

A BRIEF HISTORY OF TIME

FROM
THE BIG
BANG TO
BLACK
HOLES



STEPHEN W. HAWKING

WITH AN INTRODUCTION BY CARL SAGAN

Time:
“is the ticking of a clock”,
“cannot be bought”
“is relative”
“is money”
“flies”

So, what is time in (eco) toxicology ?

Dose and Time Responses using in vitro Metabolomics
Prof Dr. Bennard van Ravenzwaay

Time in Toxicology: Haber's Law

$$C \times t = \text{constant}$$

Haber's Law simply states that **the incidence and/or severity of a toxic effect depends on the total exposure, i.e. exposure concentration (c) and the duration time (t) of exposure (c x t).**

Time in Toxicology: Druckrey-Küpfmüller

$$d \times t^n = \text{constant}$$

$$n > 1$$

The essence of the Druckrey-Küpfmüller equation $d \times t^n = \text{constant}$ (where d = daily dose and t = exposure time-to-effect, with $n > 1$) for chemical carcinogens is that the total dose required to produce the same effect decreases with decreasing exposure levels, even though the exposure times required to produce the same effect increase with decreasing exposure levels. **Druckrey and Küpfmüller inferred that if both receptor binding and the effect are irreversible, exposure time would reinforce the effect.**

Quantitative Analyse der Krebsentstehung

Von HERMANN DRUCKREY* und KARL KÜPFMÜLLER*

(Z. Naturforschg. 3 b, 254—266 [1948]; eingegangen am 5. Juni 1947 **)

In quantitativen Versuchen an 700 Ratten mit dem krebserregenden Farbstoff „Buttergelb“ ergaben sich folgende Beziehungen zwischen der Dosis und der Wirkung:

1. Die *Latenzzeit* bis zum Auftreten der ersten Lebergeschwülste ist eine einfache Funktion der täglich gegebenen Dosis.

2. Zur Geschwulsterzeugung ist eine bestimmte Gesamtdosis „Buttergelb“ erforderlich, ohne Rücksicht darauf, über welche Zeit sie zwischen 34 Tagen und einem Jahr verteilt wird. Die Latenzzeit ist in diesem Bereich der Höhe der täglichen Dosis umgekehrt proportional.

3. Bei längerer Versuchsdauer, die sich über die ganze Lebenszeit der Ratten erstreckt, genügt sogar eine kleinere Gesamtdosis. Das deutet auf eine Zunahme der *Krebs-Disposition* im Alter hin.

4. Die Größe der zur Krebsauslösung notwendigen Gesamtdosis „Buttergelb“ kann als Maß für die Größe der vorhandenen Krebsdisposition dienen.

5. Die Streuung der Versuchsergebnisse ist mit nicht mehr als 10% auffällig gering. Daraus ergibt sich die Folgerung, daß zum Geschwulstwachstum eine Mindestzahl von erzeugten Krebszellen vorhanden sein muß.

6. Die Effekte auch der kleinsten Einzeldosen bleiben bei diesem Farbstoff über die ganze Lebenszeit der Ratten voll summationsfähig bestehen.

7. Da in dieser Zeit häufig Zellteilungen stattgefunden haben, müssen die gesetzten Effekte auf die Tochterzellen übertragen worden sein. Die Zellbestandteile, an denen die cancerogene Wirkung ansetzt, haben also die Fähigkeit zur Selbstproduktion, d. h. der Effekt ist erblich.

8. Nach den vorliegenden Ergebnissen bestehen zwischen krebsiger Entartung und genetischer „Mutation“ zumindest quantitative Unterschiede.

9. Der einfache reaktionskinetische Ansatz erweist sich für die Wirkung cancerogener Agenzien auf den fraglichen Zellbestandteil anwendbar. Er erklärt eine Reihe bisher unerklärbarer Phänomene zwanglos und führt zu weiteren klaren Problemstellungen.

10. Die „Treffertheorie“ wird auf den gleichen reaktionskinetischen Ansatz zurückgeführt.

11. Die krebserzeugende Wirkung unterliegt genau so bekannten physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten wie jede andere Wirkung auch.

