

# **Srečanje nacionalnega vozlišča v okviru projekta PARC**

izr. prof. dr. Bojana Žegura

15.12.2023

# NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO



## ODDELEK ZA GENETSKO TOKSIKOLOGIJO IN BIOLOGIJO RAKA

VKLJUČENI V DS3 in DS5.

PREDSTAVLJENE BODO DEJAVNOSTI, KI JIH  
IZVAJAMO V DS5

Večna pot 121, 1000 Ljubljana

# ODDELEK ZA GENETSKO TOKSIKOLOGIJO IN BIOLOGIJO RAKA - GEN



Assoc. Prof.  
Bojana Žegura



Assist. Prof.  
Alja Štern



Dr. Katja Kološa



Dr. Matjaž Novak



Dr. Martina Štampar



Assist. Prof.  
Tina Eleršek

PROJEKTNA PISARNA



Sonja Žabkar



Katarina Fras



Tim Ravnjak



Iza Rozman



Irma Zeljković-  
Vitas



Mojca Drobnič  
[mojca.drobnic@nib.si](mailto:mojca.drobnic@nib.si)

# Sodelovanje NIB v DS5

- DS 5.1 - Investigating and closing data gaps identified by key stakeholders. Activities will be conducted in collaboration with tasks 5.2 and 5.3 as to make best use of biological matrices generated in the context of in vivo studies.
  - DS 5.1.1 Testiranje mutagenosti mikotoksinov – AMES test
  - DS 5.1.2 Testiranje analogov BPA na embrijih rib cebric (*Danio rerio*) - FET test (OECD TG 236)
- DS 5.2 - Improving the current hazard characterisation paradigm by establishing comprehensive testing strategies that logically combine novel methods with well-established approaches, preferably in a tiered manner. By combining efforts from the tasks of the WP, the availability and applicability of new approach methodologies (NAMs) in RA will be promoted.
  - DS 5.2.1 Testiranje ne-genotoksičnih karcinogenov
  - DS 5.2.2 Novi pristopi za testiranje analogov BPA – celična linija ZFL - 3D modeli

# DS 5.1.1 - Testiranje mutagenosti mikotoksinov – AMES test (OECD 471)



## AMES test (OECD 471) – testiranje mikotoksinov:

Tenuzonic acid; TeA

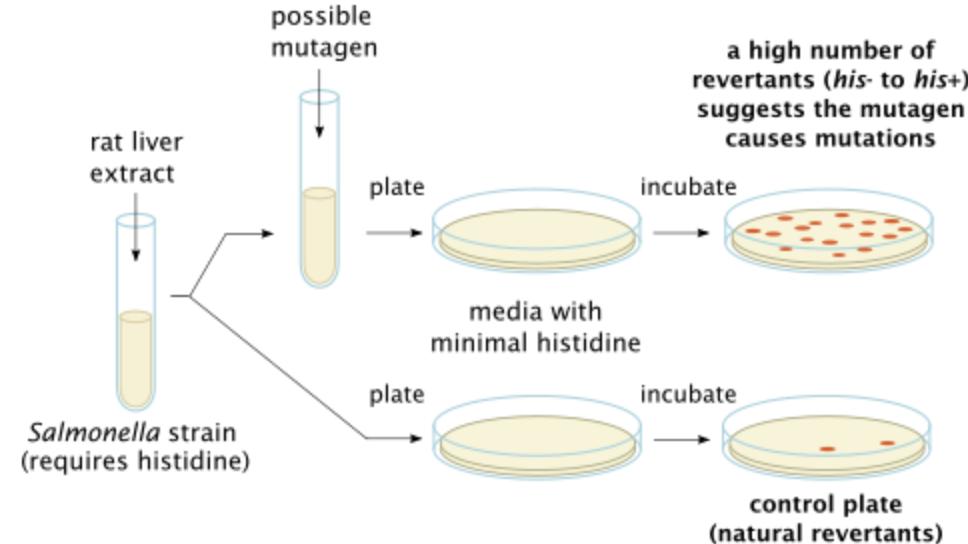
Tentoxin - TENT

Altenue – ALT

Altertoxin I – ATXI

Alternariol – AOH

Alternariol monomethyl ether – AME



Archives of Toxicology  
<https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>

1 REVIEW ARTICLE



Objava preglednega članka: Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health; Archives of Toxicology, članek sprejet v objavo

V pripravi pregledni članek, kjer opisujemo riske in tveganja zaradi izpostavitve *Enniantis* toksinom.

2 Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health

- 4 Henrique Louro<sup>1</sup> · Ariane Vettorazzi<sup>2</sup> · Adela López de Cerain<sup>2</sup> · Anastasia Spyropoulou<sup>3</sup> ·  
5 Anita Solhaug<sup>4</sup> · Anne Straumfors<sup>5</sup> · Anne-Cathrin Behr<sup>6</sup> · Birgit Mertens<sup>7</sup> · Bojana Žegura<sup>8</sup> ·  
6 Christiane Kruse Fæste<sup>5</sup> · Dieynaba Ndiaye<sup>9</sup> · Eliana Spilioti<sup>2</sup> · Elisabeth Varga<sup>10</sup> · Estelle Dubreuil<sup>11</sup> ·  
7 Eszter Borsos<sup>12</sup> · Francesco Crudo<sup>10</sup> · Gunnar Sundstol Eriksen<sup>13</sup> · Igor Snakow<sup>14</sup> · Jérôme Henri<sup>11</sup> ·  
8 Julie Sanders<sup>7</sup> · Kyriaki Macheria<sup>3</sup> · Laurent Gaté<sup>9</sup> · Ludovic Le Hégaret<sup>11</sup> · Matjaž Novak<sup>8</sup> ·  
9 Nicola M. Smith<sup>14</sup> · Solveig Krapf<sup>5</sup> · Sonja Hager<sup>10</sup> · Valérie Fessard<sup>11</sup> · Yvonne Kohl<sup>15</sup> · Maria João Silva<sup>1</sup> ·  
10 Hubert Dirven<sup>14</sup> · Jessica Dietrich<sup>16</sup> · Doris Marko<sup>10</sup>

