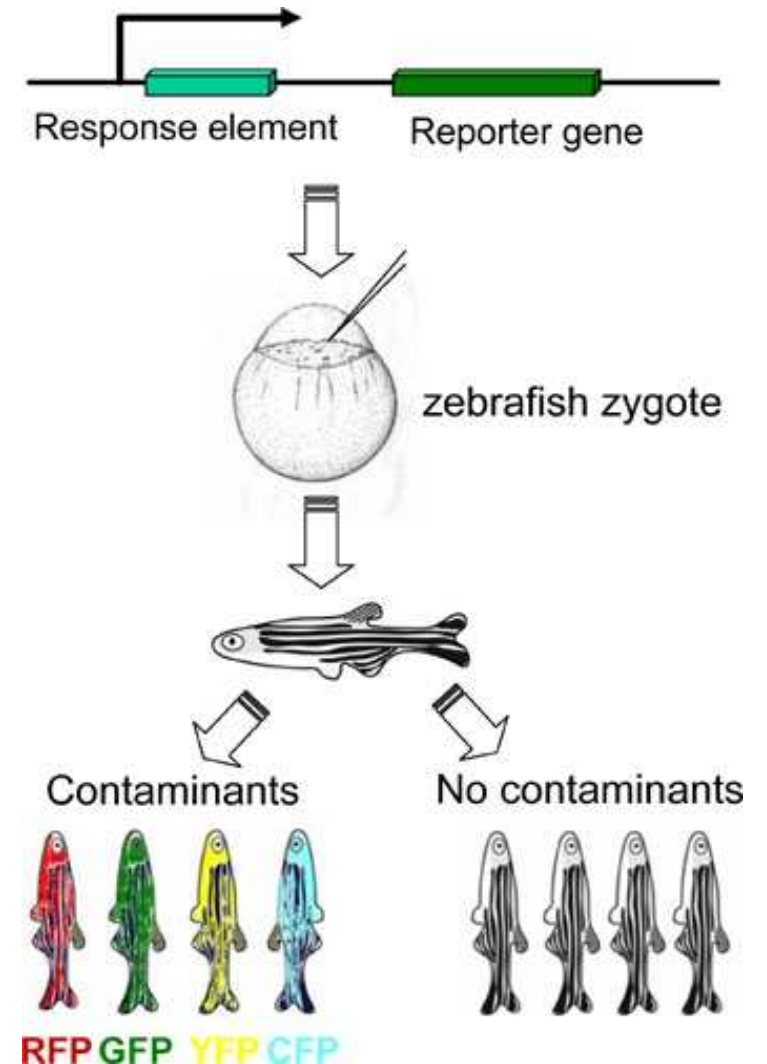
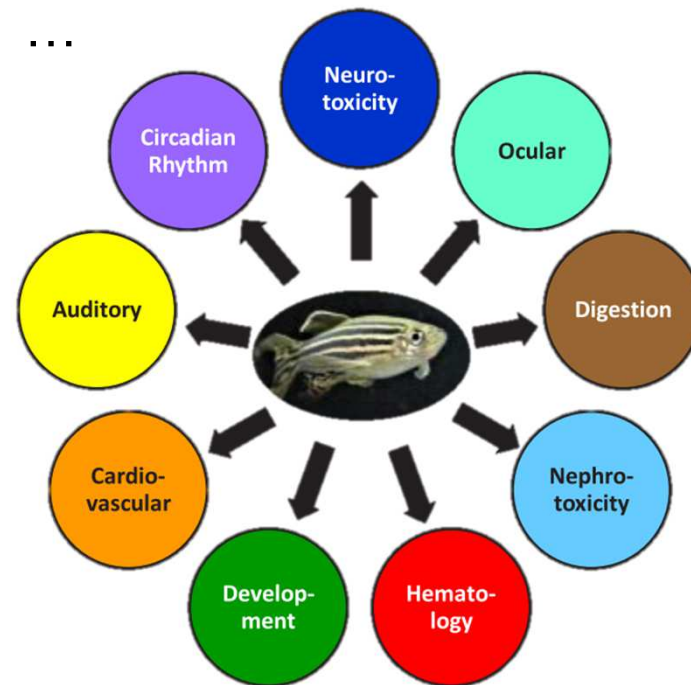
- komplexní tkáňové prostředí organismu
 - úroveň metabolismu odpovídá reálné situaci
 - efektivní určení poměru dávka vs. efekt
 - testování směsí na orgánové a organismální úrovni
 - speciální požadavky a zázemí pro chov
 - dedikovaný personál
 - časová a finanční náročnost
 - otázka etiky
- možnosti qHTS provedení
 - odhalení nových látek
 - snaha nahradit *in vivo* testy *in vitro* testováním
 - snazší reproducibilita
 - cena
 - přístrojové zázemí
 - chybí orgánový a komplexní kontext

In vivo toxikologie

př. zebrafish

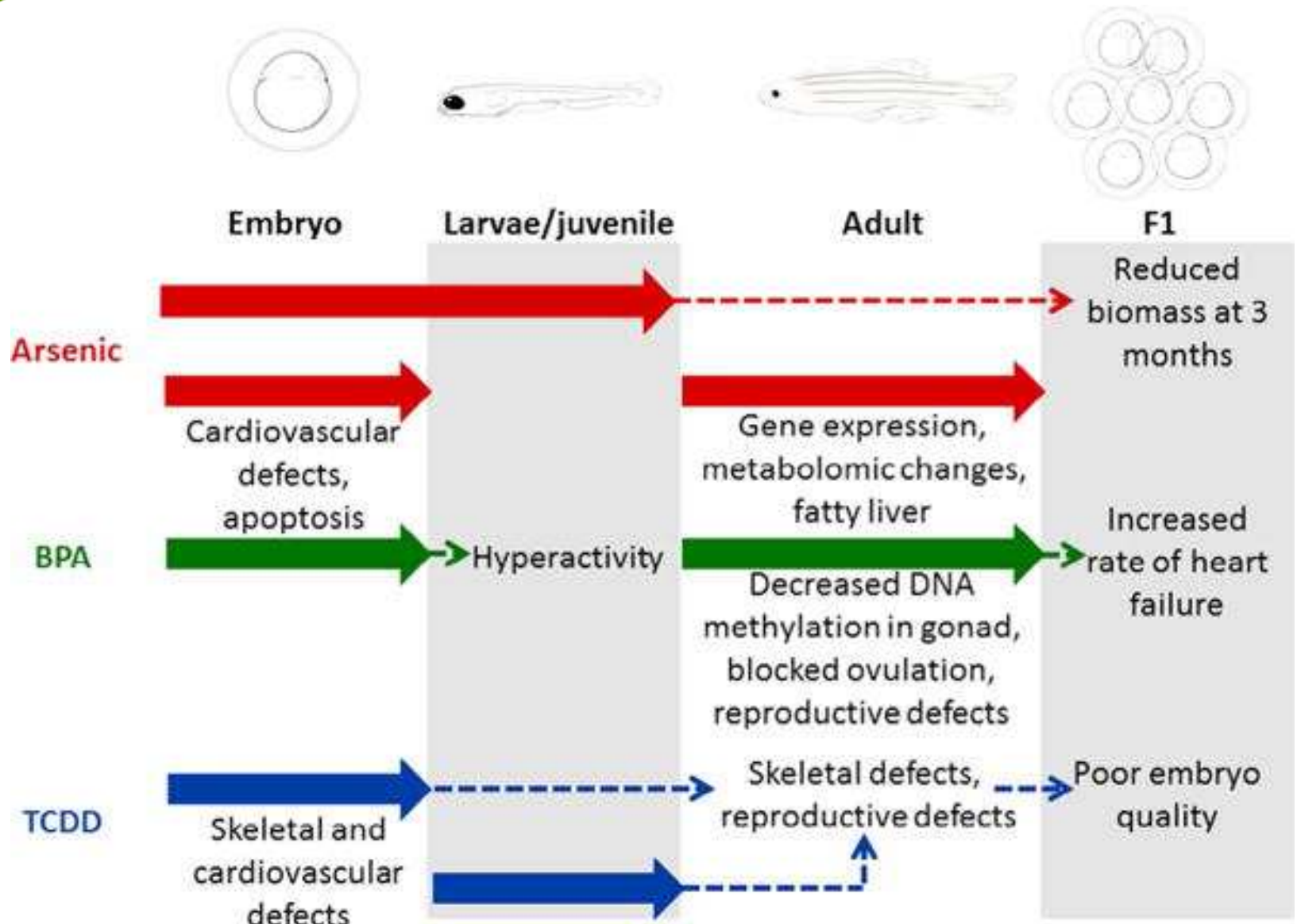
výhody Zebrafish modelu

- monitoring přítomnosti toxických látek
- odhalení mechanismu účinku
- testování vlivu urč. genu či signální dráhy na toxicitu vyvolanou testovanou látkou
- tkáňové prostředí
- ...



Dai, 2013

Cassar, 2020



In vivo toxikologie

př. zebrafish

př. testovaných parametrů

- FET - fish embryo acute toxicity test

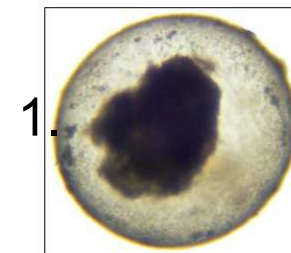


Table 1. Apical observations of acute toxicity in zebrafish embryos 24 - 96 hrs post fertilisation.

	Exposure times			
	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs
1. Coagulated embryos	+	+	+	+
2. Lack of somite formation	+	+	+	+
3. Non-detachment of the tail	+	+	+	+
4. Lack of heartbeat		+	+	+

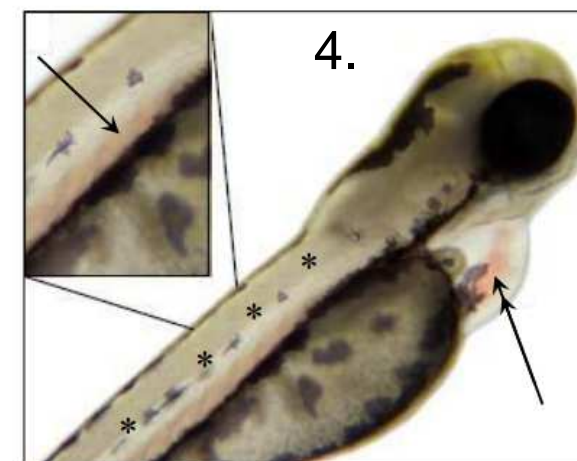
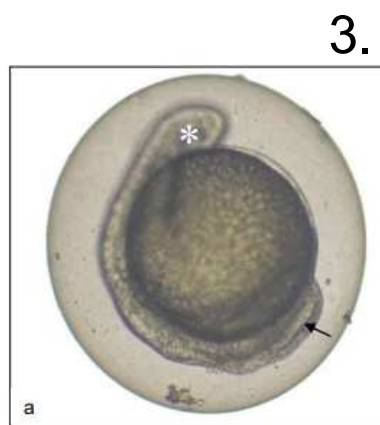
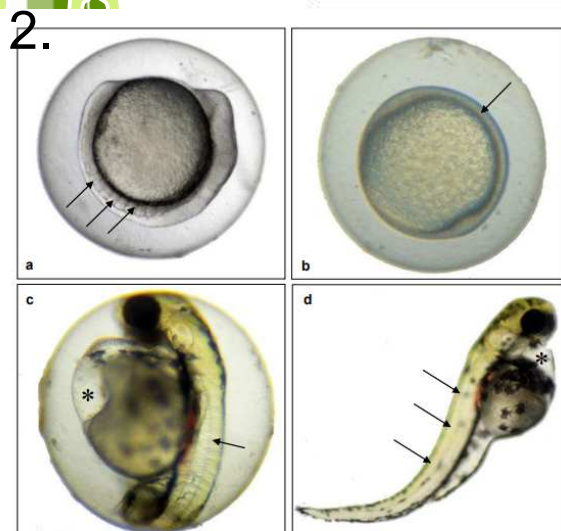
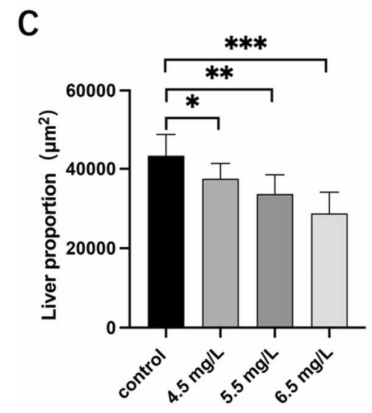
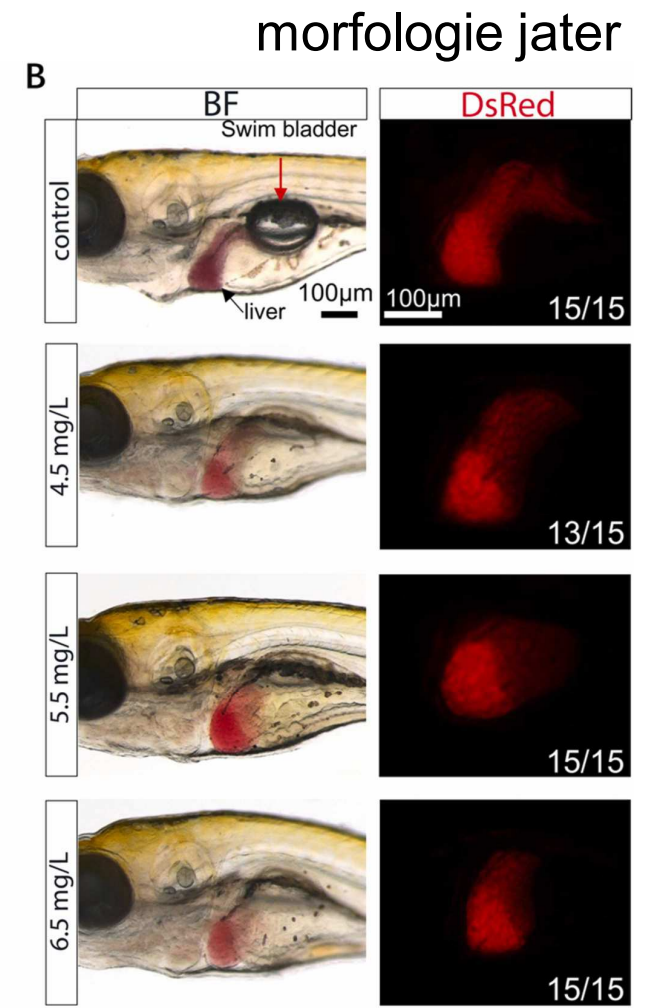
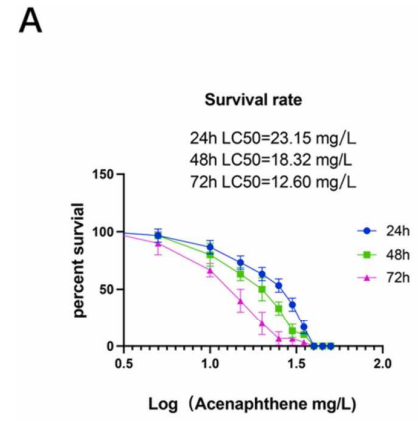
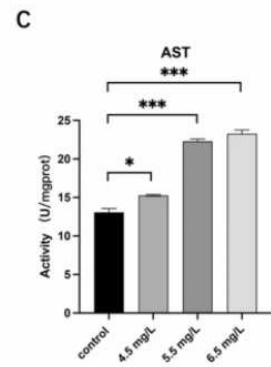
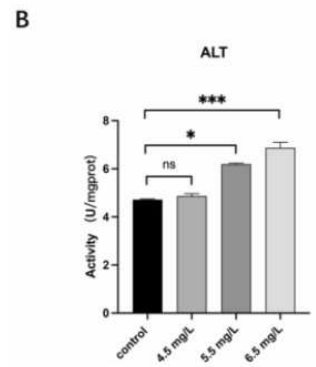
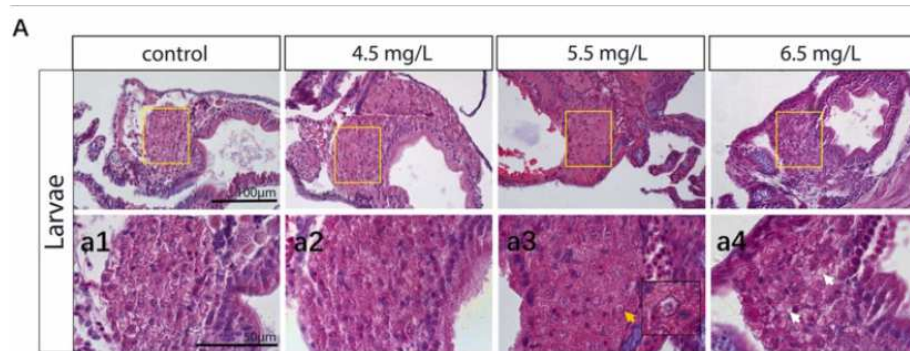


Fig. 2: **Lack of somite formation:** Although retarded in development by approx. 10 hrs, the 24 hrs old zebrafish embryo in (a) shows well-developed somites (→), whereas the embryo in (b) does not show any sign of somite formation (→). Although showing a pronounced yolk sac oedema (*), the 48 hrs old zebrafish embryo in (c) shows distinct formation of somites (→), whereas the 96 hrs old zebrafish embryo depicted in (d) does not show any sign of somite formation (→). Note also the spinal curvature (scoliosis) and the pericardial oedema (*) in the embryo shown in (d).

