

**A halembriók szerepe a molekuláris
toxikológiai vizsgálatokban
- kihívások és megoldások-**

Csenki-Bakos Zsolt

Állatmodellek a laborban



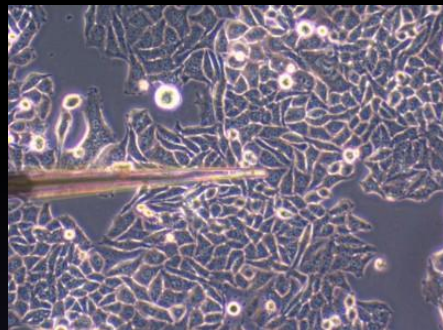
Hogyan „űszik a képbe” a hal?

- Emlős modellek (egér, patkány, nyúl stb.)
- 3R stratégia elterjedése
- Szigorodó állatvédelmi törvények
- High-throughput stratégiák alkalmazása
- Szükség volt és van alternatív modellekre



Alternatív modellek

Sejt- és
szövettenyészetek



C. elegans

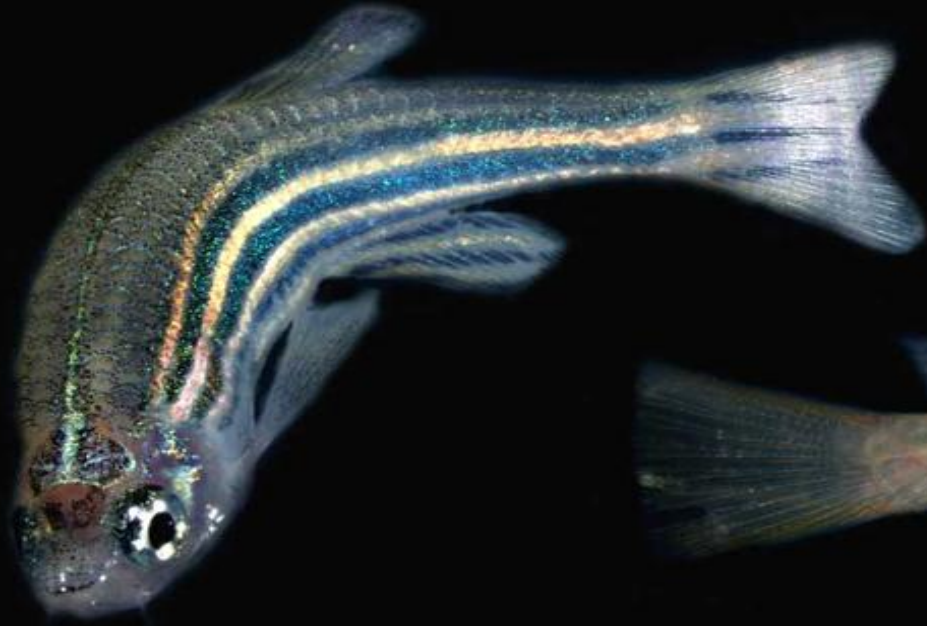


In silico modellezés



Halembriók





Danio rerio
(Cypriniformes)



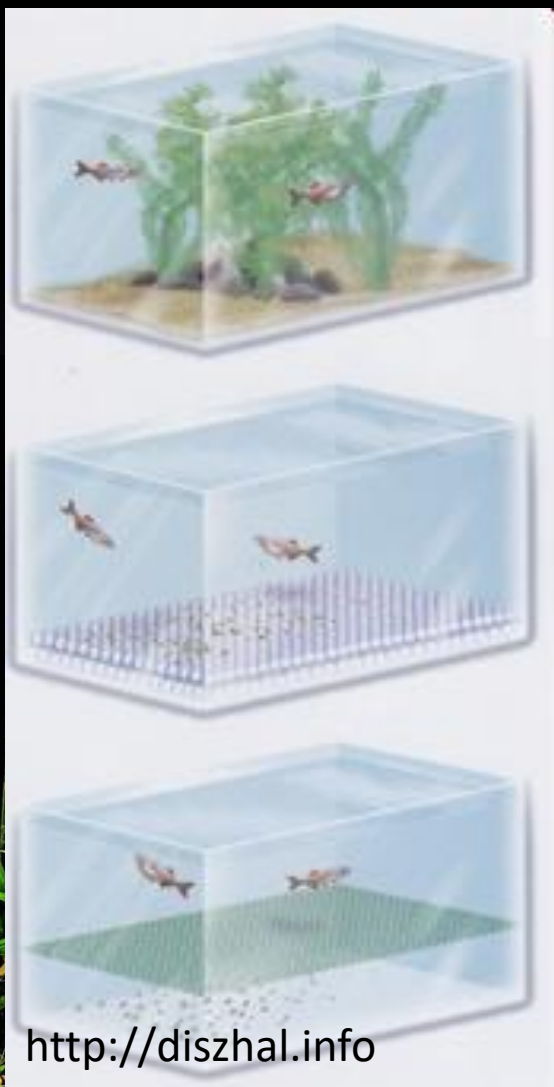
Oryzias latipes
(Belontiiformes)



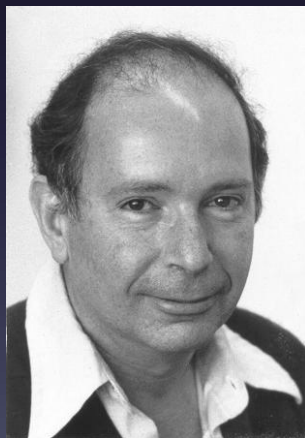
Tetraodon nigroviridis
Takifugu rubripes
(Tetraodontiformes)

Miért pont a zebradánio?

- Népszerű akváiumi díszhal
- Békés természet
- Könnyen tartható, szaporítható
- Ivari dimorfizmus



Természetesen „magyar szála” is van a történetnek



Streisinger György

Ökotoxikológia

szapo

gen

molekul

egyéb b



BEAR GRYLLS



a

atás

stan

lógia

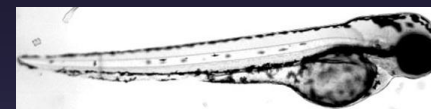
Ajánlásával

fejlődésbiológia

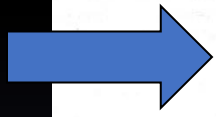
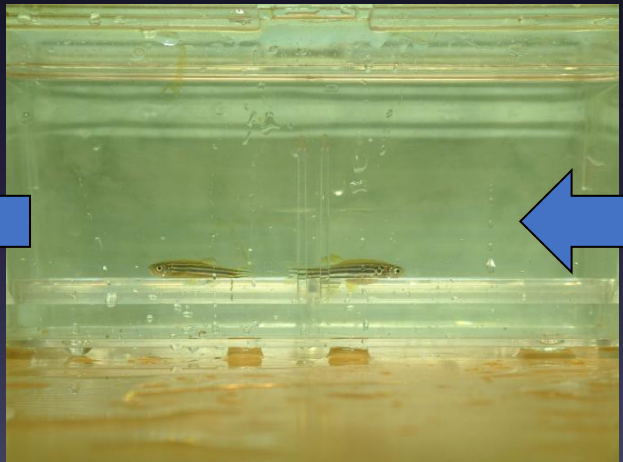
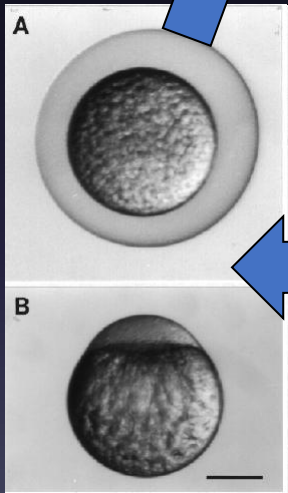
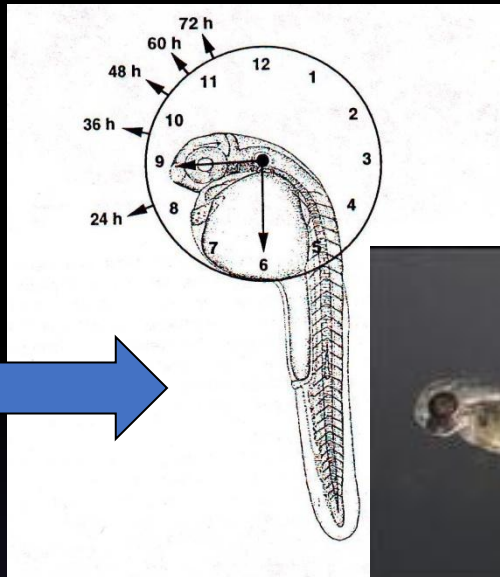
Stb...

Zebradánió mint modellállat

- OECD által javasolt toxikológiai modell
- Kis termet
- Rövid generációs idő
- Nagy mennyiségű ivartermék
- ex utero fejlődés, áttetsző embrió
- teljes genom ismerete
- a gének, receptorok, a folyamatok molekuláris biológiai és élettani háttere homológ az emlősökkel
- teljes életsiklus vízben






- **Az embriók és a lárvák a táplálkozó kor eléréséig nem minősülnek állatnak!**



A laboratóriumi modellek összehasonlítása

Toxikológiai vizsgálatok megoszlása: 80% egér/patkány; 10% zebradánio 10%-egyéb (kutya, tm, nyúl, béka stb...)

			
Tartási költségek	\$	\$\$\$	\$\$\$
Toxikológiai vizsgálatok	++/+++	++++	+++
Transzgenikus és mutáns vonalak	+++	++	++
Célzott génmódosítás	+	++++	+
Transient in vivo assay	++++	+	+
Alkalmasság átfogó screening vizsgálatokra	++	+	+

Milyen kihívásokkal kell szembenéznünk a zebradániós toxikológiai vizsgálatoknál?



- Az engedélyeztetési folyamatokban nagyobb presztízs, de állatkísérlet...
- Durva vizsgálati végpontok a szabvány tesztekénél
- Csak az állat feláldozása után figyelhetőek meg a szervi elváltozások (kivéve „Casper”)



- Kisebb elismertség az engedélyeztetési vizsgálatok során
- Adult vizsgálatokkal sokszor nem korrelálnak az eredmények (enzimkészlet még más, ikrahéj barrier)

- „Vizes expozíció” miatt a magas szervesanyag tartalmú minták vizsgálata nehéz
- Kis elfogadottság a humán betegségmodelként
- Más halfajokra mennyire ültethetőek át az eredmények?

Fenotípusos elváltozások keresésének lehetőségei zebra

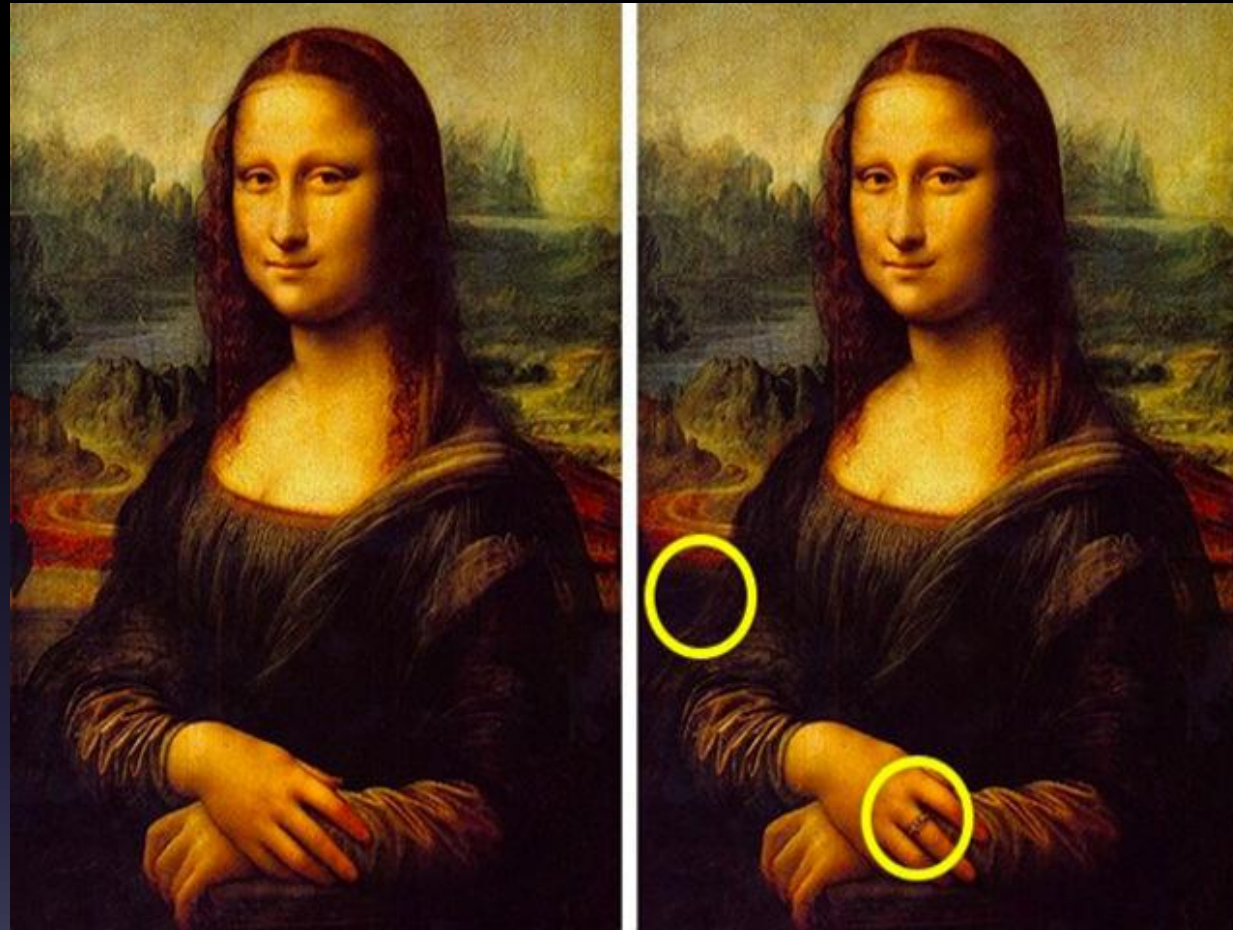
- A hal „tünetszegény” modell.
- Adult halak esetében ez általában igaz → az embriókban van lehetőség erre, de általában nem használják ki.
- OECD szabványokban is csak 3 fenotípusos végpontot írnak elő.
- Vad típusú és transzgenikus embriókat is használhatunk a vizsgálatokhoz, de gyakorlat kell hozzá.