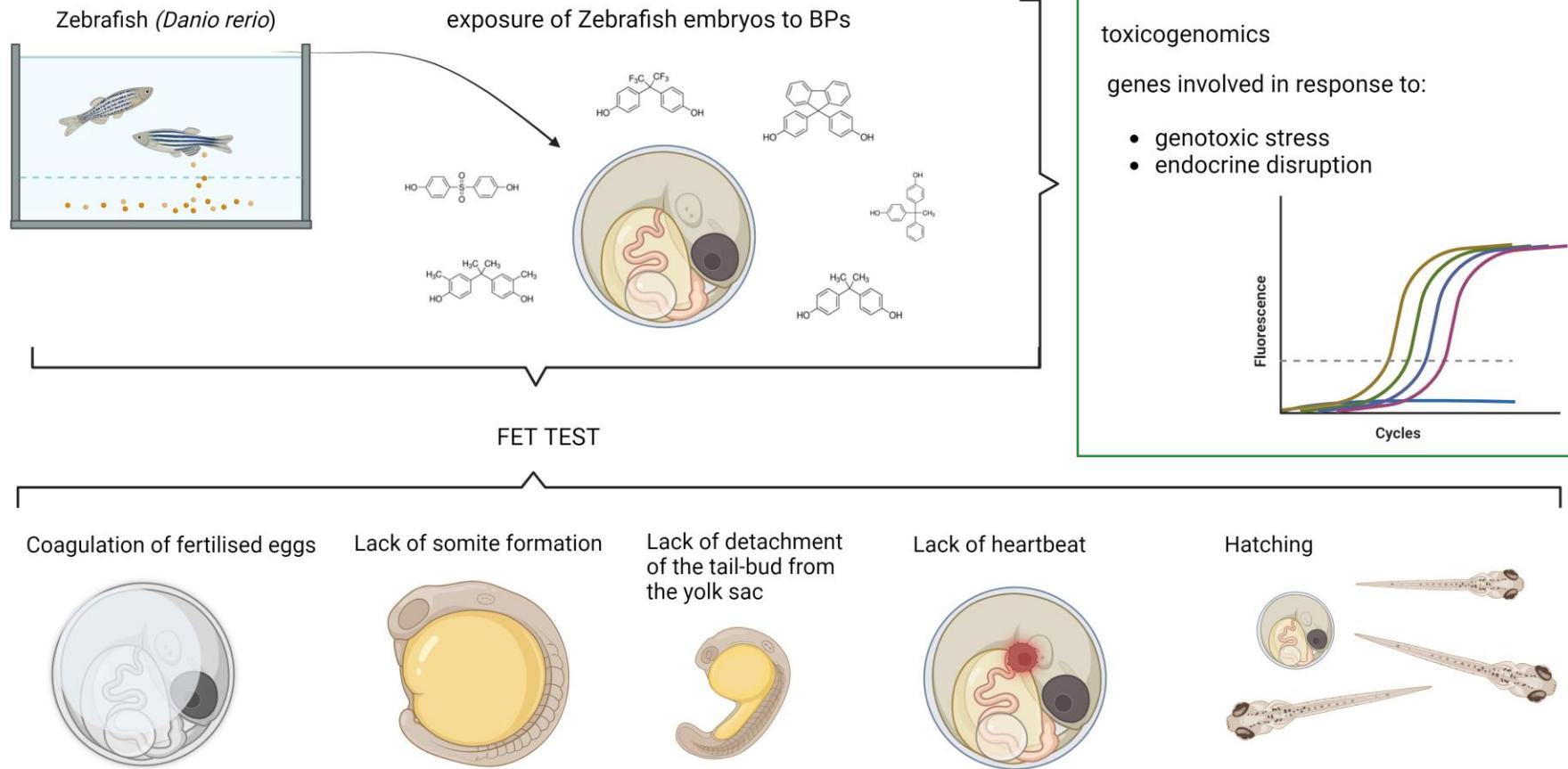
11 Received: 30 October 2023 / Accepted: 9 November 2023

12 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

# DS 5.1.2 – Testiranje analogov BPA na zarodkih rib cebric - FET



Assist. Prof. Irma Zeljković-Vitas  
Tina Eleršek

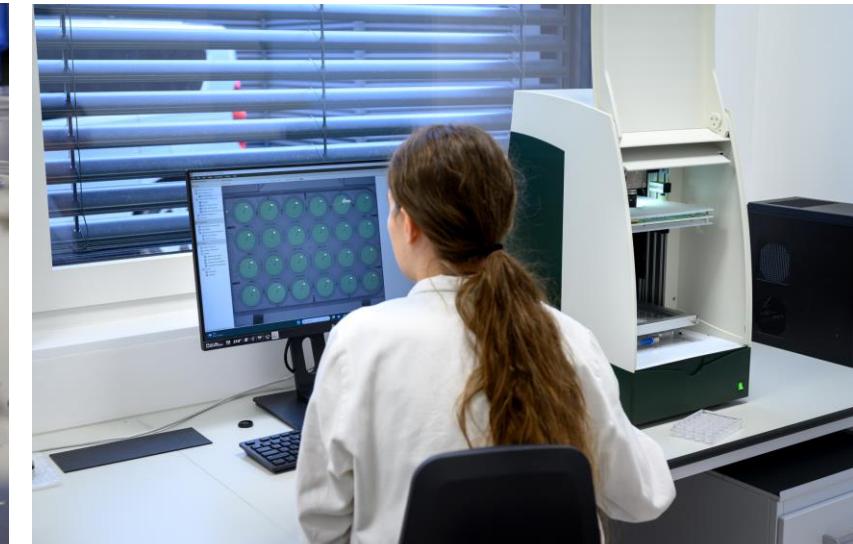


Ta aktivnost bo  
potekala v  
okviru:  
- DS 5.2.2

## DS 5.1.2 – DOSEDANJE DELO

Testiranje BPx poteka po protokolih, dogovorjenih znotraj PARC konzorcija - Task 5.1.b (Fish embryo toxicity test na *Danio rerio* - FET OECD TG 236). Do sedaj smo na zarodkih rib cebric testirali 4 različne snovi. Vedno v testiranje vključimo vsaj 5 različnih koncentracij BPx, negativno kontrolo, pozitivno kontrolo (DCA 4mg/L) in kontrolo topila (DMSO, če je potrebno). Test traja 96h.

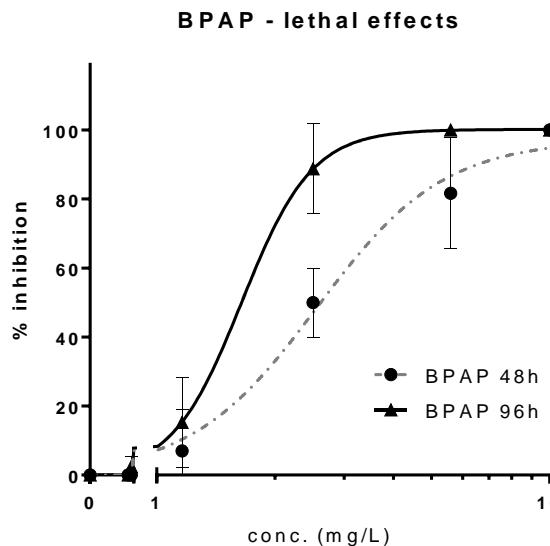
- (1) BPA kot referenčna kemikalija za potrditev novega sistema "NBS zebrafish facility"
- ➔ naš sistem je ustrezen in primerljiv
  - ➔ testiranje izbranih BPx: BPAP, BPAF, BPPH in njihovih mešanic (izbor glede na že zaznano pojavljanje v okolju in pomembnosti za regulativo)



# DS 5.1.2 – DOSEDANJE DELO

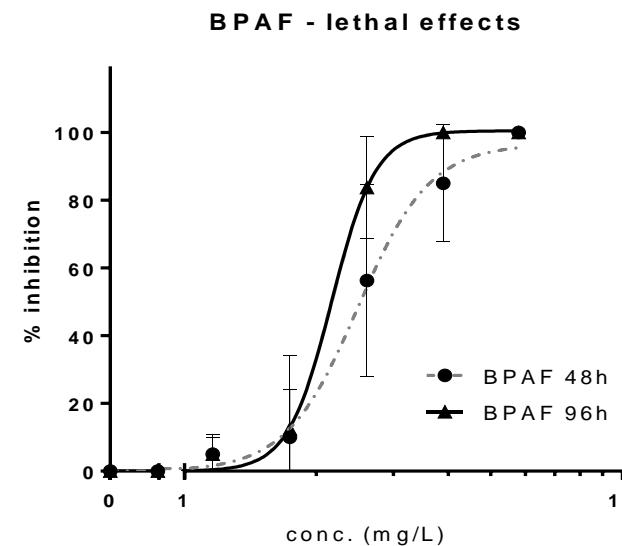
## (2) BPAP

- ✓ izvedli 4 ponovitve testiranja
- ✓ izračunali EC50 (96h) za letalne učinke: 1,6 mg/L
- ✓ v literaturi: EC50 (96h)= 1,16 mg/L (Gao et al., 2022)
- ✓ top3 subletalni učinki so bili: odsotnost krvnega obtoka, prisotnost edemov, odsotnost spontanih premikov



## (3) BPAF

- ✓ izvedli 4 ponovitve testiranja
- ✓ izračunali EC50 (96h) za letalne učinke: 2,2 mg/L
- ✓ povprečje EC50 (96h) iz literature= 1,7 mg/L (Gao et al., 2022, Gu et al. 2020, Xiyan et al., 2018, Welong et al., 2022)
- ✓ top3 subletalni učinki so bili: odsotnost krvnega obtoka, prisotnost edemov, zkrnelost v razvoju