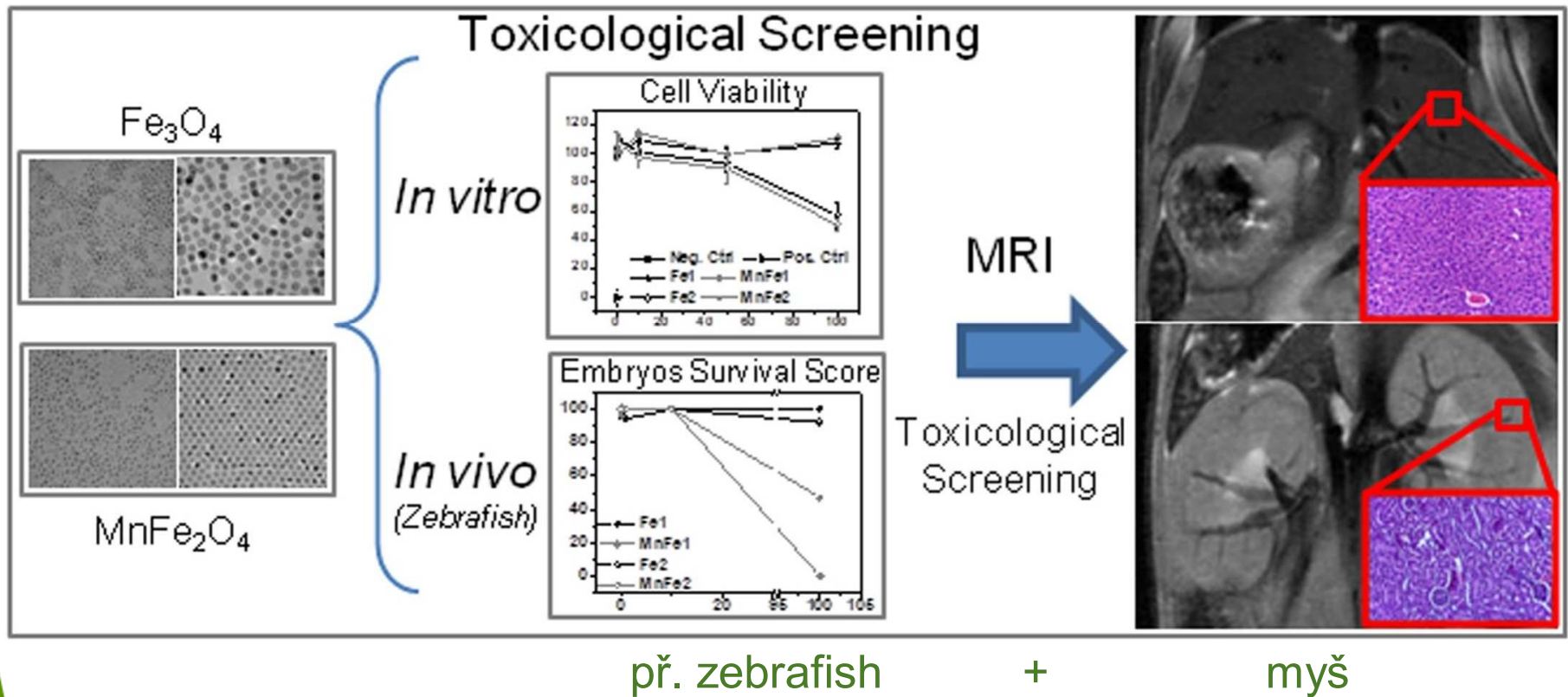
př. testovaných parametrů
- hepatotoxicita acenaftenu

aktivita jaterních enzymů



In vivo toxikologie

př. kombinace propojení in vivo modelů v testování toxicity částic kovu



In vivo toxikologie – příklad postupu

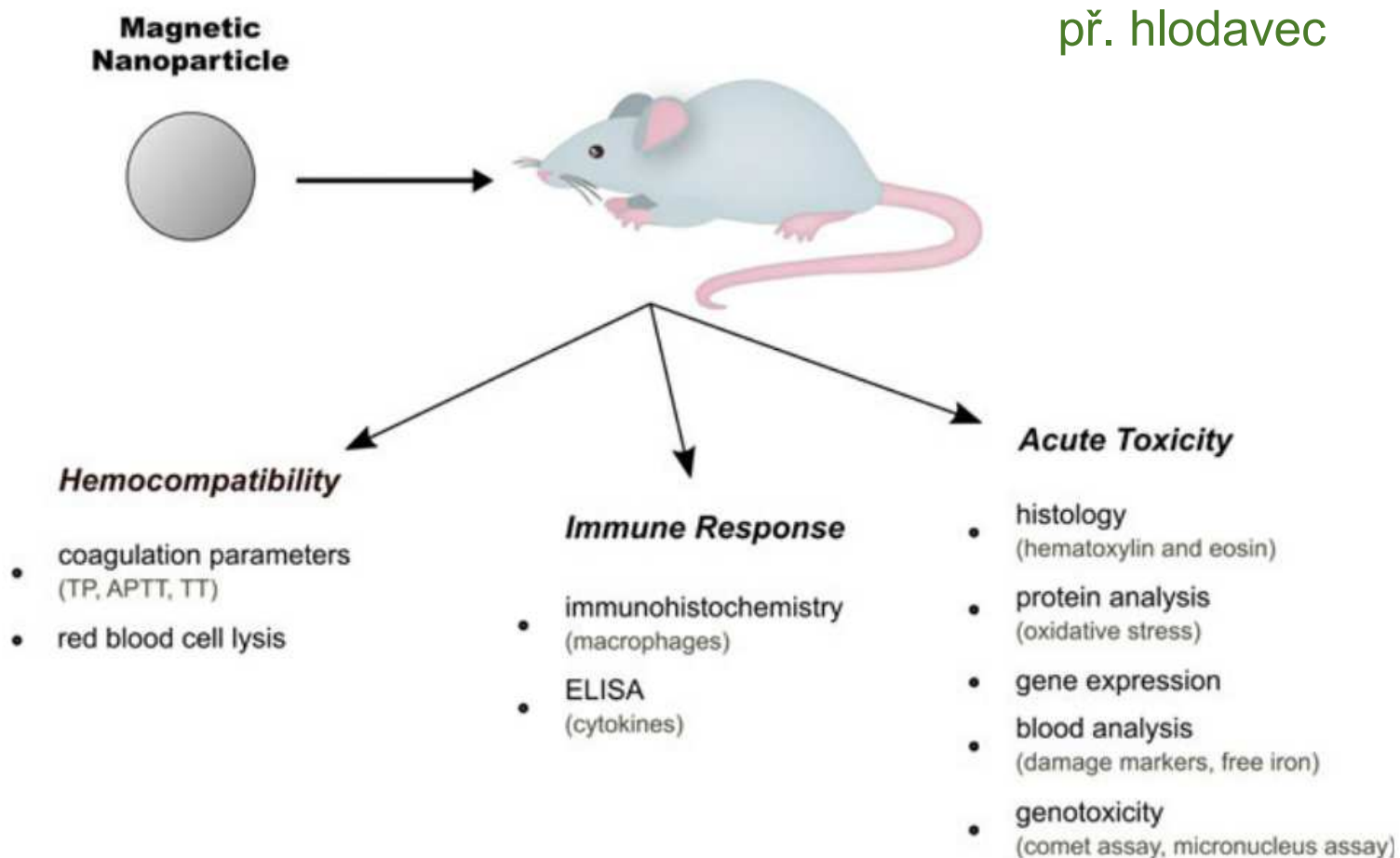
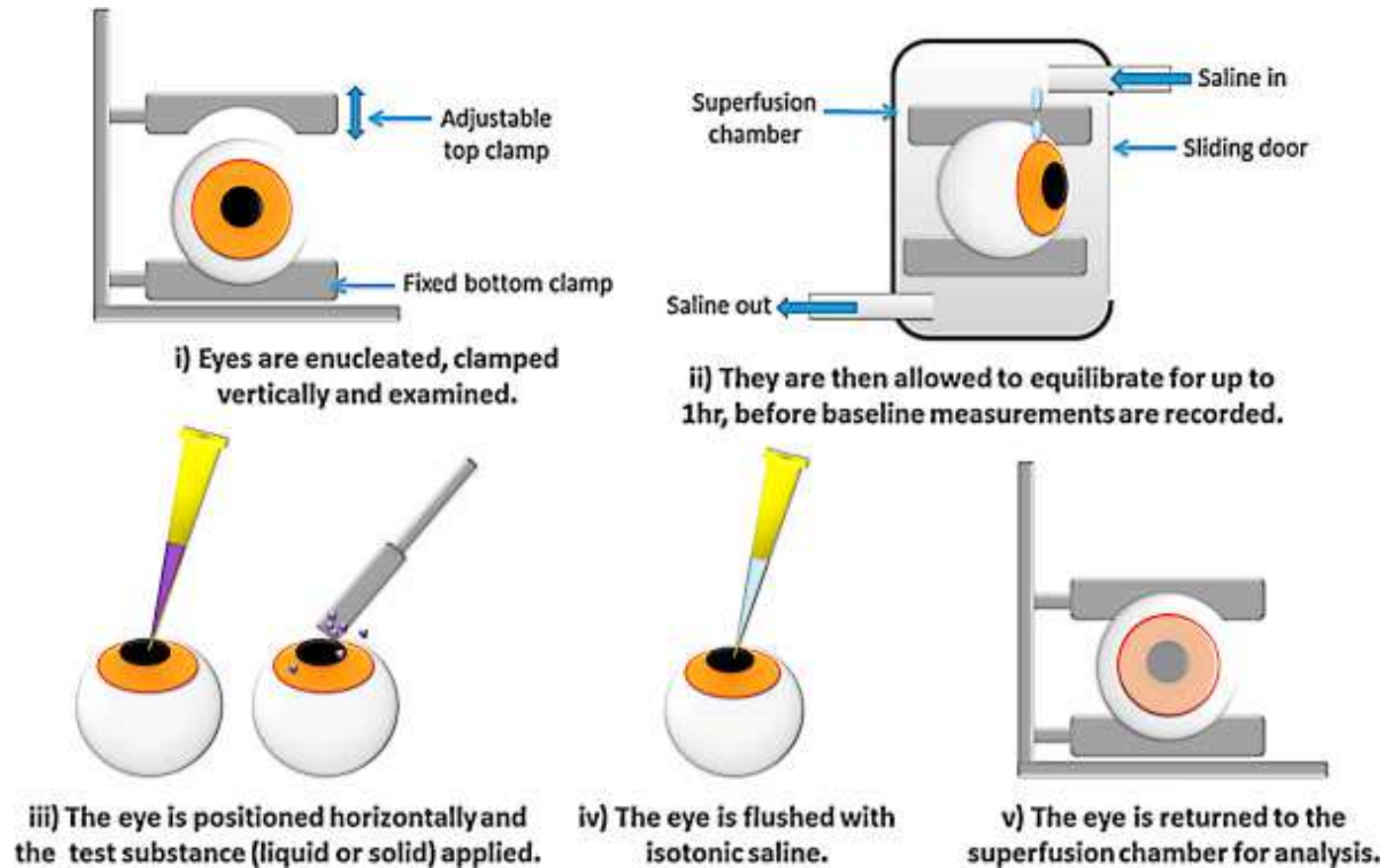


Fig. 5 Frequent assays and parameters evaluated when in vivo toxicity studies of nanoparticles are performed

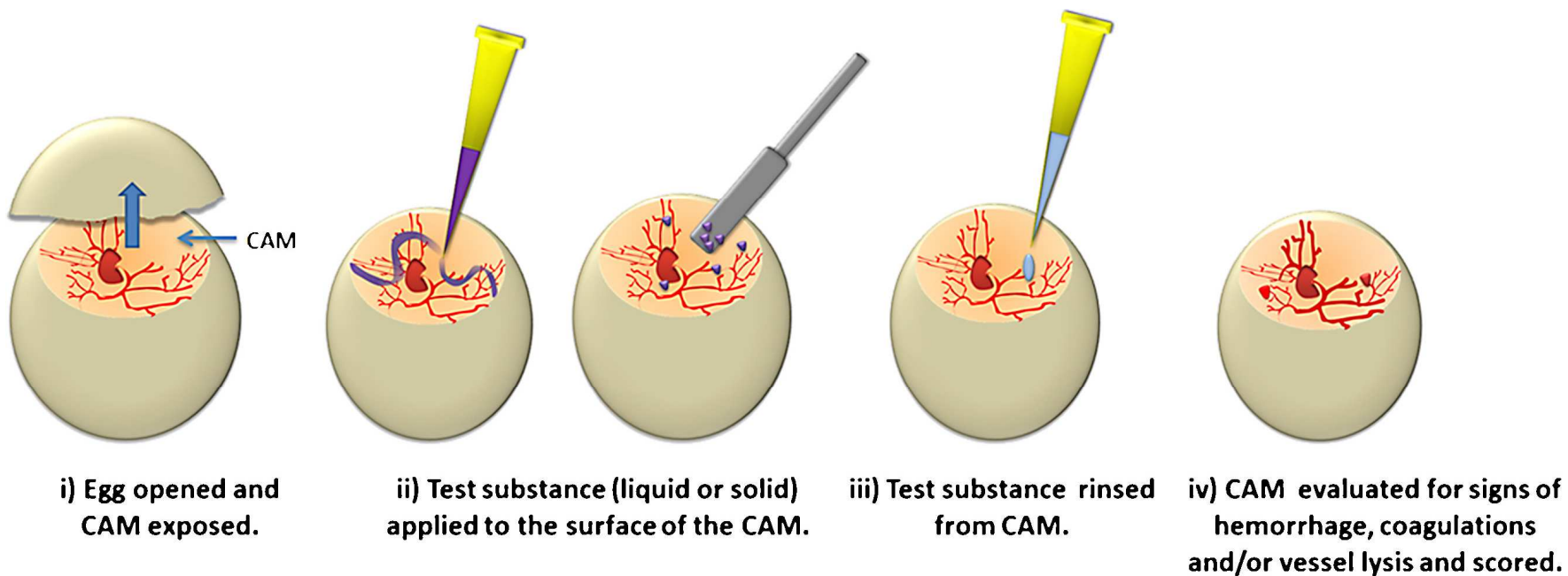
In vivo toxikologie – ex vivo modely



př. kuře, králík, prasečí či hovězí rohovky

In vivo toxikologie – *In ovo* model

CAM - Chorioallantoic Membrane

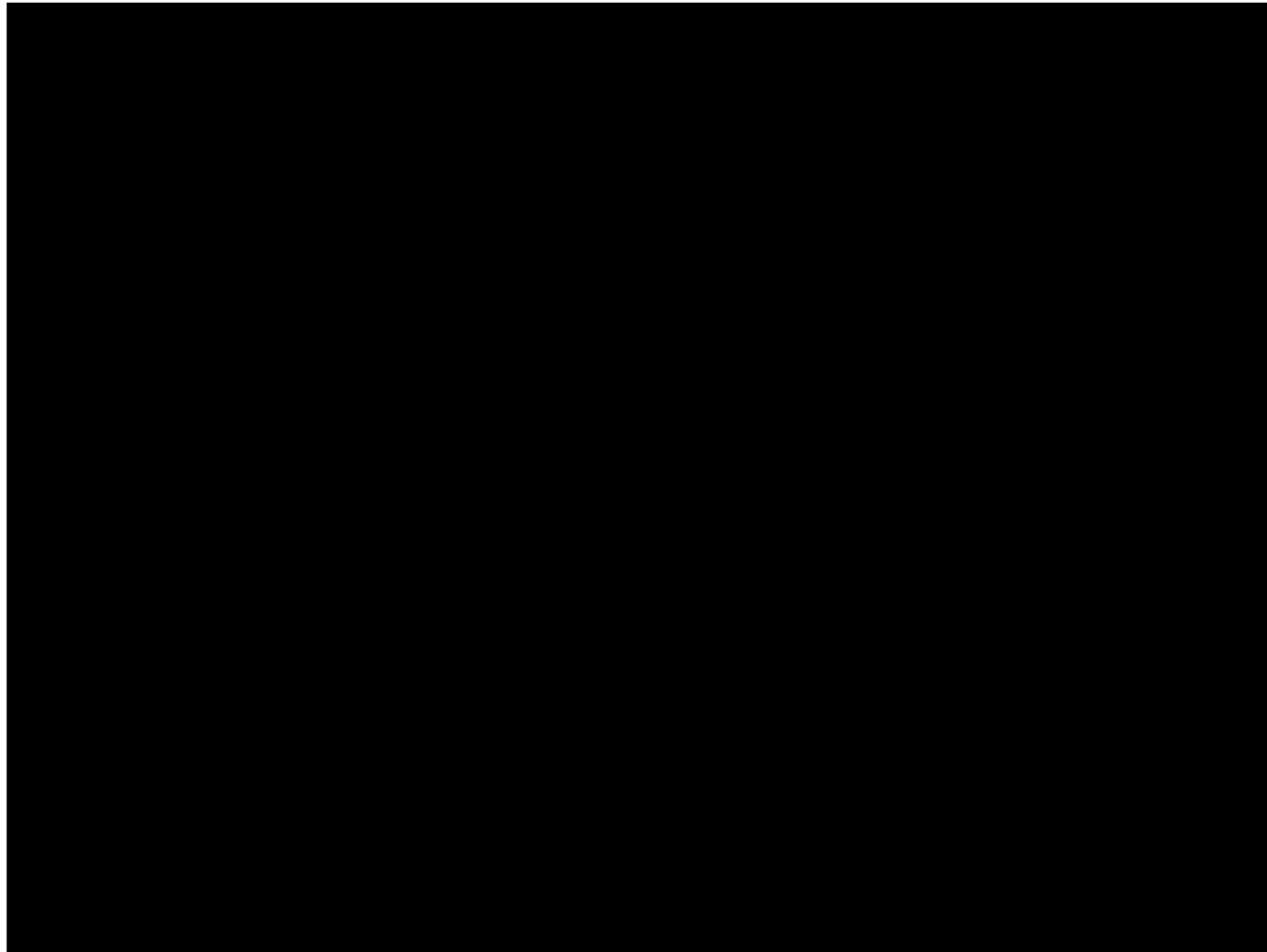


př. kuřecí vejce

Li, 2015
Wilson, 2015

In vivo toxikologie – *In ovo* model

CAM - Chorioallantoic Membrane (to 3:58 min)