Emberben is van „tünetszegény”,
de azért nem ez az általános



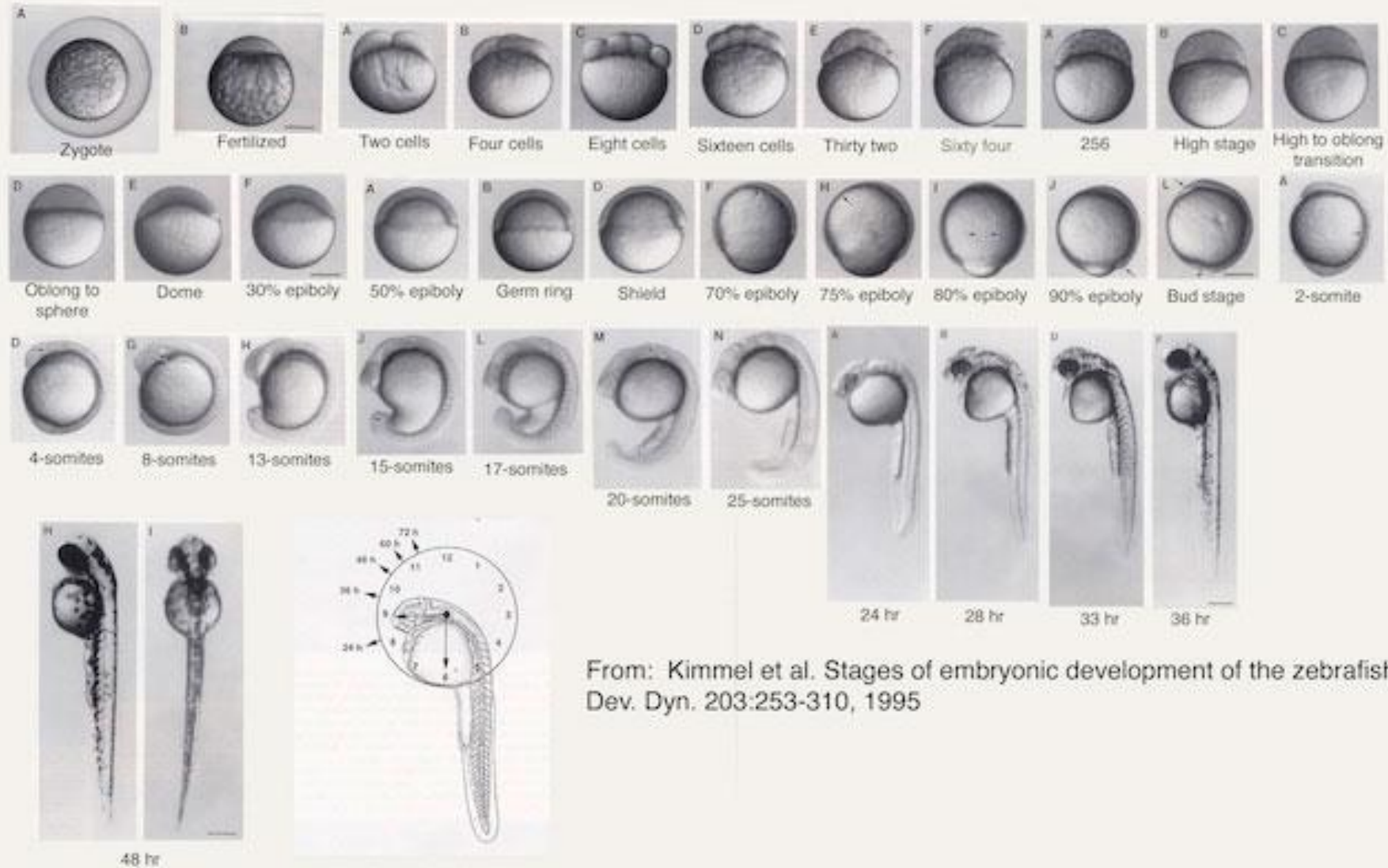
A fenotípus vizsgálat erre a játékra hasonlít:
Keresd a két különbséget a két kép között...



cosmopolitan.hu

... a nehezítés csak annyi, hogy senki nem mondja meg előre mennyi különbség lesz.

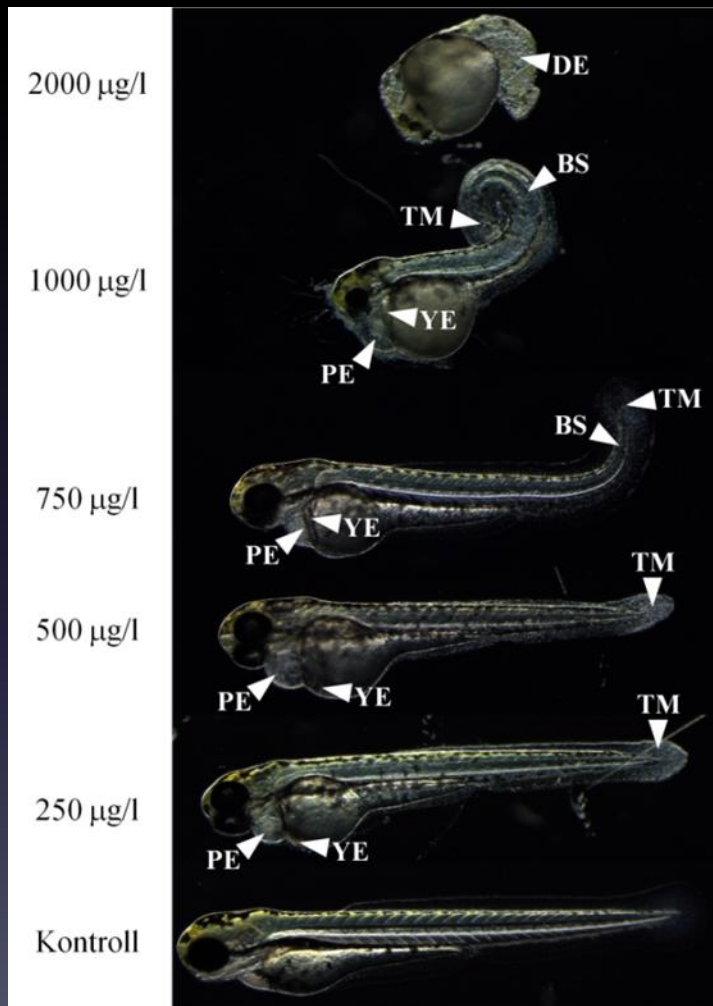
A zebradánió embriók egyedfejlődése



From: Kimmel et al. Stages of embryonic development of the zebrafish
 Dev. Dyn. 203:253-310, 1995

Ösztrogénhatású anyagokra jellemző fenotípusos rendellenességek

Zearalenon (mikotoxin)

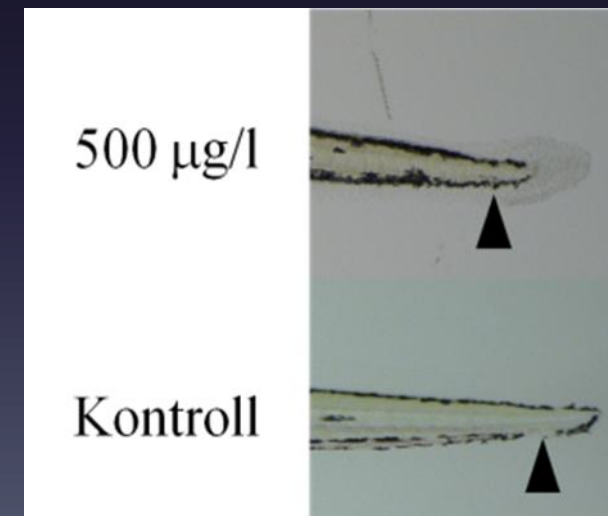


Heart and soul „-szerű” fenotípus → atipikus protein-kináz C (*aPKC*) gén működése változik „valószínűleg” (epitheliális szövetek kialakulása és szervfejlődés)

Ha ezeket a tüneteket tapasztaljuk egy új vegyületnél, akkor érdemes azt ösztrogénhatásra is tesztelni.

Szabálytalan pigmentáció

ZEA

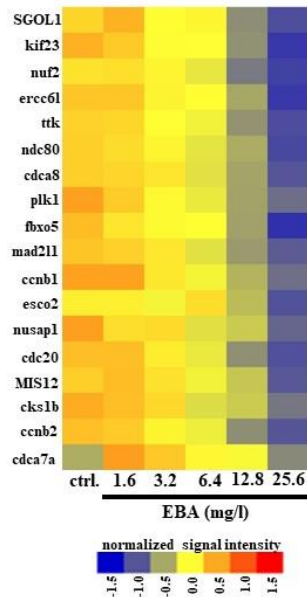
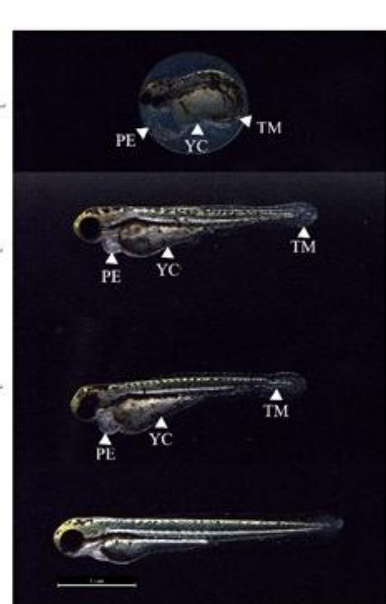
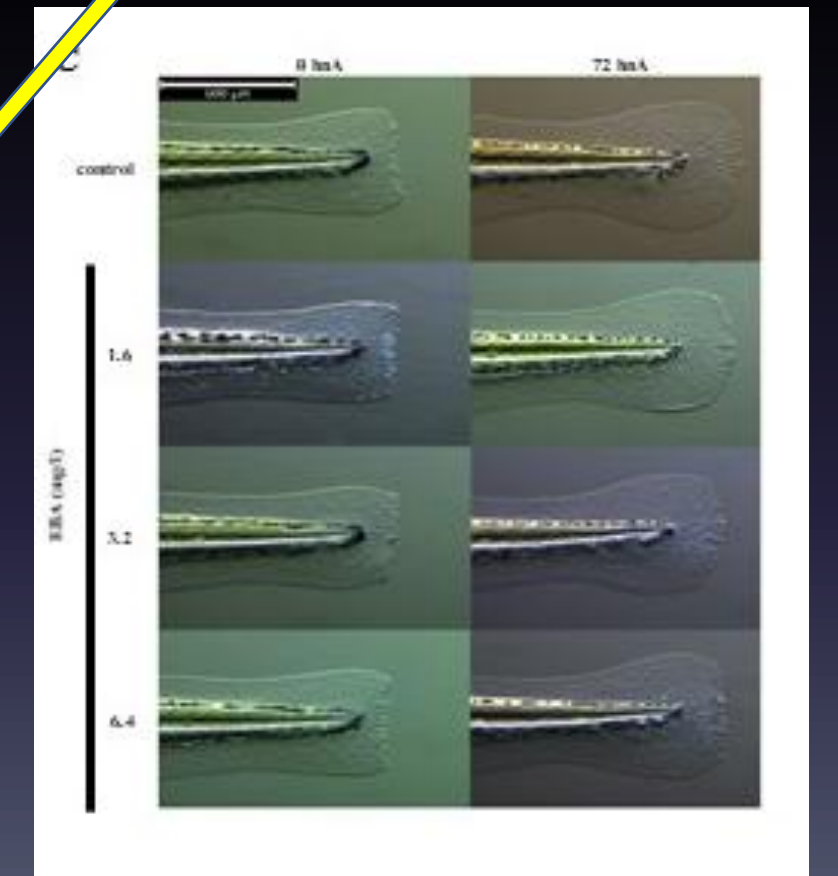
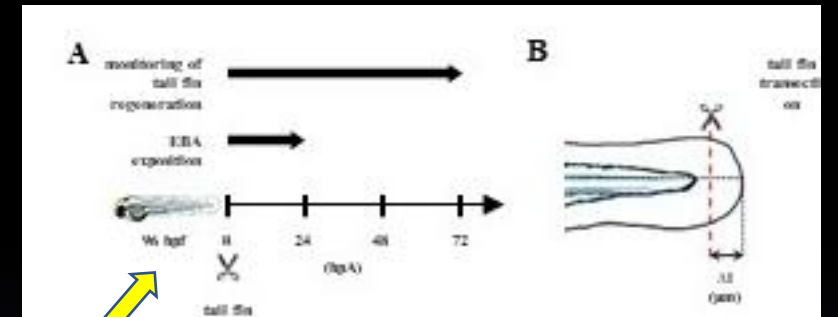


A 4-etil-benzaldehyd (EBA) hatásai

Az EBA:

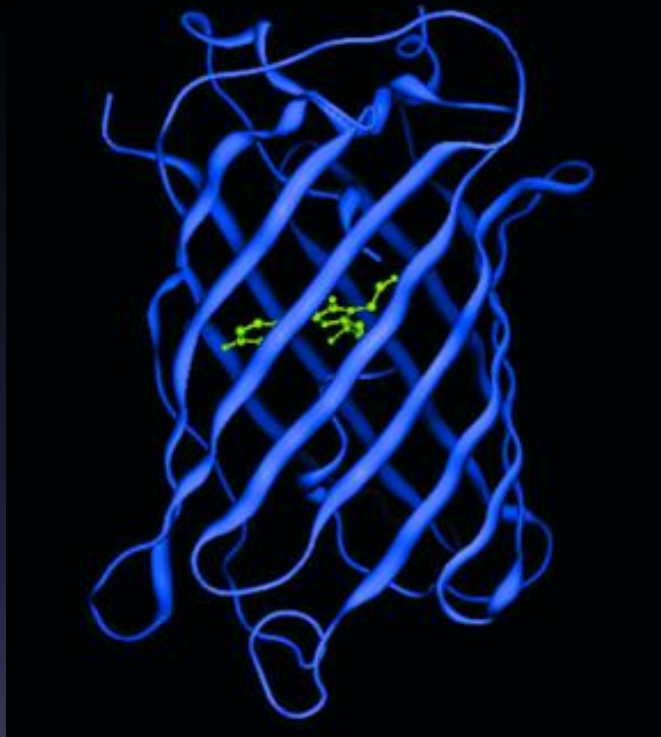
- Vízisztítási melléktermék
- Ibuprofen bomlási termék
- Aromaanyag