## (4) BPPH

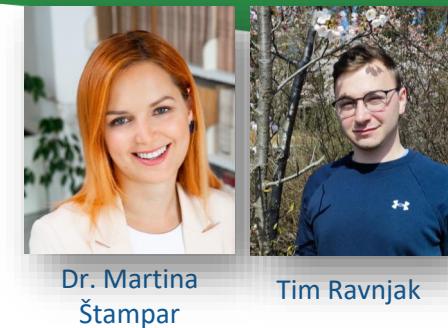
- ✓ izvedli 1 ponovitev testiranja (ni dovolj za izris grafa nelinearne regresije)
- ✓ izračunali EC50 (96h) za letalne učinke: 2,5 mg/L
- ✓ ni drugih objavljenih podatkov
- ✓ top2 subletalna učinka sta bila: zkrnelost v razvoju in odsotnost krvnega obtoka



## DS 5.1.2 – PLAN 2024

- Meritve začetnih in končnih koncentracij v poskusu (sodelovanje z IJS, dr. Ester Heath)
- Dodatne in manjkajoče ponovitve FET za izbrane koncentracije s preveliko variabilnostjo (računalniška določitev outlierjev)
- Poskusi z binarnimi in terciarnimi mešanicami izbranih BPx
- Dodatni “končni učinki” za nevrotoksične učinke z analizo gibanja zarodkov po 96h (Danio Vision)
- Transkriptomske analize – izražanje izbranih tarčnih genov po izpostavitvi BPx
- V pripravi je pregledni članek: Exploring BPA Alternatives – Environmental Levels and Toxicity Review (DS 5.1.2 in DS 5.2.2)

# DS 5.2.1 Testiranje negenotoksičnih karcinogenov



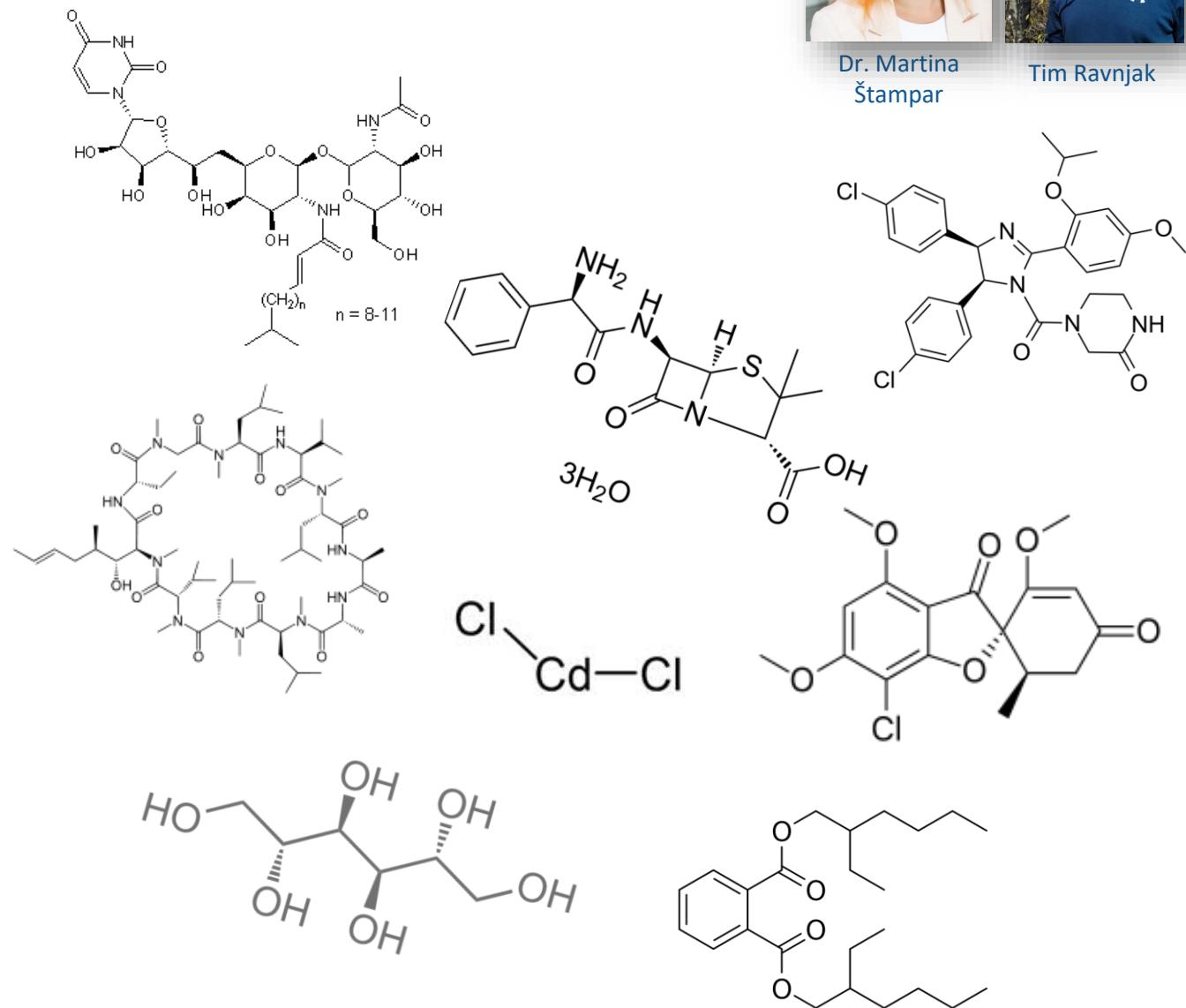
IZBIRA TESTNIH KEMIKALIJ:

## NEGATIVNE KONTROLE

- Tunicamycin
- Nutlin-3
- Ampicillin trihydrate
- D-mannitol

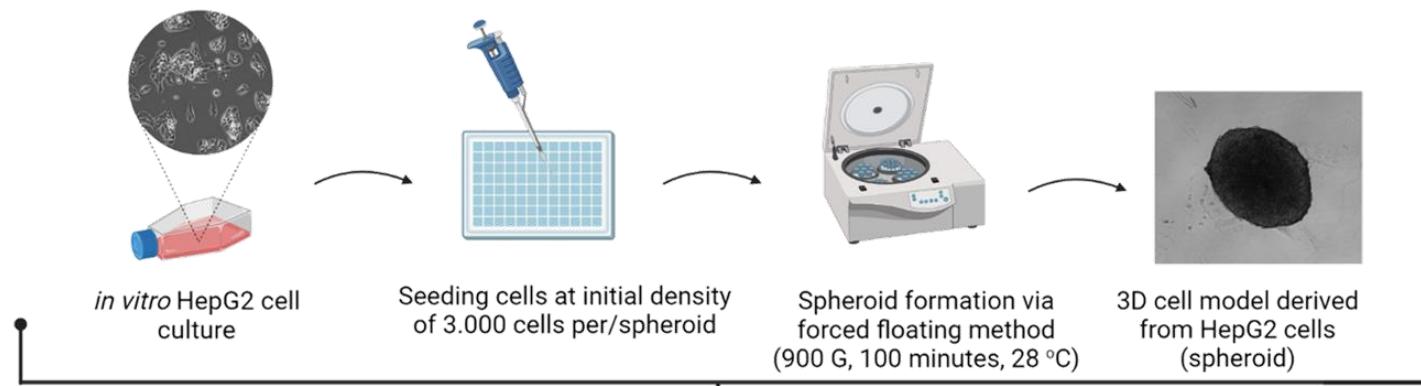
## POZITIVNE KONTROLE

- Griseofulvin
- Cadmium chloride
- DEHP
- Cyclosporin A

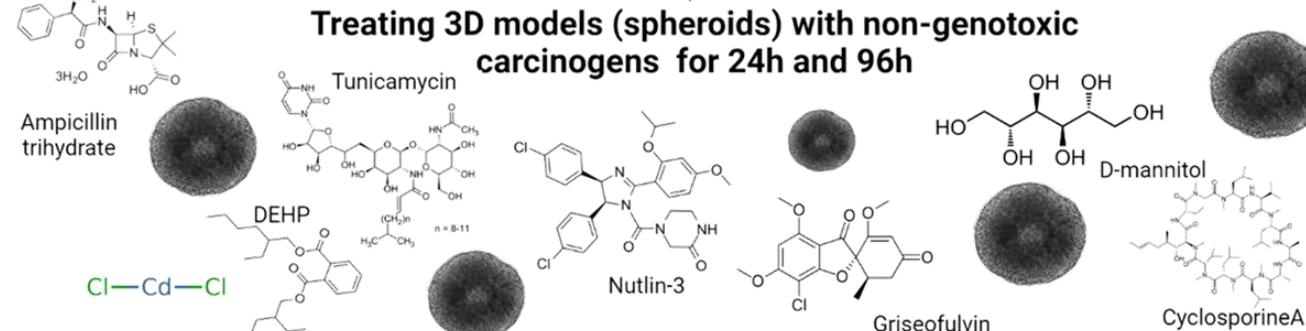


# DS 5.2.1 Testiranje negenotoksičnih karcinogenov

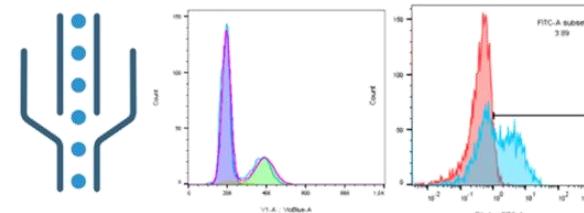
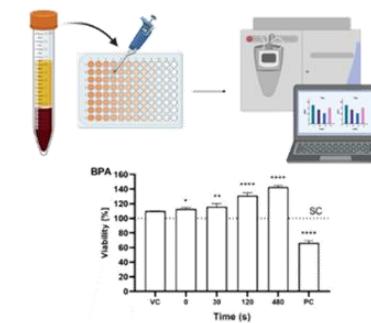
MODEL



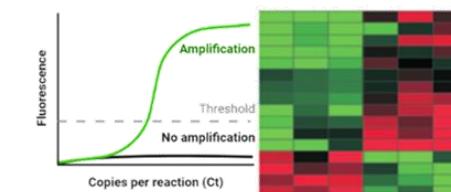
IZPOSTAVITEV



METODE



Transcriptomics  
qPCR on dynamic array IFC



genes involved in DNA damage,  
oxidative stress, epigenetic markers

# Citotoksičnost - MTS

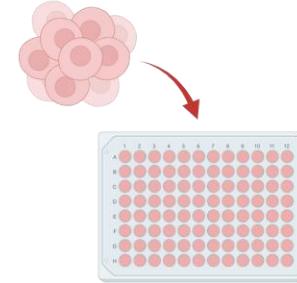
Določanje toksičnih učinkov

Izbira ne-citotoksičnih koncentracij za nadaljnje teste

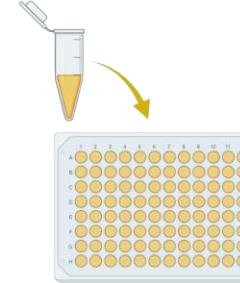
## MTS Assay

Cytotoxicity evaluation

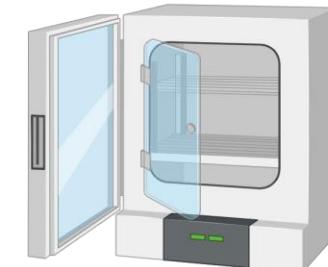
- ① Treatment of 3 days old spheroids with selected chemicals for 24 and 96 hours



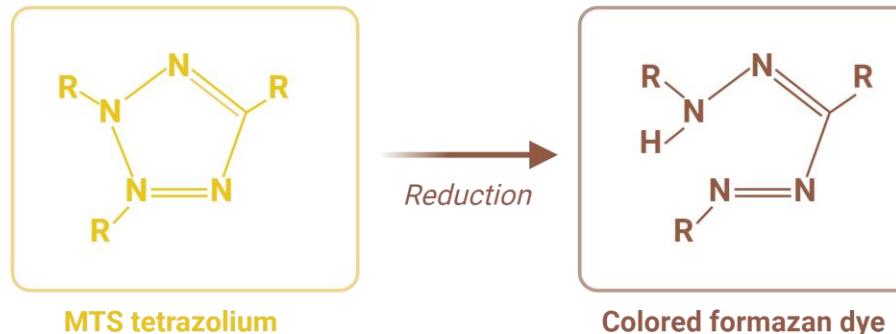
- ② MTS reagent addition



- ③ Incubation for 3 hours



- ④ Colorimetric reaction to determine spher viability



- ⑤ Absorbance reading

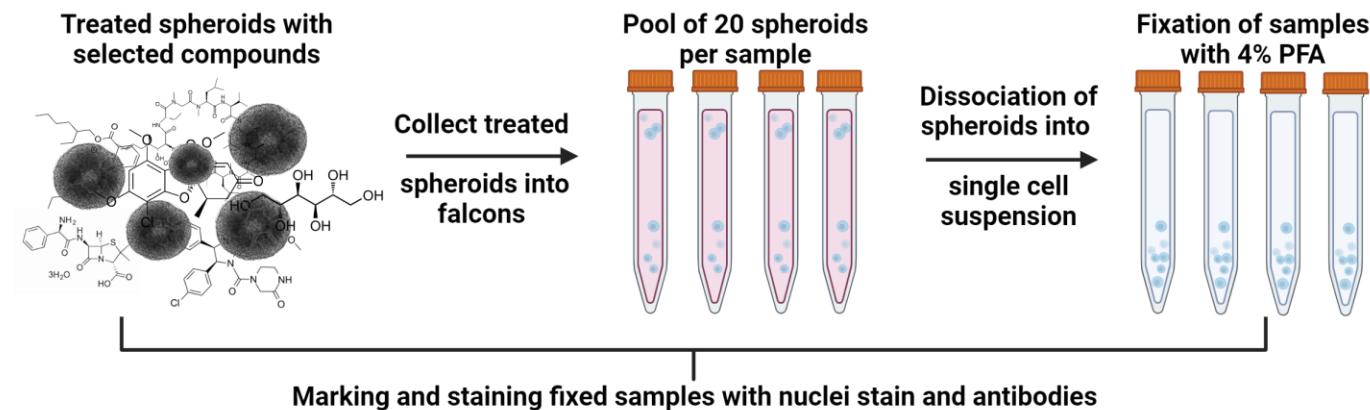


# Označevanje specifičnih markerjev – pretočna citometrija

Analiza vpliva na celični cikel in proliferacijo (Ki67)

Analiza nastanka dvo-verižni prelomov DNK ( $\gamma$ H2AX) - klastogenost

Analiza števila mitotičnih celic (p-H3) - aneugenost



Marking and staining fixed samples with nuclei stain and antibodies

Cell cycle - Hoechst staining  
Ki67 - proliferation  
 $\gamma$ -H2AX - DNA double strand breaks  
Histone-H3 - mitotic cells