12. Der Farbstoff „Buttergelb“ ist bei dauernder Zufuhr auch in kleinsten Dosen schädlich und deshalb als Lebensmittelfarbstoff abzulehnen.

Time – in *in vivo* toxicology

Rats

- Acute
- 28-day (subacute)
- 90-day (subchronic)
- 1 year (chronic)
- 2 years (cancer bioassay)

Reduction of NOAEL*

not determined

3x (2-4)

3x (1-4)

1x (1-2)

* Guesstimates by van Ravenzwaay (without guarantee)

Time – in *in vivo* toxicology

Dogs

Reduction of NOAEL*

- Acute

not determined

- 28-day (subacute)

2x (1-4)

- 90-day (subchronic)

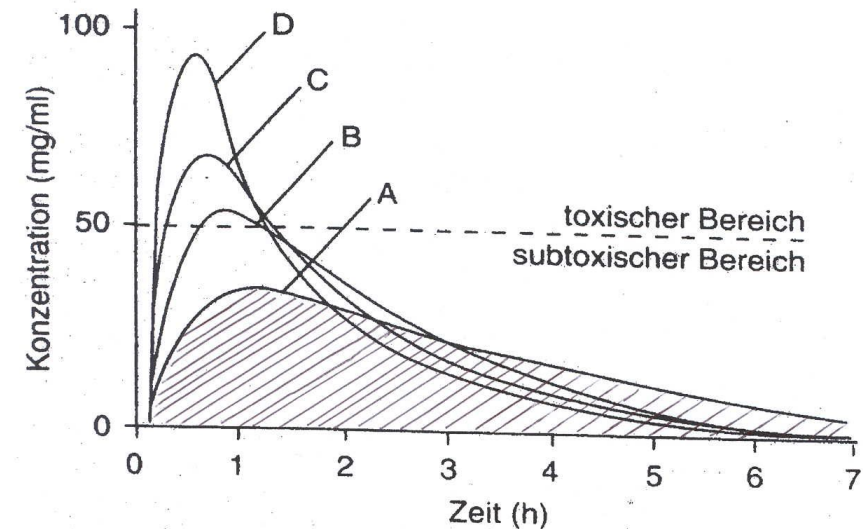
1x (1-2)

- 1 year (chronic)

→ Take life span into account (a 1 -year study in dogs is < 10% of lifespan, for a rat it is 50%)

* Guesstimates by van Ravenzwaay (even less guarantee)

Time: Toxicokinetics

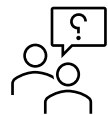


Concentration (C_{max}) or AUC related toxicity ?

C_{max} e.g. receptor mediated effects, enzyme inhibition ect → in vitro



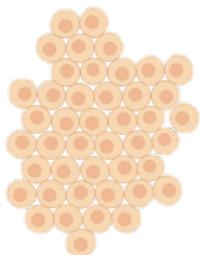
AUC e.g. cumulative damage, functional demand, “wear & tear” → in vitro ?



MINIATURIZATION OF METABOLOMICS IN VITRO



Cell seeding density



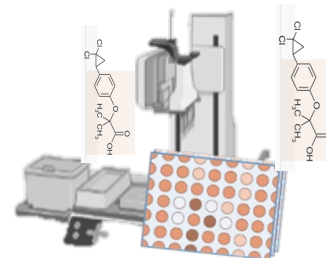
15000 HepG2 cells/well
Robust metabolic signal

Cytotoxicity Testing



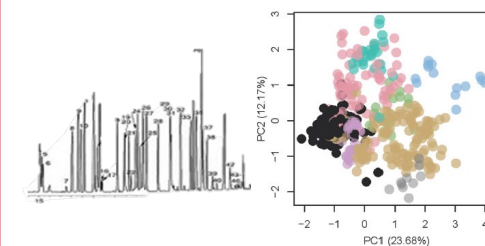
Multiplexed: ATP +
Membrane integrity

Quenching and Extraction



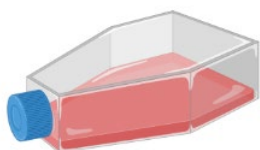
Directly in the 96 well-plate
Minimal perturbations