Génexpressziós változás alátámasztása fenotípusos vizsgálattal

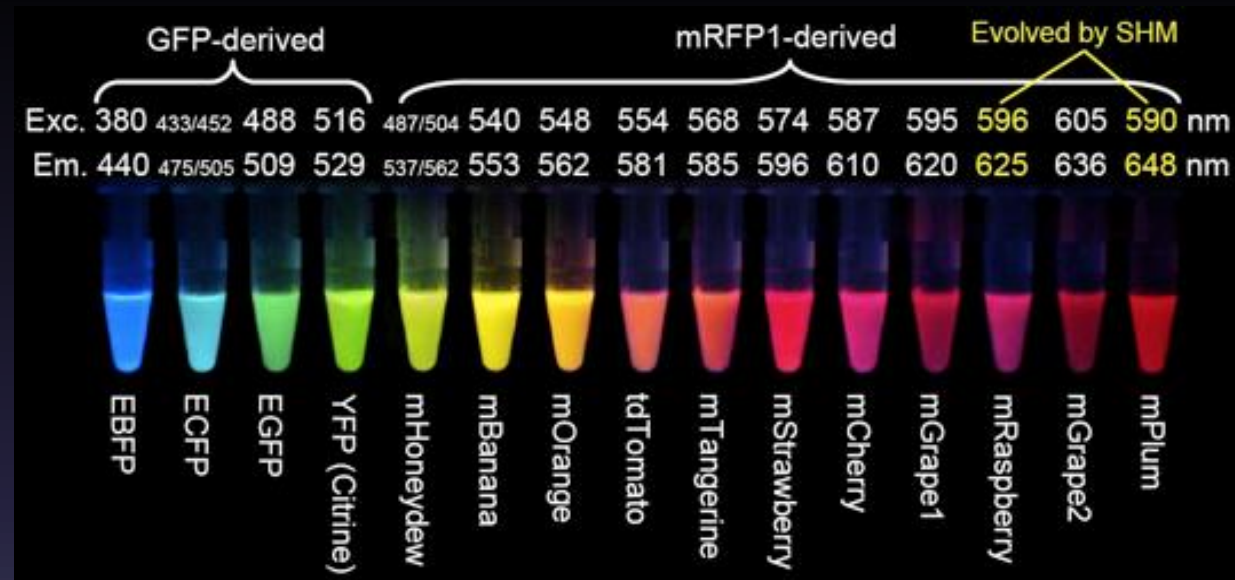


Cluster	Top 5 biological functions	p-value
Cluster 1	response to light stimulus	1,38E-06
	response to radiation	4,38E-06
	DNA repair	1,11E-05
	response to DNA damage stimulus	2,07E-05
	cellular response to stress	3,24E-05
Cluster 2	cell division	3,24E-12
	cell cycle	5,14E-10
	M phase	1,37E-07
	cell cycle phase	1,79E-07
Cluster 3	cell cycle process	1,16E-06
	response to bacterium	0,00523
	response to organic substance	0,008128
	immune response	0,014503
	cellular amino acid derivative metabolic process	0,04253
	response to inorganic substance	0,048799

Legyen LÁTHATÓ a láthatatlan - Transzgenikus vonalak-



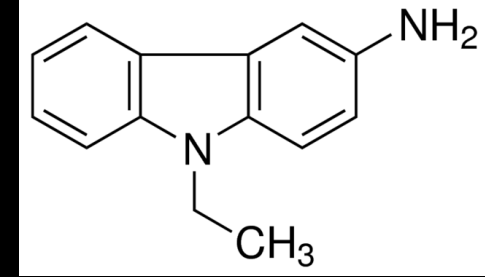
GFP fehérje modellje



Különböző színű fluoreszcens fehérjék

(ZIMMER 2010)

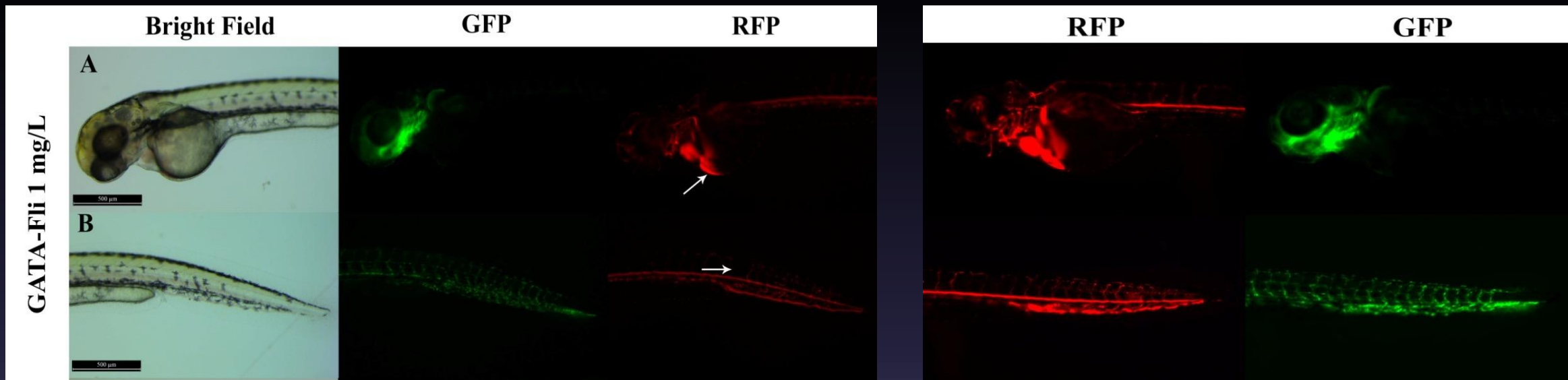
A 3-amino-9-etilcarbazol (3A9EC) hatása az érfejlődésre



Ez is víztisztítási melléktermék

A hatások vizsgálata: v.véresejt- és ér-transzgenikus vonalakon

Kontroll



Olyan hatásait írhatjuk le egy vegyületnek, amit vad típusú vonalon nehezen láthatunk.

Környezeti minták (xenoösztrogén) vizsgálatának nehézségei

Több száz molekula rendelkezik
hormonháztartást megzavaró hatással

A vegyületek szerkezeti változatossága miatt
különböző analitikai módszerek szükségesek
a kimutatásukhoz

Környezeti mintákban keverékek formájában
vannak jelen a vegyületek

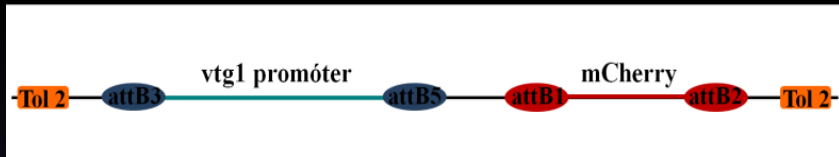
A hatás oldalról történő megközelítés egyfajta
megoldást jelenthet a problémára →
*transzgenikus biomarker modellek
használata*



hulladéklerakók (1), szennyvíztisztító telepek (2), ipari
tevékenység (3), háztartások és kórházak elfolyó vize (4),
állattartó telepek (5) szántóföldek, gabonátárolók(6)

Tg(vtg1: mCherry) ösztrogén hatást kimutató transzgenikus bioszenzor zebradánió vonal

Vitellogenin — ösztrogénfüggő → Kifejeződése májspecifikus



Kontroll

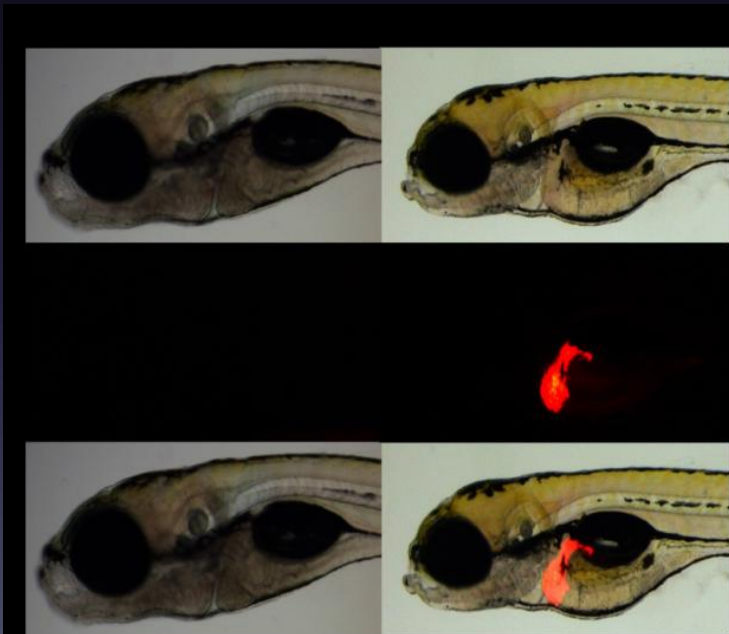
100ng/l E2

Egy élettani folyamatot teszünk láthatóvá

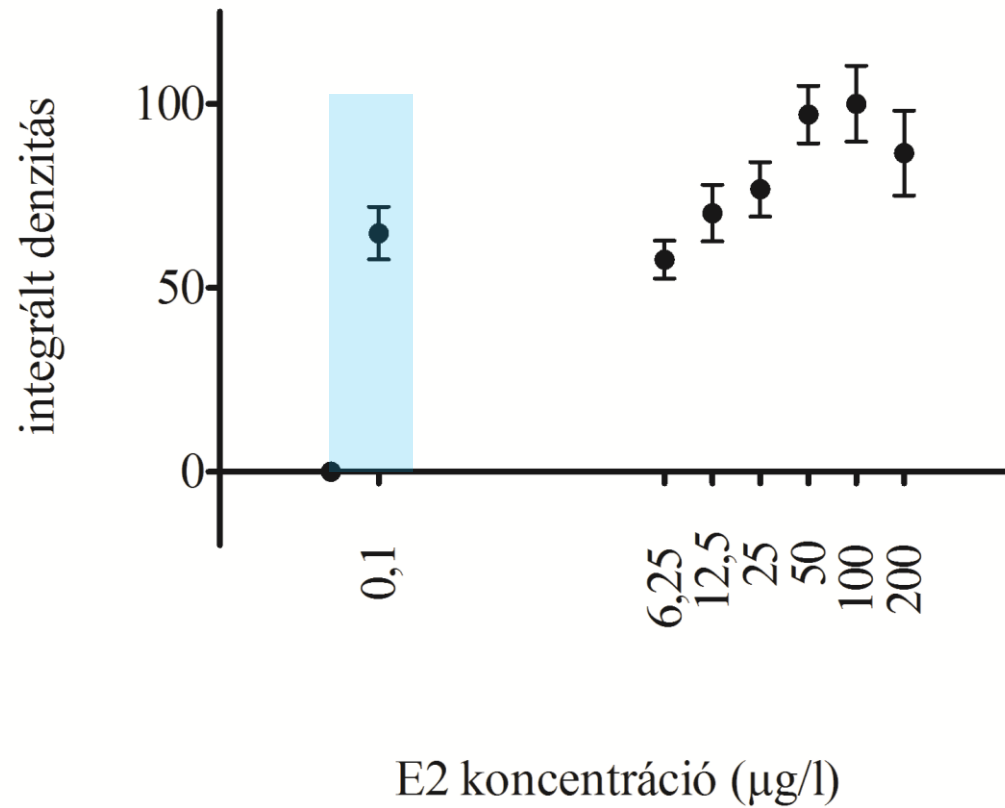
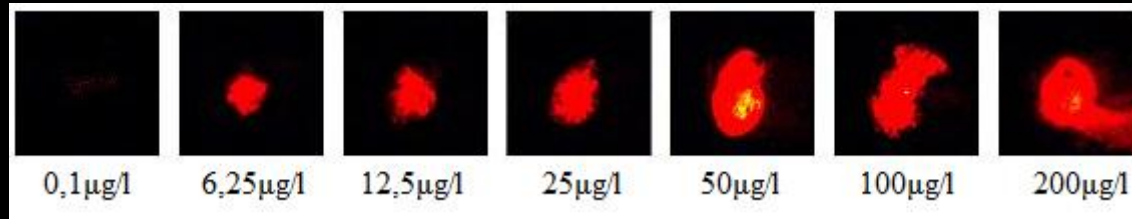
- A jel erősségének kiértékelése egyszerű, integrált denzitás érték (ID) alapján fényképről (ImageJ szoftverrel)