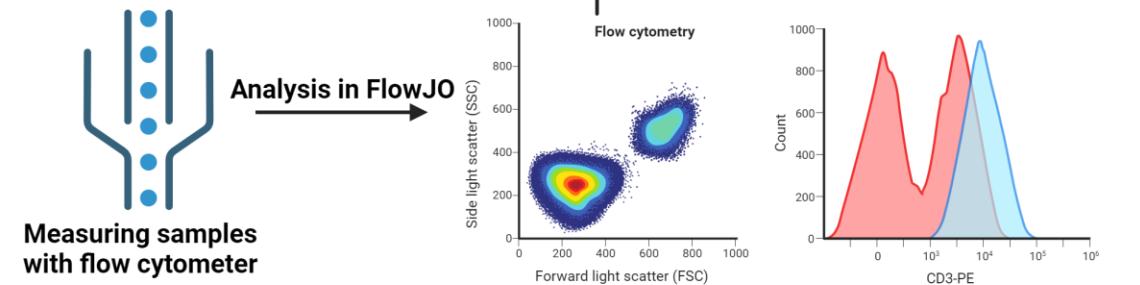
Multicolour staining of one sample

Hoechst

Fitc

APC

PE



# Spremembe v izražanju specifičnih/tarčnih genov - toksikogenomika

Izbrani geni:

- geni vpleteni v regulacijo epigenetskih modifikacij

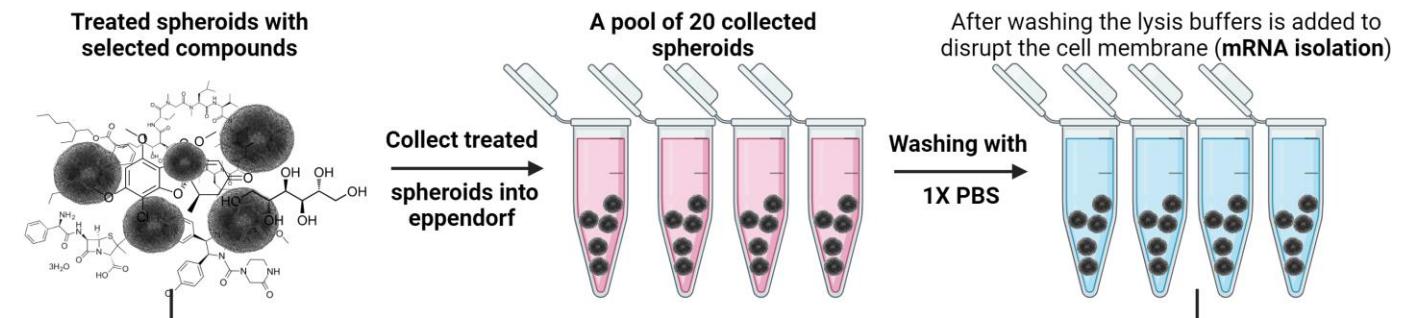
*DNMT1, DNMT3A, HDAC1, KDM3A, HDAC7, SETD2, EZH2*

- geni vpleteni v odziv na oksidativni stres  
*OGG1, GCLC*

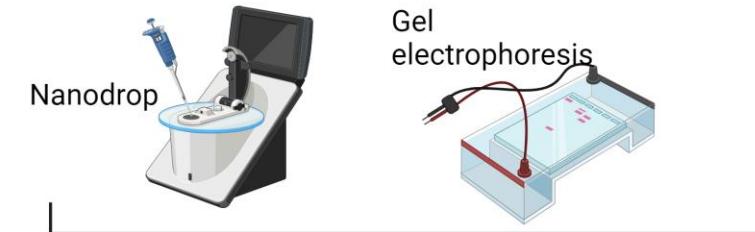
- geni vpleteni v odziv na poškodbe DNK  
*TP53, MDM2, GADD45α, CDKN1A, CHK2, MYC, JUNB*

- geni vpleteni v regulacijo proliferacije in apopotoze *Ki67, TOP2A, BBC3*

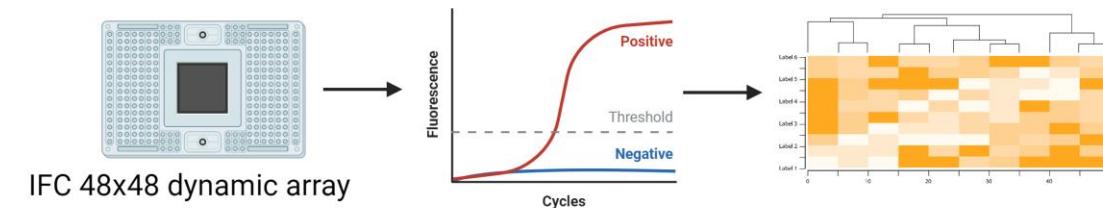
- geni vpleteni v metabolizem ksenobiotikov  
*AHR, PXR (NR1I2), CAR (NR1I3)*



Checking the RNA quality and degradation of isolated mRNA



Reverse transcription and Q-PCR analysis

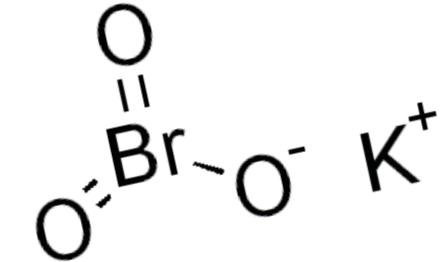
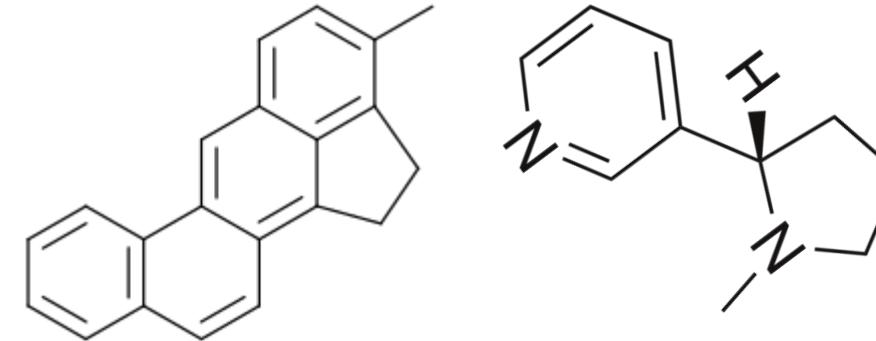


# DS 5.2.1 – PLAN 2024

Testiranje naslednjega sklopa kemikalij:

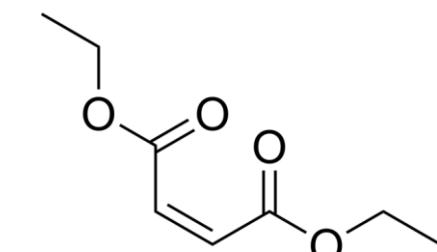
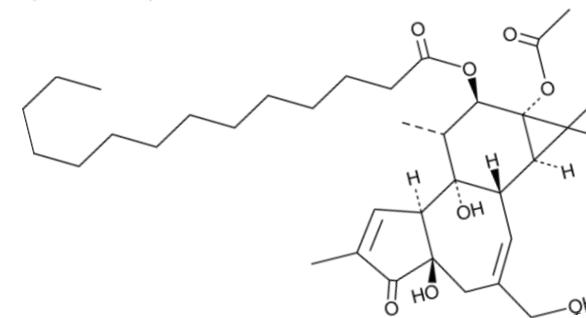
**NR (activation-ER, Ahr)**

3-methylcholanthrene (MCA),  
Diuron



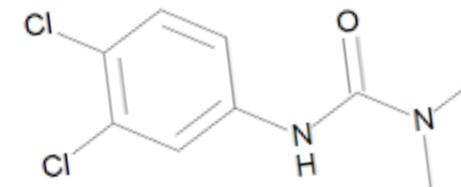
**Proliferation- mitogenic signal**  
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA),

Nicotine



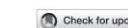
**Oxidative stress**

$\text{KBrO}_3$ ,  
Diethyl maleate



frontiers | Frontiers in Toxicology

TYPE Review  
PUBLISHED: 10 July 2023  
DOI: 10.3389/ftox.2023.1220998



OPEN ACCESS

EDITED BY  
Volodymyr Tryndyak,  
National Center for Toxicological  
Research (FDA), United States