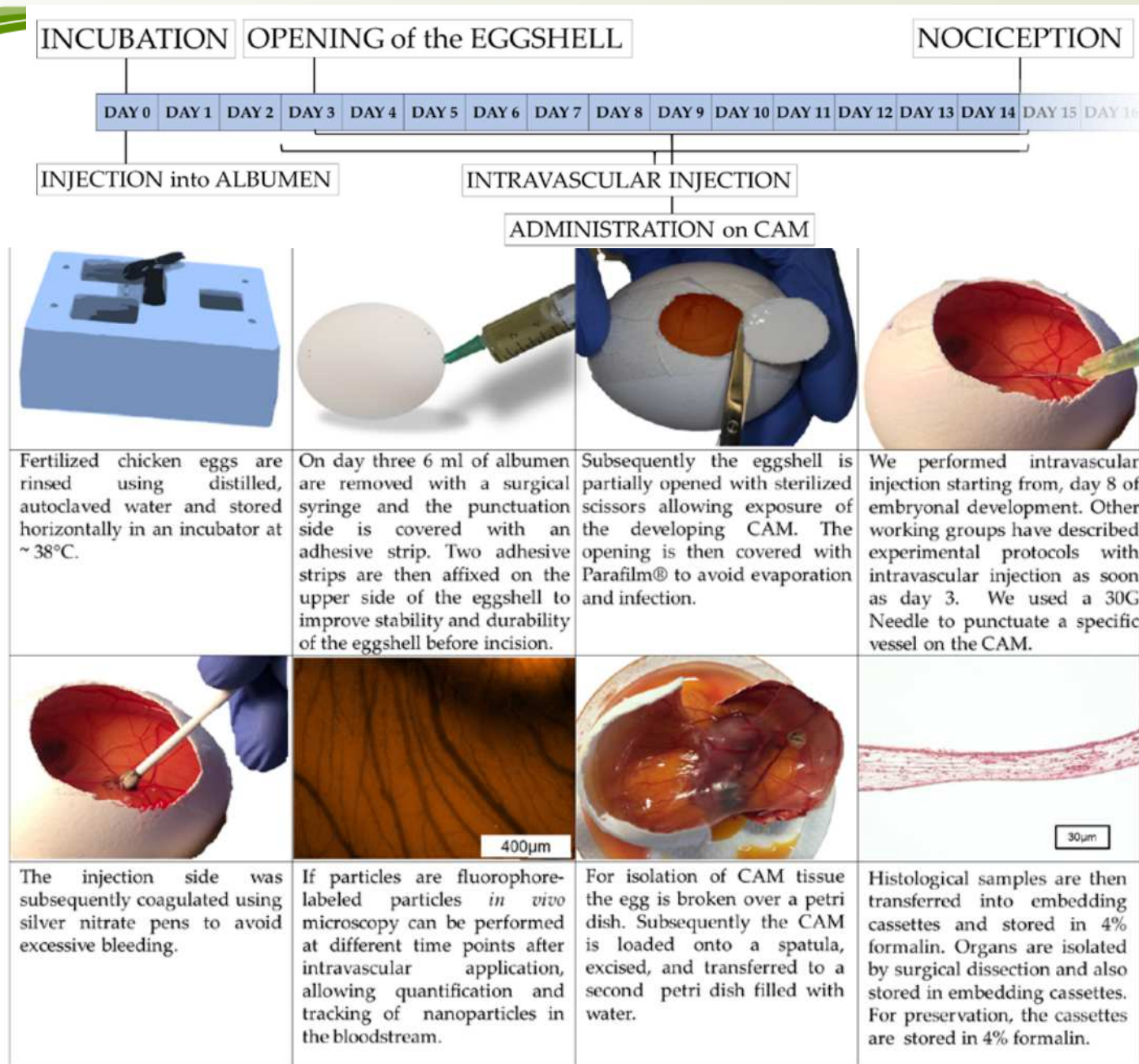


př. kuřecí vejce

Li, 2015

Wilson, 2015

In ovo model v nanotoxikologii



Fyziologie působení farmak a toxických látek



Rat

- Widely used for drugs and chemicals
- Large amount of historical control data
- Mid-sized rodent
- Larger group size vs rabbit or NHP



Mouse

- Often used for non-clinical immunology
- Large amount of historical control data
- Larger group size vs rabbit or NHP



Rabbit

- Large non rodent
- Sufficient blood sampling volume
- Full intramuscular injection volume^{2,3}
- All (or most) endpoints can be measured in each animal
- Human-animal body wt ratio lower than rodent



Monkey

- Limited intramuscular injection volume^{2,3}
- Limited blood sampling, may necessitate satellite groups for additional sampling
- Small rodent

Pros

Cons

- Limited intramuscular injection volume^{2,3}
- Limited blood sampling, may necessitate satellite groups for additional sampling/ measurement
- Human-animal body wt ratio higher than rabbit

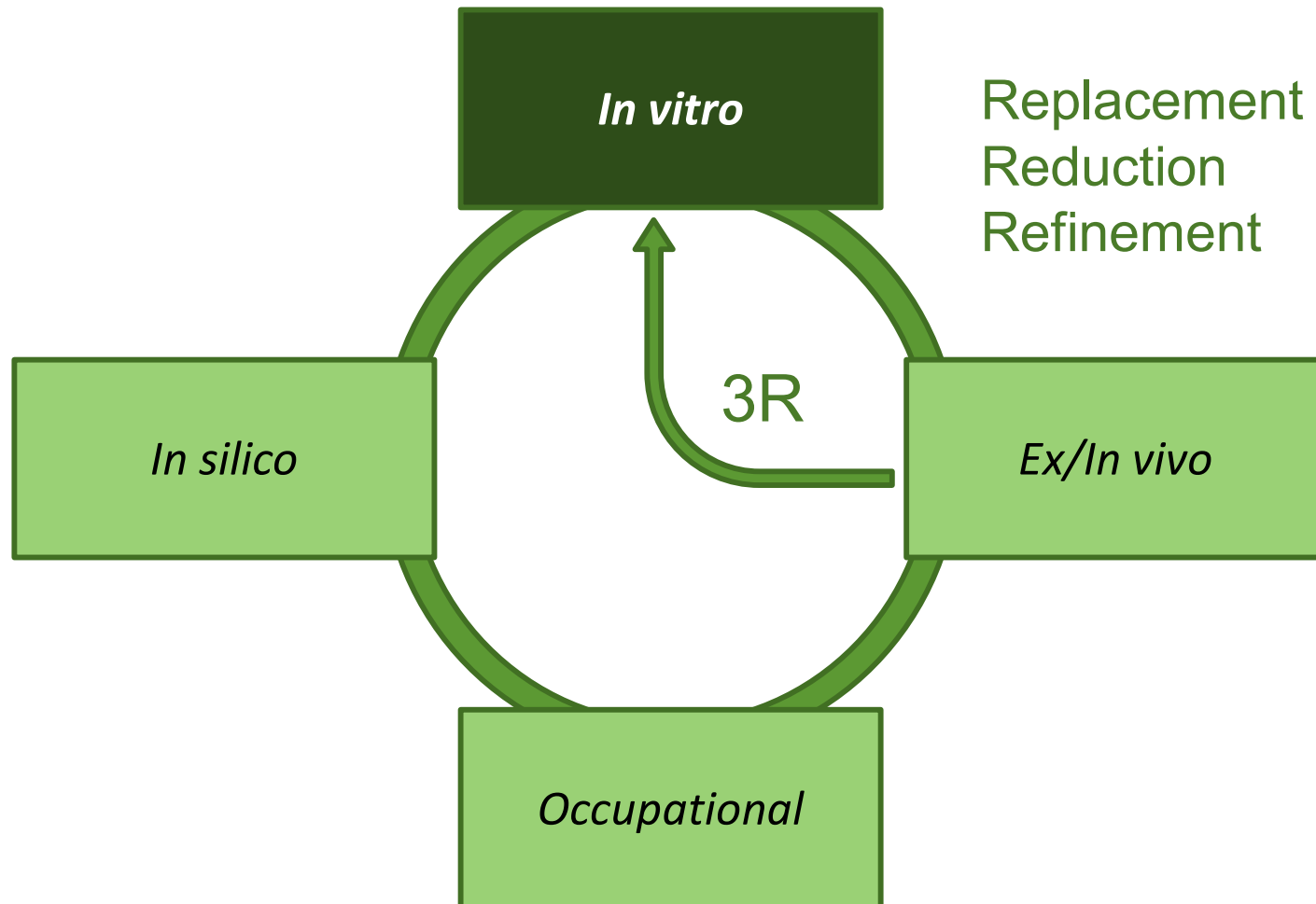
- Limited intramuscular injection volume^{2,3}
- Limited blood sampling, may necessitate satellite groups for additional sampling
- Small rodent
- May not be possible to measure all endpoints in each animal
- Human-animal body wt ratio higher than rabbit

- Delicate husbandry
- Limited historical control data for some study types
- No urinalysis or CV
- Smaller group size vs rodents

- Limited numbers, small group size vs rodents or rabbits
- Expensive
- Ethical issues

Osnova

Moderní metody v toxikologii



Moderní *in vitro* metody v toxikologii

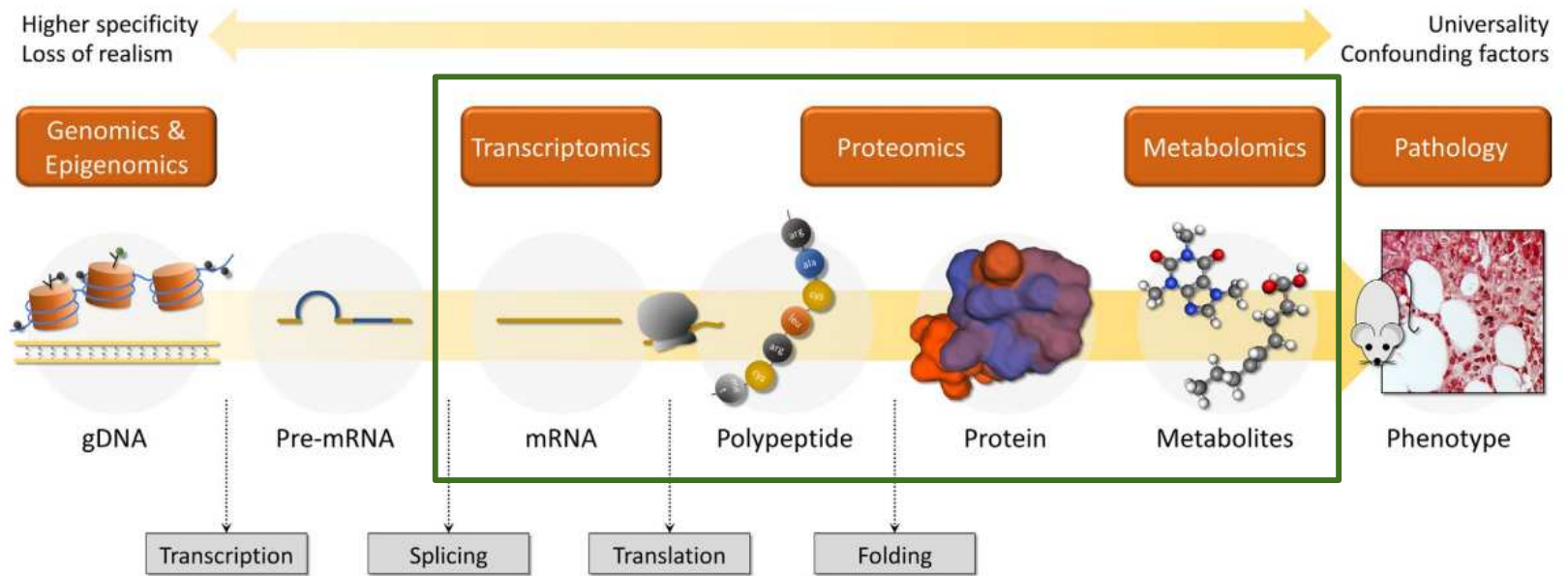


Fig. 1 A simple overview of gene expression in eukaryotes and its relation with omics methods and their analytical targets. Not all mechanisms intervening in the regulation of gene expression are represented (such as interference RNAs), as well as post-translational modifications (like phosphorylation and glycosylation) and eventual degradation of proteins by proteases and the proteasome. However, all these factors have important consequences for omics measurements.

Osnova

Moderní *in vitro* metody v toxikologii

1. Genomika
2. Transkriptomika př. RNAseq, GROseq, ATACseq
3. Proteomika př. Hmotnostní spektrometrie (MS)
4. Metabolomika př. HPLC-MS/MS
5. Kvantitativní vysokokapacitní analýzy qHTS assays

Osnova

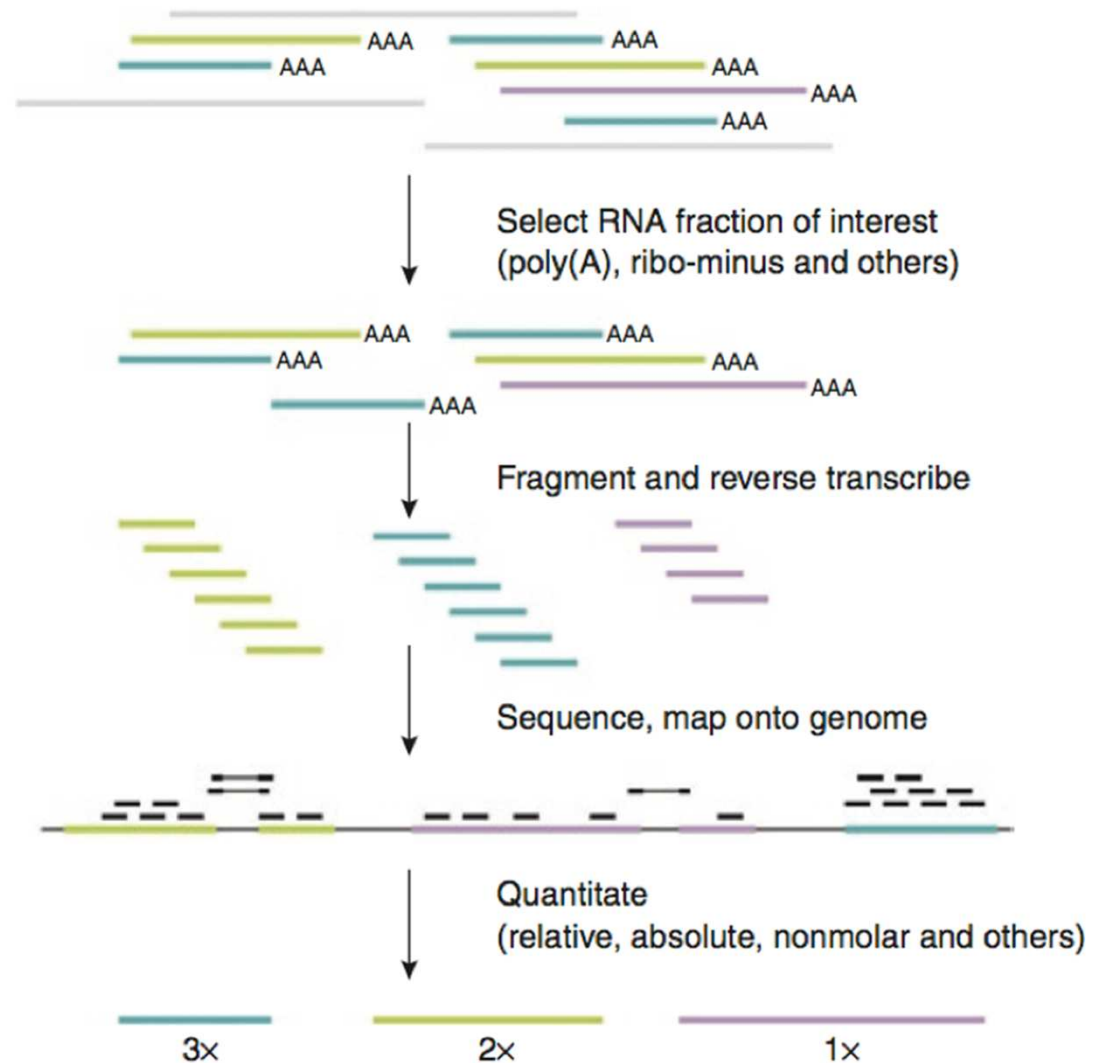
Moderní *in vitro* metody v toxikologii

1. Genomika
2. Transkriptomika př. RNAseq, GROseq, ATACseq
3. Proteomika
4. Metabolomika
5. Kvantitativní vysokokapacitní analýzy

Transkriptomika

RNAseq

- globální analýza
transkriptomu

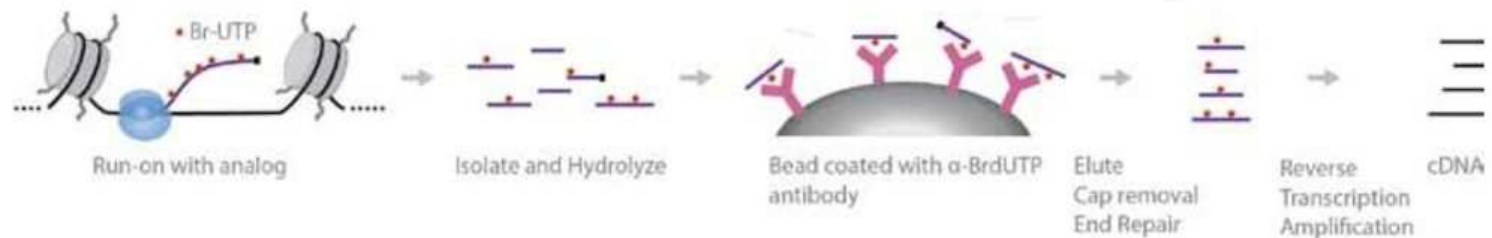


Transkriptomika

GRO-seq

- globální analýza aktivní transkripce

GLOBAL RUN-ON SEQUENCING (GRO-SEQ)