- A vonal elkészülte után még módszerfejlesztések és validálások szükségesek

A fluoreszcens jel megjelenését számosbiológiai tényező befolyásolja



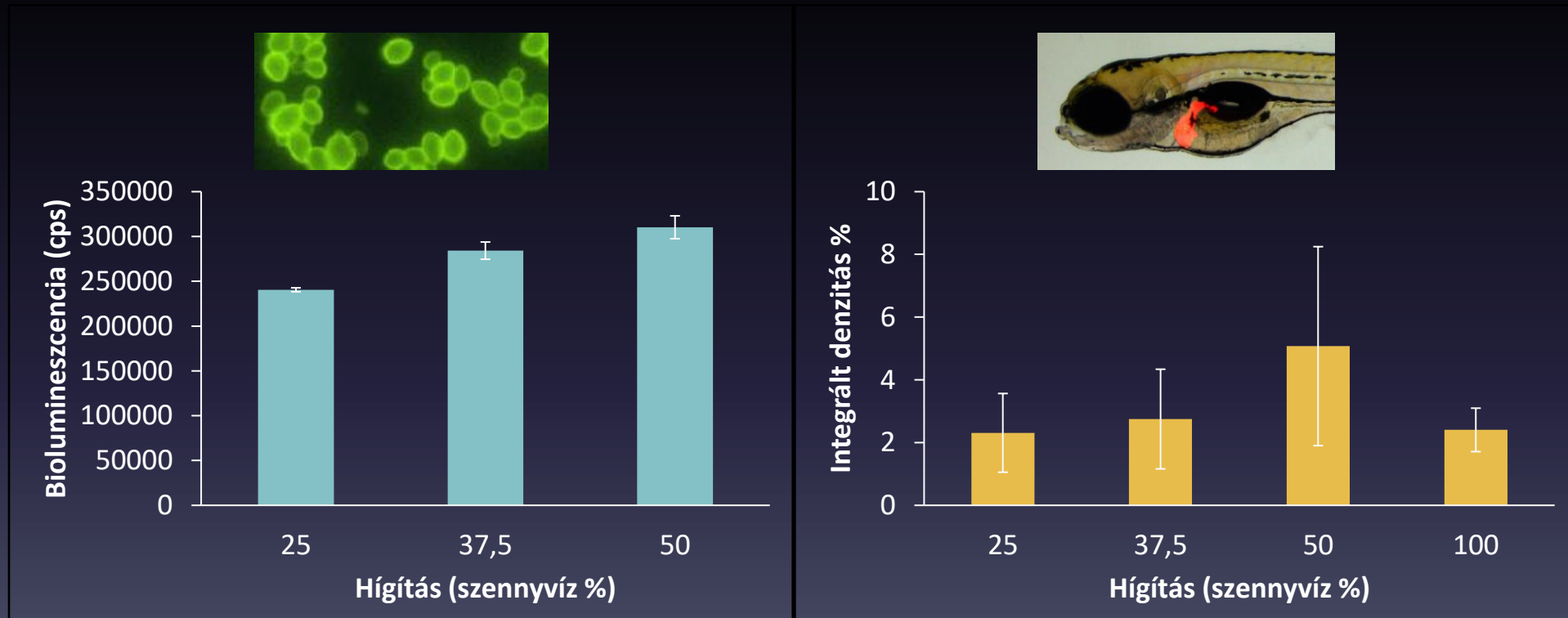
17- β - öszt radiol



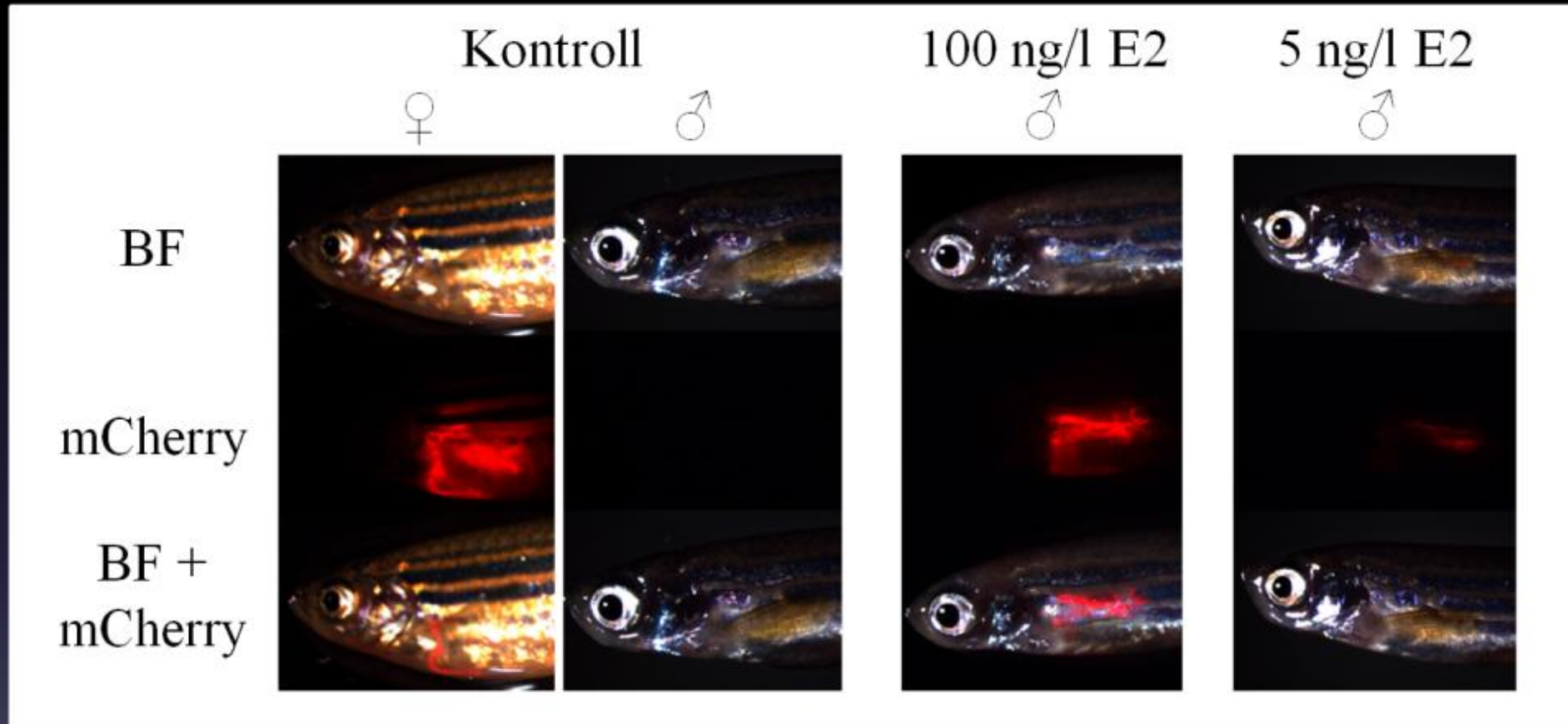
$EC_{50} = 8,304 \mu\text{g/l}$

Valóban használható környezeti mintákon?

- 5 szennyvíz minta (pelyhes, eleveniszapot is tartalmazó fázis)
- Vizsgálat az új vonallal és ösztrogénhatást kimutató élesztővel (BLYES)- validálás
- Ösztrogénhatás mindkét módszerrel 1 mintában

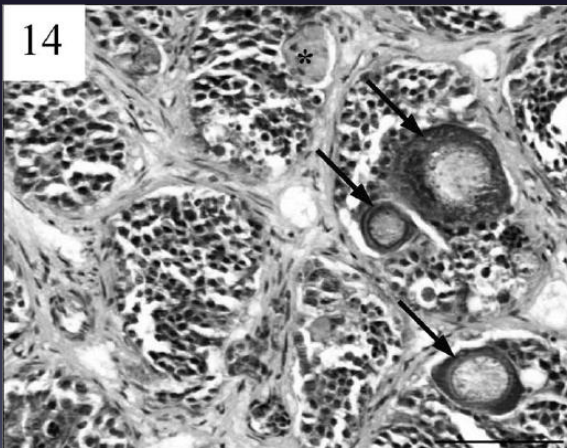


Mi a helyzet kifejlett korban?



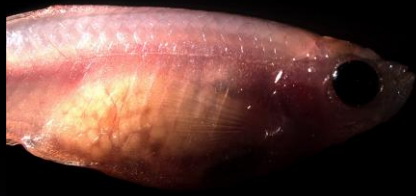
In vivo ovotestis modell kialakítása

- *Ovotesztisz*: here- és petefészekszövetet egyaránt tartalmazó belső nemi szerv
- Hím halaknál gyakran előfordul környezeti ösztrogénterhelés hatására
- Kimutatása szövettannal → az állat feláldozásával jár

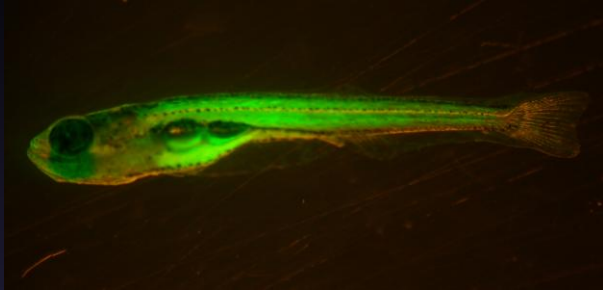


Stentiford et al. 2003

A CSILI (Chili) vonal



Casper: $mitfa^{w2/w2}; mpv17^{a9/a9}$

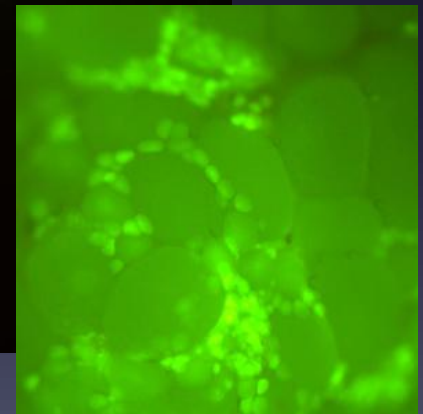
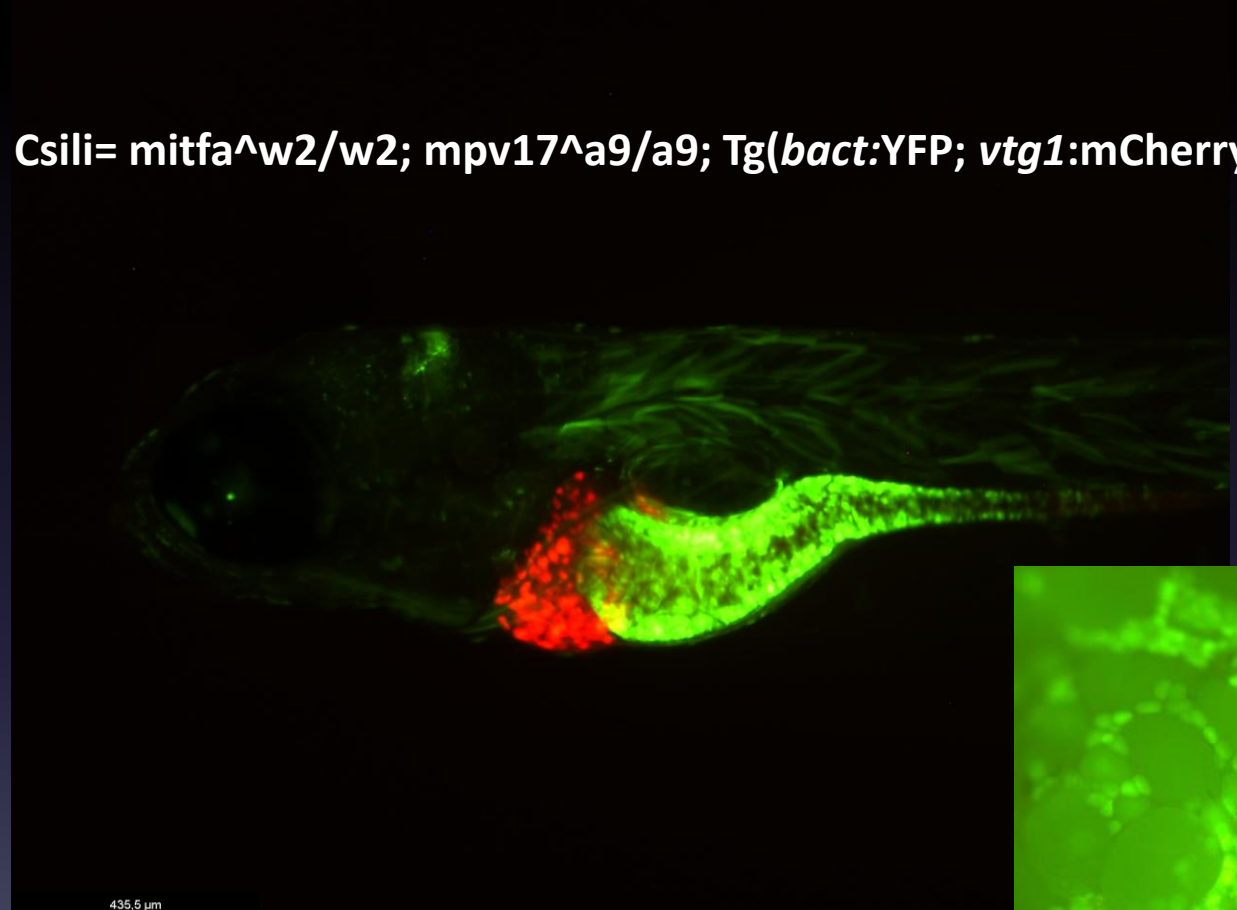


Tg(*bact*:YFP)



Tg(*vtg1*:mCherry)

Csili= $mitfa^{w2/w2}; mpv17^{a9/a9}; Tg(bact:YFP; vtg1:mCherry)$



Fejleszthetünk élőhelyeket toxikológiai vizsgálatok segítségével? (amikor felül kell vizsgálnunk a modellünk eredményeit...)

❖ Mintavételi pontok

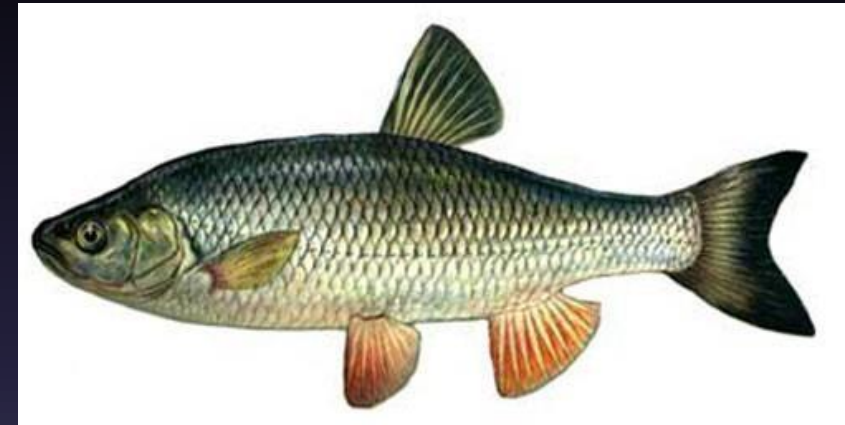


- 1 - Kerekudvar híd felett
- 2 - Kerekudvar híd
- 3 - Kerekudvar híd alatt



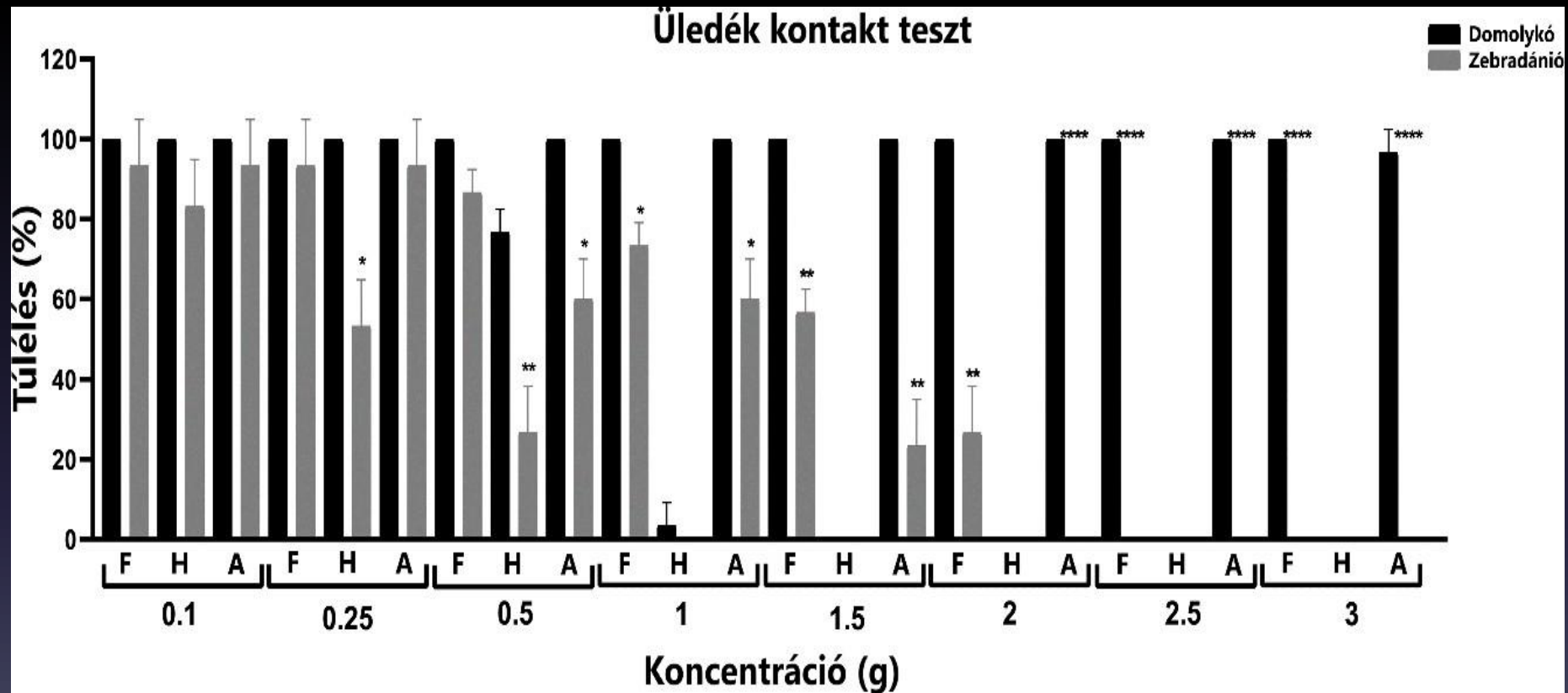
❖ Zebradánió (*Danio rerio*)

VS.