REVIEWED BY  
Romualdo Benigni,  
National Institute of Health (ISS), Italy  
Jui-Hua Hsieh,  
National Institute of Environmental  
Health Sciences (NIH), United States

CORRESPONDENCE  
Marc Audebert,  
[marc.audebert@inrae.fr](mailto:marc.audebert@inrae.fr)  
[Michael Oelgeschläger](mailto:michael.oelgeschlaeger@bfr.bund.de)  
[michael.oelgeschlaeger@bfr.bund.de](mailto:michael.oelgeschlaeger@bfr.bund.de)

\*These authors have contributed equally  
to this work and share last authorship  
RECEIVED: 11 May 2023  
ACCEPTED: 19 June 2023  
PUBLISHED: 10 July 2023

CITATION  
Audebert M, Assmann A-S, Azqueta A,  
[DOI: 10.3389/ftox.2023.1220998](https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1220998)

New approach methodologies to facilitate and improve the hazard assessment of non-genotoxic carcinogens—a PARC project

Marc Audebert<sup>1\*</sup>, Ann-Sophie Assmann<sup>2</sup>, Amaya Azqueta<sup>3</sup>,  
Pavel Babica<sup>4</sup>, Emilio Benfenati<sup>5</sup>, Sylvie Bortoli<sup>6</sup>, Peter Bouwman<sup>7</sup>,  
Albert Braeuning<sup>2</sup>, Tanja Burgdorf<sup>2</sup>, Xavier Coumoul<sup>6</sup>,  
Kloé Debizet<sup>6</sup>, Maria Dusinska<sup>8</sup>, Norman Ertich<sup>2</sup>, Jörg Fahrer<sup>9</sup>,  
Verena Fetz<sup>2</sup>, Ludovic Le Hégarat<sup>10</sup>, Adela López de Cerain<sup>3</sup>,  
Harm J. Heusinkveld<sup>11</sup>, Kevin Hogevreen<sup>10</sup>, Miriam N. Jacobs<sup>12</sup>,  
Mirjam Luijten<sup>11</sup>, Giuseppa Raitano<sup>5</sup>, Cynthia Recoules<sup>1</sup>,  
Elise Rundén-Pran<sup>8</sup>, Mariam Saleh<sup>10</sup>, Iva Sovadinaová<sup>4</sup>,  
Martina Stampar<sup>13</sup>, Lea Thibol<sup>9</sup>, Céline Tomkiewicz<sup>6</sup>,  
Ariane Vettorazzi<sup>3</sup>, Bob Van de Water<sup>7</sup>, Naouale El Yamani<sup>8</sup>,  
Bojana Zegura<sup>13</sup> and Michael Oelgeschläger<sup>2\*</sup>

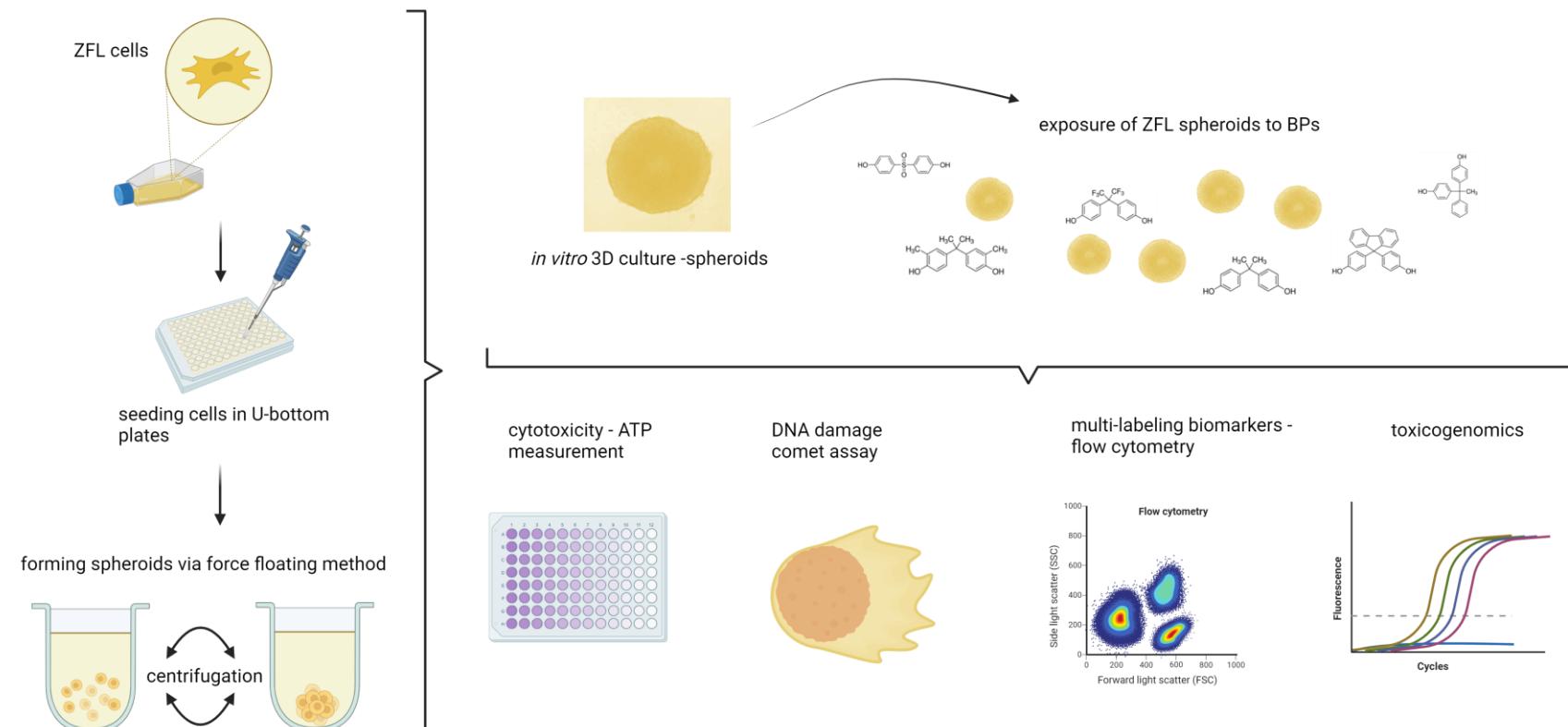
## DS 5.2.2 Novi pristopi za testiranje analogov BPA

Vzpostavitev *in vitro* 3D celičnega modela na celični liniji jetrnih ZFL celic (*Danio rerio*) rib cebric v 3D in prilagoditev (geno)toksikoloških testov za namene testiranja analogov BPA