Data Analysis



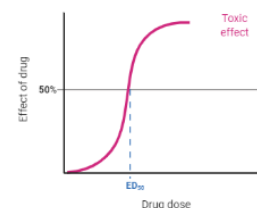
QA process and statistics

Passage Number



From 5 to 9
Flexibility + Robustness

Dose Setting



5 dose levels : EC₁, EC₅, EC₁₅,
EC₅₀, EC₈₅
Metabolomics dose response

Analytical Method



Target LC-MS/MS
Good metabolite coverage

Proof of Concept

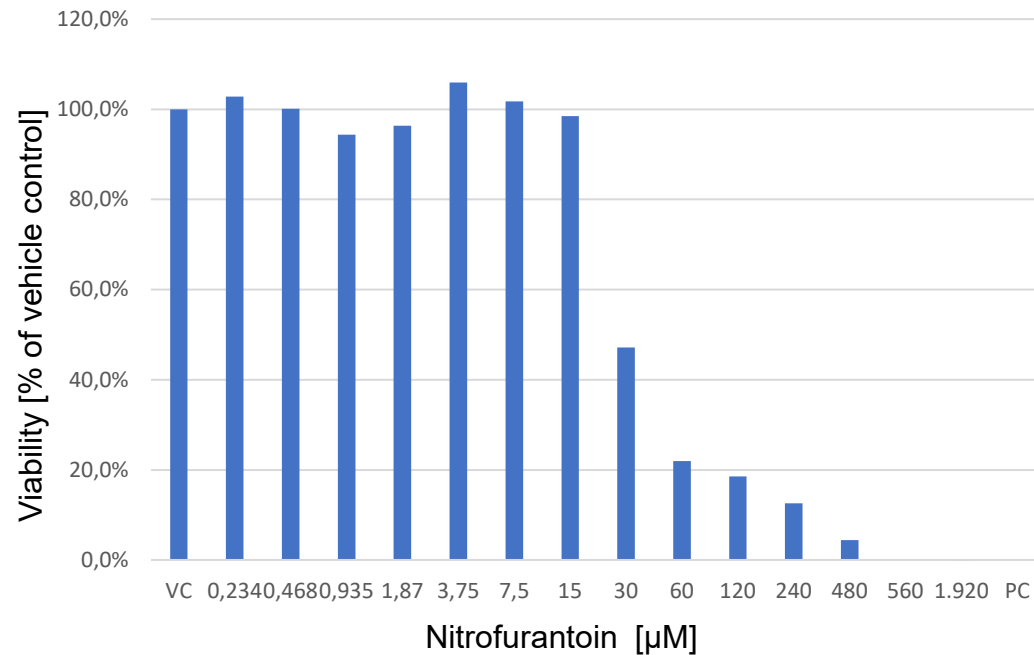


Different Liver Toxicity MoA

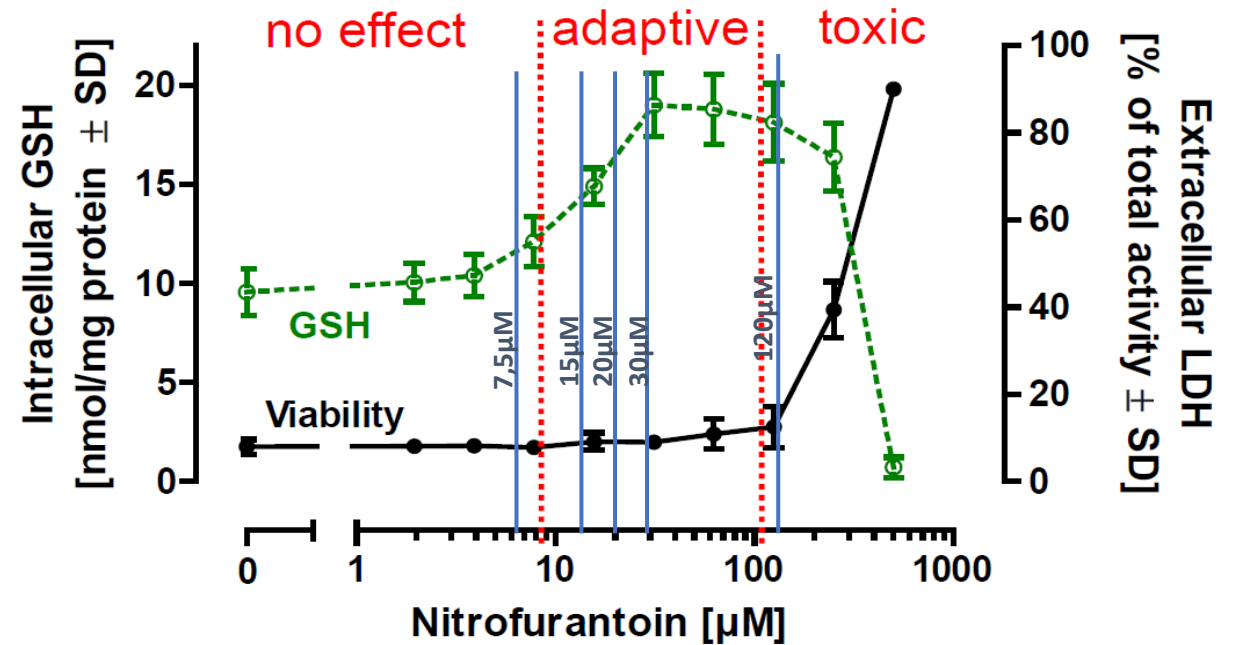
NITROFURANTOIN

DOSE SETTING