❖ Domolykó (*Squalius cephalus*)
Üledék kontakt vizsgálat (vizes fázis)
Üledék kivonat vizsgálat (oldószeres fázis)

Üledék kontakt teszt eredményei

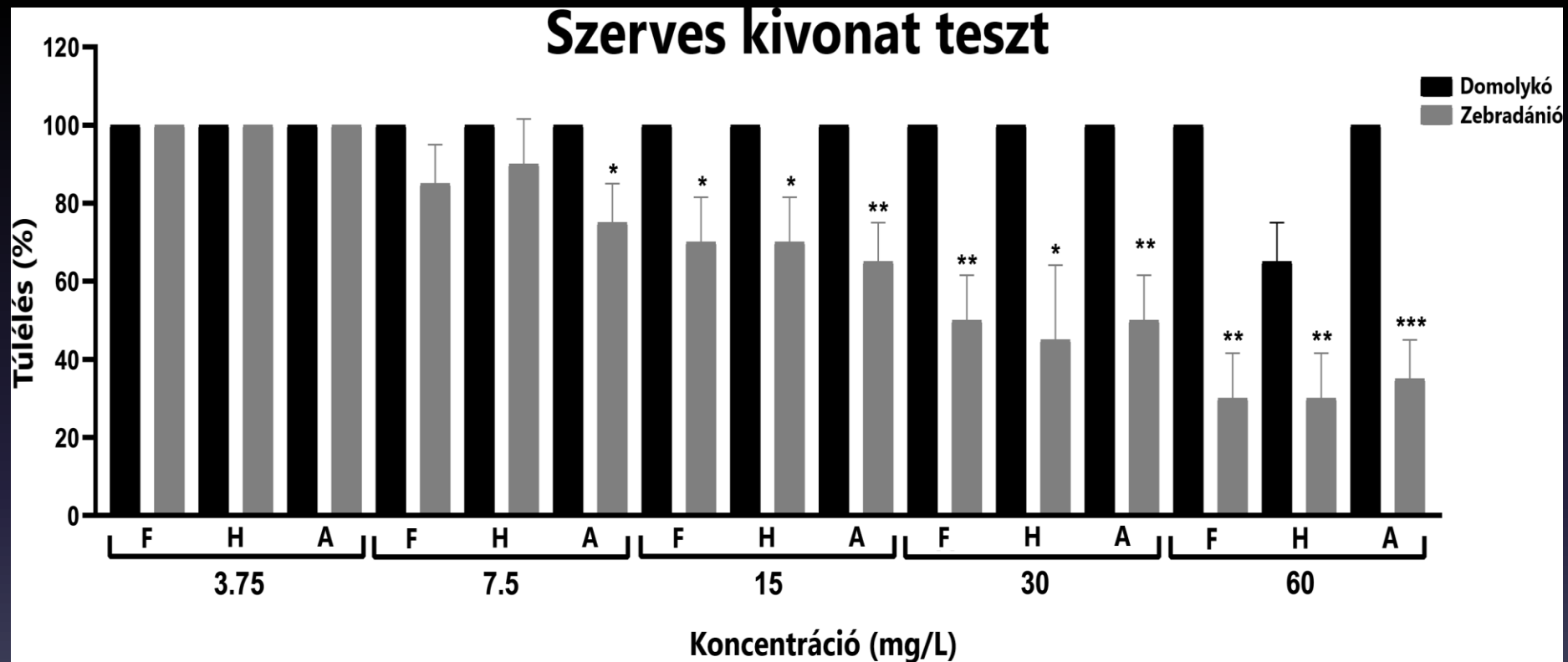


F - Kerekudvar híd felett

H - Kerekudvar híd

A - Kerekudvar híd alatt

Szerves kivonat teszt eredményei



F - Kerekudvar híd felett

H - Kerekudvar híd

A - Kerekudvar híd alatt

A domolykó is alkalmas modell, de...



Kontroll



Kezelt

Hogyan vizsgáljunk magas szervesanyag tartalmú mintákat?

Magas szervesanyag tartalmú oldatok tesztelésére alkalmas módszerek jellemzői:

- Expozíció kezdete 4 - 128 sejtes állapotban (termékenyülést követő 4. órában az embriók túlélése magasabb (Geller és Heinrichsdorf 2001))
- Az embriók méretéhez viszonyítva nagy térfogatban kell elvégezni
- Vizsgálati anyagot hígítani kell — nagy mennyiségű hulladék keletkezik
- Az expozíció 48- 120 óra, az előírt vizsgálati végpontok száma csekély
- Oxigénhiány léphet fel a tesztközegben



Toxikológiai vizsgálatok halakon mikroinjektálás segítségével - a kezdetek-

Szivárványos pisztráng embrió	1994	Indole-3-carbinol, AFB1	indole-3-carbinol antikarcinogenitás vizsgálata	Dashwood et al.
Zebradánió, medaka embrió	1997	HCB, TCDD, toluene, benzene, ezek keveréke	kardiovasculáris defektusok	Mizell és Romig
Ezüstlazac embrió	1988	AFB1	májkárosodás	Black et al.
Medaka, guppi lárva	1988	Benzo(a)pyrene	máj karcinogenitás	
Szivárványos pisztráng embrió	1994	PAH, PCB	EROD aktivitás és mortalitás	Engwall et al.
Zebradánió embrió	1999	4-chloroaniline	máj és kopoltyú citopatológia és regeneráció	Burkhardt-Holm et al.
Szivárványos pisztráng embrió	1988	Benzo(a)pyrene	karcinogenitás vizsgálat	Black et al.
Medaka embrió	1995	pentachlorophenol	PCP hatás vizsgálat	Helmstetter et al.
Szivárványos pisztráng embrió	1998	AFB1, klorofillok	Klorofillok kemopreventív hatás az aflatoxinra	Dashwood et al.
Szivárványos pisztráng embrió	1999	Arzén	máj hiperplázia és vese fibrózis	Kotsanis és Iliopoulou-Georgudaki

Miért nem terjedt el a kezdeti próbálkozások után?

- Magas mortalitási értékek jelentkeztek még a kontroll csoportok esetén is
- Időigényes módszer tartották
- A kapott eredmények értékelése nehézkesnek tűnt — korrekció a kontroll csoport mortalitási eredményeivel.

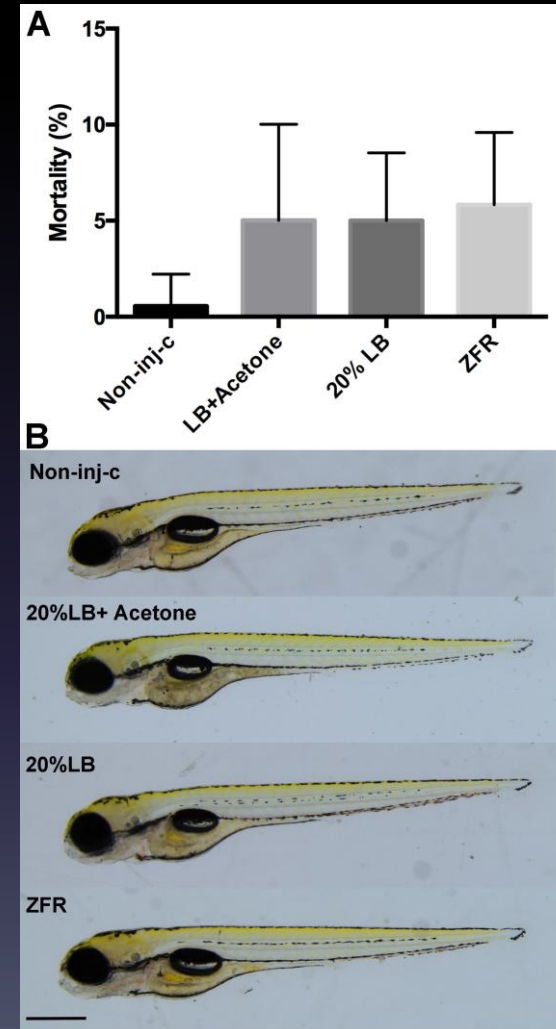
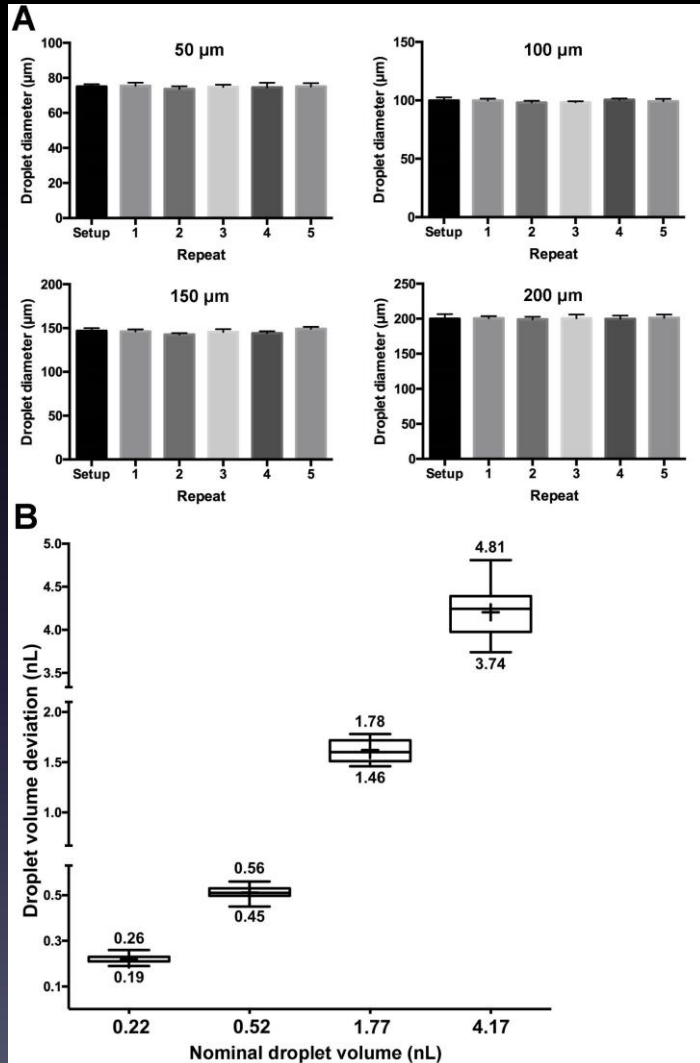
Mivel érvelnek manapság a módszer ellen? (Hátrányok)

- Nem alkalmazható dózis-hatás összefüggés meghatározására
- A szik kiáramolhat az injektálás helyén
- Kicsi cseppméret választása a kapilláris eltömődését okozhatja
- Nem tartható a csepp mérete az injektálás során
- Nem természetközeli vizsgálat

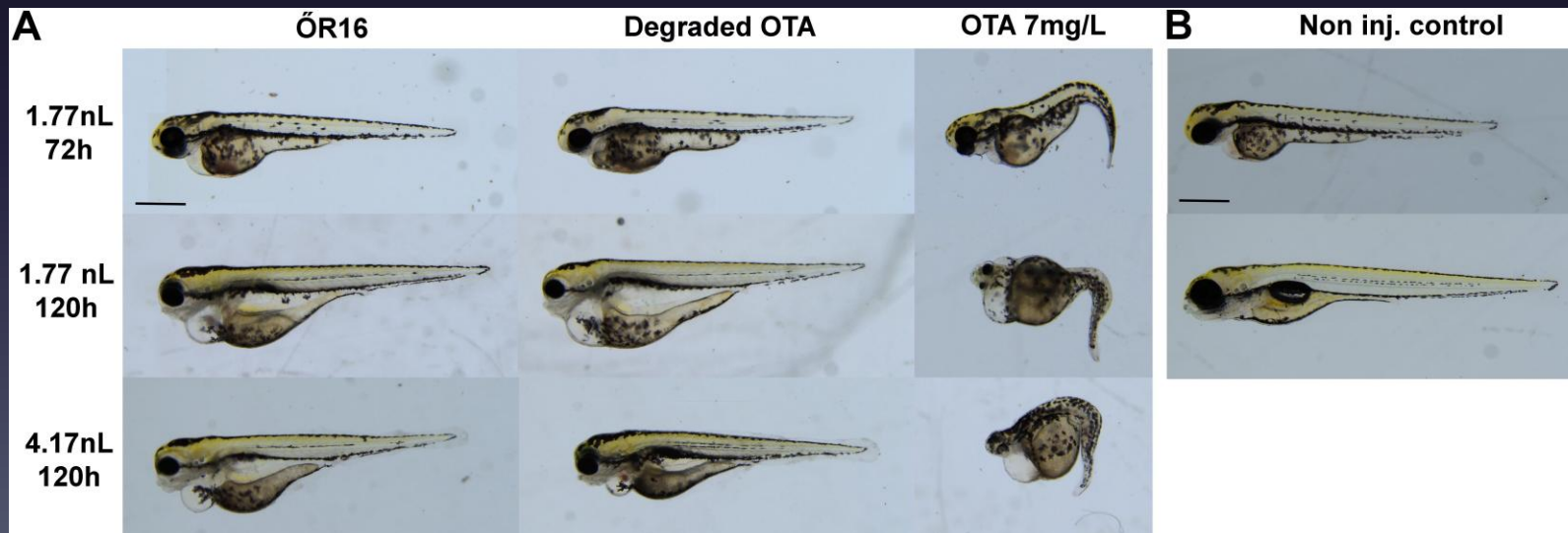
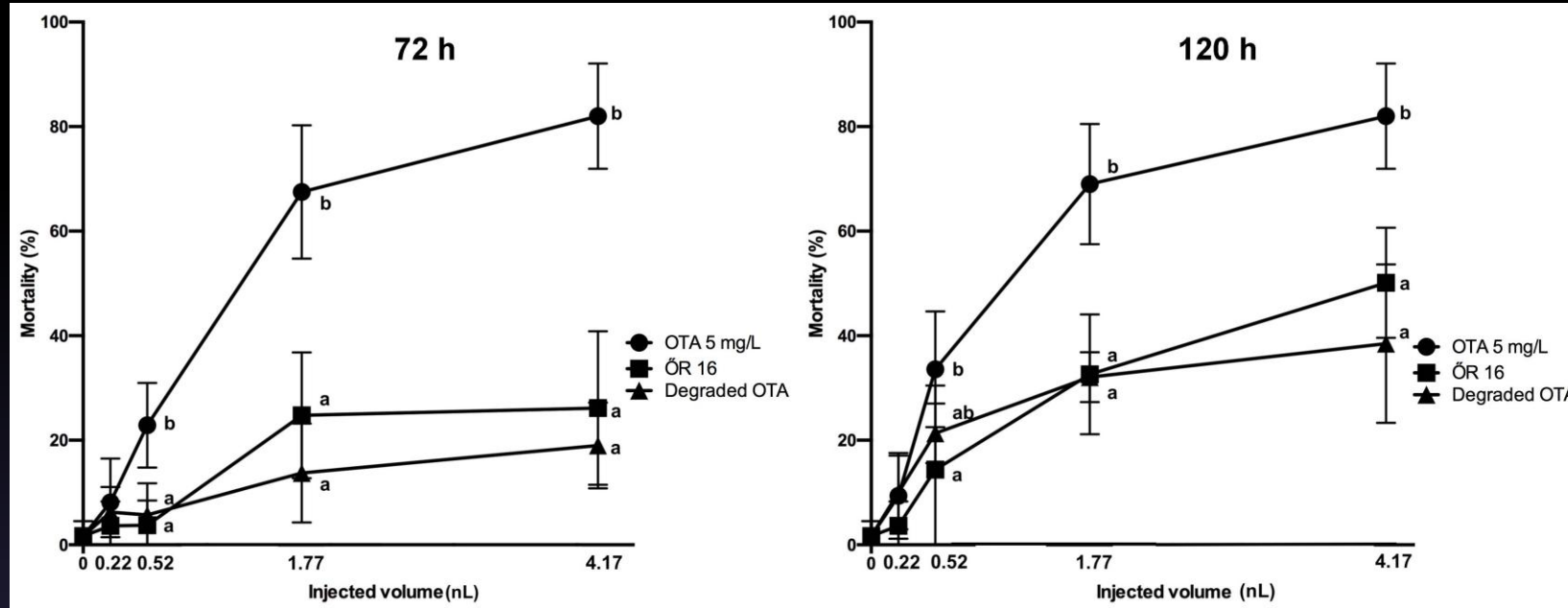
Bizonyítsuk be, hogy mégis jó módszer, a többit meglátjuk...