### Testirani BP:

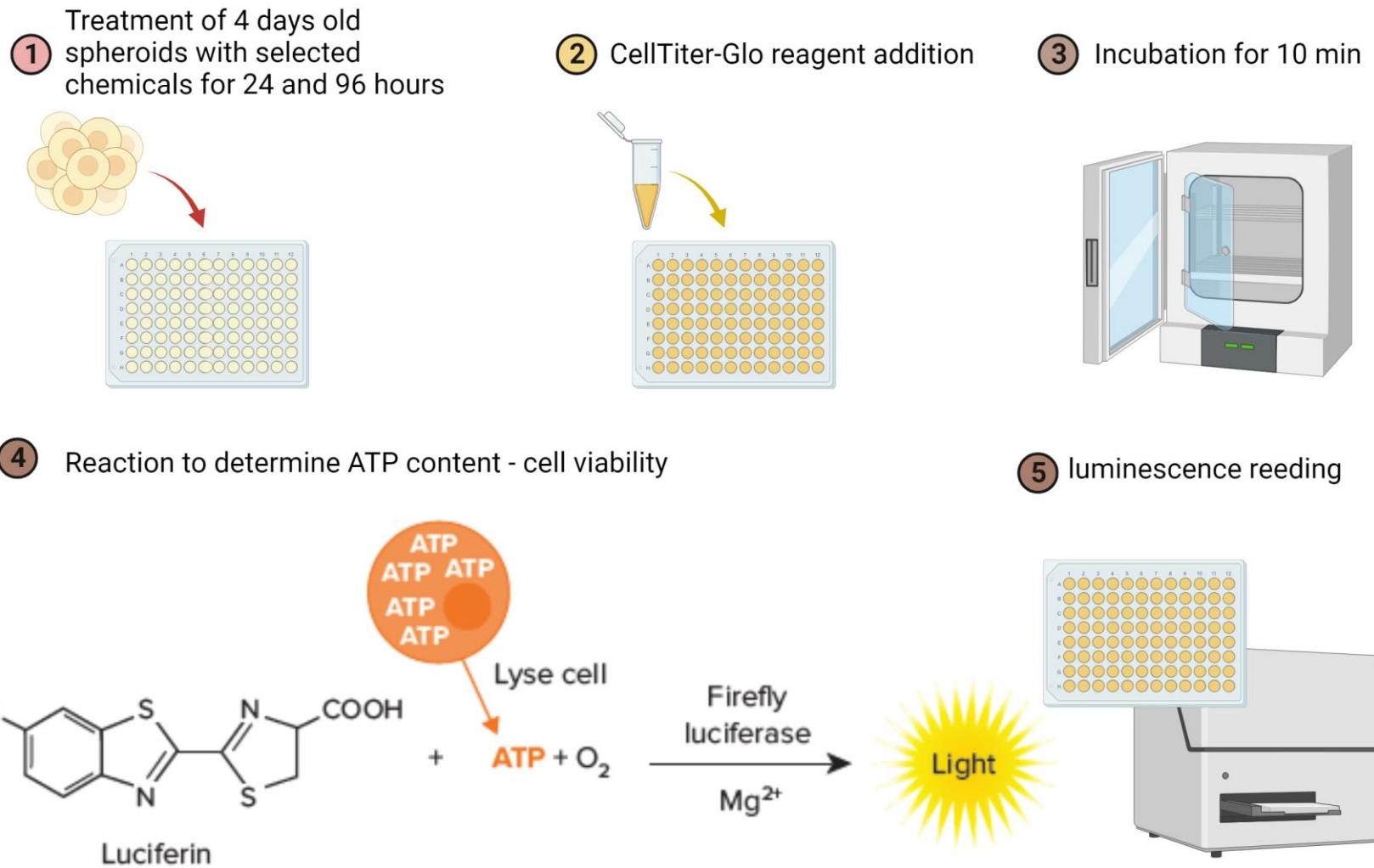
- BPA (standard)
- BPAP
- BPAF
- BPPH



- Toksikogenomika na zarodkih rib cebric (komplementarno z DS 5.1.2)

# Citotoksičnost – merjenje ATP – CellTiter-Glo

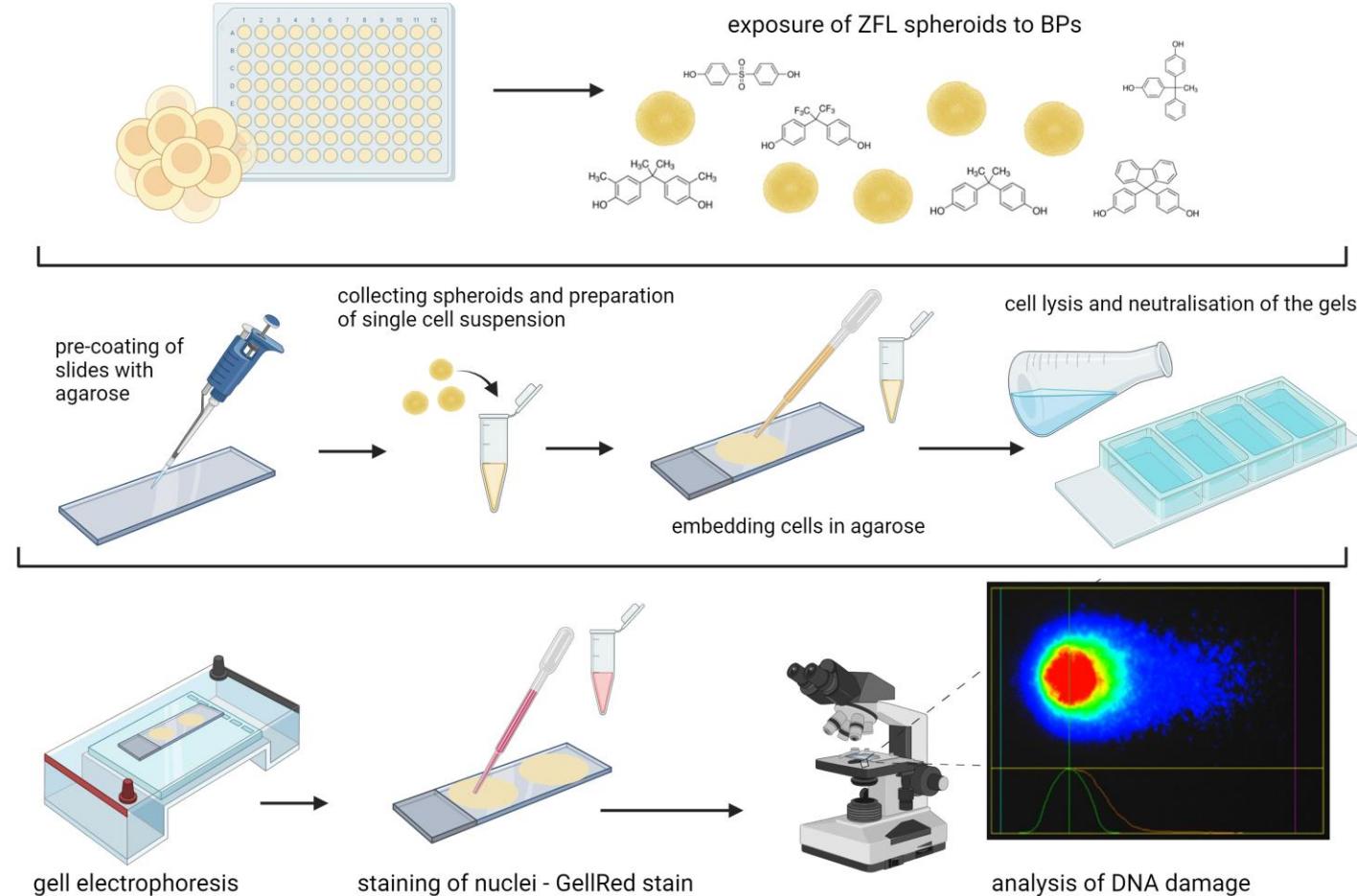
- Določanje toksičnih učinkov
- Izbira ne-citotoksičnih koncentracij za nadaljnje teste



# Merjenje poškodb DNK – test komet

## Merjenje nastanka DNK poškodb:

- enoveržni prelomi
- dvoveržni prelomi
- prečne povezave med DNK in proteini
- prečne povezave med DNK
- Prehodni prelomi, ki nastanejo med popravljanjem DNK poškodb
- Oksidativne poškodbe DNK