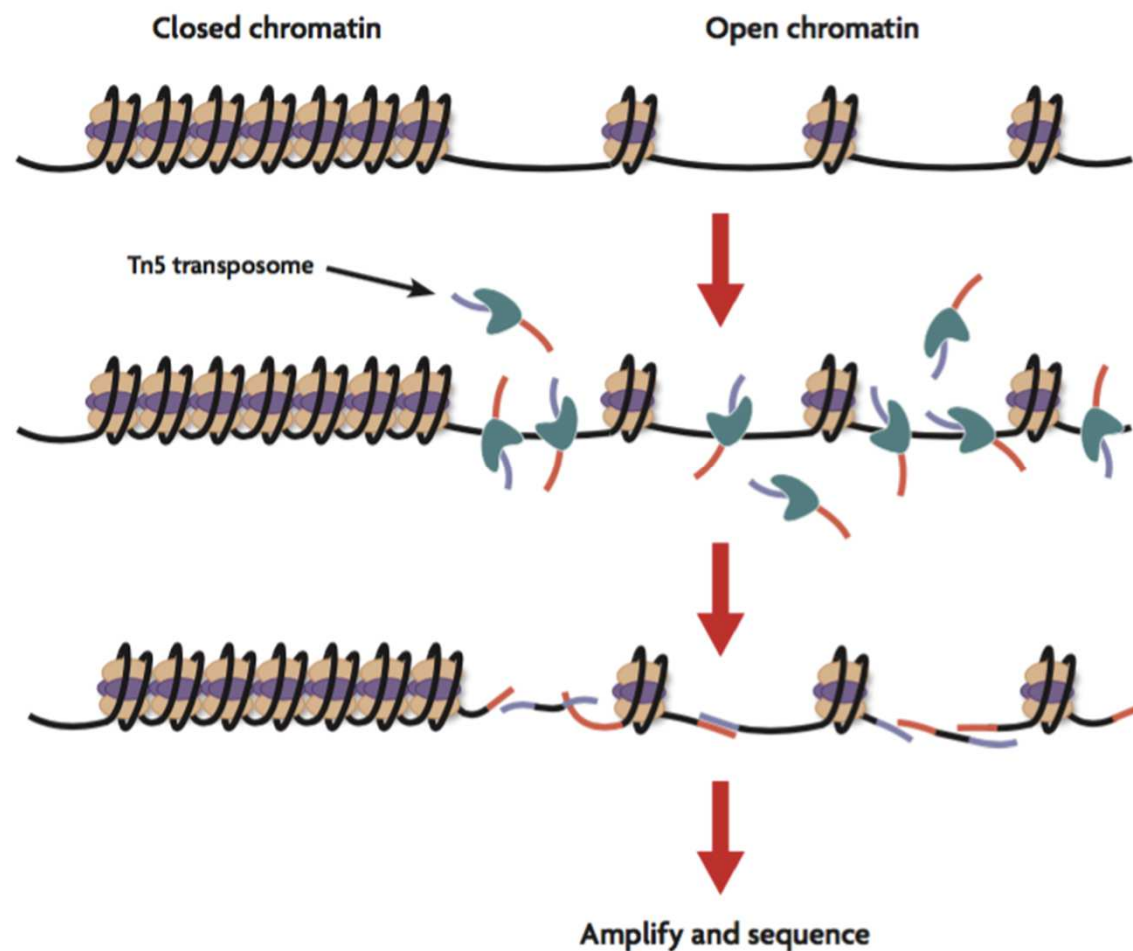


- Active RNA Polymerase is allowed to run on in the presence of Br-UTP.
- RNAs are hydrolyzed and purified using beads coated with Brd-UTP antibody.
- The eluted RNA undergoes cap removal and end repair prior to reverse transcription to cDNA.
- cDNA is sequenced.

Transkriptomika

ATAC-seq

- globální analýza přístupnosti chromatinu



Transkriptomika

- kombinací těchto metod lze získat informaci o změně profilu genové transkripce indukované testovanou látkou
- následné analýzy pomocí „free“ či placených nástrojů mohou naznačit biologický proces, dráhu či signalizační spouštěč (př. GSEA, IPA)
- identifikace genových podpisů spec. pro urč. skupinu látek
- nominace cílových genů pro vytvoření reportérového systému
- výhody – globální měřítko, rychlá a relativně nenáročná příprava vzorku
- nevýhody – cena, nutnost bioinformatického zázemí pro následné zpracování dat a s tím se pojící nutnost výpočetní kapacity
- nutnost verifikace dat dalšími metodami – RT-qPCR, WB atp.

Osnova

Moderní *in vitro* metody v toxikologii

1. Genomika
2. Transkriptomika
3. Proteomika př. Hmotnostní spektrometrie (MS)
4. Metabolomika
5. Kvantitativní vysokokapacitní analýzy

Proteomika

„Top-Down“ proteomika

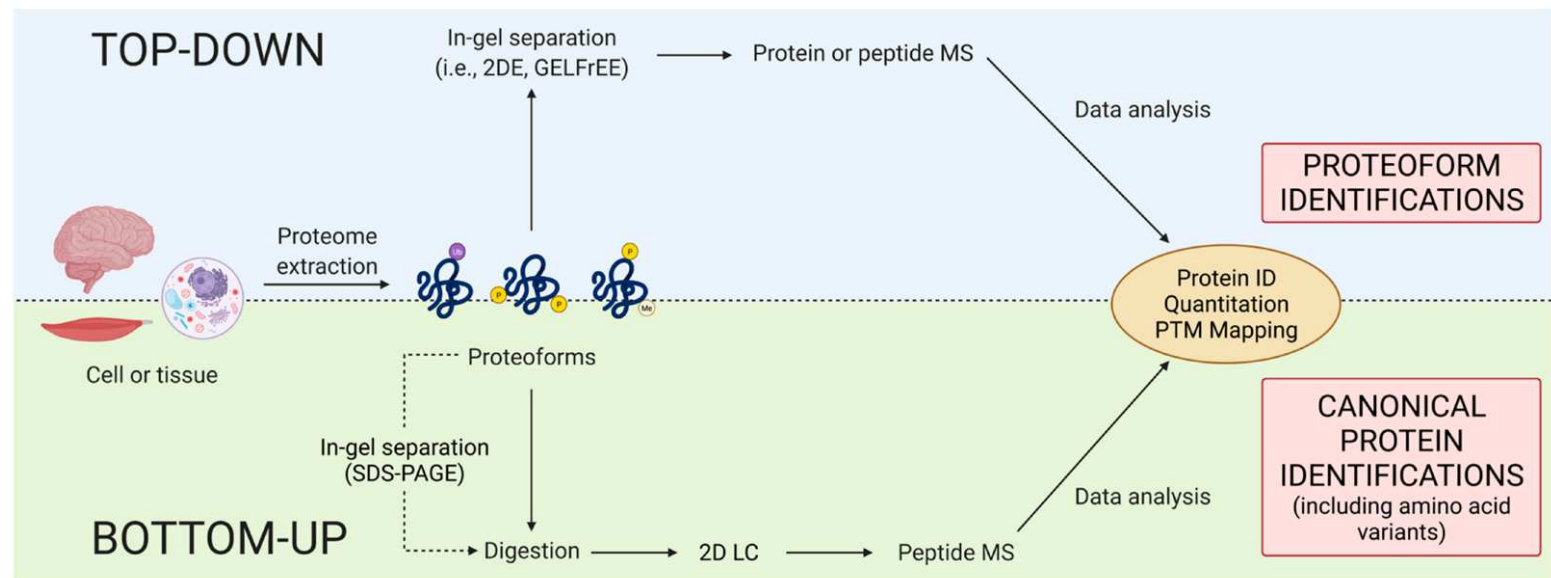
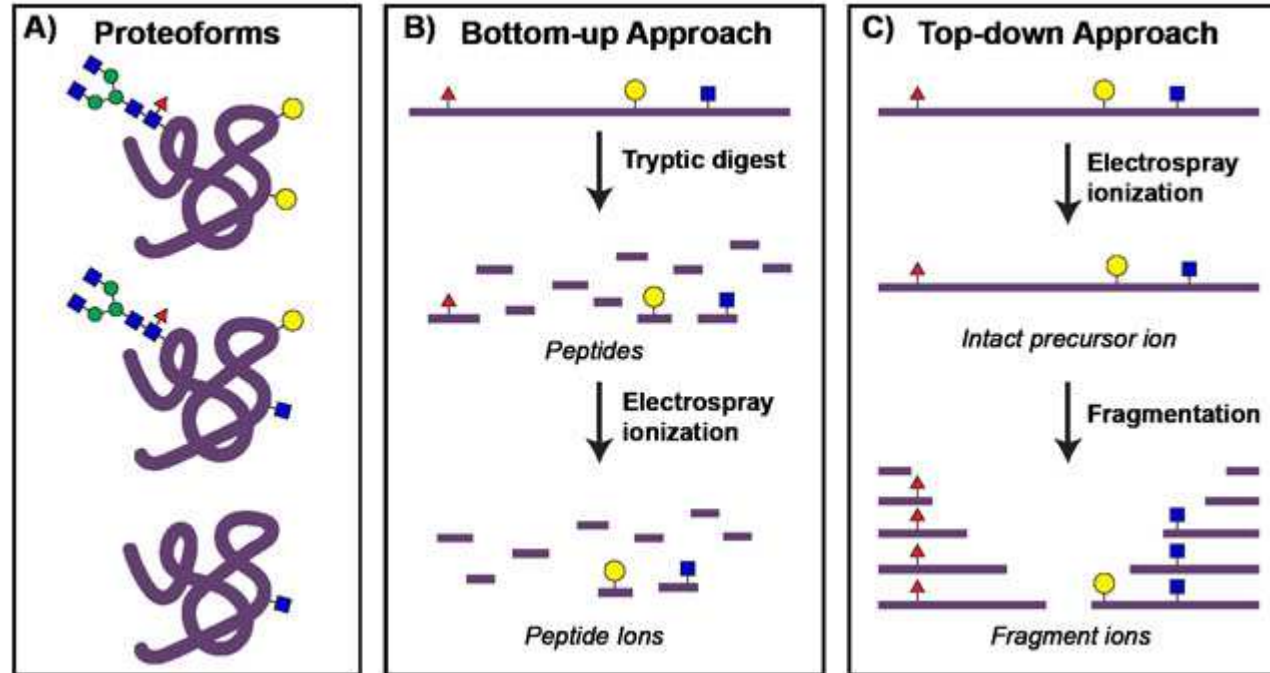
- analýza intaktních proteinů
- identifikace proteinových izoform
- mapování proteinových modifikací

“Bottom-Up” proteomika

- štěpení proteinů na peptidy, separace
- nejčastěji používaný přístup

cílová analýza – **ESI/LC-MS/MS**

Proteomika



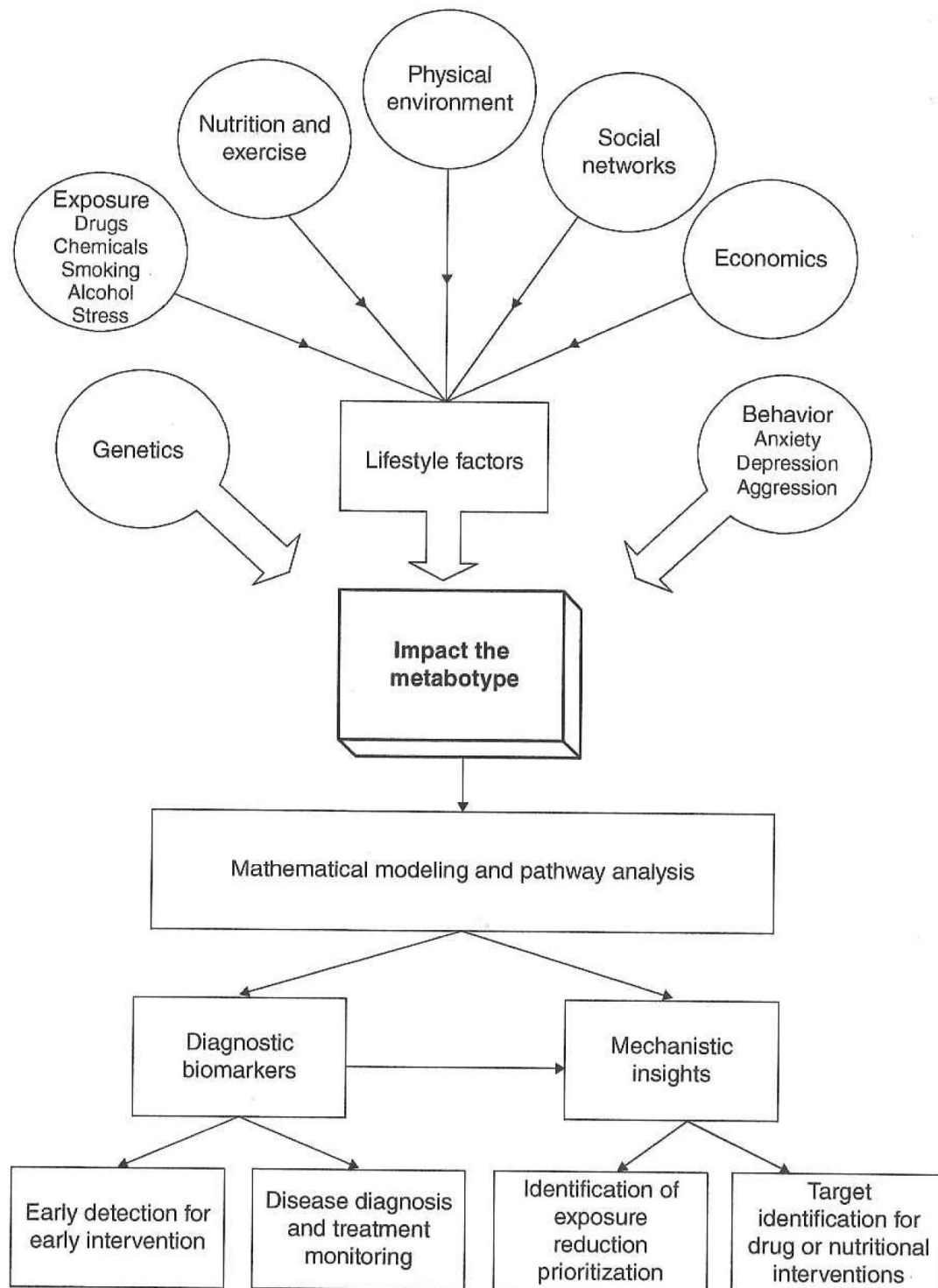
Osnova

Moderní *in vitro* metody v toxikologii

1. Genomika
2. Transkriptomika
3. Proteomika
4. Metabolomika
5. Kvantitativní vysokokapacitní analýzy

př. HPLC-MS/MS

Metabolomika



- informuje o vlivu expozice na biochemické úrovni a poskytuje biomarkery spojené s aktuálním stavem expozice jedince, jeho zdravotním stavem atp.
- buněčné a tkáňové zdroje – moč, sliny, sérum...
- koncept „exposome“ = „kumulativní analýza environmentálních vlivů, stravy, chování atp. na biologické procesy v průběhu života jedince“

Ukázka propojení „omic“ metod

Environment International 157 (2021) 106802



Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envint



Integrated multi-omics analysis reveals the underlying molecular mechanism for developmental neurotoxicity of perfluorooctanesulfonic acid in zebrafish

Hyojin Lee^a, Eun Ji Sung^b, Seungwoo Seo^c, Eun Ki Min^a, Ji-Young Lee^d, Ilseob Shim^d, Pilje Kim^d, Tae-Young Kim^{c,1,2}, Sangkyu Lee^{b,1,2}, Ki-Tae Kim^{a,*}

^a Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 01811, Republic of Korea

^b BK21 FOUR Community-Based Intelligent Novel Drug Discovery Education Unit, College of Pharmacy and Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

^c School of Earth Sciences and Environmental Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju 61005, Republic of Korea

^d Environmental Health Research Department, National Institute of Environmental Research, Incheon 22689, Republic of Korea

- PFOS - transkriptom, proteom, metabolom
 - indukce vývojové neurotoxicity
 - deregulace oxidativního stresu a energetického metabolismu
 - indukce zánětu, deregulace Ca²⁺ signalizace, deformace axonů

Ukázka propojení „omic“ metod



Metabolomics and proteomics study reveals the effects of benzo[a]pyrene on the viability and migration of KYSE-150 esophageal cells

Yuting Shen, Guangshan Xie, Siyi Lin, Lin Zhu, Hongna Zhang, Zhu Yang*, Zongwei Cai

State Key Laboratory of Environmental and Biological Analysis, Department of Chemistry, Hong Kong Baptist University, Hong Kong, China



- kombinací metod lze získat informaci o změně profilu genové transkripce indukované testovanou látkou a zároveň identifikovat biomarkery expozice v příslušné tkáni

Ukázka propojení „omic“ metod

Shen, 2022

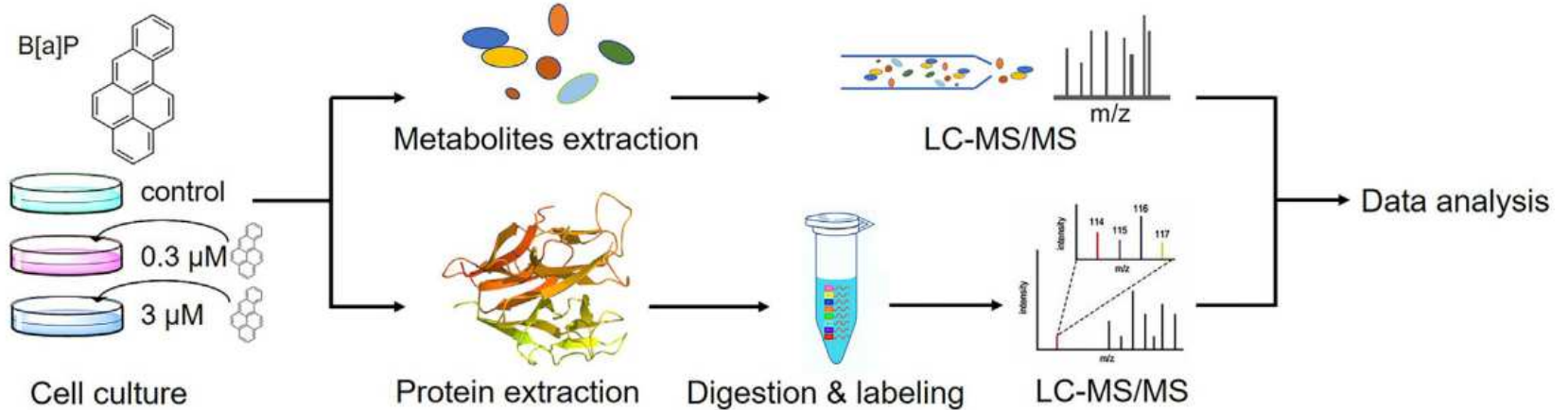
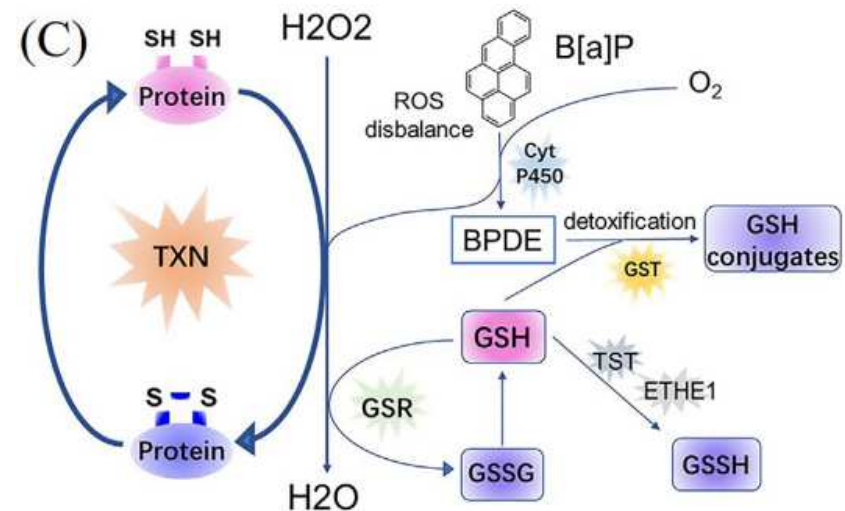


Fig. 1. Schematic workflow of the integrated metabolomics and proteomics study approach applied in the present study.