7,5µM (EC₁), 15µM (EC₁₅), 20µM (EC₂₅), 30µM (EC₅₀), 120µM (EC₈₅)



Nitrofurantoin adaptive and toxic concentration ranges

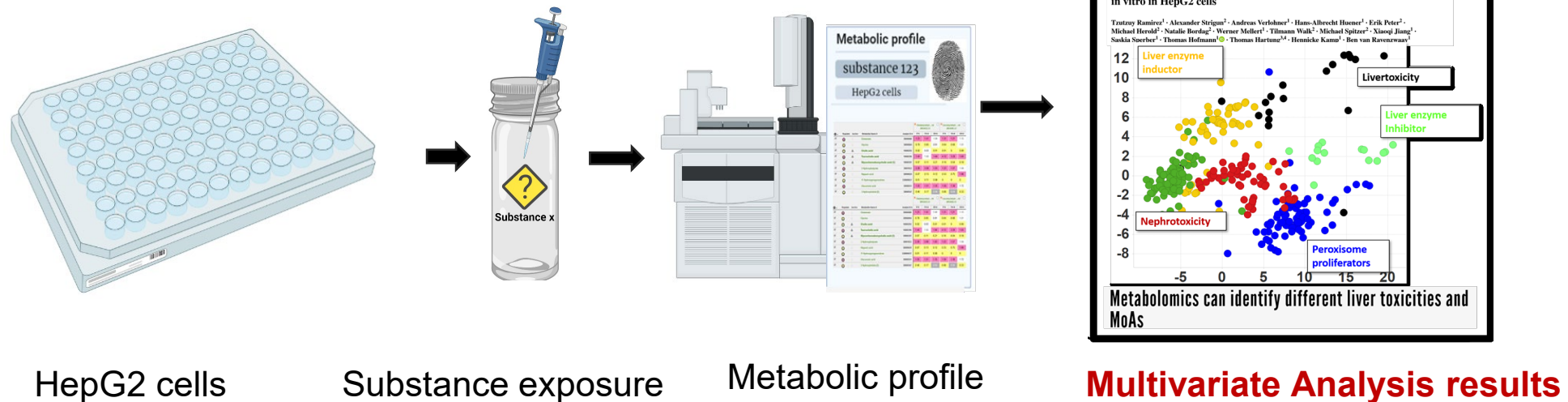


Source: Stefan Schildknecht slidedeck

Nitrofurantoin study plan

SUMMARY

Five concentrations (7,5, 15, 20, 30, 120µM) and four different **time points (3, 6, 24 and 48h)** were tested. The metabolomics data was supported with real time **imaging data** and **cytotoxicity/ cell viability analysis**.