Koncentrációtartó-e a módszer? (IGEN)

Van-e negatív hatása önmagának az injekciónak? (NINCS)



Gyakorlati felhasználás: Toxinbontó mikroorganizmusok minősítése 3 lépésben



Állattartó telepek környezeti terhelése ösztrógenhatás szempontjából

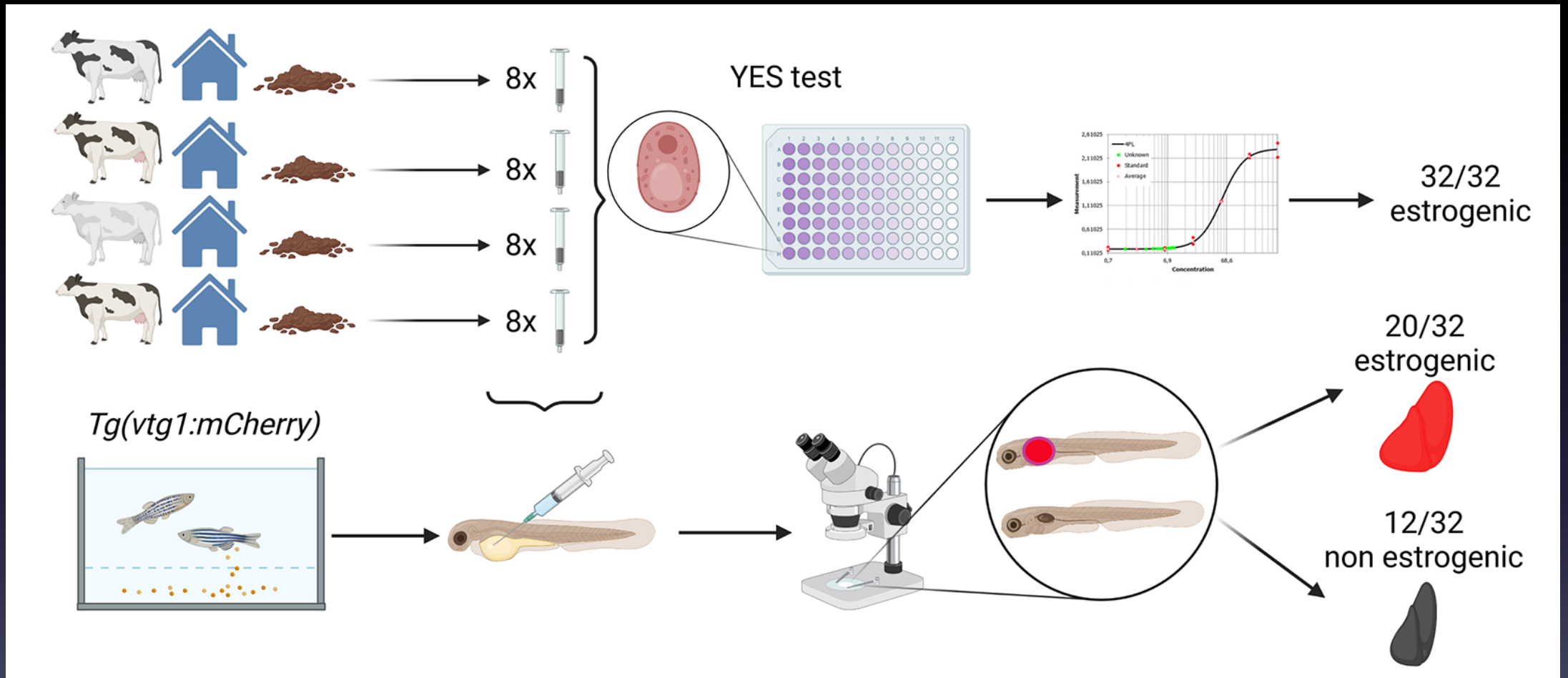
Az állattartó telepeken jelentős mennyiségű trágya keletkezik, melyet szerves trágyaként szívesen használnak fel a növénytermesztésben.

A mezőgazdasági hulladékok, például a szarvasmarha-gazdaságok trágyája, azonban a természetes és szintetikus szteroid ösztrogének és nem szteroid típusú ösztrogénvegyületeknek is a forrásai.

Egy telep ösztrogén kibocsátását (takarmányozás, életkor, állomány nagyság, vemhes állatok száma stb.), valamint az ösztrogénhatású anyagok környezeti sorsát is számos tényező befolyásolja (pl. talaj tulajdonságai, mikrobiológiai tényezők, időjárás stb.).

A trágyában nem csak ösztrogénhatású vegyületek találhatóak és ezek befolyásolhatják a hatásukat.

Na vizsgáljuk csak meg halon is...



Állattartó telepek környezeti terhelésének vizsgálata ösztrogénhatás szempontjából

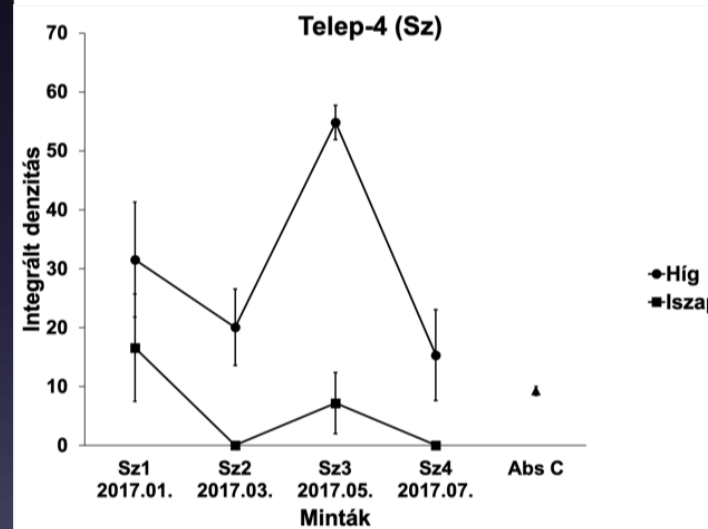
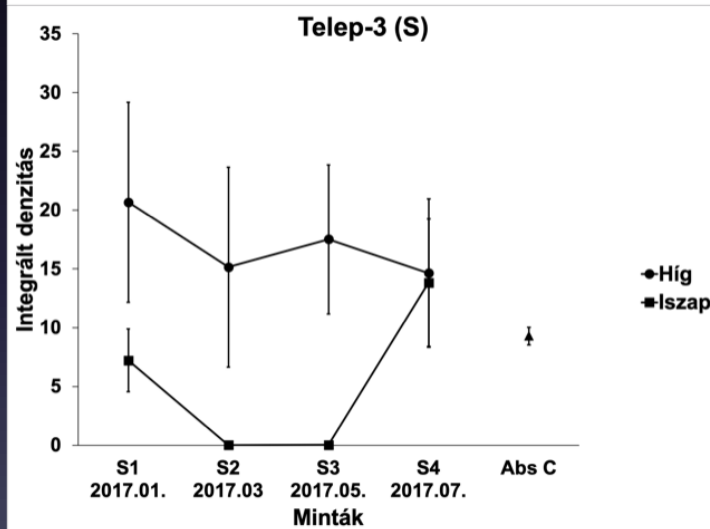
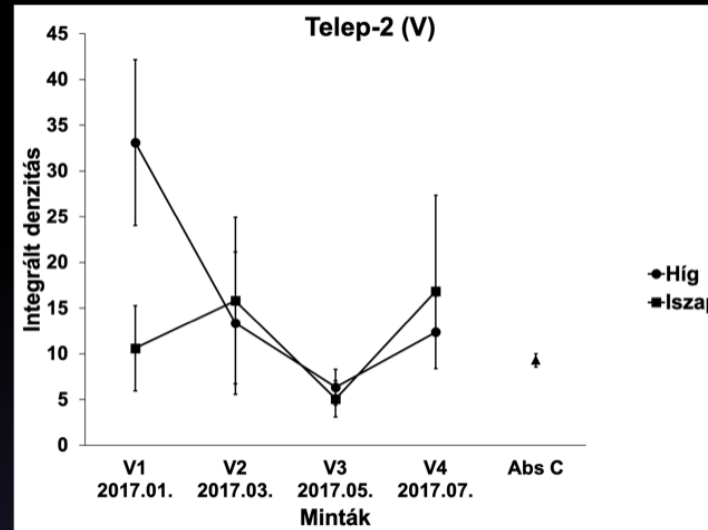
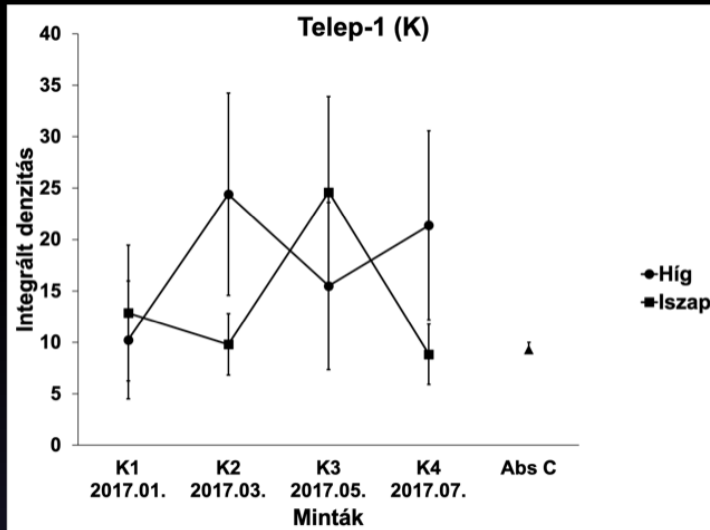
Ösztrogénhatás igazolása 20 minta estében (összes mintaszám:32)

4 telepről mintái

Magas szervesanyagtar talmú minta → mikroinjektálás sal vizsgáltuk

A módszer kialakításához és validálásához YES teszt

A YES tesztben minden minta pozitív volt

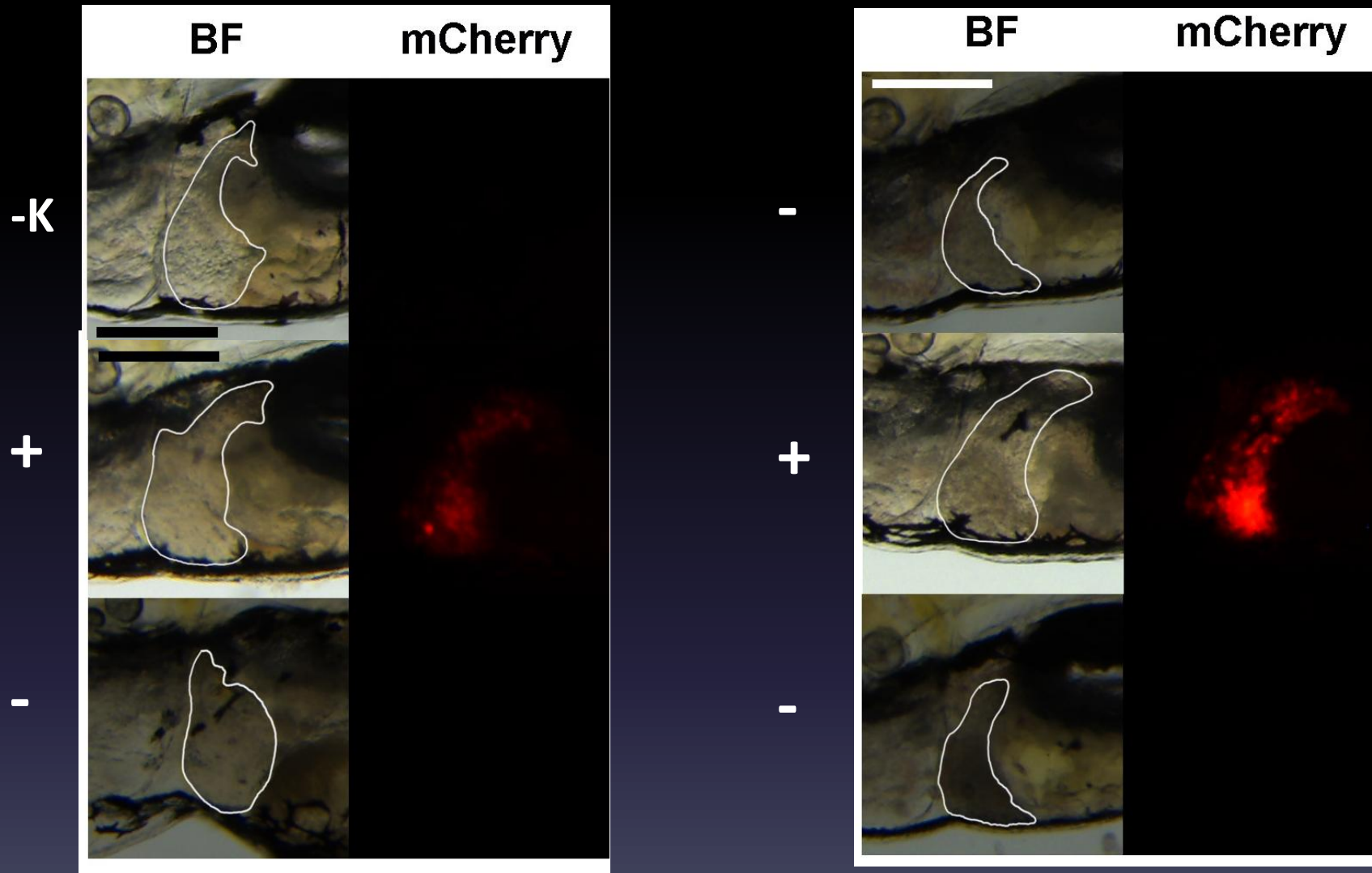


A hígtrágya termőtalajra történő kijuttatása kockázatot rejthet magában ösztrogénhatás szempontjából.