- B[a]P caused reduced cell viability and increased oxidative stress in esophageal cells.
- In response to B[a]P treatment of cells, TXN was upregulated and GSH depleted.
- B[a]P induced the expression of both tumor suppressor and promoter proteins, such as S100 family, AXN, Basigin and Serpin B5.
- B[a]P not only inhibits cell proliferation but also impairs the cell mobility of the esophageal epithelial cells.



Osnova

Moderní *in vitro* metody v toxikologii

1. Genomika
 2. Transkriptomika
 3. Proteomika
 4. Metabolomika
 5. Kvantitativní vysokokapacitní analýzy qHTS assays
- standartní testy cytotoxicity a proliferace
 - aktivita NADPH oxidáz (př. MTT test)
 - spotřeba ATP (př. Cell TiterGlo)
 - poškození membrány (př. LDH assay)
 - produkce aminů (př. Live/Dead fixable dead cell stain)
 - množství DNA (př. CyQuant)

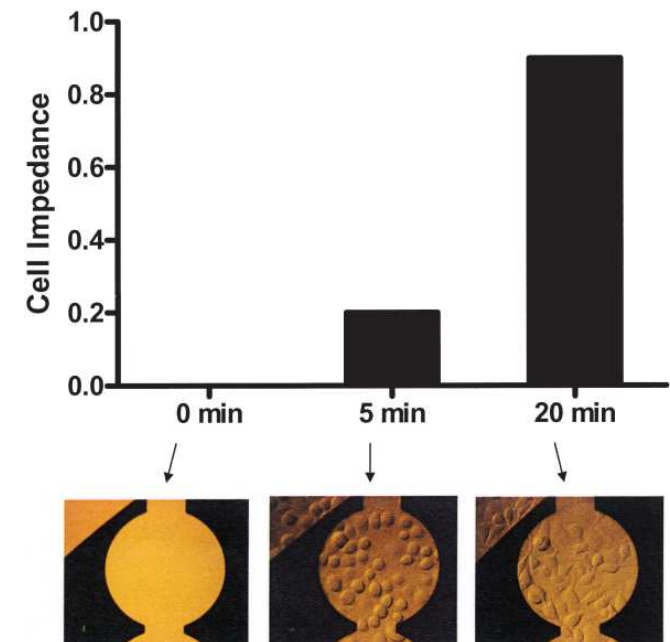
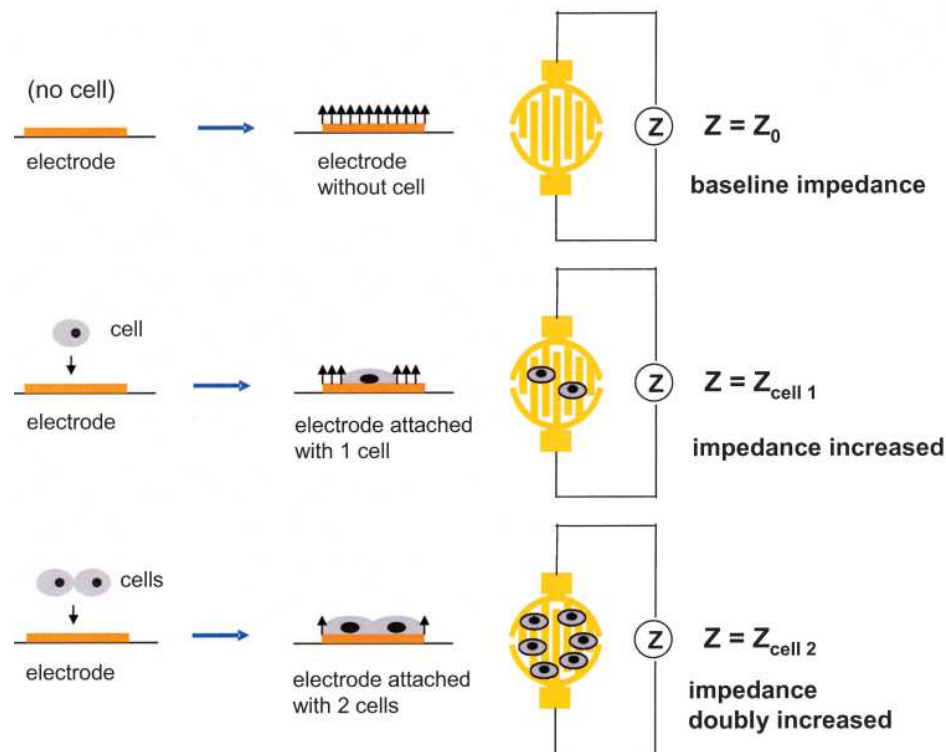
Osnova

Moderní *in vitro* metody v toxikologii

1. Genomika
 2. Transkriptomika
 3. Proteomika
 4. Metabolomika
 5. Kvantitativní vysokokapacitní analýzy qHTS assays
- specifické testy
 - kvantitativní monitoring buněčné morfologie pomocí impedance
 - reportéry enzymatické aktivity
 - reportéry transkripční aktivity (př. Attagene Transfactorial, CALUX)
 - disrupce mezibuněčné komunikace (př. GJIC, TEER)
 - detekce disrupce syntézy a metabolismu hormonů
 -

Monitorování buněčné impedance

- ▶ stanovení vlivu testované látky na základní buněčné parametry vč. cytotoxicity



- ▶ Analýza růstu, proliferace, adheze

Monitorování buněčné impedance

Research

A Section 508–conformant HTML version of this article
is available at <https://doi.org/10.1289/EHP7102>.

Aggressiveness and Metastatic Potential of Breast Cancer Cells Co-Cultured with Preadipocytes and Exposed to an Environmental Pollutant Dioxin: An *in Vitro* and *in Vivo* Zebrafish Study

Meriem Koual,^{1,2,3†} Céline Tomkiewicz,^{1} Ida Chiara Guerrero,⁴ David Sherr,⁵ Robert Barouki,^{1,3} and Xavier Coumoul^{1,3†}*

¹UMR-S1124, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), T3S, Toxicologie Environnementale, Cibles thérapeutiques, Signalisation cellulaire et Biomarqueurs, Paris, France

²Service de Chirurgie Cancérologique Gynécologique et du Sein, Hôpital Européen Georges-Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France

³Université de Paris, Paris, France

⁴Plateforme protéomique 3P5-Necker, Structure Fédérative de Recherche Necker, Université de Paris, US24/CNRS UMS3633, Inserm, Paris, France

⁵Department of Environmental Health, Boston University School of Public Health, Boston, Massachusetts, USA

příklad *in vitro* vs. *in vivo* přínosu

Monitorování buněčné impedance

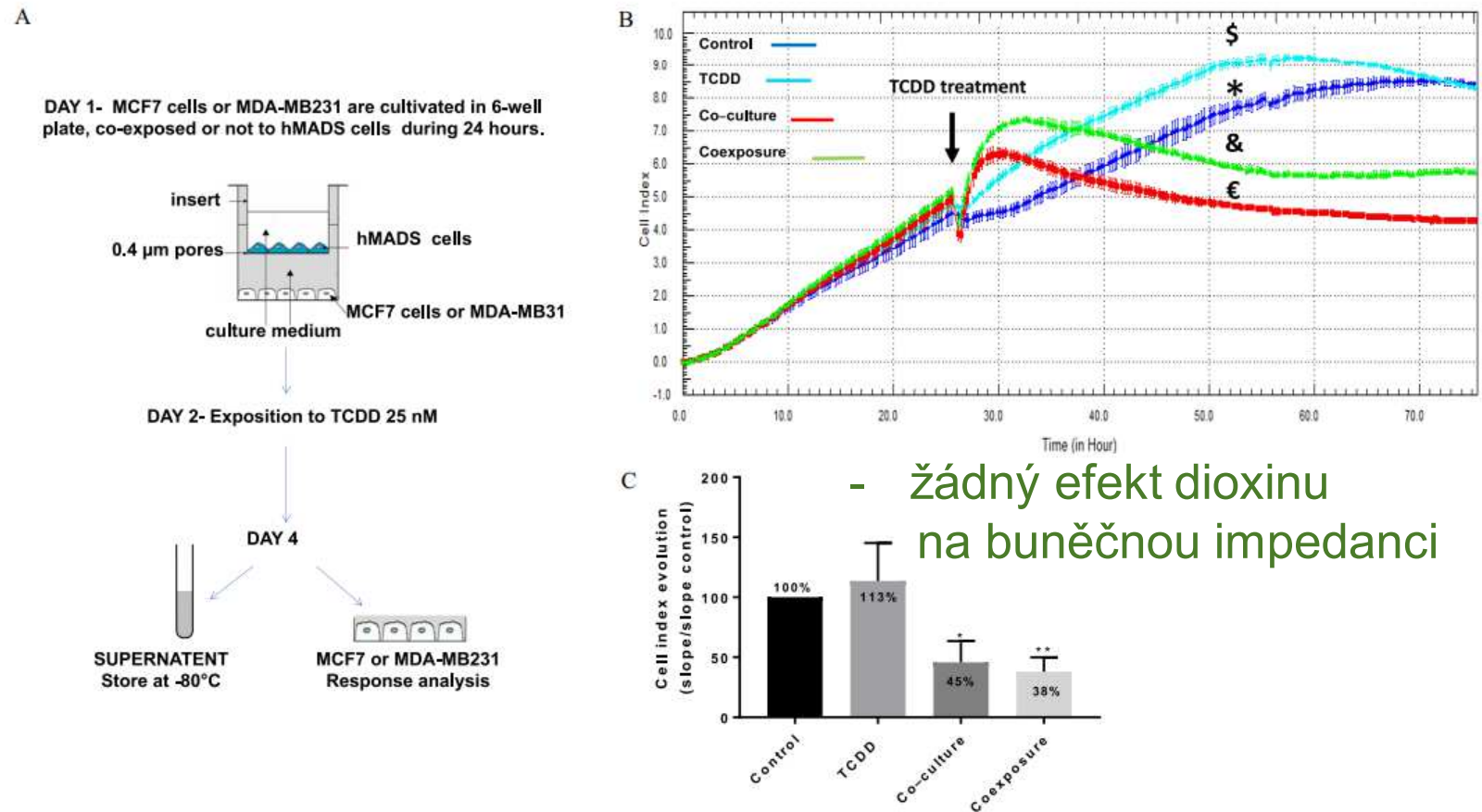


Figure 1. Co-culture model and real time MCF7 cells analysis. (A) Presentation of the 2D co-culture system and the protocol. (B) xCELLigence dynamic monitoring of MCF-7 cells, A representative graph from xCELLigence system: cell index (CI) profiles are the mean \pm SD (duplicate) of each condition: Control (*, vehicle MCF-7 cells, alone), TCDD (\$, MCF-7 cells treated with 25 nM TCDD), co-culture (€, MCF-7 co-cultured with hMADS) and coexposure (&, co-culture with TCDD). (C) The evolution of the CI for each condition was determined by analyzing the slope of the line in the interval (26–48 h). Each graph represents the mean slope (in bold) compared with the control \pm SEM for six measurements. The numerical information mean \pm SEM and *p*-values are provided in Table S1. (Kruskal–Wallis’s H test (nonparametric comparison of *k* independent series) followed by a 1-factor ANOVA test (parametric comparison of *k* independent series), ***p* < 0.01; **p* < 0.05). Note: ANOVA, analysis of variance; SEM, standard error of the mean; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

Monitorování buněčné impedance vs. *in vivo* test šíření metastáz

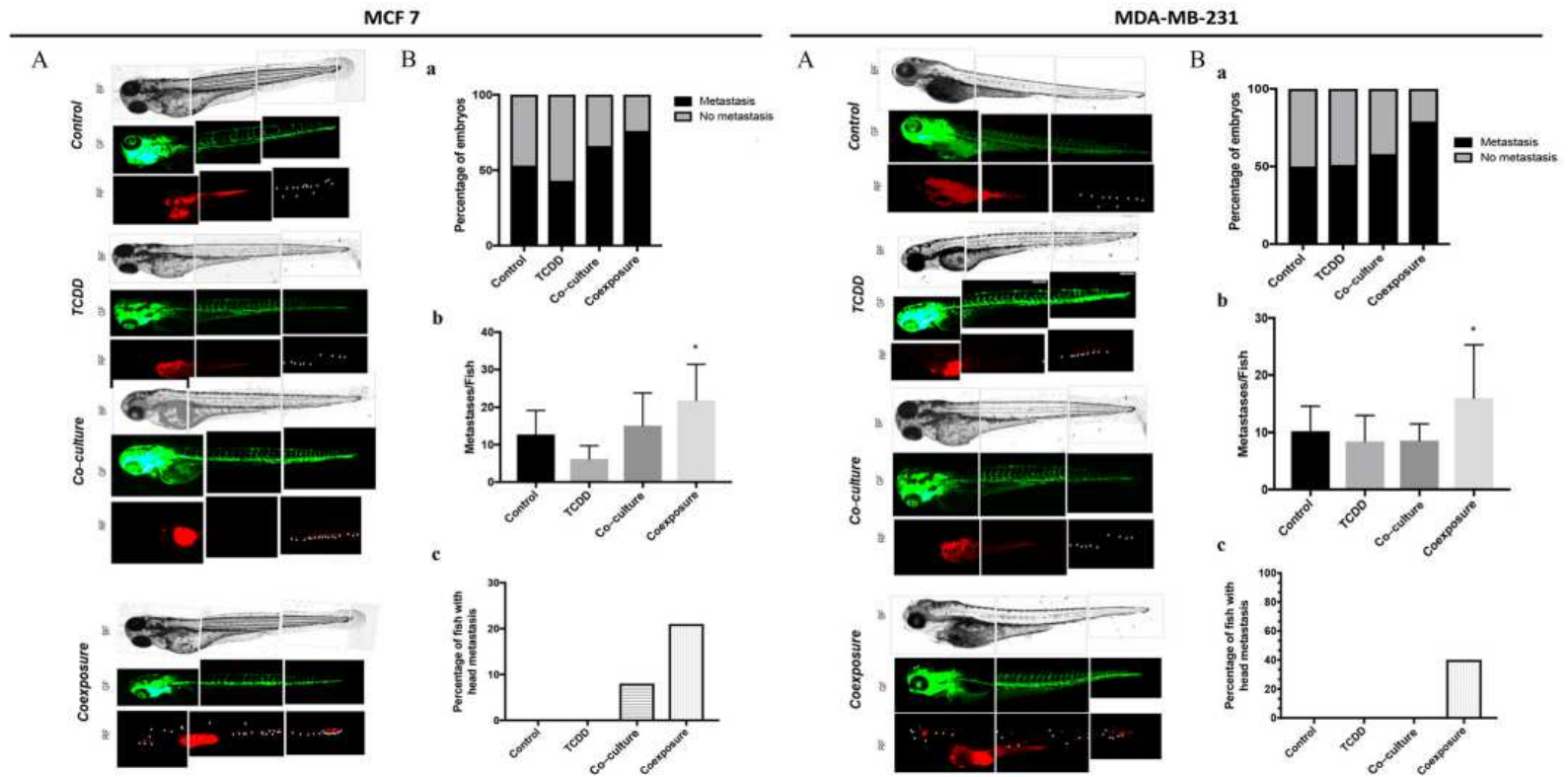


Figure 6. Measurement of metastatic spread of MCF7 and MDA-MB231 cells in zebrafish larvae *in vivo* models Human RFP-MCF7 (left) or RFP-MDA-MB-231 (right) cells cultured with conditioned media from different conditions, were injected into the perivitelline space of 2-day-old zebrafish larvae [Control (vehicle MCF-7 cells, alone), TCDD (MCF-7 cells treated with 25 nM TCDD), co-culture (MCF-7 co-cultured with hMADS), and coexposure (co-culture with TCDD)]. Fish were imaged 24 h later at 8.5× magnification by fluorescence microscopy. (A) Representative images from 21–46 fish/group. (B) Quantitation of (a) the number of fish with one or more metastases and (b) the average number of metastases/fish+SE. Graph represents means ± SEM of three measurements. The numerical information mean ± SEM and *p*-values are provided in Table S8. (Kruskal–Wallis’s H test (nonparametric comparison of *k* independent series) followed by a 1-factor ANOVA test (parametric comparison of *k* independent series, * *p* < 0.05). (C) The percentage of fish with metastasis in the head region. Each experiment was repeated in triplicate (MCF-7) or quadruplicate (MDA-MB-231) with 7–12 fish per condition in each experiment. Note: ANOVA, analysis of variance; SEM, standard error of the mean; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