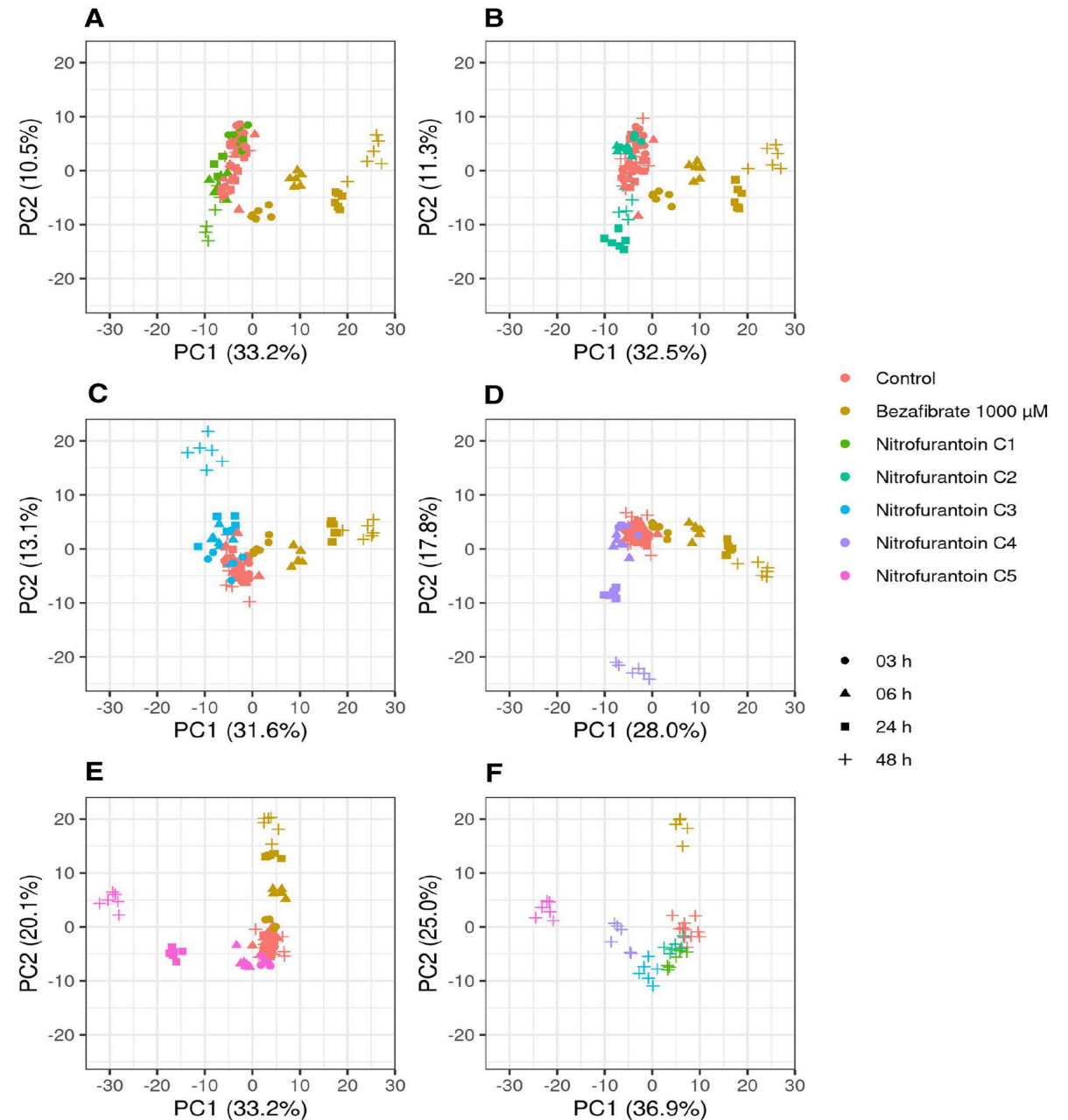
Nitrofurantoin: Dose and Time Response

PCAs of metabolomics time-response effect for each tested concentration.