Trágyakezelési eljárásokat tesztelhetünk a vizsgálattal

Elemzés egy „Cut-off formula” segítségével: (MEAN + 3 x SD) of negative controls Classen et al. (1987)

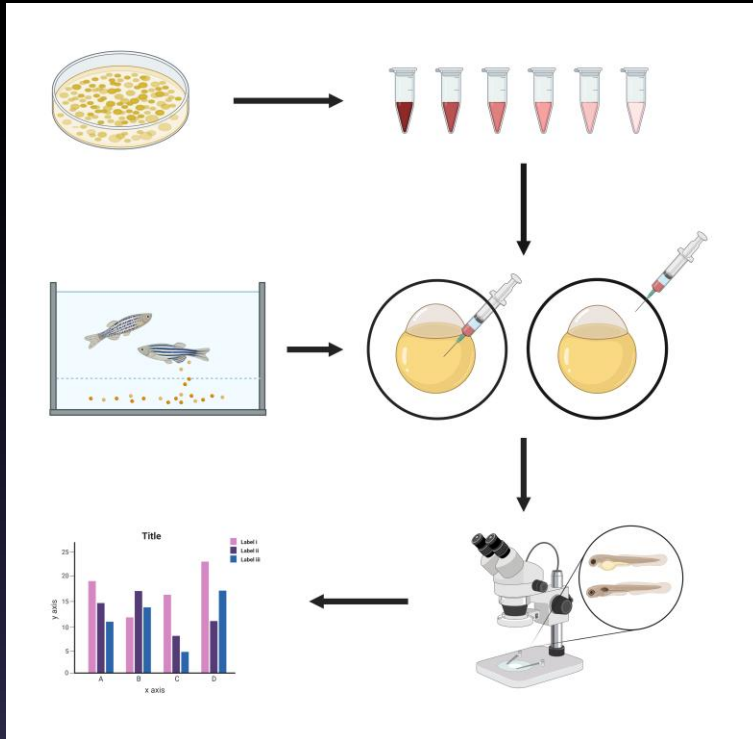
A klasszikus és a fluoreszcens megfigyelések találkozása



A minták hepatotoxikus hatása befolyással van az ösztrogénhatás kimutatására

Mire jó még az injekció?

Környezeti baktériumok virulenciájának mérése



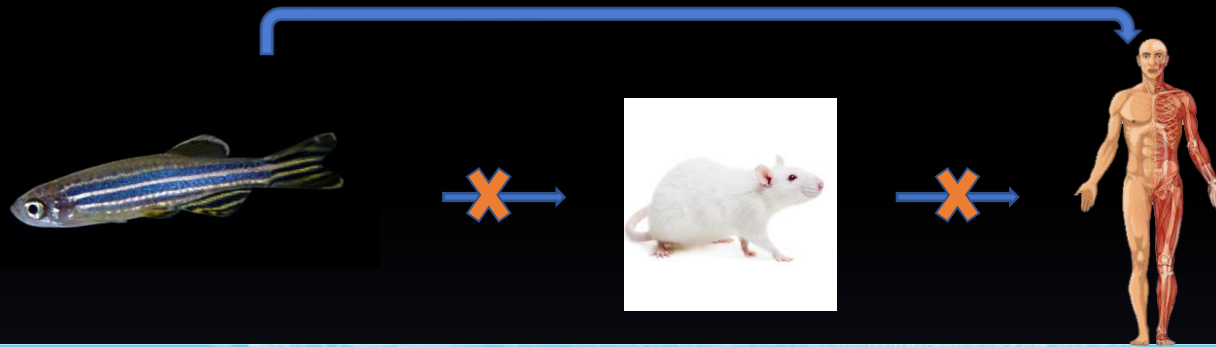
Virulenciavizsgálatok eredményei a túlélő egyedek %-a alapján

Galleria m.	P.e. törzs	N (150)	PV (150)	átlag (150)	N (200)	PV (200)	átlag (200)	összes átlag
95	P14	3	46	24,5	0	36	18	21,25
5	P66	17	56	36,5	3	33	18	27,25
75	P9	76	74	75	46	76	61	68
90	P18	0	53	26,5	0	43	21,5	24
90	P43	34	82	58	16	70	43	50,5
5	P114	66	94	80	34	86	60	70
70	P135	36	80	58	18	70	44	51
0	P144	78	76	77	68	72	70	73,5
0	P164	76	78	77	68	72	70	73,5
30	P177	76	88	82	70	14	42	62
-	P204	86	80	83	82	86	84	83,5
-	P206	98	90	94	94	88	91	92,5
-	KP	54	92	73	24	92	58	65,5
-	AT	66	98	82	26	94	60	71

virulencia kategória	túlélési arány
avirulens	100-75%
közepesen avirulens	74-50%
közepesen virulens	49-25%
virulens	24-0%

Hogyan növeljük a zebradánió modell elfogadottságát növekedése

tesztelt vegyületek eredményeinek közvetlen felhasználása klinikai tesztelésben



doi:10.1093/brain/aww342

BRAIN 2017; 140; 669–683 | 669

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

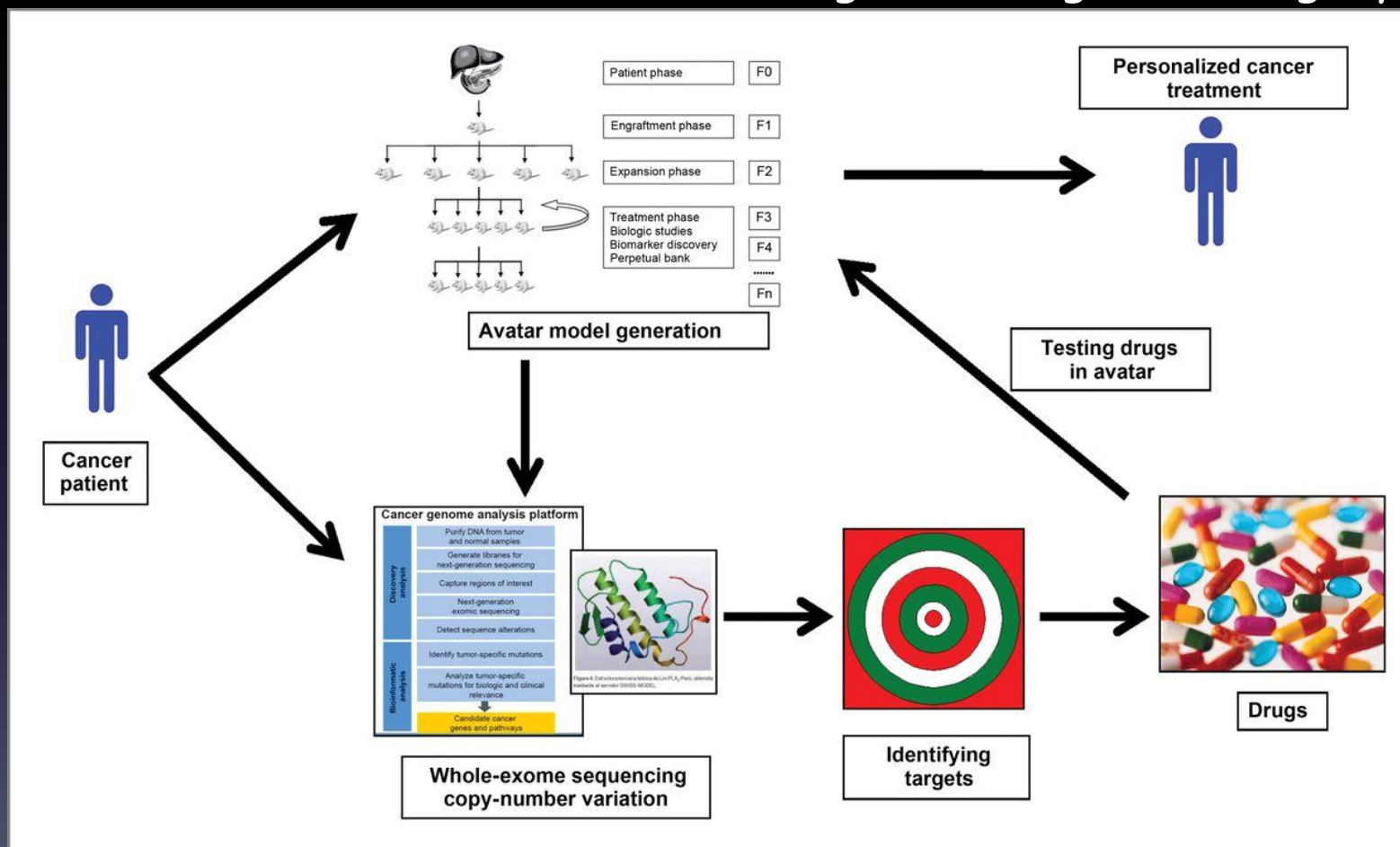
Clemizole and modulators of serotonin signalling suppress seizures in Dravet syndrome

Aliesha Griffin,¹ Kyla R. Hamling,¹ Kelly Knupp,² SoonGweon Hong,³ Luke P. Lee³ and Scott C. Baraban¹

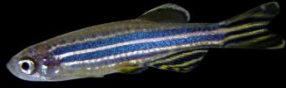
Dravet syndrome is a catastrophic childhood epilepsy with early-onset seizures, delayed language and motor development, sleep disturbances, anxiety-like behaviour, severe cognitive deficit and an increased risk of fatality. It is primarily caused by *de novo* mutations of the *SCN1A* gene encoding a neuronal voltage-activated sodium channel. Zebrafish with a mutation in the *SCN1A* homologue recapitulate spontaneous seizure activity and mimic the convulsive behavioural movements observed in Dravet syndrome. Here, we show that phenotypic screening of drug libraries in zebrafish *scn1* mutants rapidly and successfully identifies new therapeutics. We demonstrate that clemizole binds to serotonin receptors and its antiepileptic activity can be mimicked by drugs acting on serotonin signalling pathways e.g. trazodone and lorcaserin. Coincident with these zebrafish findings, we treated five medically intractable Dravet syndrome patients with a clinically-approved serotonin receptor agonist (lorcaserin, Belviq®) and observed some promising results in terms of reductions in seizure frequency and/or severity. **Our findings demonstrate a rapid path from preclinical discovery in zebrafish, through target identification, to potential clinical treatments for Dravet syndrome.**

Személyre szabott gyógyászat -Avatar modellek-

A módszer lényege, hogy rákbeteg páciensek tumorából izolált sejteket ültetnek be egér/patkány egyedekbe. Miután a tumor kialakult bennük, kikísérletezhetik rájuk a legmegfelelőbb gyógyítási módszert. A módszer működik, azonban igen költséges és időigényes.



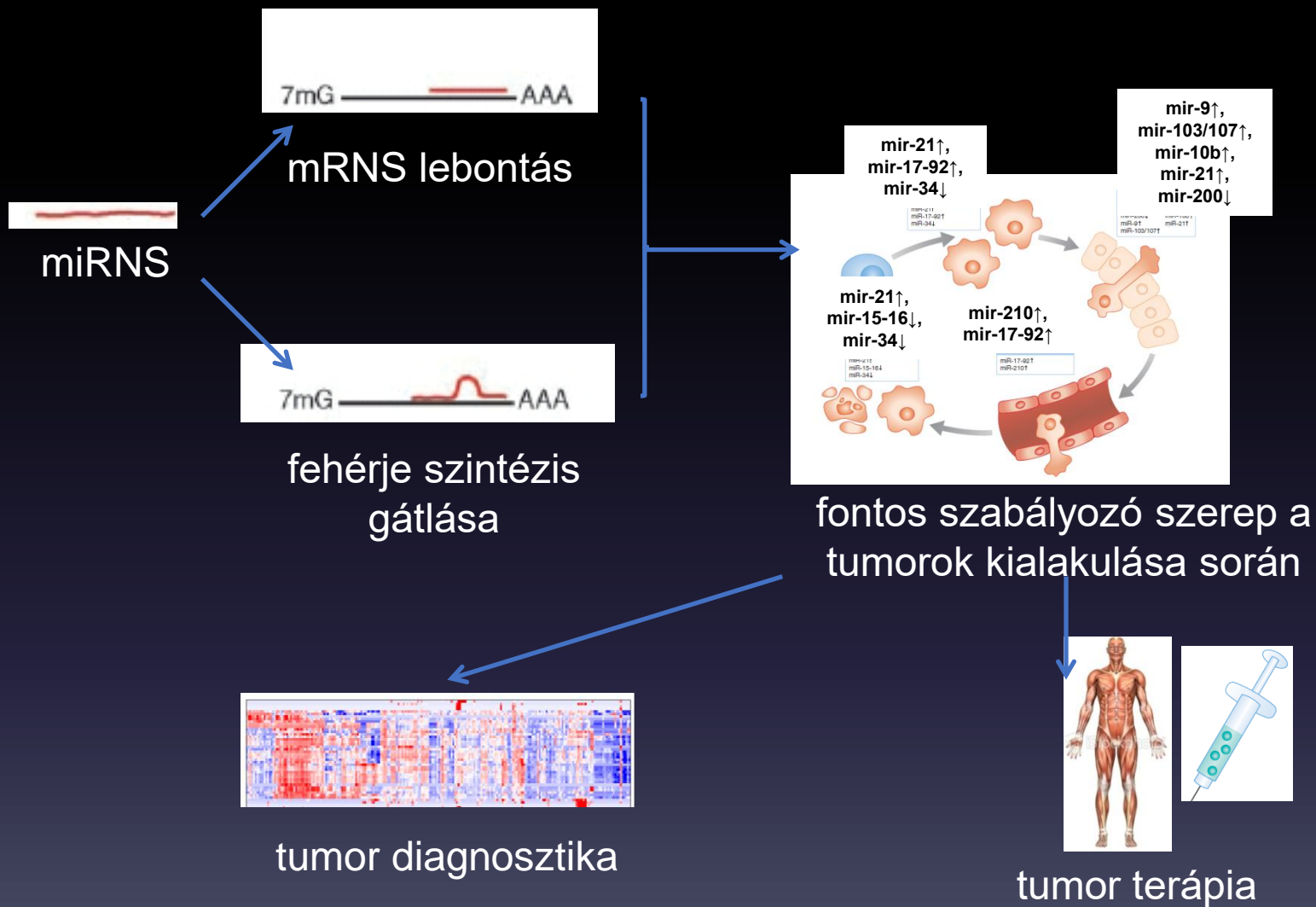
Hal - avatar



- Gyorsabb kiértékelés
- Olcsóbb vizsgálati alany
- Nagyobb mennyiségű tesztelési lehetőség
- 5 napos kor előtt gyakorlatilag nincs immunrendszere a halaknak
- Állatvédelmi törvények nem szabályozzák
- Human sejtek --- Zebradánió sejtek hőmérsékletigénye eltérő - ez a probléma jelenleg még megoldásra vár

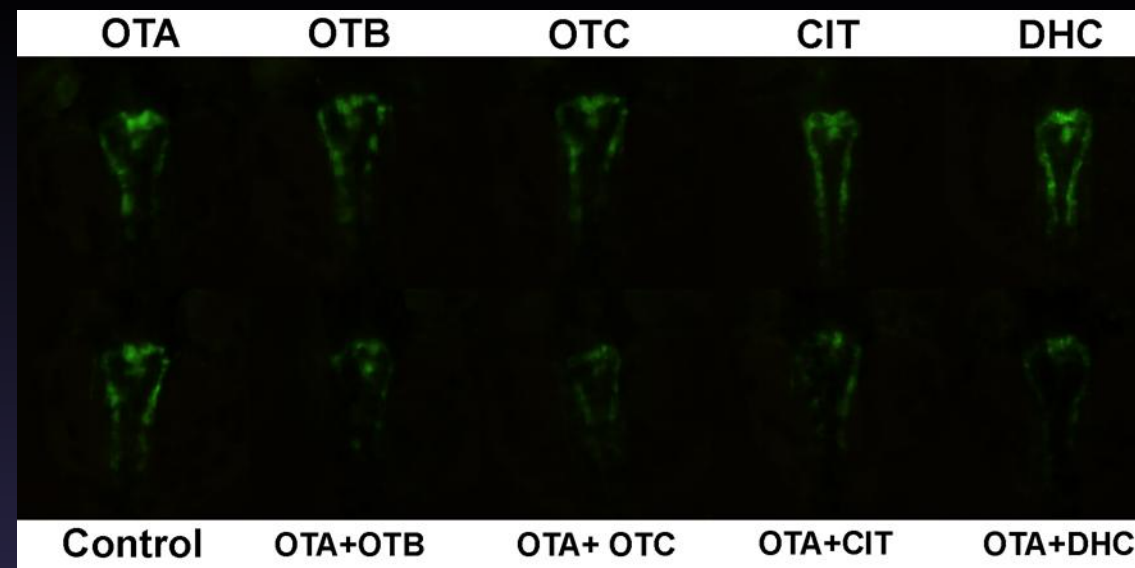
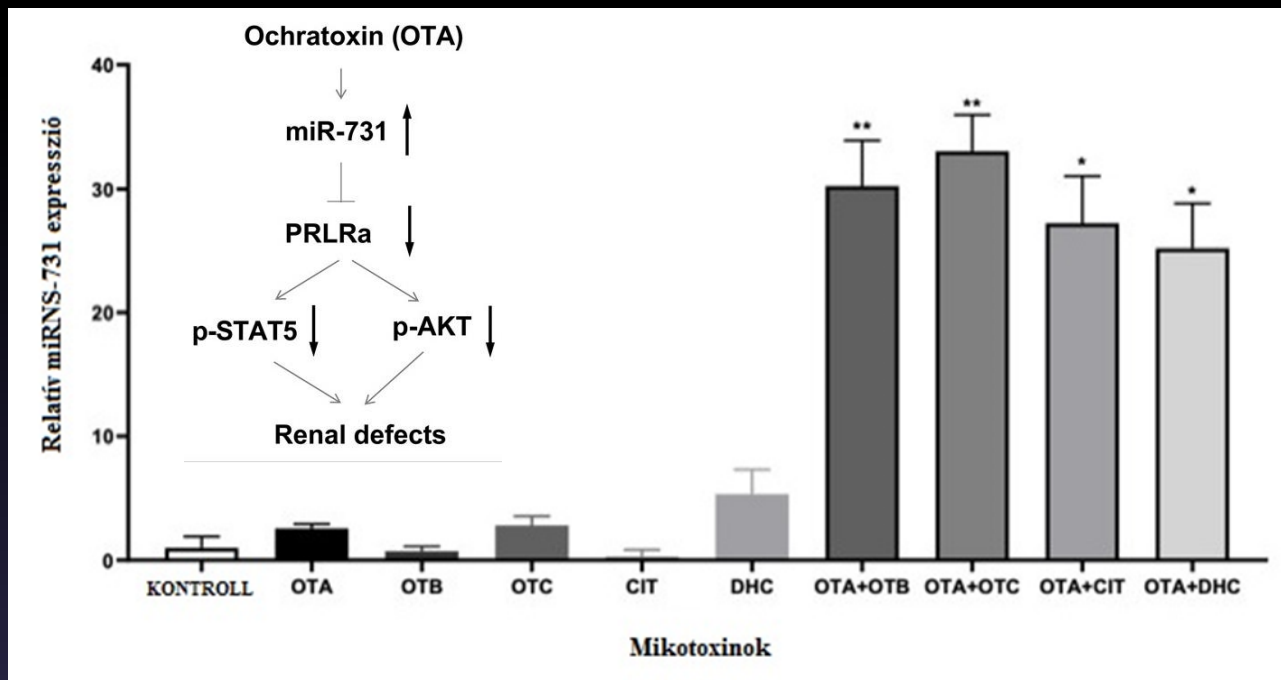


MiRNS-ek alkalmazása a tumor diagnosztikában és terápiában



Kombinált mikotoxinkezelések hatása a miR-731 miRNS expressziójára és a vese fejlődésére Tg(wt1:GFP) embriókban

Génexpressziós változás alátámasztása fenotípussal
 → vad típusú vonalon ez nem lenne megfigyelhető

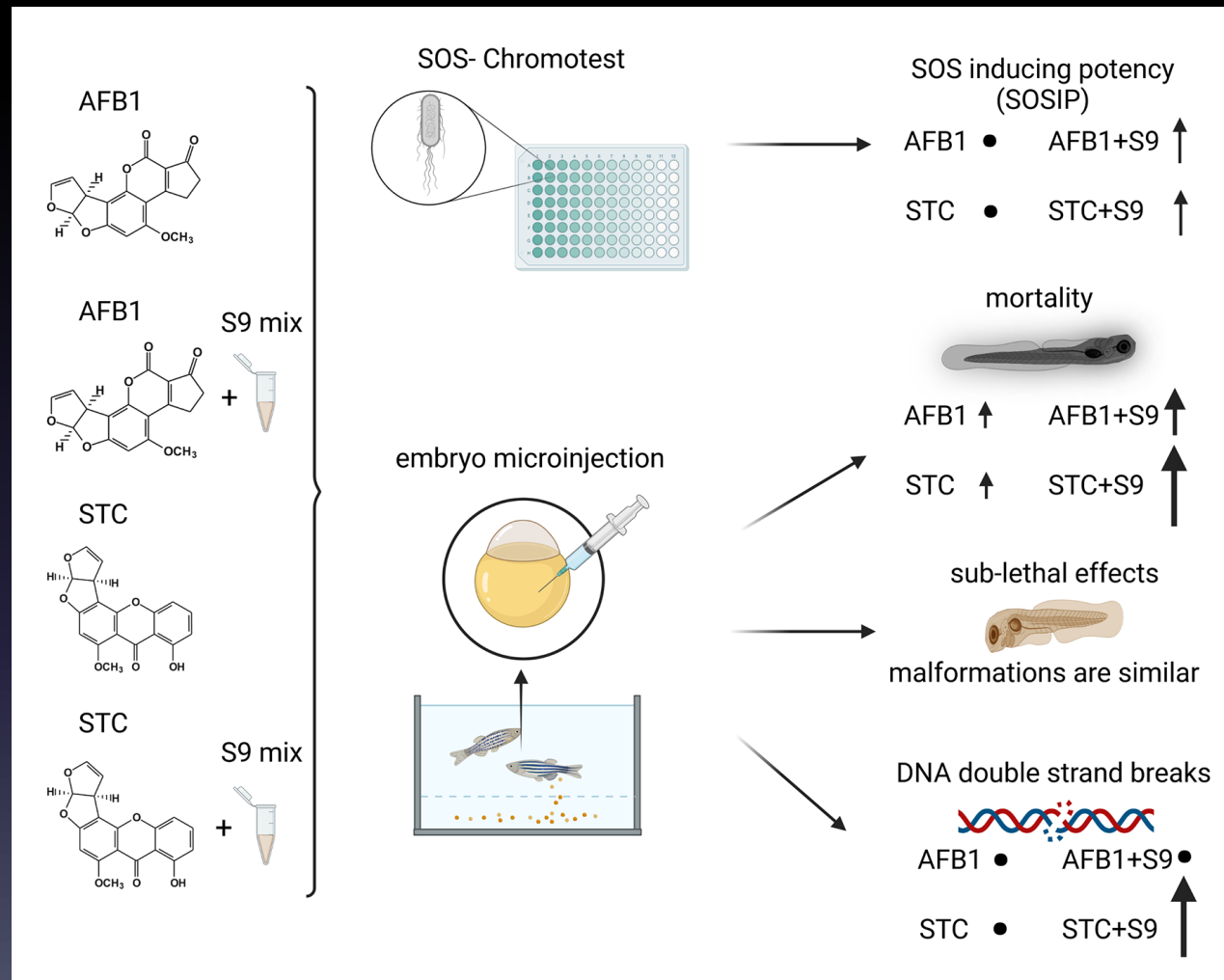


A miR 731- vízháztartást, szervefejlődést befolyásoló útvonlon keresztül hat. (Wu et al. 2016)

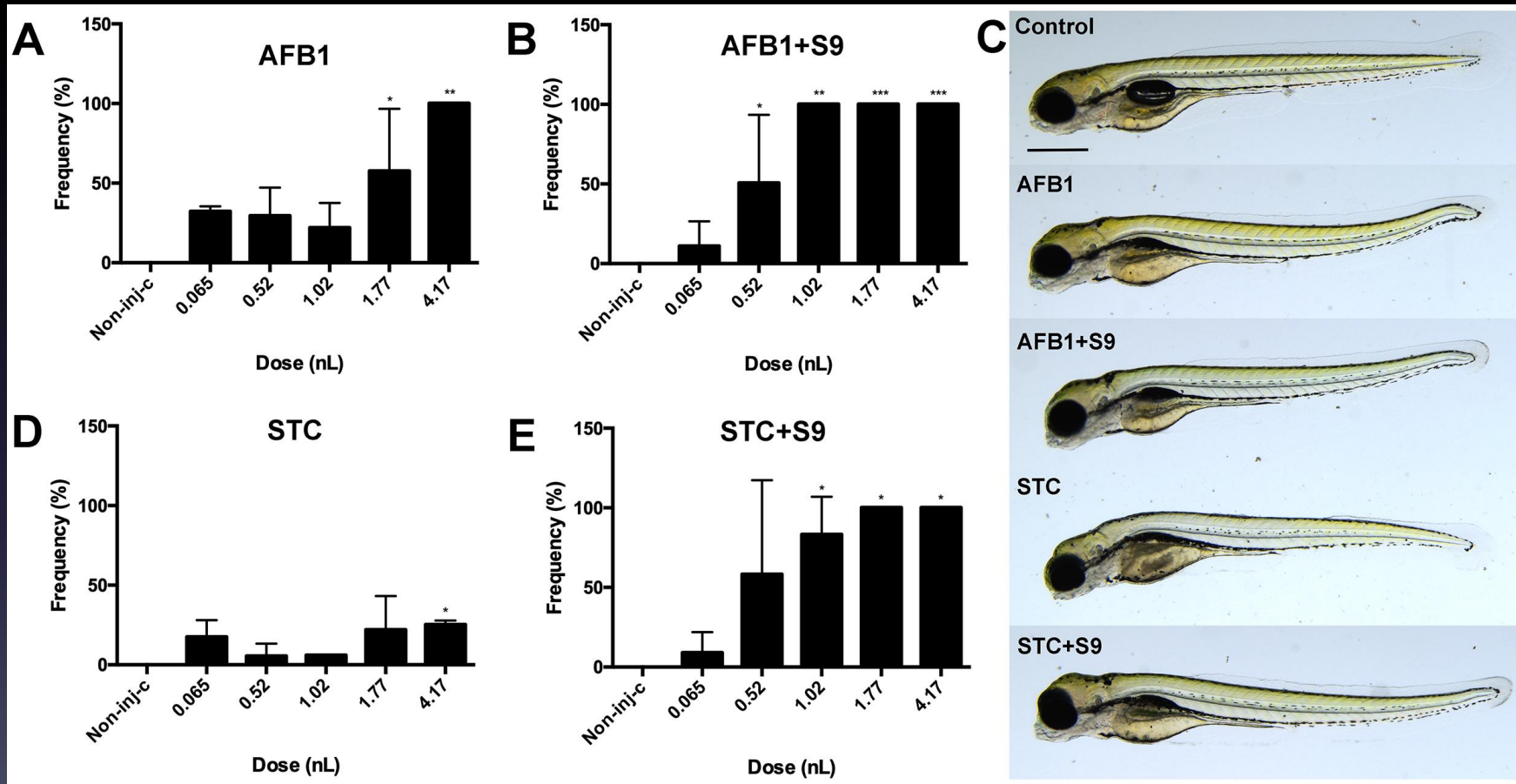
Expozíció	Koexpozíció
OTA: 0,23 µM	0,23 µM OTA + CIT: 3,125 µM
OTB: 2,58 µM	0,23 µM OTA + DHC: 3,125 µM
OTC: 0,055 nM	0,23 µM OTA + OTB: 2,58 µM
CIT: 3,125 µM	0,23 µM OTA + OTC: 0,055 nM
DHC: 3,125 µM	

Fejlesztünk ilyen markereket emlősre halon!
 Lehet?
 Igen 😊

Hozzuk közelebb egymáshoz az halembrió és az adult hal eredményeket (és ha lehet, az emlőst is...)



Sikerült 😊...



Köszönöm szépen a megtisztelő figyelmet!