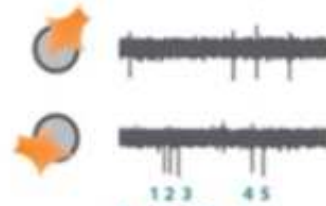
- efekt dioxinu na formaci metastáz

Mikroelektrodové arrays

- síť elektrod monitorující elektrický odpor vytvářený buňkami
- měří elektrickou aktivitu buněk

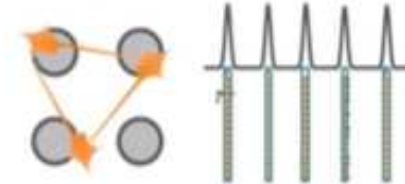


Mean Firing Rate = # of Spikes / Time



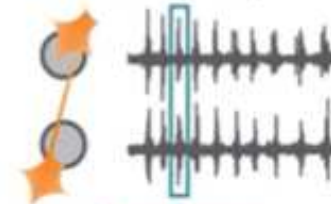
Activity

Burst of Action Potentials



Oscillation

Connectivity

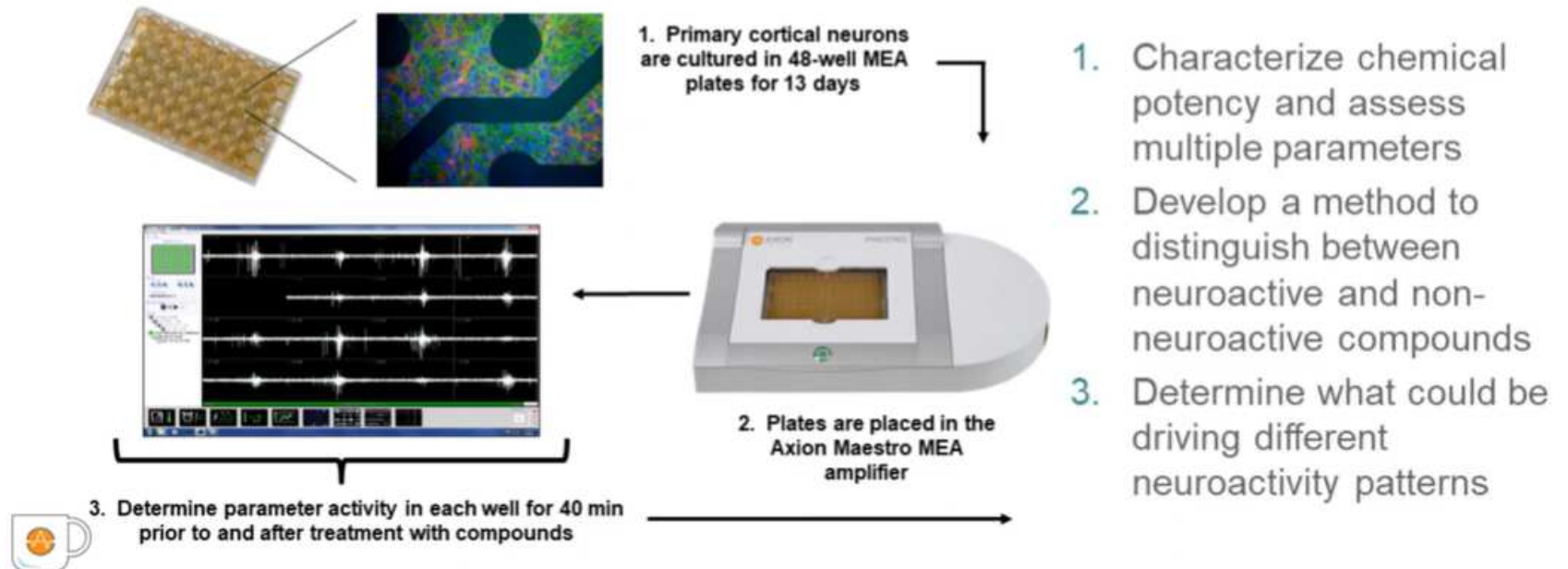


Synchrony

Příklad testování neurotoxicity

MEA preparation

- 384 ToxCast compounds (222 active in single-concentration screen) were screened in a concentration range (7 concentrations, 0.03-40 μ M)
- Compounds were analyzed in 43 parameters (including MFR)



TEER analýza

- „Transepithelial electrical resistance“
- měření permeability buněčných membrán skrze měření elektrického odporu
- test disrupce mezibuněčných spojení
- monitoring permeability buněčných bariér
- informace o kompaktnosti buněčné vrstvy a mezibuněčných těsných spojů
- př. tkáňová toxicita – GI, plíce, BBB ...

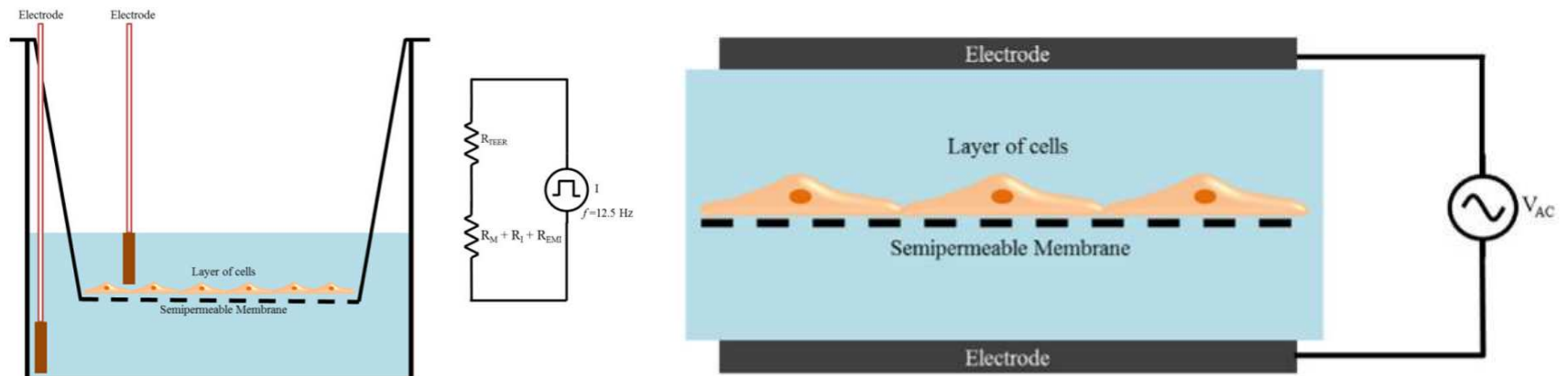
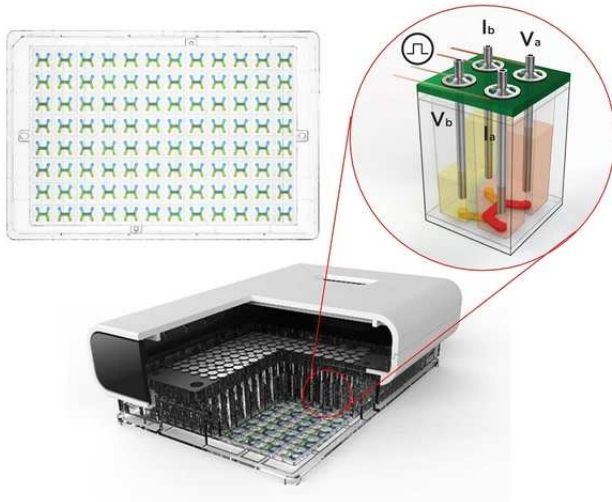
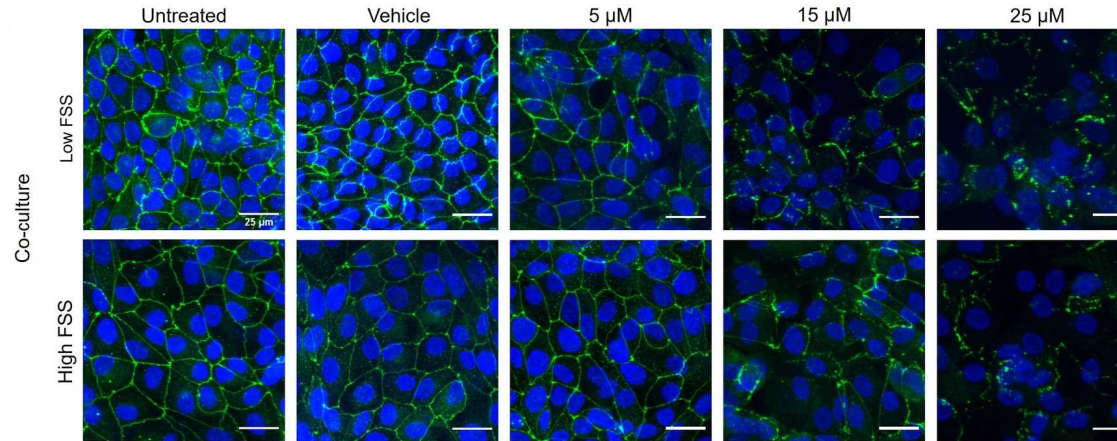


Figure 1.
TEER measurement with chopstick electrodes. The total electrical resistance includes the ohmic resistance of the cell layer R_{TEER} , the cell culture medium R_M , the semipermeable membrane insert R_I and the electrode medium interface R_{EMI} .

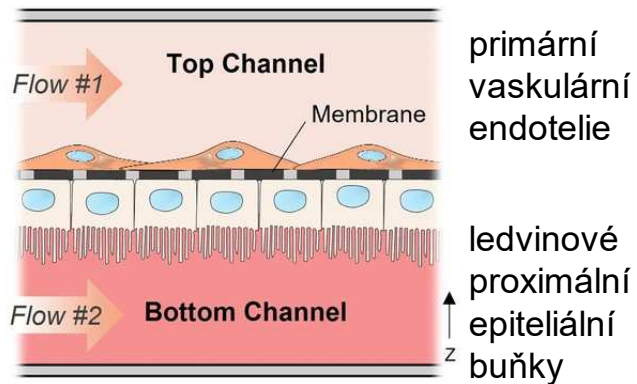
a



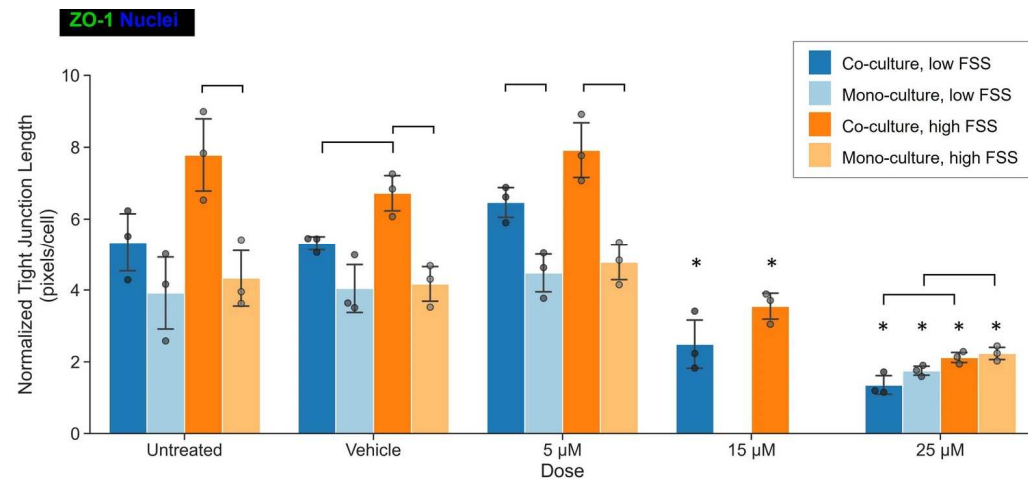
Kvantifikace obrazové informace TJs



b

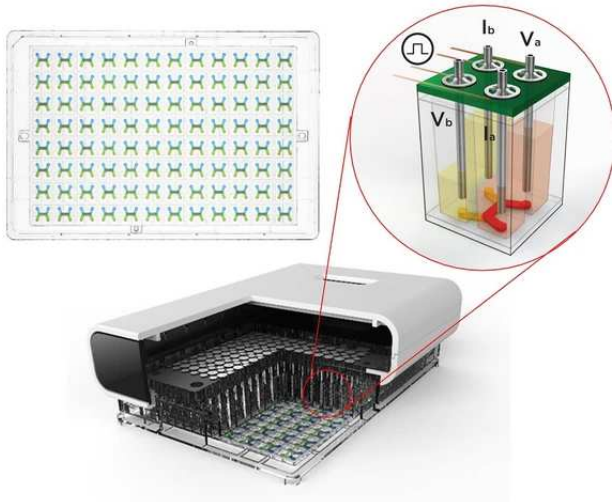


c

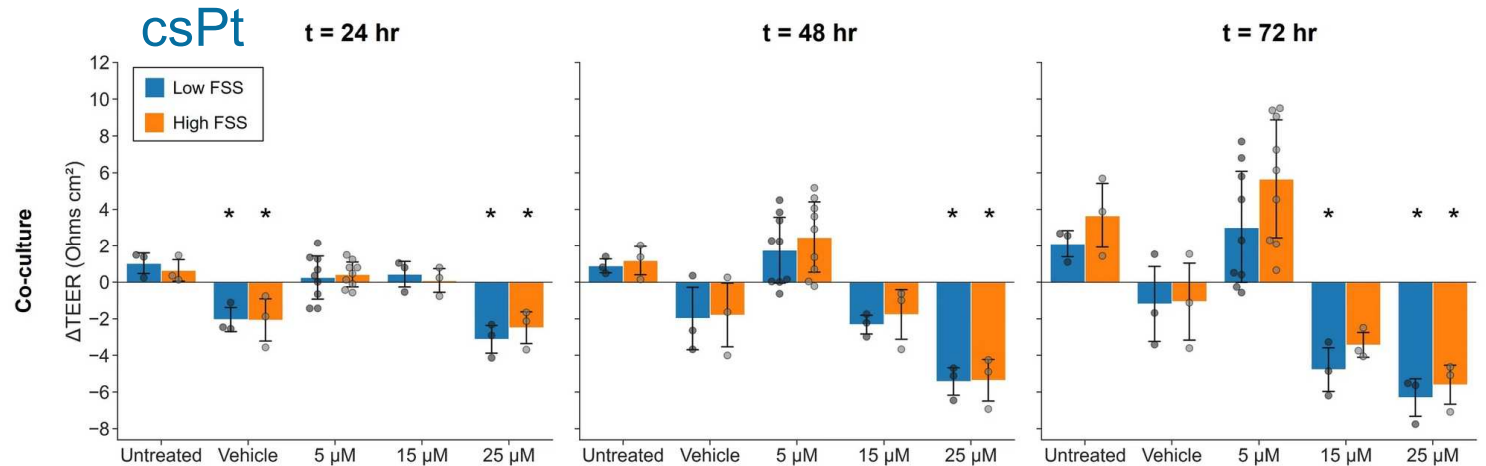


➤ nefrotoxicita cisplatinu – 96-well formát
- 2 formáty mikrofluidity

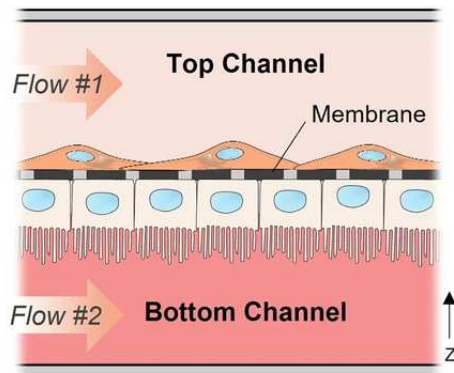
a



TEER - Kvantifikace prostupnosti bariéry epitel-endotel



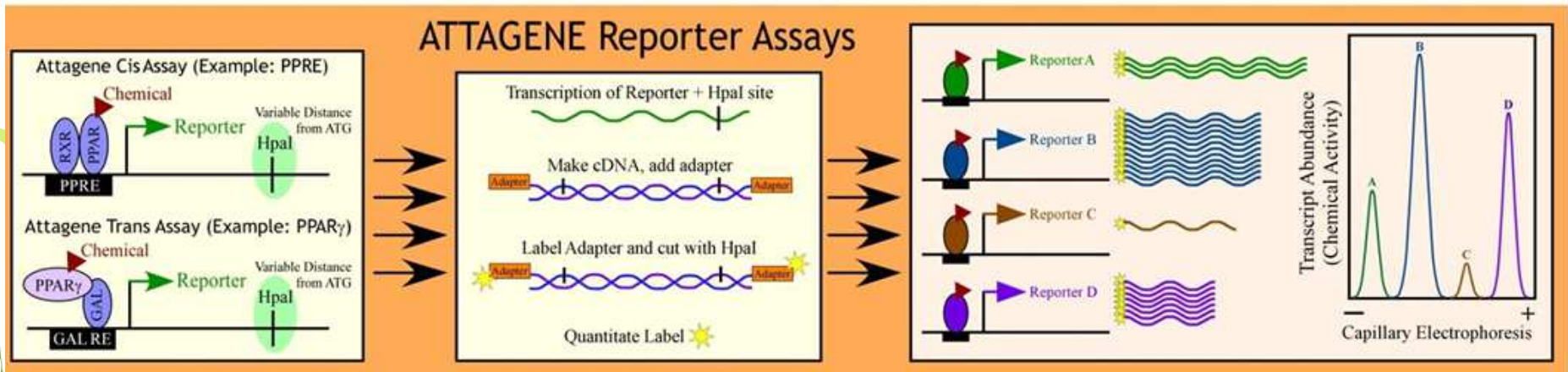
b



- nefrotoxicita cisplatinu – 96-well formát
- 2 formáty mikrofluidity

Stanovení transkripční aktivity jaderných receptorů (NR)

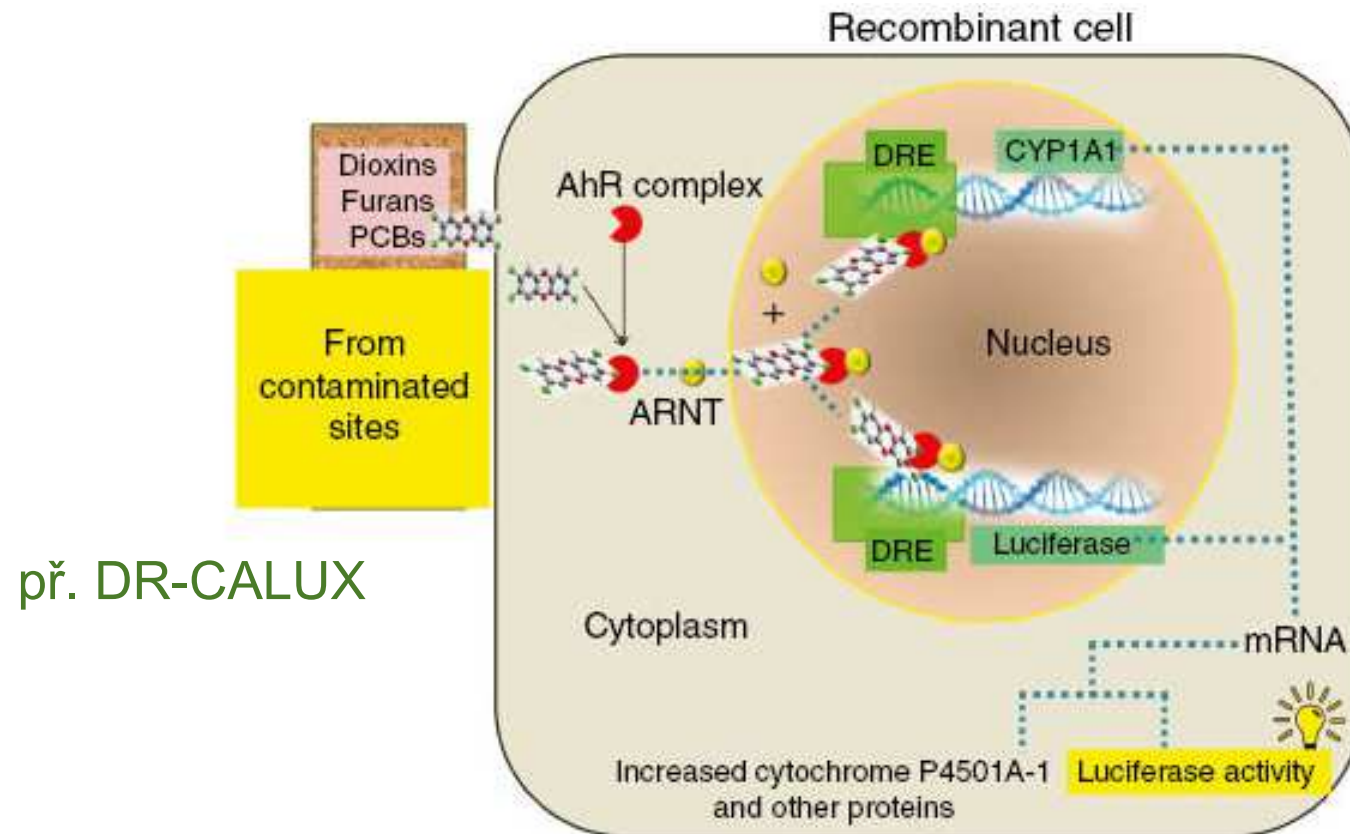
- Attagene FACTORIAL™ assay
- odhalení módu agonista, antagonisty
- cis- a trans- mód



- Multiple reporter transcription unit (MRTU) + chimeric Gal4-NR protein
- až 48 typů lidských jaderných receptorů

Testování transaktivace NRs – CALUX

- DR, AR, PR
- detekce reportéru tj. aktivita luciferázy



Testování transaktivace – DR CALUX®

- př. skríníng PCBs a dioxinových látek v rybách
- může DR CALUX „nahradit“ standartní GC/MS?
- stabilní linie – H4IIE, HepG2

Mol. Nutr. Food Res. 2006, 50, 945–957

DOI 10.1002/mnfr.200600061

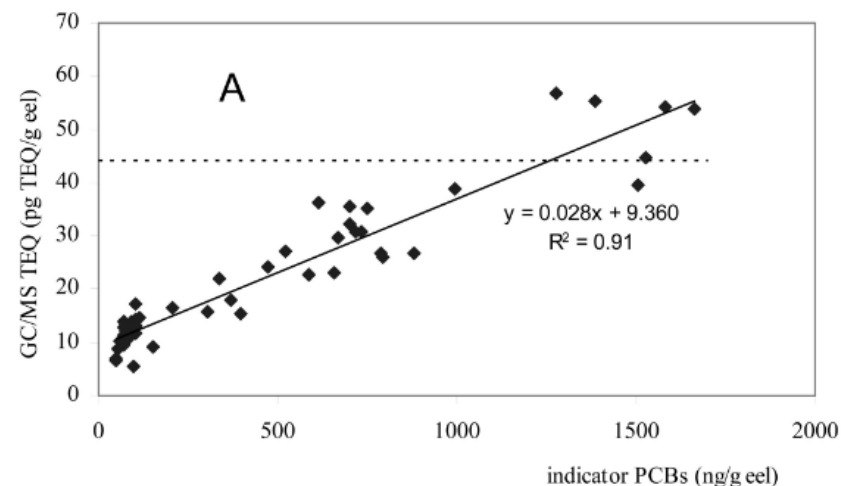
The use of the DR CALUX® bioassay and indicator polychlorinated biphenyls for screening of elevated levels of dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls in eel

Ron Hoogenboom¹, Toine Bovee¹, Win Traag¹, Ronald Hoogerbrugge², Bert Baumann², Liza Portier¹, Guido van de Weg¹ and Jaap de Vries³

¹ RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands

² RIVM, Bilthoven, The Netherlands

³ VWA, Zutphen, The Netherlands



- GC/MS- limitace- malé množství vstupního vzorku, cena, náročnost analýzy

TEQs- toxic equivalence

- *concentration + TEFs*

- *TEFs – toxicity equivalency factors*

Hoogenboom, 2006

Testování znečištění ovzduší


ENVIRONMENTAL
Science & Technology

Article

Cite This: *Environ. Sci. Technol.* 2018, 52, 2926–2933

pubs.acs.org/est

Development and Application of a Novel Bioassay System for Dioxin Determination and Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Evaluation in Ambient-Air Samples

Songyan Zhang,^{†,‡,||} Shuaizhang Li,^{†,‡,||} Zhiguang Zhou,^{§,||} Hualing Fu,^{†,‡} Li Xu,^{†,‡} Heidi Qunhui Xie,^{*,†,‡} and Bin Zhao^{*,†,‡} 

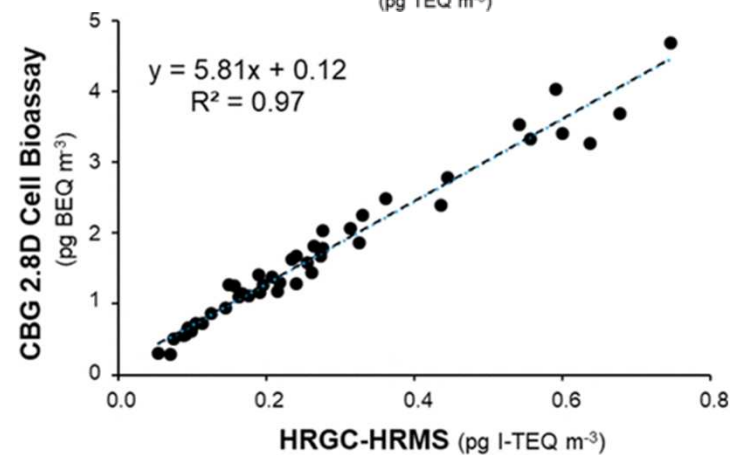
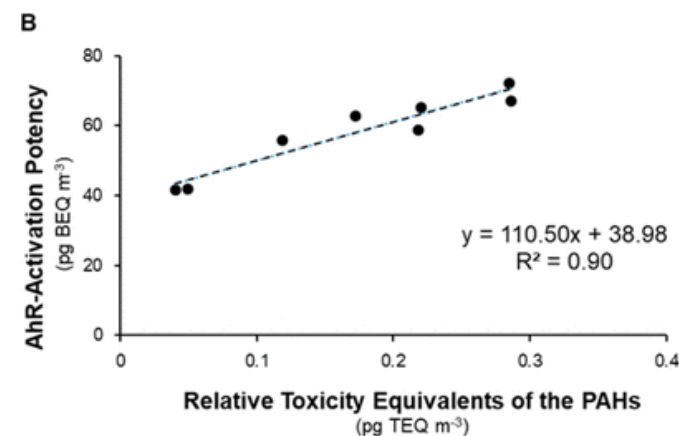
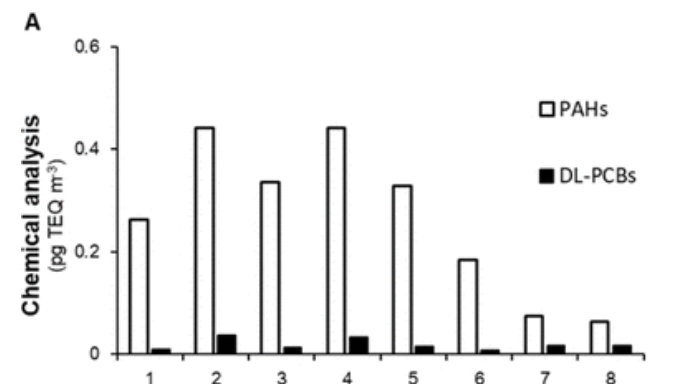
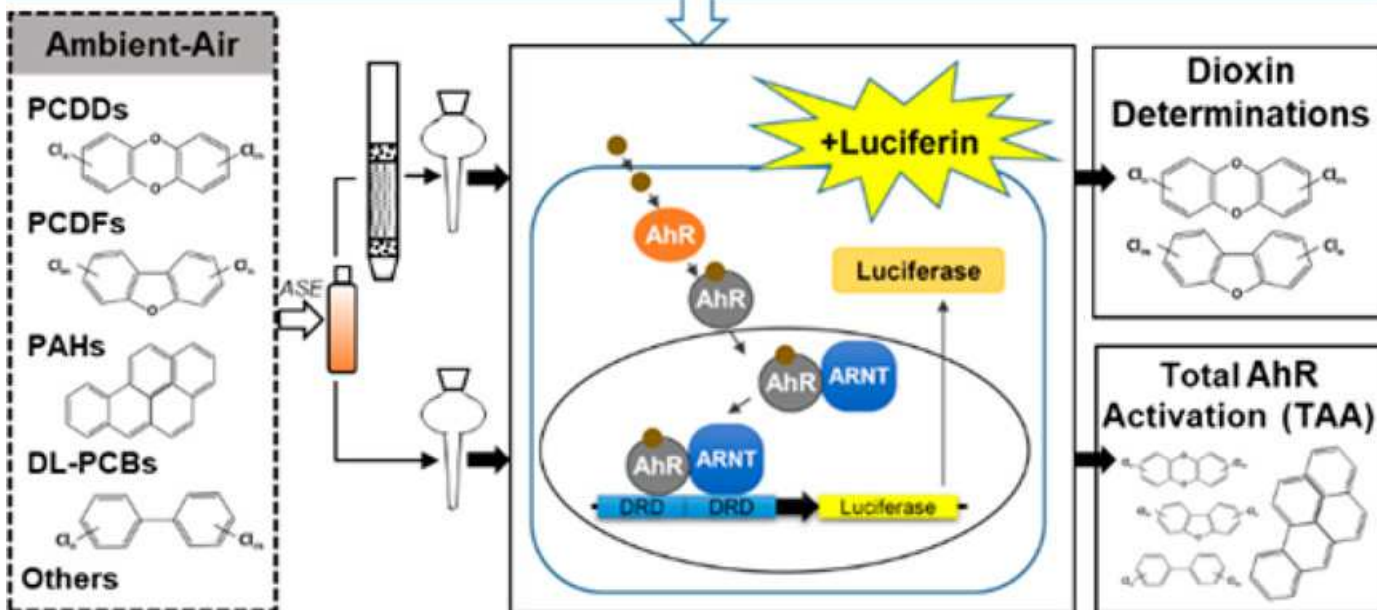
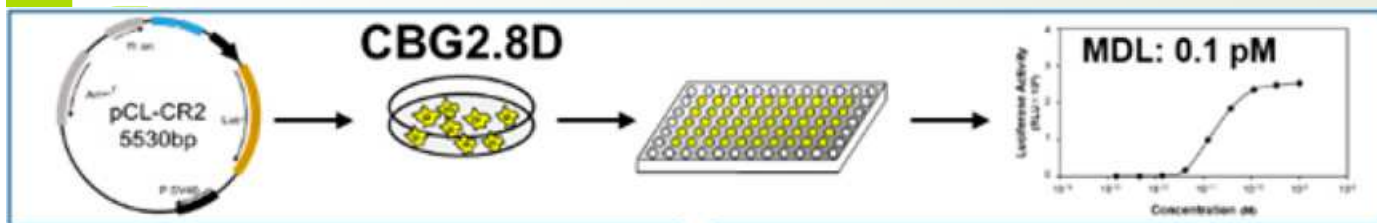
[†]State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

[‡]University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

[§]State Environmental Protection Key Laboratory of Dioxin Pollution Control, National Research Center for Environmental Analysis and Measurement, Beijing 100029, China

Testování znečištění ovzduší

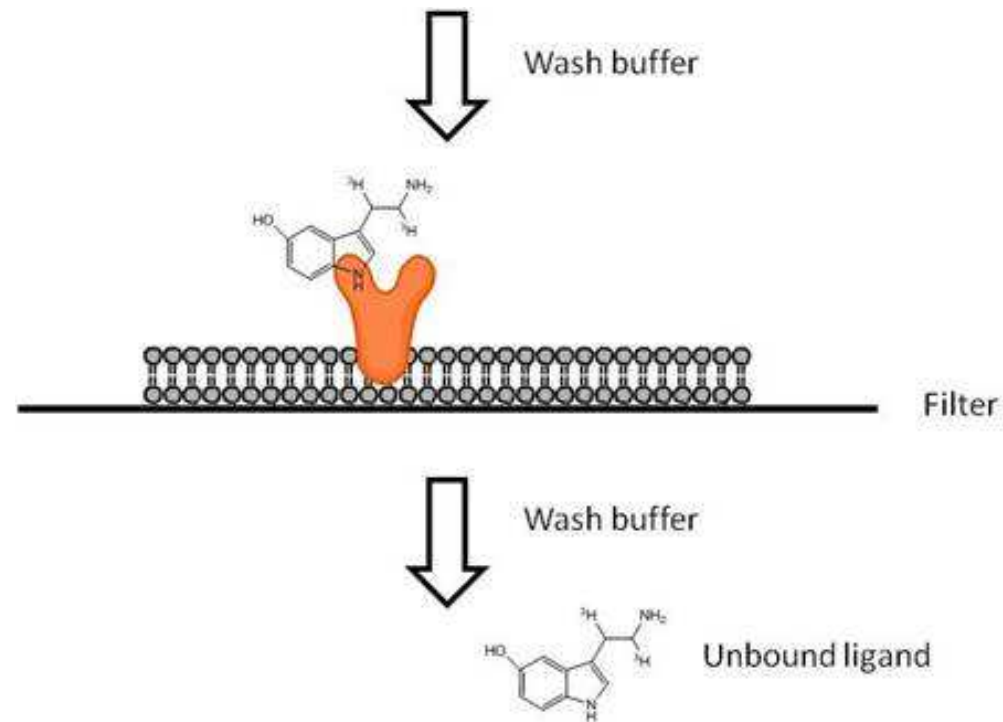
Zhang, 2018



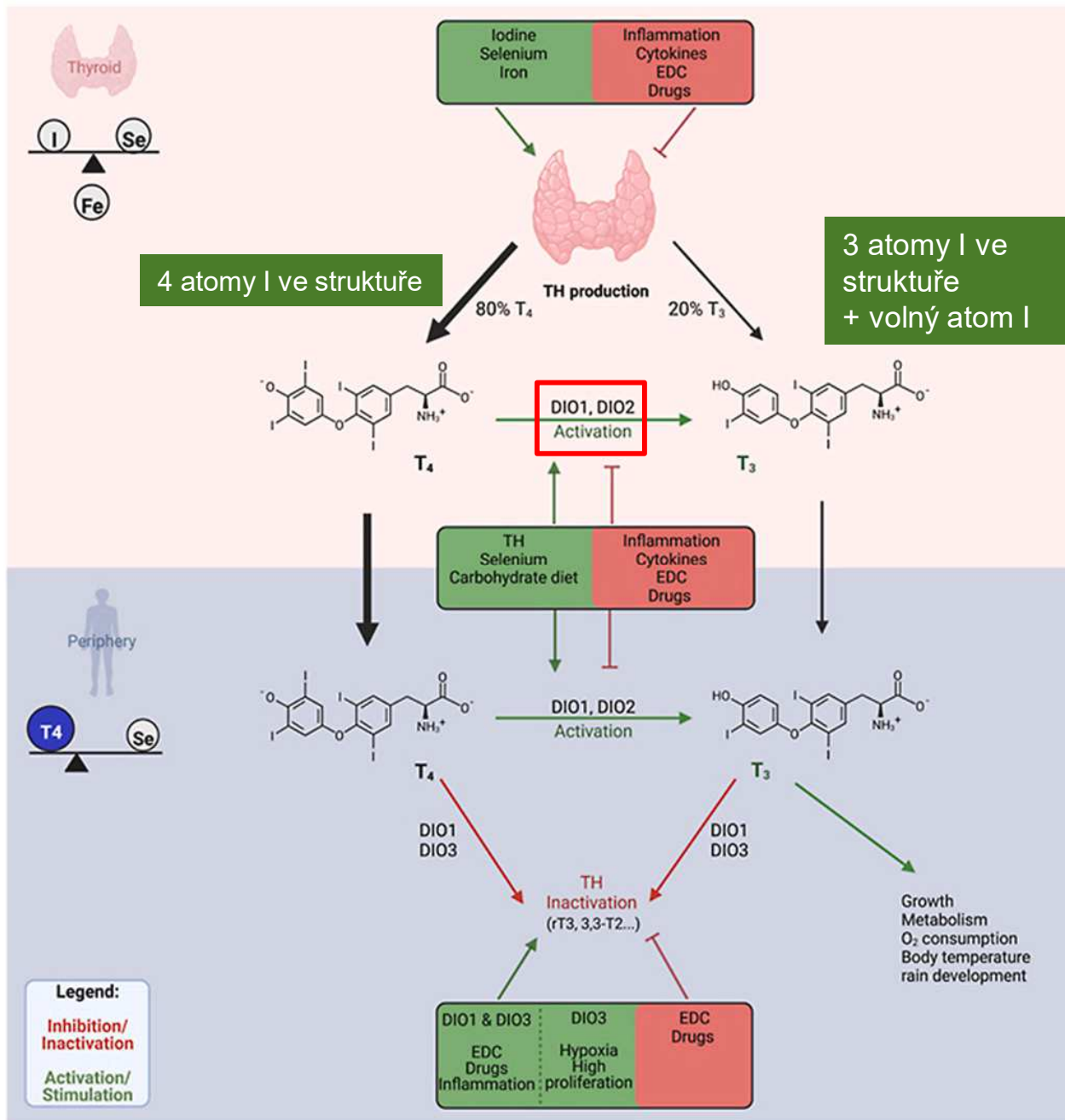
- **sensitivní metoda pro detekci aktivace AhR a stanovení rizik pro látky vyskytující se v ovzduší (Polycyklické aromatické uhlovodíky - PAHs)**

Analýza vazby ligand-receptor

- ▶ NovaScreen NR HTS Ligand-Binding Assay
- ▶ cell-free formát
- ▶ kompetitivní assay – př. radioaktivní estradiol vs. testovaná látka, vazba na ERalpha
- ▶ AR, ER, PXR, FXR, PPARa, PPARg, TRa



Testování enzymatické aktivity – DIO1



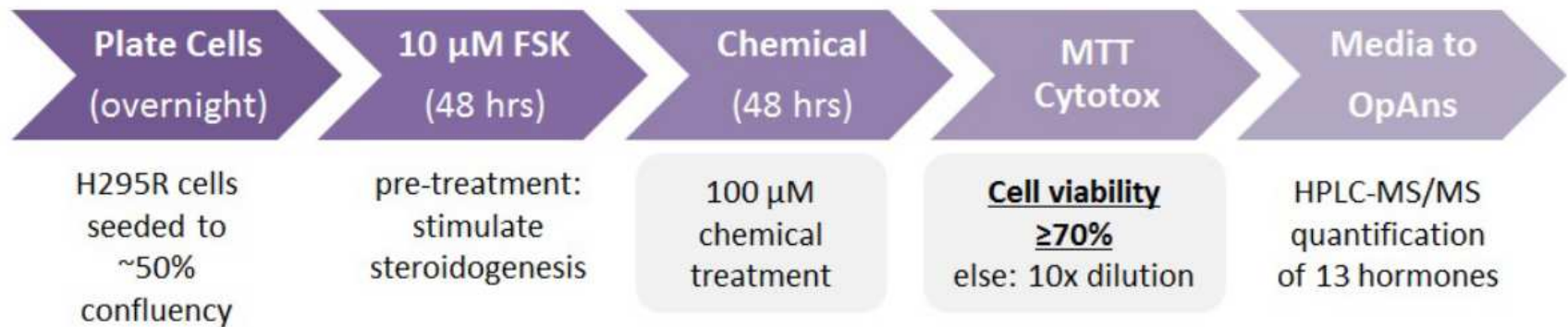
- Inhibice aktivity chemickými látkami – cell-free assay
- Inkubace enzymu s testovanými látkami 3h
- Pokud dochází k inhibici aktivity klesá nárůst volného jódu, který se následně stanovuje
- 96-well format, HEK293 DIO1-OE

Analýza disrupce syntézy steroidních hormonů

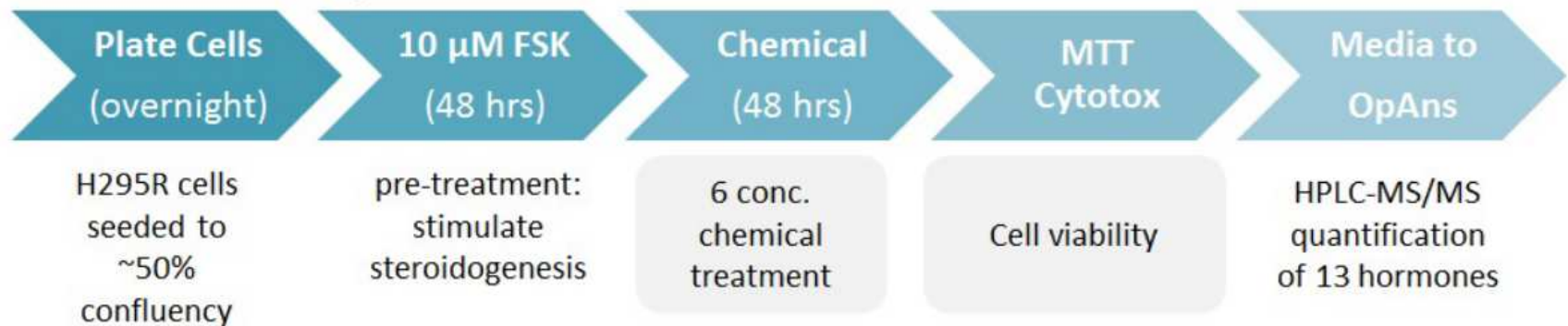
- ▶ CeeTox H295R steroidogenesis assays
- ▶ stanovení vlivu testované látky na syntézu steroidních hormonů
- ▶ odhalení endokrinních disruptorů
- ▶ 96-well format
- ▶ Detekce 13 steroidních hormonů pomocí LC-MS/MS

CeeTox H295R steroidogenesis assays

MTC Evaluation



Concentration-Response



Konzorcia, databáze, projekty

1. **ToxCast**
2. **Tox21**
3. CTD – Comparative Toxicogenomics Database
4. ExpoCast – modely predikující expozici
5. Human Toxome project – „multiomic“ nástroje
6. ToxRefDB
7. ToxBank
8. TOXRIC
9. ToxNET
10. ...

Zajímavý literární zdroj

TOXICITY FORECASTER (TOXCAST) IN VITRO ASSAYS

Assay Documentation for Non-Guideline In Vitro Test Methods

ToxCast

- *Toxicity Forecaster*
- *In vitro* qHTS výstupy (“high-throughput screening”) předpovídající toxicitu testovaných látek
- EPA - ~700 HTS, 300 signálních drah
- využívá vysokokapacitní metody a výpočetní počítačové modely pro vytvoření předpovědi toxické aktivity určité látky a stanovení rizika
- >2000 chemických sloučenin – různé zdroje
- farmaceutický, chemický, kosmetický průmysl, environmentální zdroje, bezpečnost potravin

ToxCast HTS Assays:

>1100 readouts / effects

Assay Provider

ACEA
 Apredica
 Attagene
 BioSeek
 CellzDirect
 NCGC/Tox21
 NHEERL MESC
 NHEERL NeuroTox
 NHEERL Zebrafish
 NovaScreen
 Odyssey Thera

Biological Response

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

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

Cell Format

Cell free
 Cell lines
 Primary cells
 Complex cultures
 Free-living embryos

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

Detection Technology

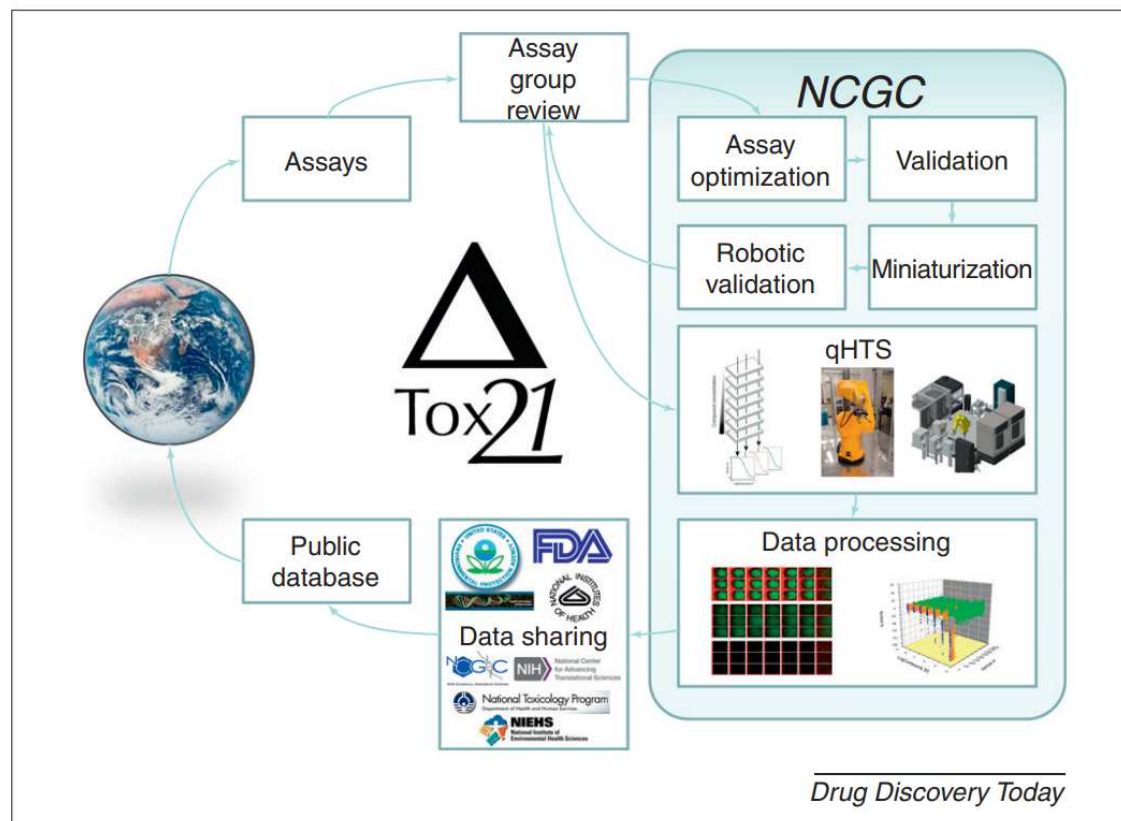
qNPA and ELISA
 Fluorescence & Luminescence
 Alamar Blue Reduction
 Arrasyscan / Microscopy
 Reporter gene activation
 Spectrophotometry
 Radioactivity
 HPLC and HPEC
 TR-FRET

Tox21

Attene-Ramos, 2013

Thomas, 2018

- *In vitro* toxikologie 21. století (est. 2008)
- robotizace, 1536-well format
- ~80 assays



➤ Cíle:

1. identifikovat mechanismus biologické aktivity testovaných látek
2. určit látky pro další extenzivní testování
3. vývoj modelů pro predikci *in vivo* odpovědi
4. vývoj strategických a operačních plánů

Toxicology in the 21st Century

Through a Memorandum of Understanding, research, develop, validate and translate innovative chemical testing methods that characterize toxicity pathways Research, develop, validate and translate innovative chemical testing methods that characterize toxicity pathways.

zakladatelské organizace:

Environmental Protection Agency (EPA), National Toxicology Program (NTP), National Institute of Environmental Health Sciences, National Center for Advancing Translational Sciences (NCATS) and Food and Drug Administration (FDA)

 Tox21 Public Data

 Tox21 Assay Tracking


 Tox21 Data Browser

 Tox21 Data Download

 Pathway Browser

 Collaborator Download

 Tox21 Manuscripts

 Tox21 Assays

 Tox21 Publications

 Tox21 Presentations

 Tox21 Curve Browser

 SAR Tools

 Tox21 Data Processing

 Assay Annotation Update

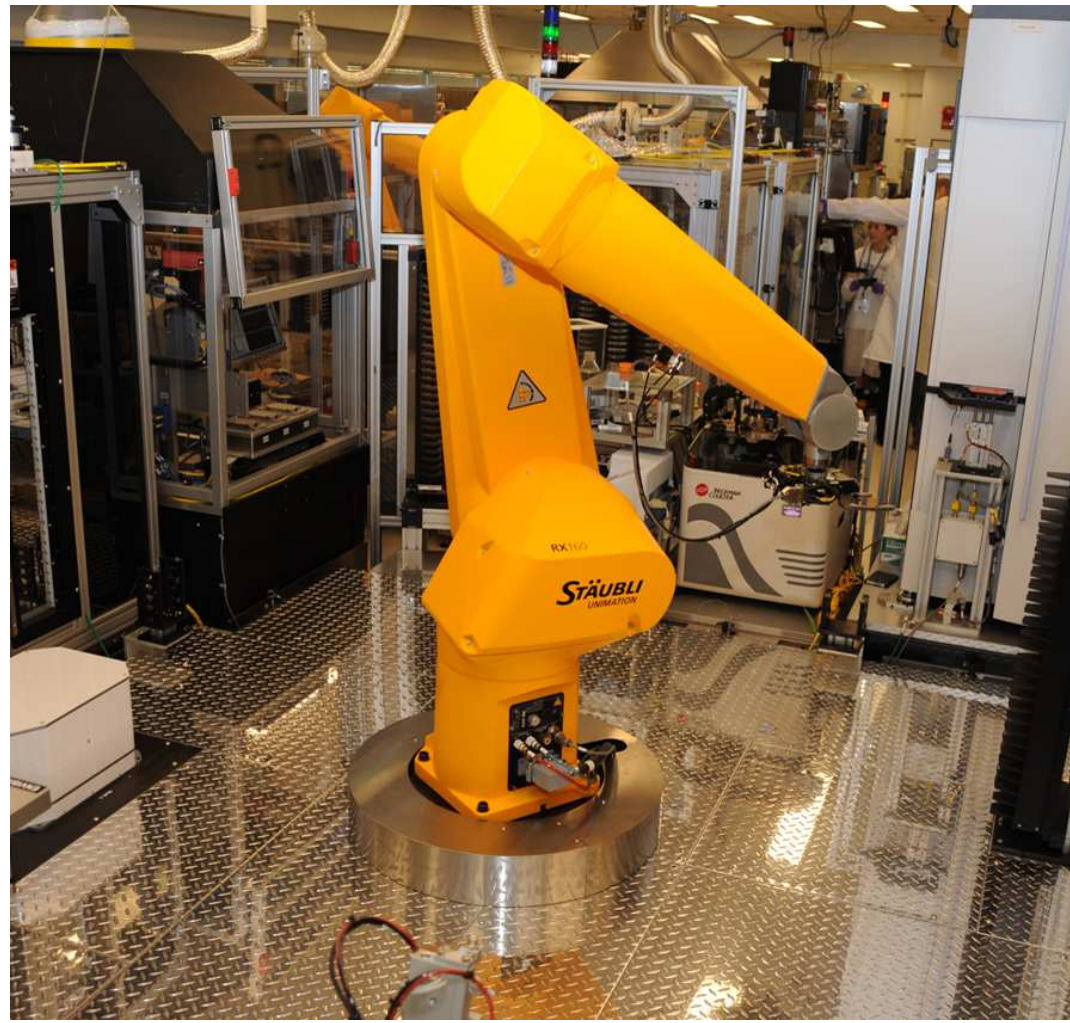
 Curve Fitting

 Structure Search

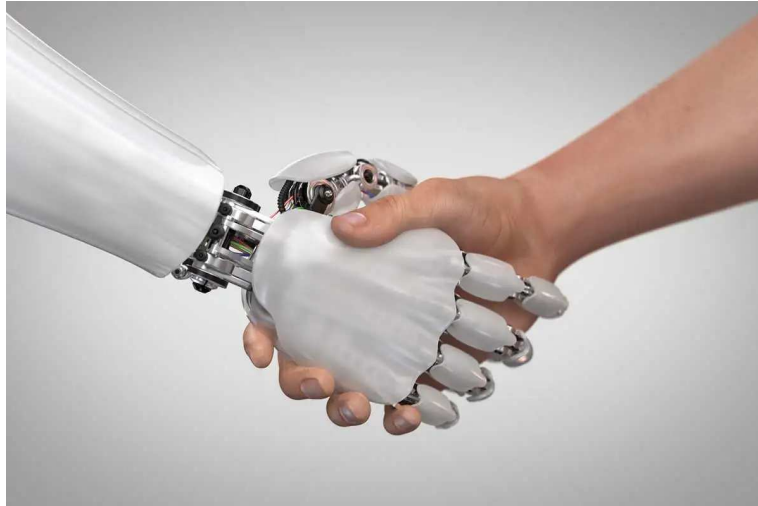
Tox21

Robot B-Roll (7:40-9:10)

<https://www.youtube.com/watch?v=CjQTVfXQ8N4&t=383s>



Toxikologie 21. století



Děkuji za pozornost 😊