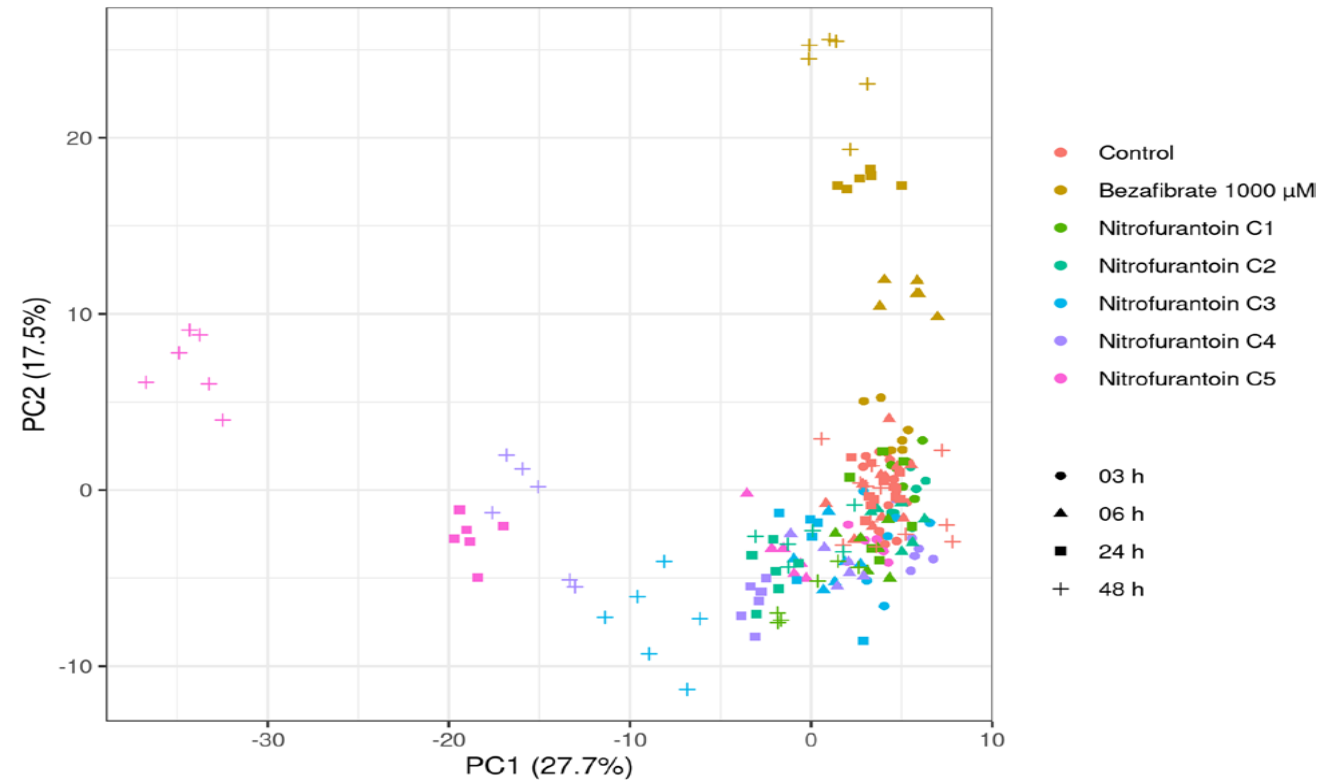
a C1: 7.5 μ M, **b** C2: 15 μ M, **c** C3: 30 μ M,

D C4: 60 μ M, C5: 120 μ M and

f metabolic profiles of the five tested concentrations: C1–C2, upon 48 h of exposure



Nitrofurantoin: Dose and Time Response

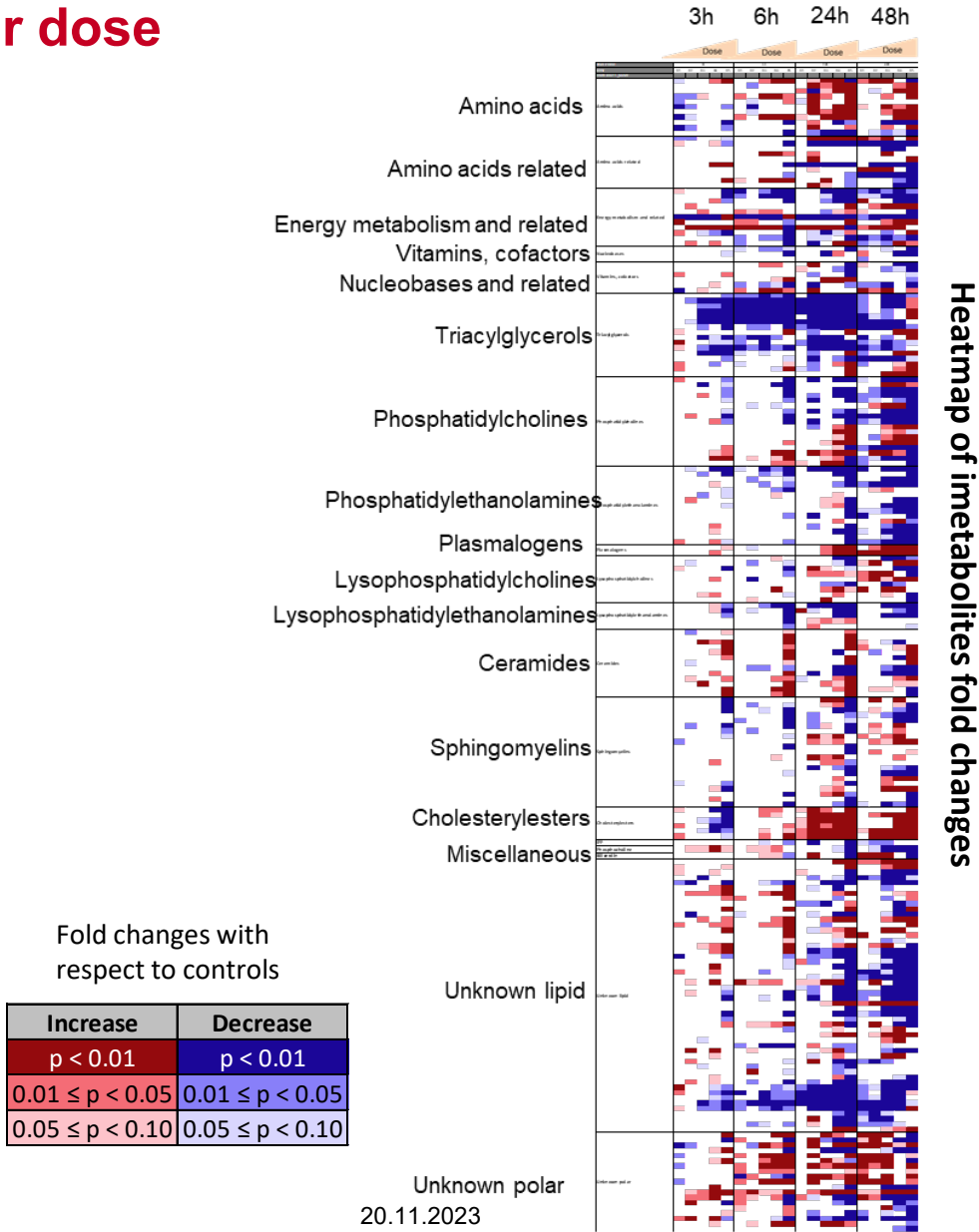


PCA of nitrofurantoin metabolic profiles show time and concentration response effects. PCA analysis of the metabolic profiles of HepG2 cells upon nitrofurantoin treatment. Bezafibrate was use as a positive control. C1:7.5 μ M, C2:15 μ M, C3:30 μ M, C4:60 μ M, C5:120 μ M

Ramirez-Hincapie, S. et al. 2023, Archives of Toxicology, 97, open access

Univariate Analysis – Metabolite changes

Time response per dose



- The total number of altered metabolites and magnitudes of fold changes increases in the later time points

Conclusion: Time Matters in vivo and in vitro

Toxicodynamics → how do validate NAMs for quantitative (sub)chronic toxicity ?

Toxicokinetics → measure intracellular concentrations over time
IVIVE based on C_{max} and AUC