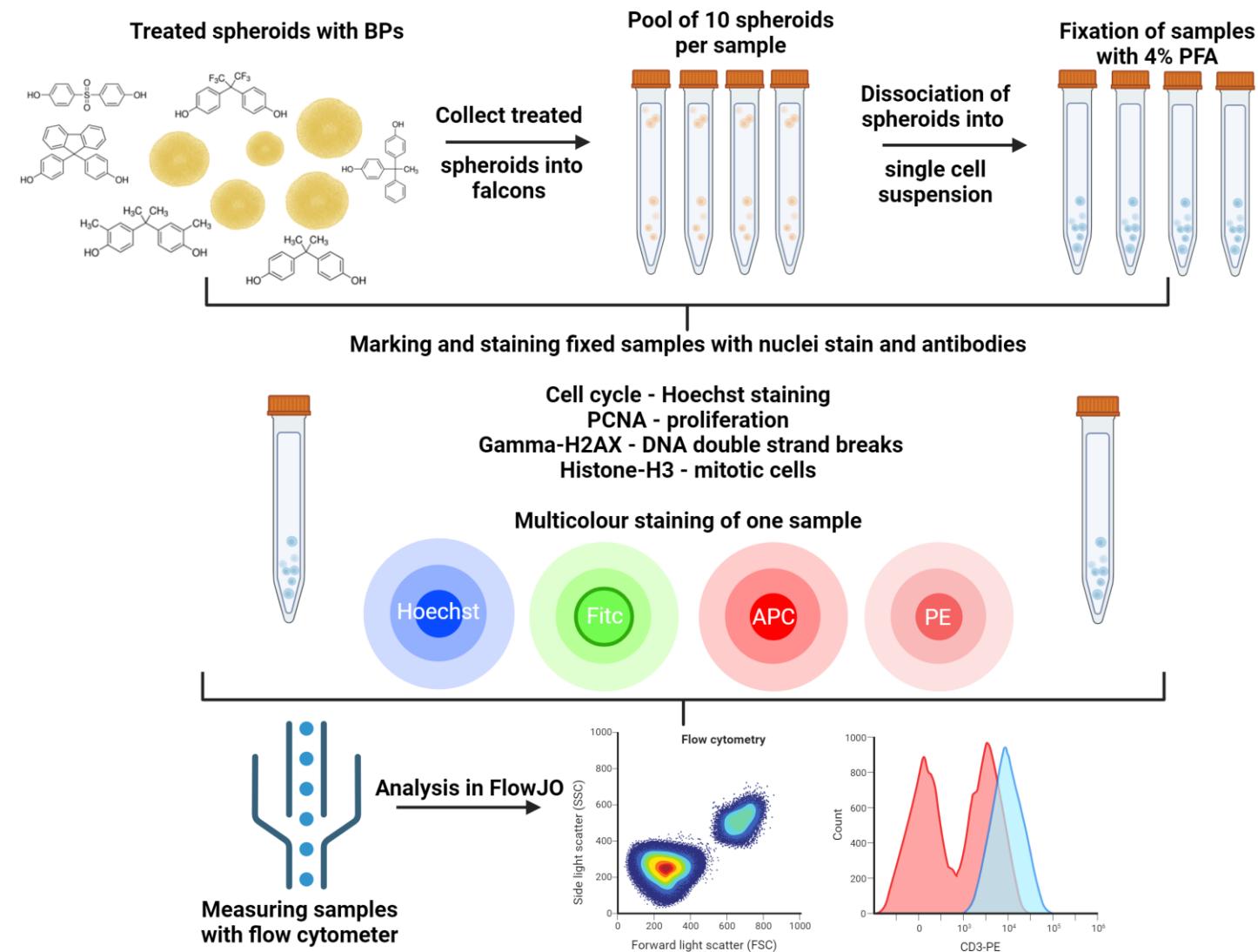
# Označevanje specifičnih markerjev – pretočna citometija

Optimizacija pogojev za ribje celice.

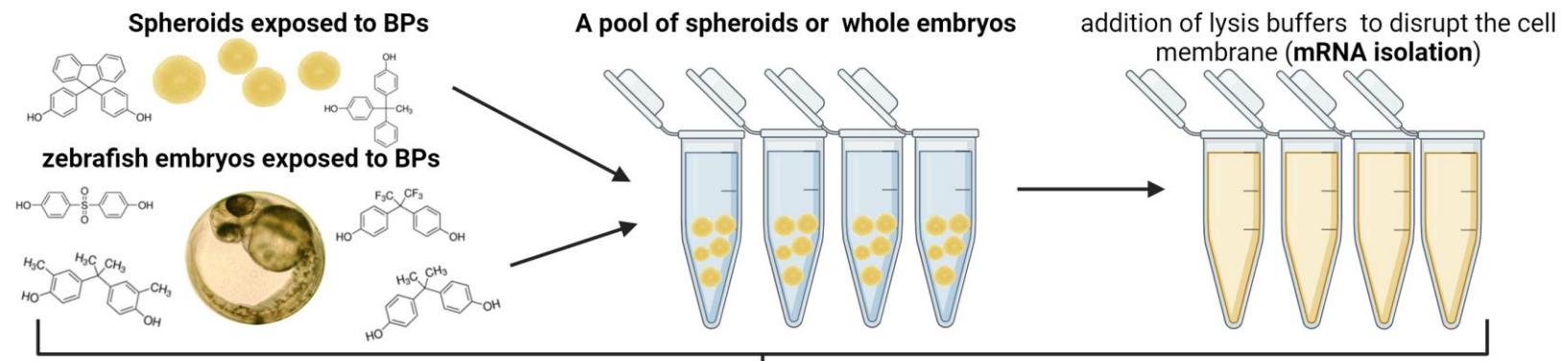
Analiza vpliva na celični cikel in proliferacijo (PCNA)

Analiza nastanka dvo-verižni prelomov DNK ( $\gamma$ H2AX) - klastogenost

Analiza števila mitotičnih celic (p-H3) - aneugenost



# DS 5.2.3 – PLAN 2024

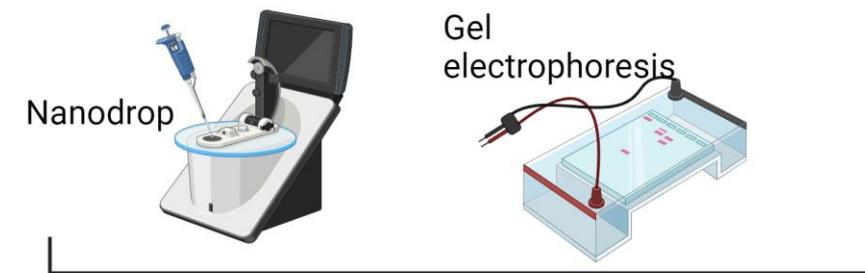


## Toksikogenomska analiza

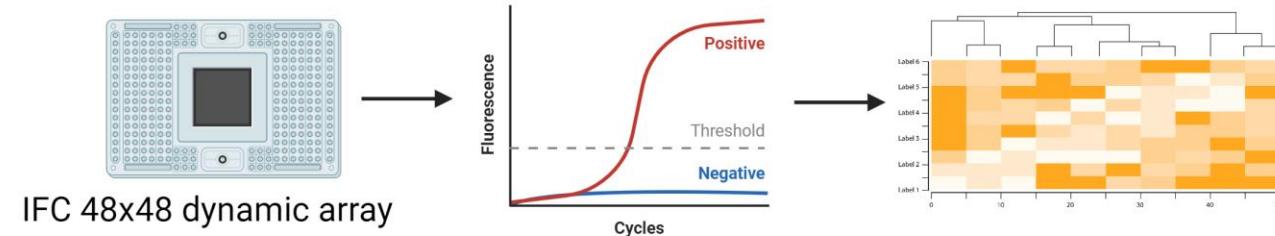
ZFL sferoidov izpostavljenih BPs

Zarodkov rib cebrič izpostavljenim BPs

**mRNA isolation with Qiagen RNeasy Mini kit**  
Checking the RNA quality and degradation of isolated mRNA



**Reverse transcription and Q-PCR analysis**



*Naj vam prihajajoče leto odstira nova obzorja.*

*Srečno 2024!*

**HVALA ZA  
POZORNOST!**



BIOTEHNOŠKO  
STIČIŠČE  
NACIONALNEGA INŠITUTA  
ZA BIOLOGIJO



NACIONALNI INŠITUT ZA BIOLOGIJO  
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY