Hodnocení toxicity látek

Experimentální metody v toxikologii

Klára Hilscherová

Více info k: Přístupy k charakterizaci a hodnocení účinků, nebezpečnosti a rizik různých látek i směsí - E1240 Experimentální a aplikovaná toxikologie a ekotoxikologie (podzim)

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Zjišťování toxicity látek a materiálů - identifikace a charakterizace nebezpečnosti

Případové a epidemiologické studie (retrospektivní i prospektivní)

- pozorování lidí vystavených účinku toxické látky
  - v pracovním prostředí
  - v životním prostředí
  - v důsledků havárií apod.

  } Epidemiologické studie

  ⇣

  - záměrná kontrolovaná expozice dobrovolníků

  } Klinické studie

Experimentální metody (prediktivní)

- Experimenty s živými organismy – *in vivo*
- Experimenty s částmi živých organismů – *ex vivo*
- Experimenty s *in vitro* modely

Počítačové simulace a modelování – *in silico* (prediktivní)

- metody předpovědi toxicity

Epidemiologické studie

exponované vs. kontrolní populace

založené na známých případech z praxe, případových studiích

Dle způsobu realizace studie

- **observační (pozorovací) studie** *(observational study)*
  - **sběr dat bez přímého vlivu na probíhající děj**
  - **deskriptivní studie - popis rozložení negativního účinku v populaci**
  - **analytické studie - objasnění příčin vzniku negativního účinku**
- **intervenční (experimentální) studie** *(intervention trial)*
  - **kontrolovaná a řízená expozice sledované látce**
  - **optimalizované podmínky experimentu**

Dle časového hlediska

- **prospektivní - sledování začíná s počátkem expozice (nebo i dříve)**
- **retrospektivní - sledování začíná v průběhu či po ukončení expozice**

Epidemiologické studie

Observační (pozorovací)

- **Kauzistiky** *(case reports)*
- **Série případů** *(case series)*
- **Ekologické studie** *(ecological studies)*
- **Surveillance**
- **Průřezové studie** *(cross-sectional studies)*
- **Studie případů a kontrol** *(case-control studies)*
- **Kohortové studie** *(cohort studies)*

DESKRIPTINÍ

ANALYTICKÉ

Intervenční (experimentální)

- **Klinické studie** *(clinical trial)*
- **Terénní kontrolované studie** *(field trial)*

KVALITA VÝPOVĚDI

Epidemiologické studie

Kauzistika

- detailní popis průběhu intoxikace (otravy) jednotlivce

Série případů

- detailní popis série případů intoxikací (otrav)

Surveillance

- propojení řady sérií případů a kauzistik
- sledování trendů ve vývoji negativních účinků intoxikací
- analýza dat, interpretace, využití závěrů při preventivním opatření
- cílem detekce a popis problému a hlavně formulace hypotéz o příčinách problému a způsobech řešení (akutní situace – hromadné otravy)

Ekologická (korelační) studie

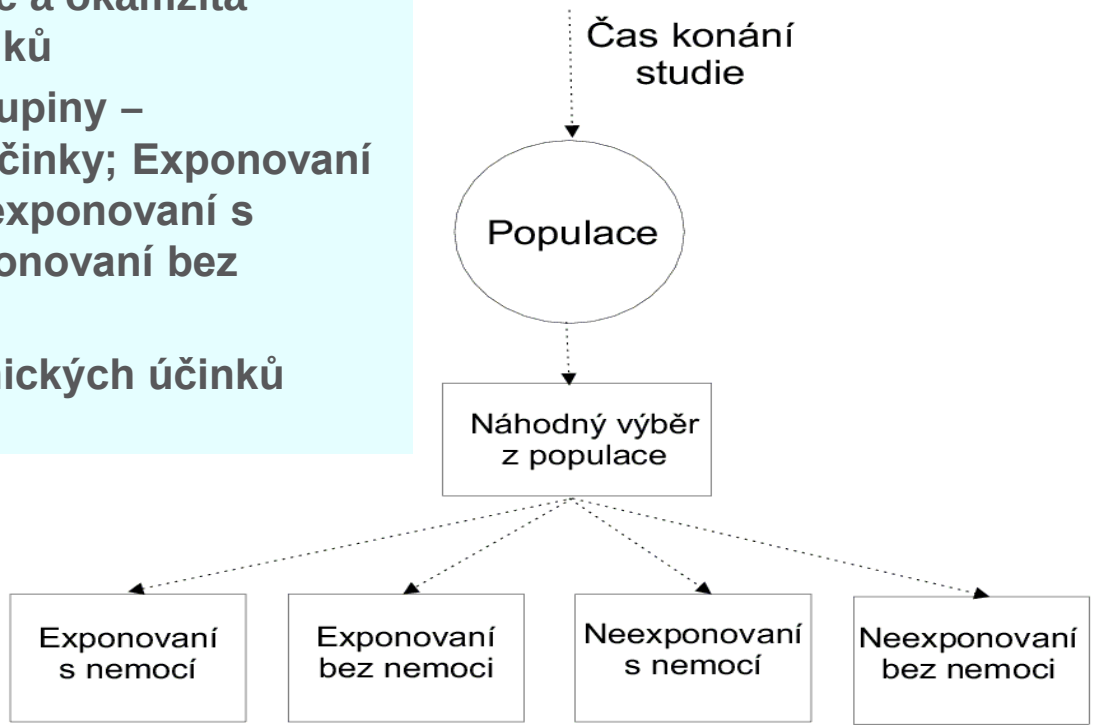
- vztah mezi negativními účinky a rizikovým faktorem na úrovni populace
- klíčová data nejsou na individuální, ale pouze na skupinové úrovni

(denní průměrná koncentrace prachových částic na Ostravsku)

Epidemiologické studie

Průřezová studie

- retrospektivní studie
- náhodný výběr jedinců ze studované populace
- jednorázový sběr dat o zdravotním stavu a úrovni expozice
- okamžitá prevalence expozic a okamžitá prevalence negativních účinků
- rozdělení výběru na čtyři skupiny – Exponovaní s negativními účinky; Exponovaní bez negativních účinků; Neexponovaní s negativními účinky a Neexponovaní bez negativních účinků
- vhodné pro sledování chronických účinků



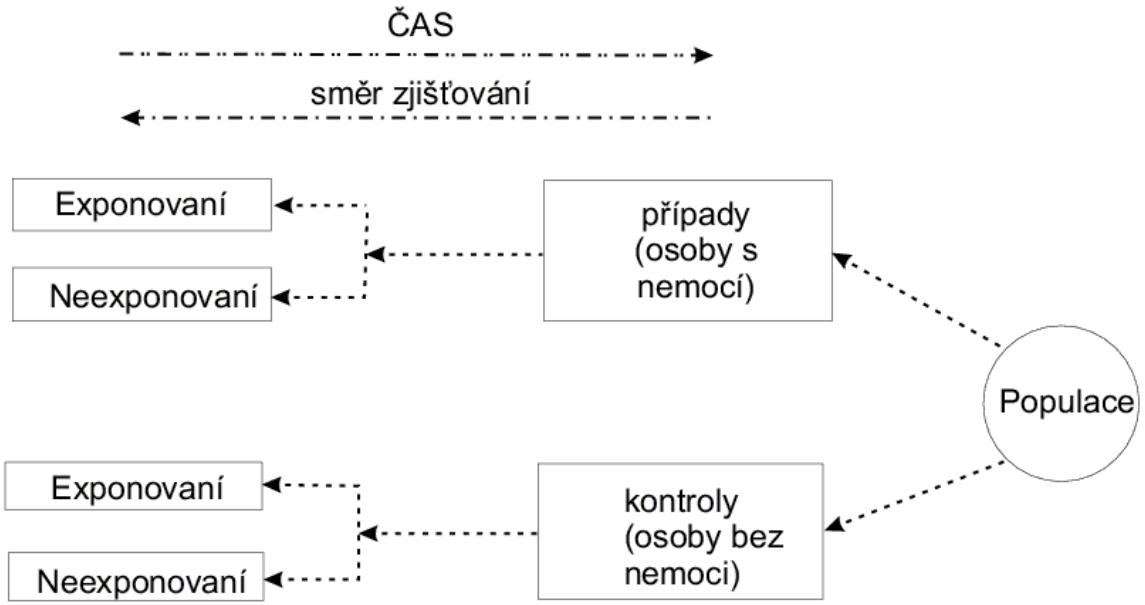
Epidemiologické studie

Studie případů a kontrol

- retrospektivní analytická studie
- testování hypotéz o vztahu mezi expozicí a negativními účinky

- nejprve identifikace „*případů*“ – jedinci se zjištěnými negativními účinky
- dále výběr skupiny „*kontrol*“ – jedinci bez sledovaných účinků, ale v ostatních parametrech (věk, pohlaví, sociální status, atd.) co nejvíce podobní případům

- v obou skupinách hodnotíme úroveň expozice

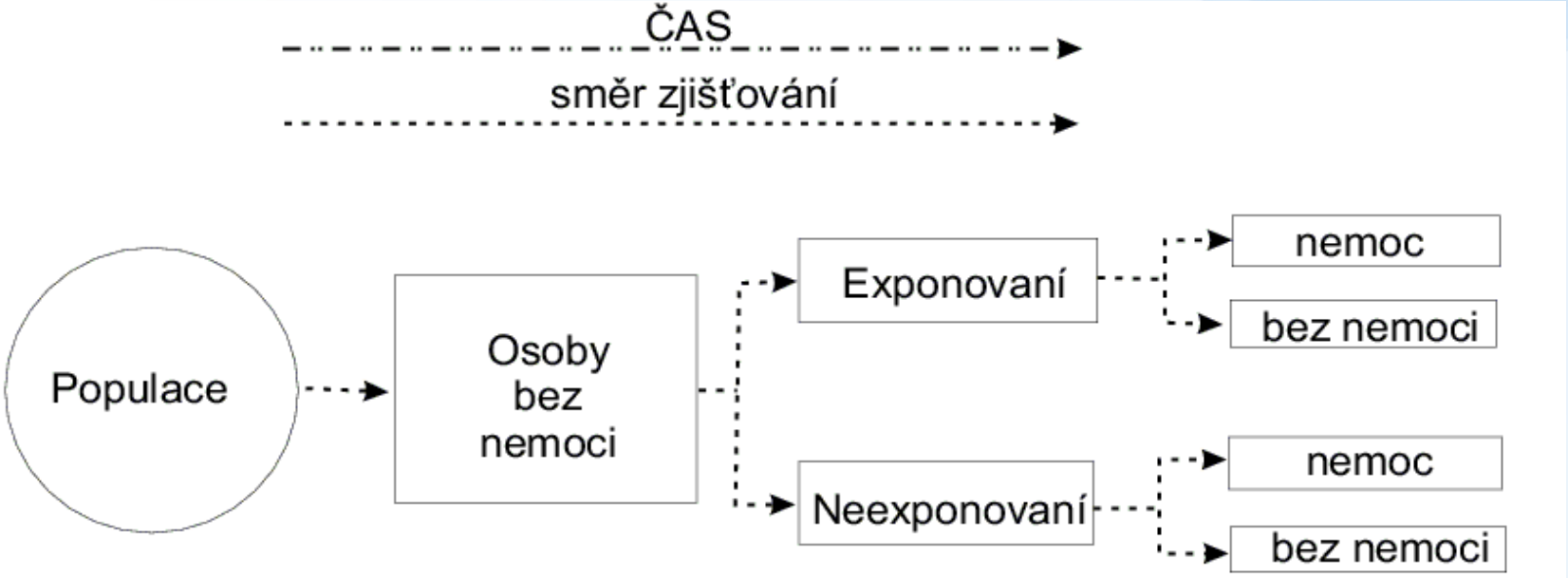


Epidemiologické studie

Kohortové studie

- prospektivní analytická studie
- testování hypotéz o vztahu expozice a negativních účinků

- skupiny jedinců (kohorty) složeny z jedinců nevykazujících na počátku studie sledovaný zdravotní efekt na základě určitého společného znaku
- jednotlivé kohorty se liší úrovní expozice – např. exponovaná a neexponovaná
- kohorty určitý čas (několik let) sledovány – v kohortách zaznamenávány jednotlivé případy onemocnění



Epidemiologické studie na RECETOX: https://www.celspac.cz/; https://www.elspac.cz/

Příklady epidemiologických studií

Hromadné otravy

Hg v rybách - Japonsko, osivu - Irák; PCB v poživatelném oleji-Japonsko, Taiwan, melamin v mléce - Čína

Epidemiologické studie

karcinogenní sloučeniny; kontaminanty v pitné vodě; narušení hormonální regulace

Problematická prokazatelnost - nízká citlivost, přítomnost dalších faktorů

Faktory ohrožující kvalitu informací v epidemiologických studiích

- **odlišnost důležitých faktorů osob ve výběru od charakteristik cílové populace – věk, zdravotní stav, fyzická kondice**
- **další vlivy - vedlejší expozice (kouření, alkohol, výživa, životní styl)**
- **nepřesnosti vzniklé při sběru dat o expozici či negativních účincích**

Sledování expozice v populaci / u jedinců

- stanovení koncentrací škodlivin a jejich metabolitů v biologickém materiálu – **jaké materiály vhodné a proč?**
- **moč, krev, vydechovaný vzduch, vlasy, mateřské mléko, chirurg. odebrané tkáně**
- význam zejména při krátkodobém překročení povolených limitů
- sledování úrovně vylučování a kumulace dané látky v organismu
- sledování individuálního zatížení

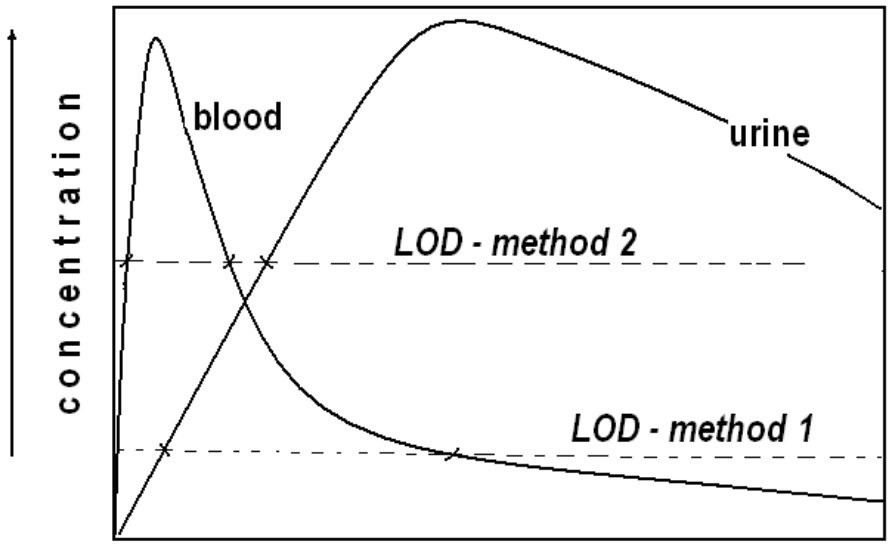
Biologický limit

- úroveň expozice, která ani při dlouhodobém každodenním opakování nepoškodí zdraví exponovaných osob.

Doba detekce po expozici

tzv. detekční okno záleží mj. na:

a) koncentraci ve vzorku
b) metodě
c) metabolizaci látky



LOD - limit of detection

Experimentální toxikologie

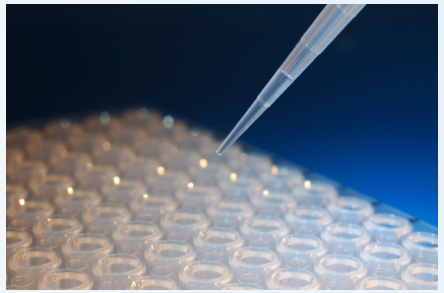
- zkoumá účinky látek na experimentálních modelech
- zjišťuje a hodnotí projevy působení chemikálií, metabolismus apod., s cílem charakterizovat jejich nebezpečnost a stanovit riziko expozice chemikálií a dodat podklady pro toxikologické limity
- stanovení bezpečné míry (hladiny) expozice, které nezpůsobí toxické účinky

Experimenty s živými organismy – ***in vivo***

- nejčastěji regulatorně používané, všechny vývojové stupně (bakterie až savci)
- standardizované metody - Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) a International Organization for Standardization (ISO)

Experimenty s částmi živých organismů – ***ex vivo & in vitro***

- Izolované orgány
- Tkáňové kultury
- Buněčné organely a extrakty
- Purifikované biomakromolekuly



Minimalizace počtu experimentálních zvířat - metody ***in silico***, stanovení výpočtem na základě matematických modelů – prediktivní toxikologie

Hodnocení toxicity

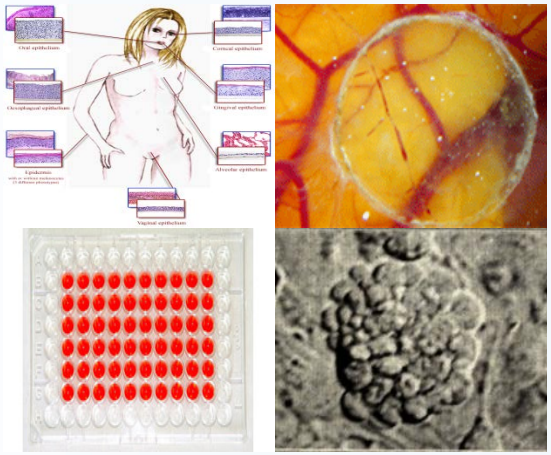
Toxikologické studie

Ekotoxikologické studie

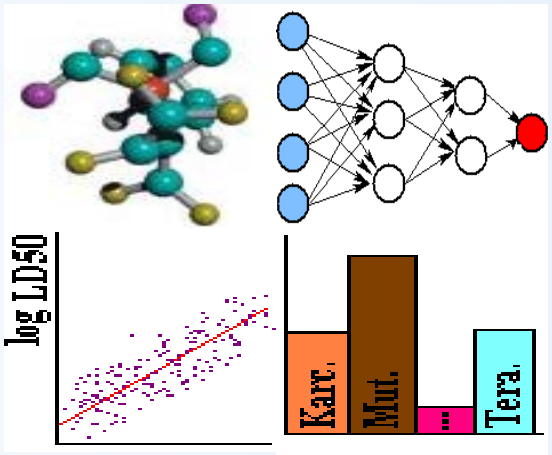
---

in – vivo

in – vitro

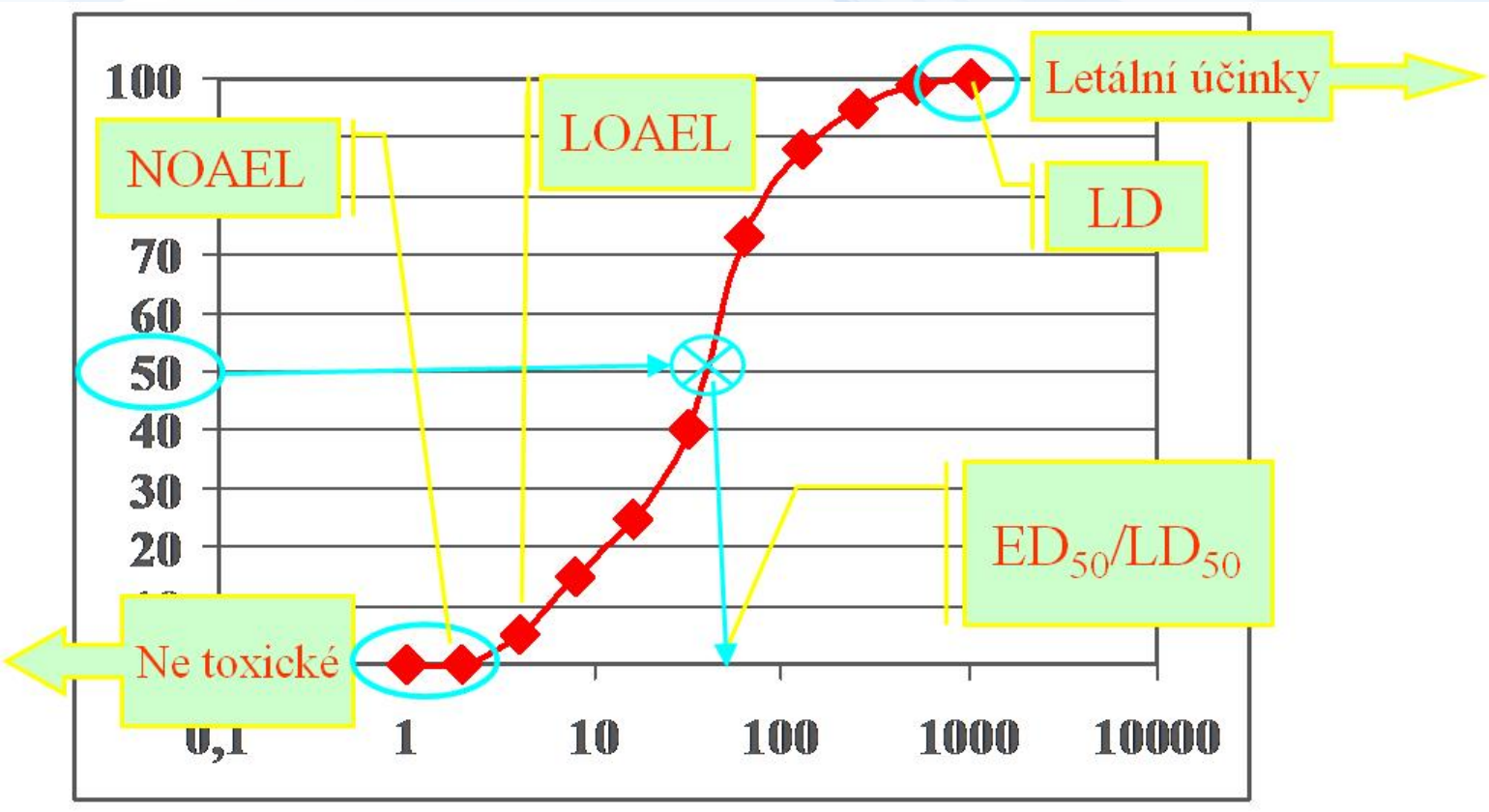


in – silico



TOXIKOMETRIE

Kvantitativní hodnocení toxicity a nebezpečnosti potenciálně toxických látek
= Hodnocení vztahu dávka - účinek



- **NOAEL no-observed-adverse-effect-level**
- **LOAEL lowest-observed-adverse-effect-level**

(viz. první přednáška,
Regulatorní toxikologie)

INTERPRETACE VÝSLEDKŮ Z POKUSŮ NA ZVÍŘATECH

NOAEL

(dávka/kg ž. hm.)

ADI = (NOAEL * standardní váha člověka v kg)/SF

- akceptovatelný denní příjem
maximální množství reziduí, které může být denně přijímáno v potravě člověka bez zdravotního rizika.

mezidruhové rozdíly
vrozená citlivost; toxikokinetika

vnitrodruhové rozdíly - rizikové skupiny - *individuální citlivost; jednostranná dieta*

sledované biologické parametry *(imunotoxicita; neurotoxicita)*

MLR

- maximální limity reziduí
(množství/kg poživatiny)

Převod na člověka

SF = bezpečnostní faktory

(UF – faktory nejistoty, MF – modifikační faktory)

snižují riziko reziduí pro člověka při extrapolaci výsledků toxicity ze zvířat na člověka. Snižuje hodnotu NOAEL 10 – 1 000x dle těchto kritérií:

- *látky s teratogenním účinkem hodnota 1 000,*
- *nejsou výsledky chronické toxicity SF > 100*
- *údaje z chronické toxicity SF = 100*
- *známy výsledky humánních testů SF =10*

Testování toxicity na savcích

Celá řada normovaných testů na laboratorních savcích

Využití: medicína, farmacie, chemický výzkum, humánní toxikologie, veterinární toxikologie….

- Legislativa - chemické látky, léčiva, kosmetické přípravky, pesticidy
- Legistiva ČR (zákony, vyhlášky)
- EC directive
- OECD
- EPA

In vivo, in vitro testy, specifické účinky – neurotoxicita, teratogenita, genotoxicita, karcinogenita

Akutní, subakutní, chronická toxicita

Laboratorní zvířata v toxikologické praxi

Myš

Potkan

Morče domácí (*Cavia aperea*)

Křeček zlatý-syrský (*Mesocricetus auratus*)

Králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*)

Pes domácí (*Canis familiaris*)

- nejčastěji plemeno beagle

kočka, miniprase, slepice, primáti

Nejčastěji používané :
myši 54%
potkani 39%
morčata 2%
králíci 2%
ostatní (psi, kočky, žáby, primáti…) 3%

3R - zásady práce s pokusnými zvířaty

Russel a Burch (1959)

Replacement (náhrada klasických testů)

- pokus se provádí na zvířeti jen tehdy, neznáme-li žádnou alternativu, jinak dáme přednost alternativě (tkáňové kultuře atd.)
- využití databází a počítačových programů – QSAR, rešerše, ...
- testy „*in vitro*“ - tkáňové kultury, bílé krvinky, jaterní buňky, testy na nižších organismech (bakterie, řasy, červi, houby, kvasinky, hmyz, semena rostlin)

Reduction (snížení spotřeby laboratorních zvířat)

- racionální a efektivní využití laboratorních zvířat
  - screeningové a pilotní studie
  - vhodný statistický design studie
  - nahrazení „skupinových testů“ individuálními
- zmenšení počtu zvířat, délky pokusu, pokus se nesmí na stejném zvířeti opakovat
- alternativy „klasických“ testů toxicity, použití technik „Acute toxic class“ „Up and down procedure“ .....

Refinement (zjemnění)

- provádět testy tak, aby docházelo k co nejmenšímu utrpení zvířat
- dobrá obživa, adekvátní zacházení školenými pracovníky, prostor pro život, pokusy v anestézii, nepoužívat extrémní koncentace (dermální testy)
- není třeba úhyn, špatný stav dostatečným projevem toxicity

Ochrana zvířat a etika práce s laboratorními zvířaty

Zákon č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání - novelizován zákonem č. **359/2012**
Vyhláška č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat, ve znění pozdějších předpisů

Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely

- použití minimálního počtu zvířat, při němž lze zajistit spolehlivé výsledky, co nejšetrnější metody
- upravuje odbornou přípravu k získání kvalifikace a odborné způsobilosti pracovníků provádějících experimenty na zvířatech – musí absolvovat náležité vzdělání a odbornou přípravu

Doporučení Komise týkající se pokynů pro umístění zvířat používaných pro pokusné a jiné vědecké účely a péči o ně (2007/526/ES)

- stanoví podmínky chovu a ochrany pokusných zvířat

státní orgány ochrany zvířat v České republice:

ministerstvo zemědělství (www.eAGRI.cz)

- Ústřední komise pro ochranu zvířat (ÚKOZ)

orgány veterinární správy

- pracoviště musí splňovat podmínky zákona 167/1993 Sb. o Státním veterinárním dozoru a být držitelem **akreditace** uživatelského zařízení a **osvědčení** pro chovné a dodavatelské zařízení dle zákona 246/1992 Sb. v platném znění (uděluje **MZe**)
- akreditované pracoviště - nezávislá odborná komise dle zákona - posuzuje a **schvaluje všechny projekty pokusů** podle předpisů, dohlíží, ověřuje odbornou způsobilost

Typy expozice

Orální - podání ústy (orálně, per os, p.o.)

Dermální - aplikace na kůži

Inhalační - podání vdechováním

Injekční podání – do svalu (intramuscular i.m.)

- do břišní dutiny (intraperitoneální i.p.)
- do pohrudniční dutiny (intrapleurální i.p.l.).
- nitrožilní aplikace - injekce do žíly (intravenozní i.v.)
- podkožní injekce (subkutánní s.c.)

- dle toho se stanovuje orální, dermální, inhalační… toxicita
- u výsledků testů toxicity nutné vždy uvádět expoziční cestu

Expoziční dávka se zpravidla uvádí v přepočtu na kg hmotnosti organismu, případně na kg potravy

Zákon o chemických látkách a chemických směsích

Zákon č.350/2011 Sb.: Zákon o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon)

- Implementace EU legislativy **REACH** = **Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals** (Regulation EC No.1907/2006)
- Systém klasifikace nebezpečných vlastností
- Základní požadavky na laboratoře klasifikující nebezpečné vlastnosti (požadavek SLP)

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008

- kterým se stanoví zkušební metody podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek

- ČÁST A: METODY PRO STANOVENÍ FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ
- **ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY A JINÝCH ÚČINKŮ NA ZDRAVÍ**
- ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY

https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX%3A32008R0440

ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY A JINÝCH ÚČINKŮ NA ZDRAVÍ

- B.1.a **AKUTNÍ** ORÁLNÍ **TOXICITA** – METODA FIXNÍ DÁVKY
- B.1.b AKUTNÍ ORÁLNÍ TOXICITA – METODA STANOVENÍ TŘÍDY AKUTNÍ TOXICITY
- B.2 AKUTNÍ TOXICITA (INHALAČNÍ)
- B.3 AKUTNÍ TOXICITA (DERMÁLNÍ)
- B.4 AKUTNÍ TOXICITA: **DRÁŽDIVÉ A LEPTAVÉ ÚČINKY** NA KŮŽI
- B.5 AKUTNÍ TOXICITA: DRÁŽDIVÉ/LEPTAVÉ ÚČINKY NA OČI
- B.6 SENZIBILIZACE KŮŽE
- B.7 **ORÁLNÍ TOXICITA** (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.8 **INHALAČNÍ TOXICITA** (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.9 **DERMÁLNÍ TOXICITA** (28DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.10 **MUTAGENITA** – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE U SAVCŮ **IN VITRO**
- B.11 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA CHROMOZOMOVÉ ABERACE V BUŇKÁCH KOSTNÍ DŘENĚ SAVCŮ **IN VIVO**
- B.12 MUTAGENITA – TEST SAVČÍCH ERYTROCYTÁRNÍCH MIKROJADER IN VIVO
- B.13/14 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA REVERZNÍ MUTACE S BAKTERIEMI
- B.15 ZKOUŠENÍ MUTAGENITY A SCREENING KARCINOGENITY – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE U SACCHAROMYCES CEREVISIAE

ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY…. (pokračování)

- B.16 ZKOUŠKA NA MITOTICKOU REKOMBINACI U SACCHAROMYCES CEREVISIAE
- B.17 MUTAGENITA – ZKOUŠKA NA GENOVÉ MUTACE V BUŇKÁCH SAVCŮ IN VITRO
- B.18 ZKOUŠKA NA POŠKOZENÍ A REPARACI DNA – NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA – V SAVČÍCH BUŇKÁCH IN VITRO
- B.19 ZKOUŠKA NA VÝMĚNU SESTERSKÝCH CHROMATID IN VITRO
- B.20 ZKOUŠKA NA RECESIVNÍ LETÁLNÍ MUTACE VÁZANÉ NA POHLAVÍ U DROSOPHILA MELANOGASTER
- B.21 ZKOUŠKY NA TRANSFORMACE SAVČÍCH BUNĚK IN VITRO
- B.22 DOMINANTNÍ LETÁLNÍ ZKOUŠKA NA HLODAVCÍCH
- B.23 ZKOUŠKA NA CHROMOSOMOVÉ ABERACE VE SPERMATOGONIÍCH SAVCŮ
- B.24 SPOT TEST NA MYŠÍCH
- B.25 ZKOUŠKA NA DĚDIČNOU TRANSLOKACI U MYŠÍ
- B.26 ZKOUŠKA **SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY** NA HLODAVCÍCH (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE **NA HLODAVCÍCH**)
- B.27 ZKOUŠKA SUBCHRONICKÉ ORÁLNÍ TOXICITY STUDIE ORÁLNÍ TOXICITY **NA NEHLODAVCÍCH** (90DENNÍ OPAKOVANÁ APLIKACE)
- B.28 STUDIE **SUBCHRONICKÉ DERMÁLNÍ TOXICITY** (90DENNÍ OPAKOVANÁ KOŽNÍ APLIKACE NA HLODAVCÍCH)
- B.29 STUDIE **SUBCHRONICKÉ INHALAČNÍ TOXICITY** (90DENNÍ OPAKOVANÁ INHALAČNÍ EXPOZICE NA HLODAVCÍCH)

ČÁST B: METODY STANOVENÍ TOXICITY…. (pokračování)

- B.30 ZKOUŠKA **CHRONICKÉ TOXICITY**
- B.31 STUDIE PRENATÁLNÍ **VÝVOJOVÉ TOXICITY**
- B.32 ZKOUŠKA **KARCINOGENITY**
- B.33 KOMBINOVANÁ ZKOUŠKA CHRONICKÉ TOXICITY A KARCINOGENITY
- B.34 JEDNOGENERAČNÍ ZKOUŠKA TOXICITY PRO REPRODUKCI
- B.35 DVOUGENERAČNÍ STUDIE **REPRODUKČNÍ TOXICITY**
- B.36 STUDIE **TOXIKOKINETIKY**
- B.37 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORG. SLOUČENIN FOSFORU PO AKUTNÍ EXPOZICI
- B.38 POZDNÍ NEUROTOXICITA ORGANICKÝCH SLOUČENIN FOSFORU – 28DENNÍ OPAKOVANÁ EXPOZICE
- B.39 ZKOUŠKA NA NEPLÁNOVANOU SYNTÉZU DNA (UDS) V JATERNÍCH BUŇKÁCH SAVCŮ IN VIVO 378
- B.40 LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI IN VITRO: ZKOUŠKA TRANSKUTÁNNÍHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)
- B.40.a LEPTAVÉ ÚČINKY NA KŮŽI IN VITRO: NA MODELU LIDSKÉ KŮŽE
- B.41 ZKOUŠKA **FOTOTOXICITY** 3T3 NRU IN VITRO
- B.42 SENZIBILIZACE KŮŽE: S VYŠETŘENÍM LOKÁLNÍCH LYMFATICKÝCH UZLIN
- B.43 ZKOUŠKA **NEUROTOXICITY** NA HLODAVCÍCH
- B.44 **ABSORPCE KŮŽÍ**: METODA IN VIVO
- B.45 ABSORPCE KŮŽÍ: METODA IN VITRO

OECD guidelines
for the Testing of Chemicals
- Section 4: Health Effects

https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section4-health-effects.htm

402 Acute Dermal Toxicity 403 Acute Inhalation Toxicity
404 Acute Dermal Irritation/Corrosion
405 Acute Eye Irritation/Corrosion
406 Skin Sensitisation
407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents
408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents
409 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents
410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study
411 Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study
412 Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study
413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study
414 Prenatal Developmental Toxicity Study
415 One-Generation Reproduction Toxicity Study
416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study
417 Toxicokinetics
418 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure
419 Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances: 28-day Repeated Dose Study
420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method
421 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity
423 Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method
424 Neurotoxicity Study in Rodents
425 Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure
426 Developmental Neurotoxicity Study ¨
427 Skin Absorption: In Vivo Method
428 Skin Absorption: In Vitro Method
429 Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay
430 In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)
431 In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test
432 In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test
435 In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion
439 In Vitro Skin Irritation
440 Uterotrophic Bioassay in Rodents: a short-term screening test for oestrogenic properties
451 Carcinogenicity Studies (Original Guideline,
452 Chronic Toxicity Studies (Original Guideline,
453 Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies
455 The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay
456 H295R Steroidogenesis Assay
471 Bacterial Reverse Mutation Test
473 In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test
474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
475 Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test
476 In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
477 Genetic Toxicology: Sex-Linked Recessive Lethal Test in Drosophila melanogaster
478 Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test
479 Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells
480 Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Gene Mutation Assay
482 Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro
483 Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test
484 Genetic Toxicology: Mouse Spot Test
485 Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay
486 Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells in vivo
487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test
488 Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays

Akutní toxicita

- Škodlivý účinek látky po aplikaci jedné dávky, krátkodobé expozici, nebo po několika dávkách během 24 h

- Výchozí zkouška pro další toxikologické studie, stanovení stupně toxicity chemické látky

- Střední smrtelná dávka LD50/koncentrace LC50

- Nejvhodnější zvíře – potkan

- příznaky toxicity – změny hmotnosti, vzhledu, kůže, srsti, očí, sliznic, dýchání a krevního oběhu, vegetativního a centrálního nervového systému, motorické aktivity a chování, výskyt třesu, křečí, slinění, průjmu, letargii, spánku a kómatu. Po ukončení pitva, histopatologické vyšetření.

Rok	TG	EU	Název	3R akce
1981	401	XXX	**Acute oral toxicity, LD_{50}**	2002: Replaced by TGs 420, 423 and 425, introducing **refinement and reduction**)
1981	402	B3	**Acute dermal toxicity**	1987: Animal test introducing **reduction** compared to the original TG (lowering of the dose level)
1981	403	B2	**Acute inhalation toxicity**	Animal test introducing potential **reduction** in animal usage compared to original 403, if one sex is more susceptible. **Refinement** by applying humane endpoints.
1981	404	B4, B40	**Acute dermal irritation / corrosion**	2002: Animal test with a sequential testing strategy for acute dermal irritation and corrosion that introduces **refinement and reduction**, including in vitro screens
1981	405	B5	**Acute eye irritation**	2002: Animal test with a sequential testing strategy for acute eye irritation and corrosion that introduces **refinement and reduction**, including in vitro screens
1981	406	B6	**Skin sensitisation**	1992: Animal test introducing **reduction** by 50% compared to original OECD TG
1981	407	B7	**Repeat dose oral toxicity (28 days), rodents**	1995: Animal test introducing **refinement** compared to original OECD TG (more information on best dosing practice, more information from the same animal)
1981	408	B26	**Repeat dose oral toxicity (90 days), rodents**	1998: Animal test (more information from the same animal than in the original test)
1981	409	B27	**Repeat dose oral toxicity (90 days), non-rodents**	1998: Animal test (more information from the same animal than in the original test)
1981	410	B8	**Repeat dose dermal toxicity (21/28 days), rodents**	
1981	411	B28	**Repeat dose dermal toxicity (90 days), rodents**	
1981	412	B9	**Repeat dose inhalation toxicity (28 days), rodents**	Animal test providing more information from the same animal than in the original test method.
1981	413	B29	**Repeat dose inhalation toxicity (90 days), rodents**	Animal test providing more information from the same animal than in the original test method.
1981	414	B31	**Prenatal development toxicity (teratogenicity)**	2001: Animal test (introduces **reduction** compared to the original OECD TG, requiring 20% fewer animals, more information from the same animals)
1981	451	B32	**Carcinogenicity**	Animal test. A Guidance Document is under development addressing issues on **reduction and refinement**.
1981	452		**Chronic toxicity**	Animal test. A Guidance Document is under development addressing issues on **reduction and refinement**.
1981	453	B33	**Combined chronic / carcinogenicity**	Animal test. A Guidance Document is under development addressing issues on **reduction and refinement**.

Rok	TG	EU	Název	3R akce
1992	420	B1	**Acute oral toxicity, fixed dose method**	2001: Animal test (**reduction and refinement** method in comparison with the conventional TG 401), less suffering, smaller number of animals
1995	421		**Reproduction / developmental toxicity screening study**	Animal test (**reduction** method compared to original TGs), new screening test provides essential information with a minimum number of animals
1996	422		**Combined repeat dose with reproduction / developmental screening**	Animal test (**reduction** method compared to the individual TGs), combines the new screening test on reproduction toxicity with TG 407, and further reduces the number of animals to an absolute minimum for these combined endpoints
1996	423	B1	**Acute oral toxicity, toxic class method**	2001 Animal test (**reduction** method compared to the conventional TG 401), much smaller number of animals (10% of that required for TG 401)
1998	425		**Acute oral toxicity, up and down method**	2001: Animal test (**reduction** method compared to the conventional TG 401), smaller number of animals, provides a closer estimate of the LD50 than TGs 420 and 423
2004	428		**Skin absorption: In vitro method**	**In vitro** alternative to the in vivo method (TG 427)
2002	429		**Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay**	Animal test (**reduction and refinement** method compared to TG 406), provides more information and causes less suffering
2004	430		**In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test (TER)**	**In vitro** test method (ex vivo test) for the corrosion part of TG 404
2004	431		**In Vitro Skin Corrosion: Human Skin Model Test**	**In vitro** test method for the corrosion part of TG 404
2004	432		**In Vitro 3T3 NRU phototoxicity test**	**In vitro** test method (no OECD TG existed for an animal test)
2006	435		**In Vitro Skin Corrosivity**	**In vitro** test method for the corrosion part of TG 404 (for specific applications, only applicable to acids and bases)
2009	436		**Acute Inhalation Toxicity: Acute Toxic Class (ATC) Method**	Animal test introducing **reduction** in animal usage compared to TG 403, and **refinement** by applying humane endpoints.
2009	437		**Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP)**	Animal test introducing **reduction** in animal usage compared to TG 403, and **refinement** by applying humane endpoints.
2009	438		**Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method**	An **in vitro** screening test for identifying potential ocular corrosives and severe irritants in a tiered-testing strategy, as part of a weight-of-evidence approach.
2009	455		**Stably Transfected Human Estrogen Receptor-α Transcriptional Activation Assay (STTA)**	**In vitro** test (could possibly introduce reduction if used in a testing strategy for detection of endocrine disrupting chemicals).

Akutní orální toxicita „Acute toxic class“

- OECD guideline 423
- 2 - 4 kroky, v prvním kroku je 3 zvířatům stejného pohlaví podána jedna z dávek 25, 200 nebo 2000 mg/kg
- podle reakce na první dávku experiment pokračuje
  - stejná dávka zvířatům opačného pohlaví
  - vyšší nebo nižší dávka zvířatům stejného pohlaví
  - experiment končí
- výsledkem testu není přesné určení LD_{50}, pouze zařazení látky do třídy toxicity

Akutní orální toxicita „Up and Down procedure“

- OECD guideline 425
- v prvním kroku je 1 zvířeti podána dávka odpovídající kvalifikovanému odhadu LD_{50}
- pokud v 1 kroku zvíře zemře (vykazuje zřetelné projevy akutní intoxikace) je dalšímu zvířeti podána dávka nižší a naopak
- experiment pokračuje do nalezení hraničních dávek - z nich je proveden přesnější odhad LD_{50}
- výsledkem testu je přesný odhad LD_{50}

Akutní inhalační toxicita (OECD 403)

u plynných látek, par a aerosolů

- stanovení škodlivých účinků látky v dýchaném vzduchu
- stanovení LC_{50} – poloviční letální koncentrace
  úhyn 50% zvířat po 4 hodinové expozici
- odstupňované dávky - min. 3 koncentrace
- sledování a popis účinků, pozorování – 14 dní , makroskopická pitva

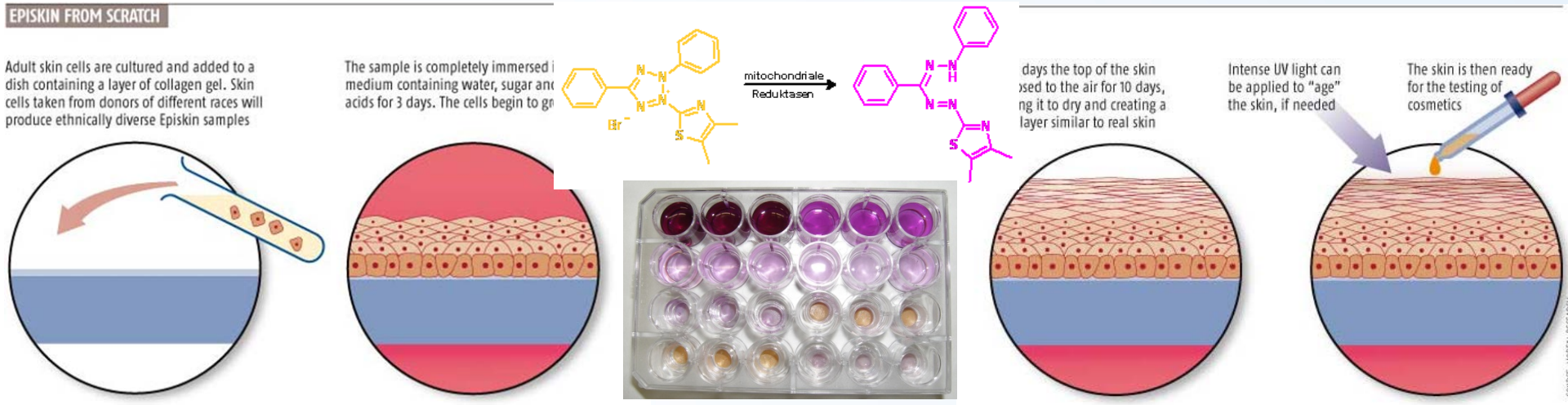
Akutní dermální toxicita (OECD 404)

- testování látek, u nichž je předpokládána významná kožní expozice
- škodlivý účinek po krátkodobé dermální aplikaci (mg/kg)
- stanovení LD_{50}, sledování a popis účinků
- látka se nanáší na hřbet po depilaci - plocha cca 10% povrchu těla
- odstupňované dávky (koncentrace)
- aplikace - roztok, suspenze, kaše
- králík, potkan, morče

Testy kožní dráždivosti a leptavosti

In-vitro – Modely lidské kůže EpiDerm a Episkin

- trojrozměrný model lidské kůže - rekonstruované epidermis s funkční stratum corneum - účinek testované látky na životnost buněk
- cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy
- testovaná látka je umístěna na stratum corneum epidermálního modelu, expozice ukončena omytím fosfátovým pufrem. Poté jsou tkáně inkubovány s MTT (žlutá tetrazoliová sůl). Pokud jsou buňky živé, MTT je v mitochondriích redukován sukcinát dehydrogenázou na modrý formazanový precipitát. Ten je přes noc z buněk vyextrahován okyseleným izopropanolem a kvantifikován spektrofotometricky.



Testy oční dráždivosti a leptavosti

stanovení dráždivých a leptavých účinků na oči po jednorázové aplikaci testované látky do oka

1. ***In silico***
2. ***In vitro* – modely EpiOcular**
3. ***Ex vivo* – metoda BCOP – test na hovězí rohovce - použití tkání z poraženého dobytka**
4. ***In vivo* – pokusné zvíře - albinotický králík**

In-vitro – Modely lidské kůže EpiOcular

trojrozměrný model umělé tkáně EpiOcularTM z lidských keratinocytů kultivovaných do podoby vrstevnatého dlaždicovitého epitelu podobného lidské rohovce

zjišťuje se účinek látky na životnost buněk, cytotoxicita je vyjádřena jako redukce aktivity mitochondriální dehydrogenázy

testovaná látka je umístěna na povrch modelu ve 3 expozičních časech

inkubace v intervalech – 3 min, 30 min, a 60 min

Testy subakutní toxicity

- obvykle **28 dní**
- expozice 1x denně po celou délku testu - orální, dermální, nebo inhalační
- dávky látky odvozeny od 1/10 LD_{50}, koncentrace 1/10 LC_{50} z akutního testu

Parametry sledované v průběhu pokusu:

- hmotnost, přírustek, úmrtnost, spotřeba potravy a vody, chování zvířete, metabolismus, mechanismus a rychlost vylučování, fyziologická vyšetření, biochemická šetření, reprodukční schopnosti

Po ukončení pokusu se pokusná a kontrolní skupina utratí a provede se pitva a celá řada vyšetření

- Podklady pro NOEL, NOAEL, LOAEL a jiné, statistické vyhodnocení

Subakutní inhalační toxicita

- testované zvíře v atmosféře zkoumané látky 14 nebo 28 dnů
- náročné technické zabezpečení, plynulý denní tok zkoumané látky

Testy na subchronickou toxicitu

90 denní test, expozice orální, dermální či inhalační

- opakované podávání testované sloučeniny
- expozice 1x denně po celou délku testu, možnost kumulace
- v ČR – spolu s akutní toxicitou – požadovány pro většinu nových chemických látek
- velká vypovídací schopnost, poznání cílových orgánů, povahy tkáňového nebo orgánového poškození
- určení hladiny „nulového účinku“
- 3 hladiny dávek, odvozeny od 1/10 LD_{50} nebo LC_{50}
- zejména hlodavci (myš, potkan); test na 2 živočiš. druzích: 1 hlodavec a 1 zvíře, které nepatří do řádu hlodavců

V průběhu pokusu se sleduje celá řada parametrů – přírůstky hmotnosti, spotřeba vody, změny chování, hematologie, klinická chemie krve, moči

Na konci pokusu se zvířata utratí a provede se pitva a celá řada vyšetření; důkladné histopatologické vyšetření, tkáňové léze, váhy orgánů
Podklady pro NOEL, NOAEL, LOAEL a jiné

Testy chronické toxicity

- pro zjištění kumulačních, mutagenních, karcinogenních a teratogenních vlastností látek
- expozice probíhá po **většinu doby života** laboratorního zvířete, experimentálně náročné, **dlouhodobé testy**, cca 2 roky
- expozice orální, dermální či inhalační
- aplikovaná látka – dobře prostudovaná, v dostatečném množství na celou dobu testu (stejná šarže, stejná kvalita)
- důkladná péče o laboratorní zvířata (sterilizace podestýlky, konstantní klima, pravidelné střídání period den-noc, kvalitní (analyzované) krmivo)
- min. 2 druhy zvířat, 50♂ + 50♀ + kontrolní skupina 50 zvířat (25♂+ 25♀)
- 3 hladiny dávek
  - nízká, na prahu „nulového účinku“
  - střední
  - vysoká, na hranici intoxikace
- modelování pracovního prostředí – 5x v týdnu + („volný víkend“)
- doba testu - potkani 24 měsíců, myši, křečci 18 měsíců, králíci
- pozorování, patobiochemické vyšetření

Testy reprodukční toxicity

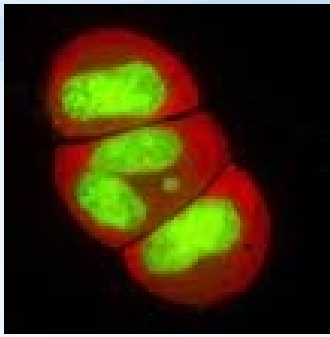
- vícegenerační studie
- cílem zjistit vliv látky nebo jejích metabolitů na reprodukci savců (vlivy na následující generace)
- zkoušená látka je podávána samcům a samicím ve vhodné době před kopulací – aplikace může pokračovat až do dalších generací
- sleduje se toxicita pro rodiče, vliv na fertilitu samců i samic, zabřeznutí, uhnízdění, doba gravidity, porod, laktace, velikost vrhů, váha a vitalita mláďat, růst a vývoj potomstva od početí do porodu přes dospělost až k reprodukční funkci potomků
- testy reprodukční toxicity nejsou určeny k detekci malformací (zničení malformovaných potomků matkou $\Rightarrow$ vývojová toxicita)

Testy vývojové toxicity - teratogenity

- vliv na prenatální vývoj, na pregnantní samice, vývoj embrya a plodu, alterace embryonálního a fetálního růstu, strukturální změny (embryoletalita, fetotoxicita).
- teratogenita = vznik malformací, které mohou nebo nemohou být slučitelné se životem
- aplikace zkoumané látky v odstupňovaných dávkách po určitou dobu - část gravidity pokusných zvířat (organogeneze)
- potkan, myš, králík
- sleduje se toxicita pro matku, embryotoxicita – preimplantační ztráty + resorbce embrya, počet živých plodů, váha plodů, malformace pevných a měkkých tkání, trvalé změny (strukturální, funkční) na embryu v období vývoje

Testy genotoxicity

- Studie poskytují informace o možných genotoxických vlastnostech látek tj. o schopnosti způsobovat změny genetického materiálu
- Zhodnocení potenciálu látek působit na genetický materiál buněk (DNA)
- Standardní série testů (s/bez metabolickou aktivací)
  - Test na genovou mutaci u bakterií (Amesův test)
  - In vitro test na chromosomální poškození savčích buněk
  - In vivo test na chromosomální poškození haematopoetických buněk hlodavců
    - micronucleus test na savčích erytrocytech
    - chromosomální aberace buněk savčí kostní dřeně
- Genové mutace - Saccharomyces cerevisiae
- Mitotické rekombinace Saccharomyces cerevisiae
- Poškození DNA reparace - neplánovaná syntéza DNA - savčí buňky in vitro
- SCE - výměna sesterských chromatid in vitro
- Recesivní letální mutace vázané na pohlaví u Drosophilla melanogaster
- Test transformace savčích buněk in vitro
- Dominantní letální test u hlodavců



Testy karcinogenity

Expozice v nízkých koncentracích, ale po dlouhou dobu (často po celý život)

Testy karcinogenity by měly být zvažovány:

- v případě pozitivních výsledků testů genotoxicity v *in vitro* a *in vivo* testech
- u látek strukturálně příbuzných se známými karcinogeny
- v případě, že výsledky dlouhodobé toxicity ukazují na možnou karcinogenitu

expozice po prakticky celou délku života (myš a potkan ≥ 1-2 roky)
test zahrnuje dvouroční studii u krys a 18-ti měsíční studii u myší, nebo pouze u krys, a v případě pozitivity i další druh

minimálně 3 různé dávky - nejvyšší = výrazná toxicita
nejnižší = bez příznaků

Parametry: změny chování; váhy orgánů; patologie, histopatologie (klinická chemie)

Další testy

Imunotoxicita

- V případě, že studie chronické toxicity prokáží působení změn ve velikosti či hmotnosti lymfoidních orgánů nebo histologické změny v lymfoidních tkáních, kostní dřeni nebo periferních lymfocytech

Neurotoxicita

testy neurotoxicity jestliže :

- substance náleží do tříd látek známých účinky neurotoxicity:
  - organofosfáty – acetylcholinesteráza,
  - pyrethroidy – změny chování, funkční změny,
  - karbamáty,
- indikace neurotoxicity či změn chování v jiných testech
- prokazují se v toxikologických studiích histologické, biofyz. nebo biochem. změny na nervovém systému.

Laboratorní zvířata: potkani

Toxikokinetické studie

cílem ukázat dosažené zatížení organizmu (koncentraci v tělních tekutinách a tkáních) ve vztahu k dávce a k časovému průběhu studie

srovnat dosaženou expozici (hladiny v těle) s toxikologickými nálezy v různých orgánech

Endokrinní disrupce

Narušení funkcí endokrinního systému, hormonální regulace

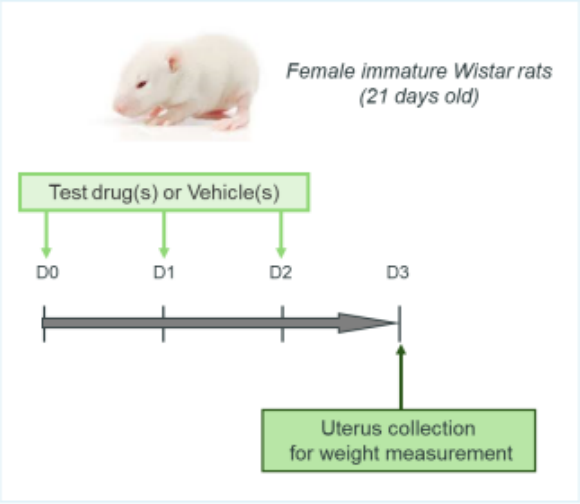
Koncepční rámec OECD pro testování a hodnocení endokrinních disruptorů - OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters
(https://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm)

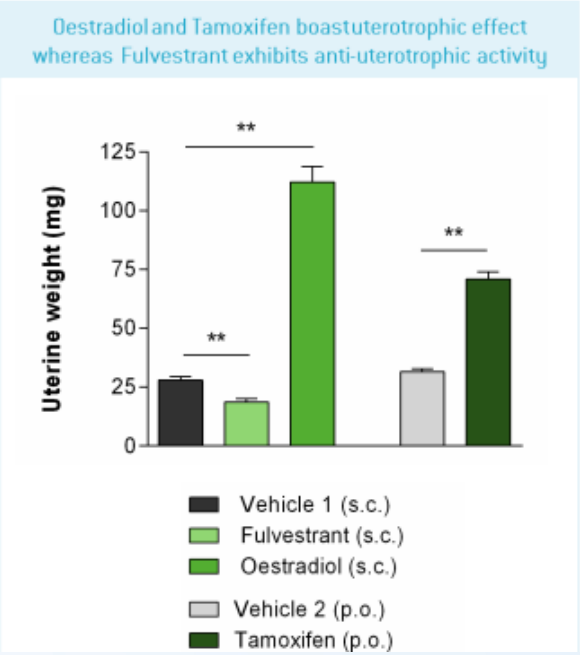
Uterotrofický screeningový test

- použití pro testování estrogenity látek (xenoestrogenů) - méně často pro testování antiestrogenity
- Princip: aplikace testované látky pohlavně nedospělým nebo kastrovaným samicím → statisticky signifikantní zvýšení hmotnosti dělohy závislé na dávce ve srovnání s kontrolní skupinou = důkaz estrogenního agonismu
- růst děložní tkáně je pod vlivem estrogenů

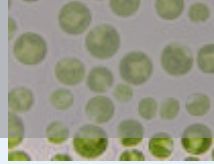
Hershberger screeningový test

- použití pro testování androgenity (xenoandrogenů) či antiandrogenity
- Princip: aplikace testované látky kastrovaným samcům → statisticky signifikantní zvýšení hmotnosti přídatných pohlavních orgánů závislé na dávce ve srovnání s kontrolní skupinou = důkaz androgenního agonismu (např.: prostata, semenné váčky)
- růst některých tkání u samců pod vlivem androgenů





Testy ekotoxicity



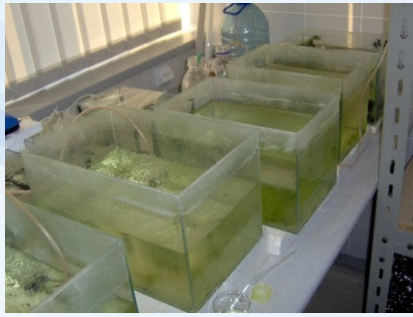
Cíl: zhodnotit možné škodlivé účinky pro organismy v životním prostředí

- účinek na půdní nebo vodní organismy
- účinek na další necílové organismy
- všechny vývojové stupně (bakterie až savci)
- metody - Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) a International Organization for Standardization (ISO).

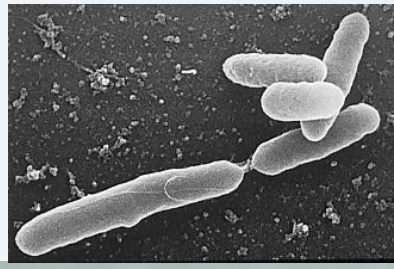
Hodnocení ekotoxicity

Organismy používané pro ekotoxikologické biotesty

Modely na všech úrovních potravního řetězce



- producenti - fotoautotrofní organismy,
  řasy, sinice, vyšší rostliny
- konzumenti – bezobratlí, obojživelníci, ryby, ptáci, savci
- destruenti – bakterie, kvasinky



➢ Baterie testů, mikrokosmy, mesokosmy
➢ Testy na biocenózách jsou nejrelevantnější, zahrnují vliv látky na organismy i na celá společenství živočichů, rostlin a dané životní prostředí x časová a finanční náročnost.

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Chemické látky a chemické přípravky – hodnocení vlastností nebezpečných pro životní prostředí

Zák. č. 350/2011 Sb. O chemických látkách a chemických přípravcích

NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 440/2008, ČÁST C: METODY STANOVENÍ EKOTOXICITY

- akutní toxicita pro ryby, akutní toxicita pro dafnie, toxicita pro reprodukci u dafnie
- inhibice růstu řas, toxicita pro žížaly
- bioakumulace – průtoková zkouška na rybách
- test růstu na nedospělých rybách
- toxicity na rybích embryích a potěru – krátkodobá zkouška
- akutní orální a kontaktní toxicita pro včelu medonosnou

Vyhláška **376/2001 Sb. + 502/2004 Sb.** o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů

Příloha č. 3: Metody hodnocení nebezpečných vlastností odpadů
Pro hodnocení vlastnosti H14 ekotoxicita se použijí metody:

ČSN EN ISO 6341 Jakost vod - Zkouška inhibice pohyblivosti Daphnia magna Straus
ČSN EN 28692 Jakost vod - Zkouška inhibice růstu sladkovodních řas
ČSN EN ISO 7346-2 Jakost vod - Stanovení akutní letální toxicity pro sladkovodní ryby
Test inhibice růstu kořene hořčice bílé (Sinapsis alba). Metodický pokyn MŽP ke stanovení ekotoxicity odpadů.

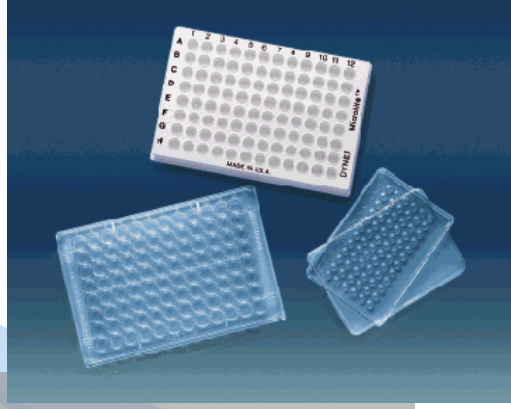
OECD Guidelines for the Testing of Chemicals
Section 2:Effects on Biotic Systems

https://www.oecd.org/env/ehs/testing/section-2-effects-biotic-systems.htm

Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
Test No. 234: Fish Sexual Development Test
Test No. 235: Chironomus sp., Acute Immobilisation Test
Test No. 209: Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Carbon and Ammonium Oxidation)
Test No. 223: Avian Acute Oral Toxicity Test
Test No. 233: Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment
Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay
Test No. 230: 21-day Fish Assay
Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay
Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil
Test No. 226: Predatory mite (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) reproduction test in soil
Test No. 228: Determination of Developmental Toxicity of a Test Chemical to Dipteran Dung Flies(Scathophaga stercoraria L. (Scathophagidae), Musca autumnalis De Geer (Muscidae))
Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test
Test No. 225: Sediment-Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment
Test No. 224: Determination of the Inhibition of the Activity of Anaerobic Bacteria
Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test

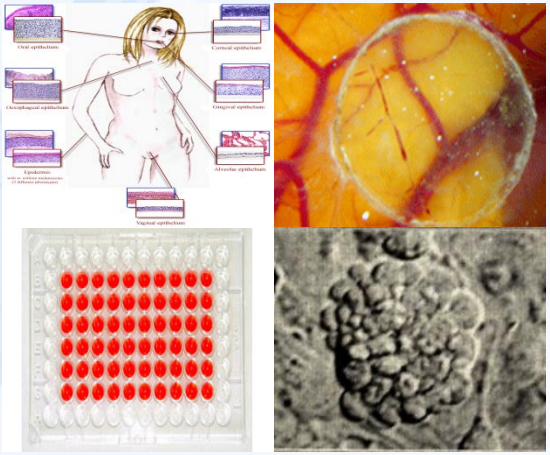
Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test
Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhabition Test
Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test
Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment
Test No. 219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Water
Test No. 220: Enchytraeid Reproduction Test
Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)
Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test
Test No. 216: Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test
Test No. 217: Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test
Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages
Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test
Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test
Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test
Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test
Test No. 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study
Test No. 205: Avian Dietary Toxicity Test
Test No. 206: Avian Reproduction Test
Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

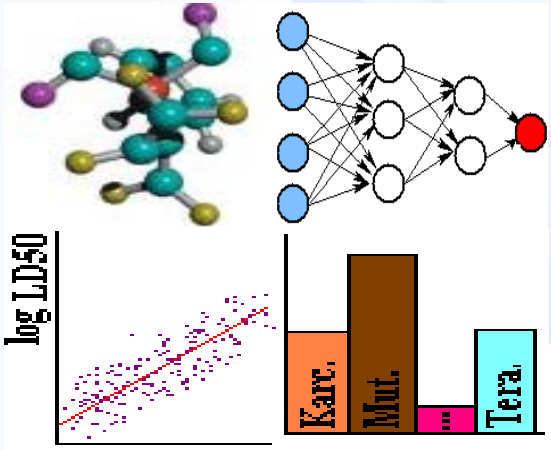


Alternativy klasických *in vivo* testů

in – vitro



in – silico

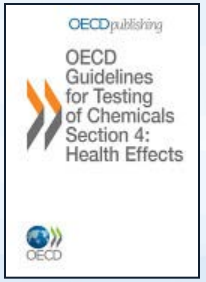


evropský sociální fond v ČR
EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITAS MASARYKIANA BRUNENSIS
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Vytvoření tohoto předmětu je spolufinancováno Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Toxikologie & Experimenty na zvířatech

- regulatorní toxikologie – od 20. století založena primárně na *in vivo* metodách
- OECD Test Guidelines
- řada metod vyvinuta před 30 - 60 léty



OECD TG / Description

401
402
403
404
405 Acute eye irritation
406 Skin sensitisation
407 Repeat dose oral toxicity (28 days), rodents
408 Rep
409 Rep
410 Rep
rod
411 Repeat dose dermal toxicity (90 days), rodents
Repeat dose inhalation toxicity (28 days), rodents
Repeat
odents
Prenata
One generation reproduction toxicity
o generation reproduction toxicity
Toxicokinetics
elayed
(acut
m pro v
toxických látek
v prostředí

Etické důvody

Relevance a spolehlivost

Pokrok v technologiích

Ekonomická a časová náročnost

požadavků
sti zce
nevyhovující
hodnocení
přístupů
okroku a
v biologii,
metodologii, instrumentaci

IN VIVO

IN VITRO

IN SILICO

TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

- Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (Regulation EC No. 1907/2006) – **REACH**
  - chemikálie s produkcí více než 1 t / rok -> hodnocení toxicity
  - odhadem cca **30000** chemických látek během **15ti let** *(Liebsch 2011, Arch Toxicol 85)*
  - s použitím současných metod odhadováno **9 – 54 mil. pokusných zvířat** *(Rovida 2009, Altex 26)*
  - nejen **etický**, ale i **ekonomický a časový aspekt**
  - **Annex XI:** pravidla pro standardní testování zahrnují možnost interpretace výsledků z *in vitro* testů:
    - Validované testy
    - „Vhodné“ (suitable) testy – dostatečně vyvinuté z hlediska mezinárodně uznávaných kritérií pro zahájení pre-validačního procesu (ECHA)

TOXIKOLOGIE & EXPERIMENTY NA ZVÍŘATECH

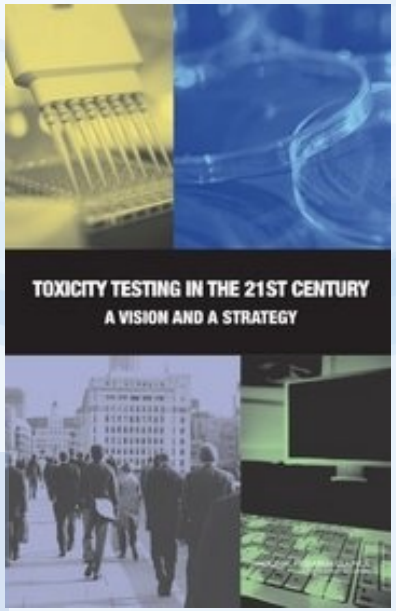
- Eticky diskutabilní - tlak odborné i laické veřejnosti
- 1959: Russel & Burch: "**3Rs principle**"

- Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely

  aktivní podpora vývoje, validace a zavádění metod v souladu s 3R principem
- ECVAM JRC European Centre for Validation of Alternative Methods, Joint research Centre, EU, Ispra, Itálie
- USA – zákony na státní úrovni (California, New Jersey, New York)

Toxikologie & Experimenty na zvířatech

- 2007: Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy
  (US National Research Council/NAS)



  - **Mezidruhové rozdíly**
  - **Vysoké dávky, krátké doby expozice**
  - **Hodnocené parametry (smrt, nádor)**
    → **Předpoklady a extrapolace, faktory nejistoty**
  - **Nespolehlivost** a **nerelevantnost** tradičních *in vivo* metod

Farmakologie a farmaceutická toxikologie:
• Pouze **43% shoda** výsledků z testů na hlodavcích s výsledky klinických studií (*ECVAM*)
• V klinické fázi testování selhává až **92% potenciálních léčiv** (*Pampaloni 2009, Rec Patents on Biotech 3*)

  - **Ekonomická a časová náročnost**, **zastaralost**, **etické problémy**

Souhrn dokumentu Toxicity Testing in the 21st Century (anglicky):
https://www.nap.edu/read/11970/chapter/2

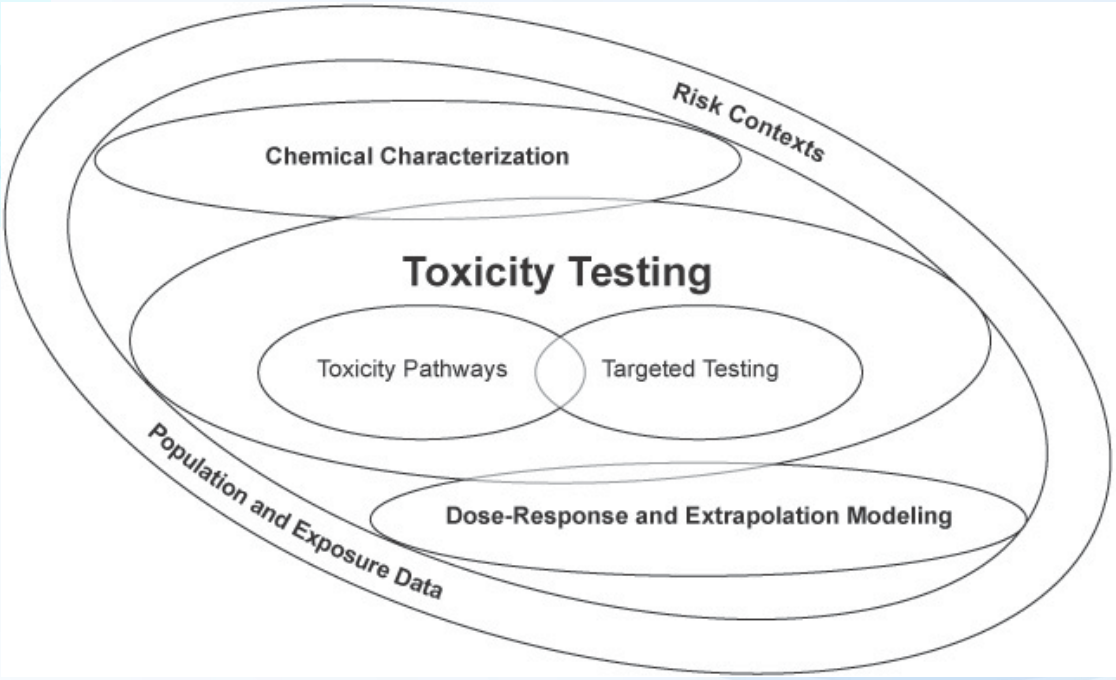
Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy

nově připravená strategie vycházející z aktuálních poznatků a nejmodernějších technologií s cílem:

1) Zvýšit počet testovaných látek

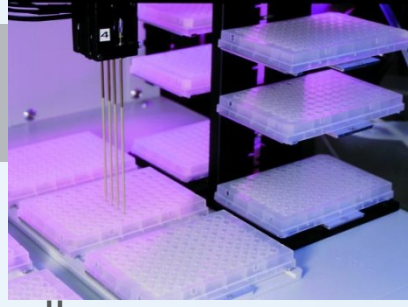
2) Snížit náklady

3) Zlepšit výpovědní hodnotu výsledků vzhledem k predikci zdravotních rizik a environmentálním koncentracím



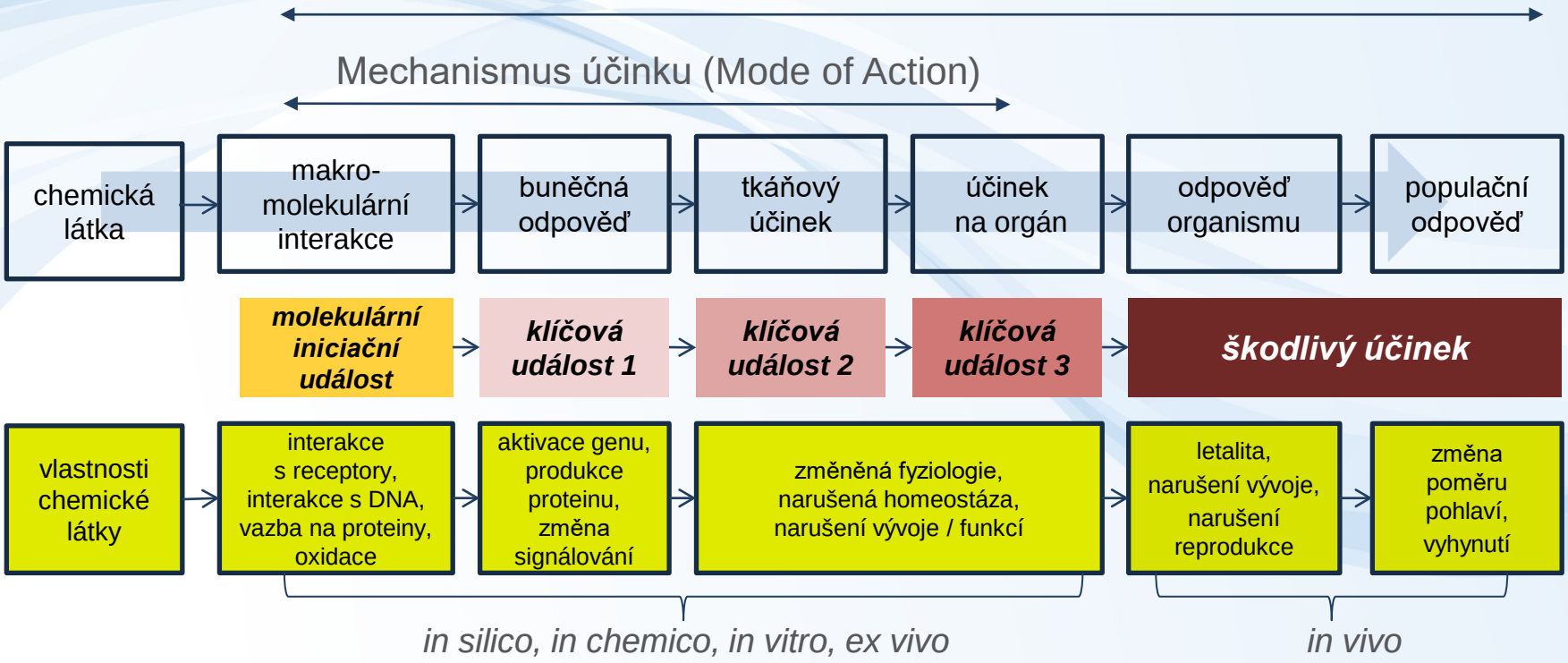
- Primárně **lidské buňky a tkáňové kultury *in vitro***
- Vlivy na **biologické procesy (toxicity pathways)** – mechanismy buněčné odpovědi, jejichž narušení v organismu vede ke škodlivým účinkům
- **Cílené testování (Targeted testing)** x Testy na celých organismech (Whole-animal testing)
- Počítačové **modelování závislostí dávka-odpověď** pro narušování toxických drah**, modelování pro účely extrapolací –** interpretace informací z buněčných systémů směrem k *in vivo* toxicitě
- **Informace o expozici - biomonitoring** – hladiny chemických látek v krvi, vlasech či dalších tkáních
- Hodnocení rizik - **minimalizace narušování** toxických drah v **exponované populaci**

Moderní přístupy



- **Systémová biologie** – využívá výpočtové modely a laboratorní data k porozumění biologickému systému a jeho fungování jako celku
- **Biomarkery** indikující narušení kritických toxických drah a procesů
- Automatizované a robotizované systémy hodnocení (**high throughput screening, HTS**)
- **Bioinformatika** – interpretace komplexních mnohorozměrných dat z genomických studií a HTS
- **Toxikogenomika**
- Modelování **závislosti dávka-odpověď** pro narušování toxických drah pomocí **počítačové systémové biologie a modelů**
- Modelování vztahu **struktura-aktivita** pro predikci účinků a chování látek
- **Extrapolace *in vitro -> in vivo*** - **farmakokinetické modely** (PBPK) pro predikci koncentrací látek v krvi a tkáních za specifických expozičních podmínek

Dráha škodlivého účinku (AOP = Adverse outcome pathway)



- **série definovaných a kauzálně spojených událostí napříč různými úrovněmi biologické organizace, které vedou k poškození zdraví nebo ekotoxicitě**

- Využití existujících znalostí a informací k propojení dvou ukotvujících bodů: **Molekulární iniciační událost** (Molecular Initiating Event, MIE) a **Škodlivý účinek** (Adverse Outcome**,** AO) přes sérií mezikroků, tzv. **Klíčové události** (Key Events)

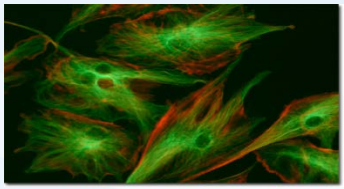
- **AOPs umožňuje propojit výsledky z *in vitro* studií a *in vitro* screeningu se škodlivými účinky na úrovni organismu nebo populací**

Alternativní testy

- Musí projít **validačním řízením**
- Dle **ECVAM** (the European Centre for the Validation of Alternative Methods) v současnosti uznávána **sada vědecky ověřených alternativních metod** (zejména testování fototoxicity, kožní dráždivosti, embryotoxicity).
- ECVAM – součástí JRC (Joint Research Centre EU)
- **EURL-ECVAM** = European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (since 2011)
- https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/
- Podporuje vývoj a uplatňování alternativních metod a přístupů, aplikace v průmyslu a akceptaci regulačními orgány
- Výzkumné organizace mohou zaslat alternativní metody, které vyvinuly, na odbornou validaci do **EURL ECVAM**
- **EURL-NETVAL** = European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods – síť validačních laboratoří ve členských státech

https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/eu-netval

Náhrady klasických testů
- testy in vitro: tkáňové explantáty, bílé krvinky, jaterní buňky, tkáňové kultury
- testy na nižších organizmech: bakterie, prvoci, červi, hmyz, řasy, houby, kvasinky, semena rostlin



IN VITRO TOXIKOLOGIE

***In vitro* metody - budoucí pilíř toxikologie**

Testy na původních či geneticky modifikovaných prokaryotických či eukaryotických buňkách

BAKTERIÁLNÍ TESTY, KVASINKOVÉ TESTY x TESTY NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH z vyšších organismů

Primární linie

- zvířecí: mezidruhová variabilita, etické problémy

- lidské: limitovaná dostupnost, heterogenita / nízká reprodukovatelnost

Permanentní linie

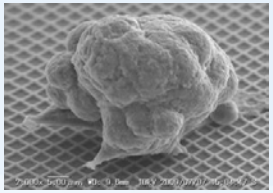
- lidské: 1951 – HeLa (cervikální karcinom)

- dnes dostupné desítky linií z různých orgánů

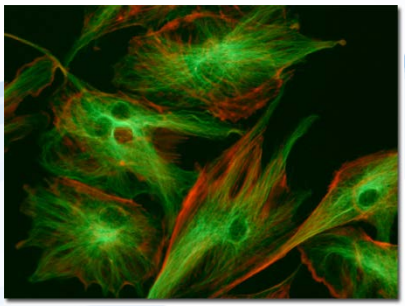
- většinou **nádorového původu** – genetické a epigenetické změny, abnormální genotyp a fenotyp – abnormální odezva? Relevance?

Alternativy? Kmenové buňky, pluripotentní buňky, 3D systémy

Testy na buněčných kulturách



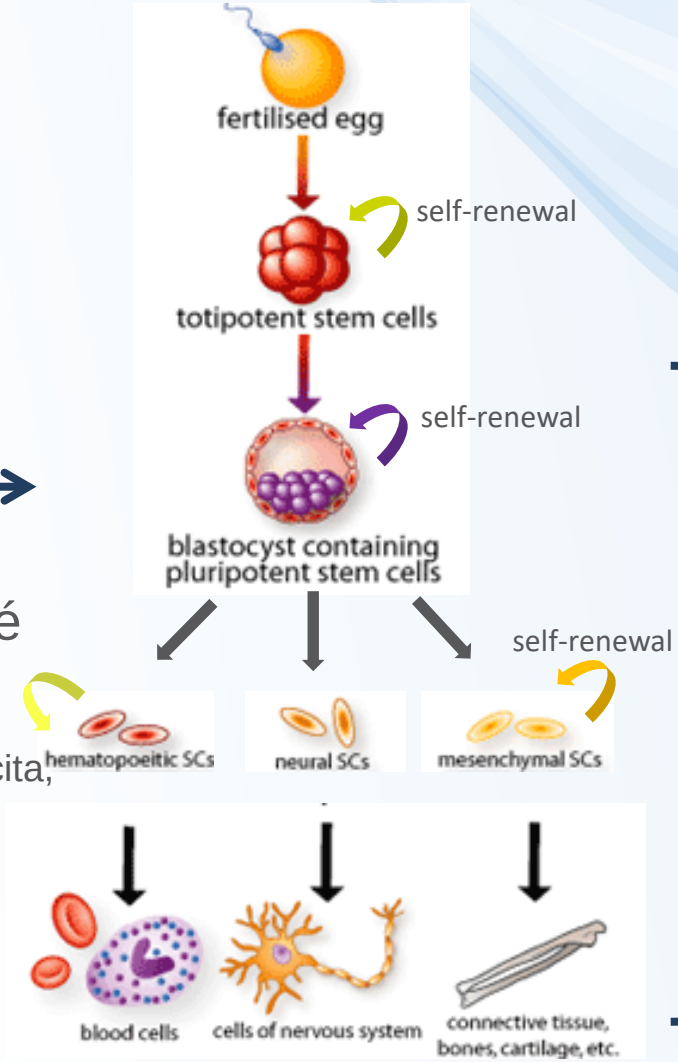
- využívány zejména pro objasnění účinku toxického agens
- v poslední době i pro rutinní provádění testů toxicity
- **primární buněčné kultury x stabilní buněčné kultury x kmenové buňky**
- primární buněčné kultury se získávají z jednotlivých tkání organismů, jsou nestandardní, což může ovlivnit výsledek testu toxicity (= nízká reprodukovatelnost).
- buněčný substrát pro založení stabilní kultury se kdysi získal většinou od lidského dárce (jako vedlejší materiál např. při operaci), byl stabilizován a uzpůsoben k neomezenému dělení a následné kultivaci – např. stabilizované linie kožních buněk, nervových buněk, buněk srdečního svalu, buněk odvozených od tkání ledvin a pod.
- možno získat stabilní buněčné linie z různých orgánů a z různých druhů organismů
- stabilizované linie se dobře pěstují, rychle rostou a lze vytvořit mnoho vzorků menších kultur x často nádorový charakter
- Kmenové buňky - normální nenádorové buňky organismu - proliferační potenciál a potence
- Různé modely dostupné v buněčných bankách, respektive Sbírkách buněčných kultur.



In vitro toxikologie & Kmenové buňky

Možnost studia vlivu látek na:

- Lidské kmenové buňky
- Lidské diferencované buňky odvozené z kmenových (hepatotoxicita, kardiotoxicita, nefrotoxicita, neurotoxicita etc.)



- Diferenciace lidských kmenových buněk (např. embryotoxicita a vývojová toxicita, karcinogeneze)

Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

In Vitro testy

- *In vitro* **testy typicky slouží k zjišťování jiného typu dat než** *In vivo*
  - **studium interakce toxická látka – receptor**
  - **mechanistická toxikologie – studium biochemických mechanismů účinku**
  - **studium genotoxicity na buněčné úrovni**

- *In vitro* **lze též použít jako náhradu testů** *In vivo*
  - **nutný proces validace – ověření shody výsledků obou metod**
  - **Predikce z *in vitro* na *in vivo* situaci**

Pomocí testů *In vitro* **lze nahradit následující** *In vivo* **testy**

- **test akutního podráždění oka (buněčná kultura z oka kuřete či králíka)**
- **test akutního podráždění kůže (lidská kožní buněčná kultura)**
- **test neurotoxicity organofosfátů na kuřeti**
- **imunologické testy**

Pomocí testů *In vitro* **nelze získat následující informace**

- **toxikokinetika**
- **systémové účinky**
- **orgánová toxicita**

Vysokokapacitní skríning
High-Throughput Screening Assays

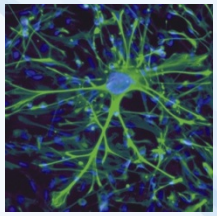
automatizované systémy

LTS | MTS | HTS | uHTS

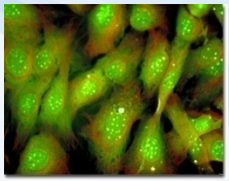
10s-100s/rok

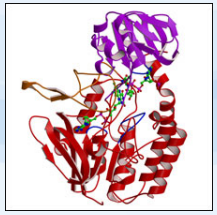
Gene-expression

10s-100s/den



1000s/den





10,000s-
100,000s/den

Relevance pro lidi/
Náklady/Komplexnost

Množství testů/
Jednoduchost

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Toxikogenomika

Nová vědecká disciplína – objasňuje, jak je celý genom zapojen v biologických odpovědích organismů na stresory

- studuje odpovědi/reakce genomu na stresory a toxické látky (Waters et al. 2003)

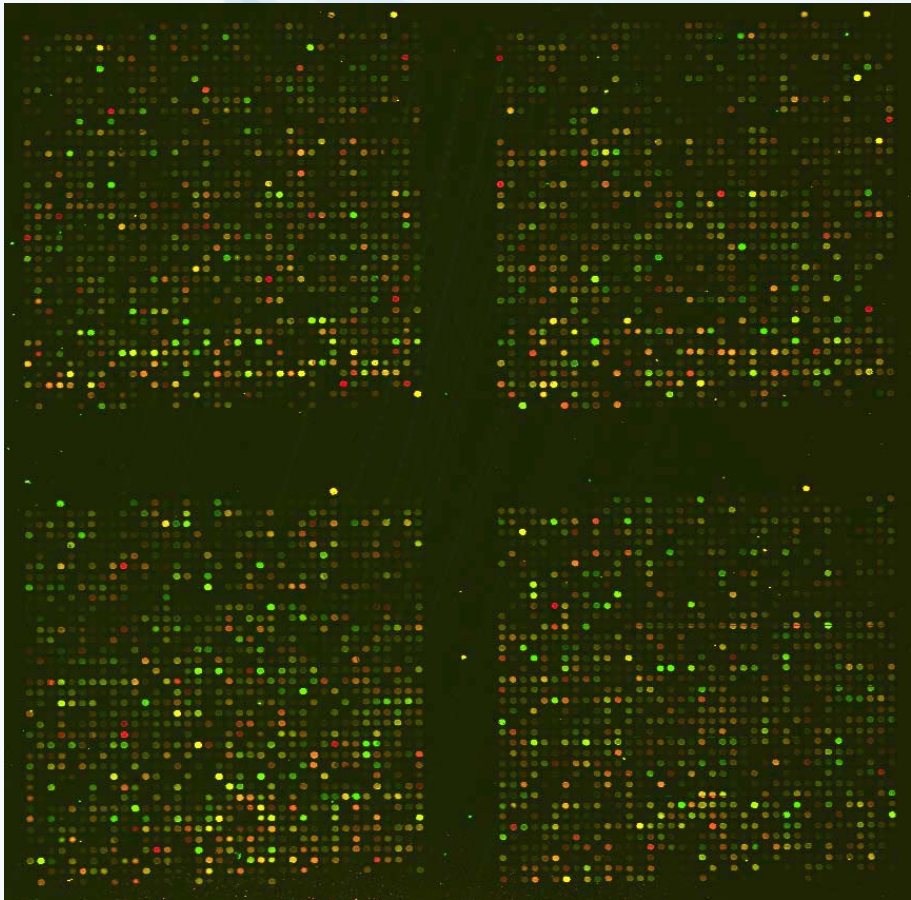
- kombinuje genomiku – transkriptomiku (exprese genů), proteomiku, metabolomiku a bioinformatiku s klasickou toxikologií

- **identifikace, kvantifikace potenciálních genetických rizik**

- **identifikace konkrétních genů, jejich produktů a procesů, kterými buňky reagují na environmentální toxikanty a stresory**

- **sledování vedlejších účinků chemických látek na biologické systémy**

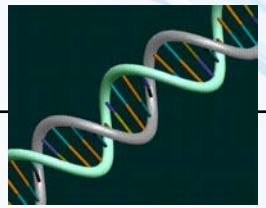
- **vytváření databází toxikologických, genetických a genomických informací**



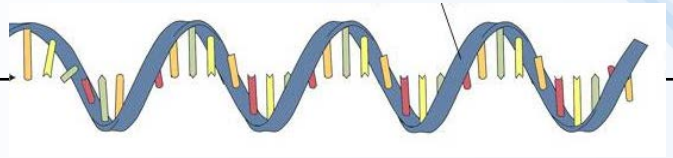
Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí

Studium procesů probíhajících v živých organismech

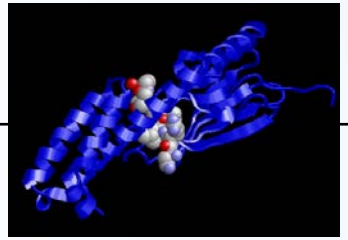
„OMICKÉ“ POLE

DNA →  → Genom / Genomika

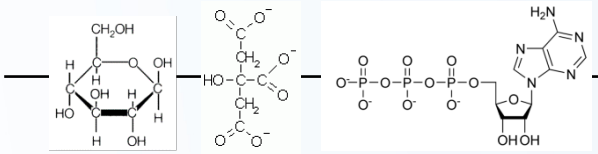
transkripce

mRNA →  → Transkriptom / Transkriptomika

translace

PROTEIN →  → Proteom / Proteomika

biochemické procesy

METABOLIT →  → Metabolom / Metabolomika

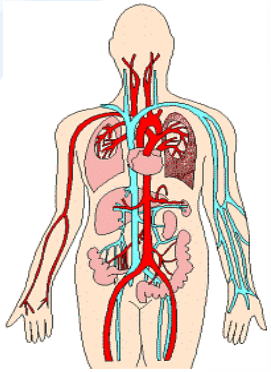
➢ identifikace užitečných biomarkerů onemocnění a expozice toxickým látkám – citlivé, specifické

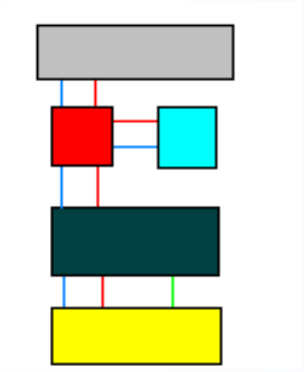
Predikční toxikologie
odhad účinku pomocí alternativních metod (QSAR, in silico)

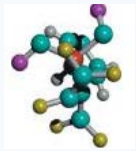
- metody stanovení toxicity a toxických indexů chemických látek, které dosud nebyly testovány experimentálně – k určení toxických vlastnosti látek bez použití pokusných zvířat
- využívá shromážděné pokusné údaje, ale též chemické struktury
- na jejich základě a zobecňováním poznatků vytváří expertní počítačové modely, pomocí nichž odhaduje toxicitu nových, dosud netestovaných látek.
- využívá znalosti chemie, fyziky, biologie, matematiky, kybernetiky a molekulové grafiky
- **expertní programy** pro odhad toxického účinku výpočtem = soubory pravidel, znalostí, údajů o toxických indexech, statistického hodnocení, výpočetních programů molekulových deskriptorů a metod matematické statistiky

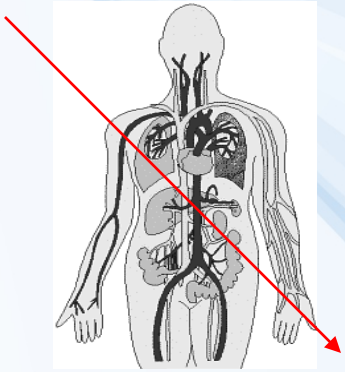
Alternativní metody – *in silico*

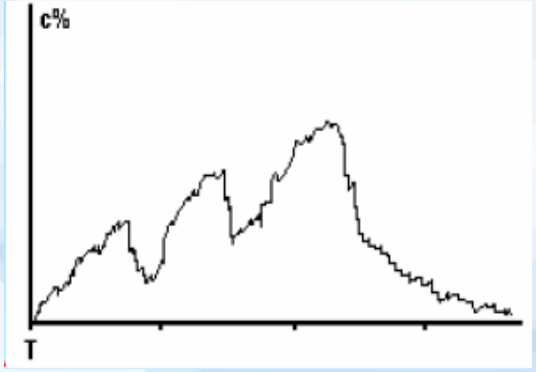
Počítačové modelování





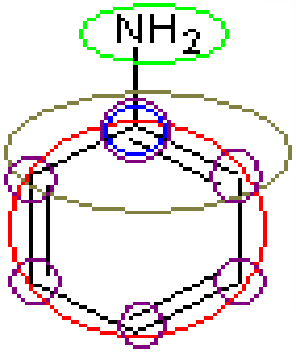


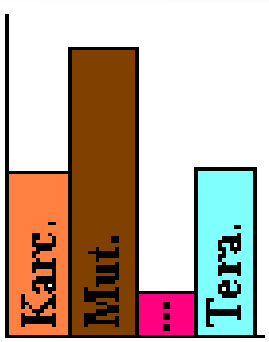




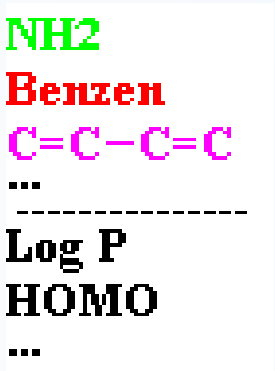
Hodnocení podobnosti

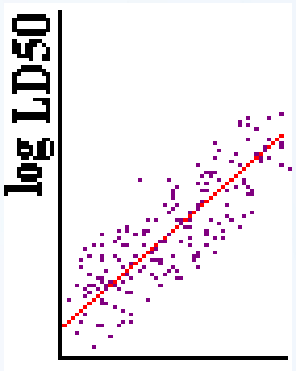
Expertní (SAR)



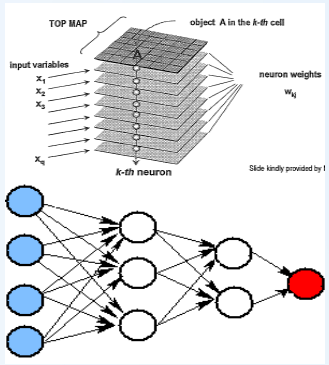


QSAR





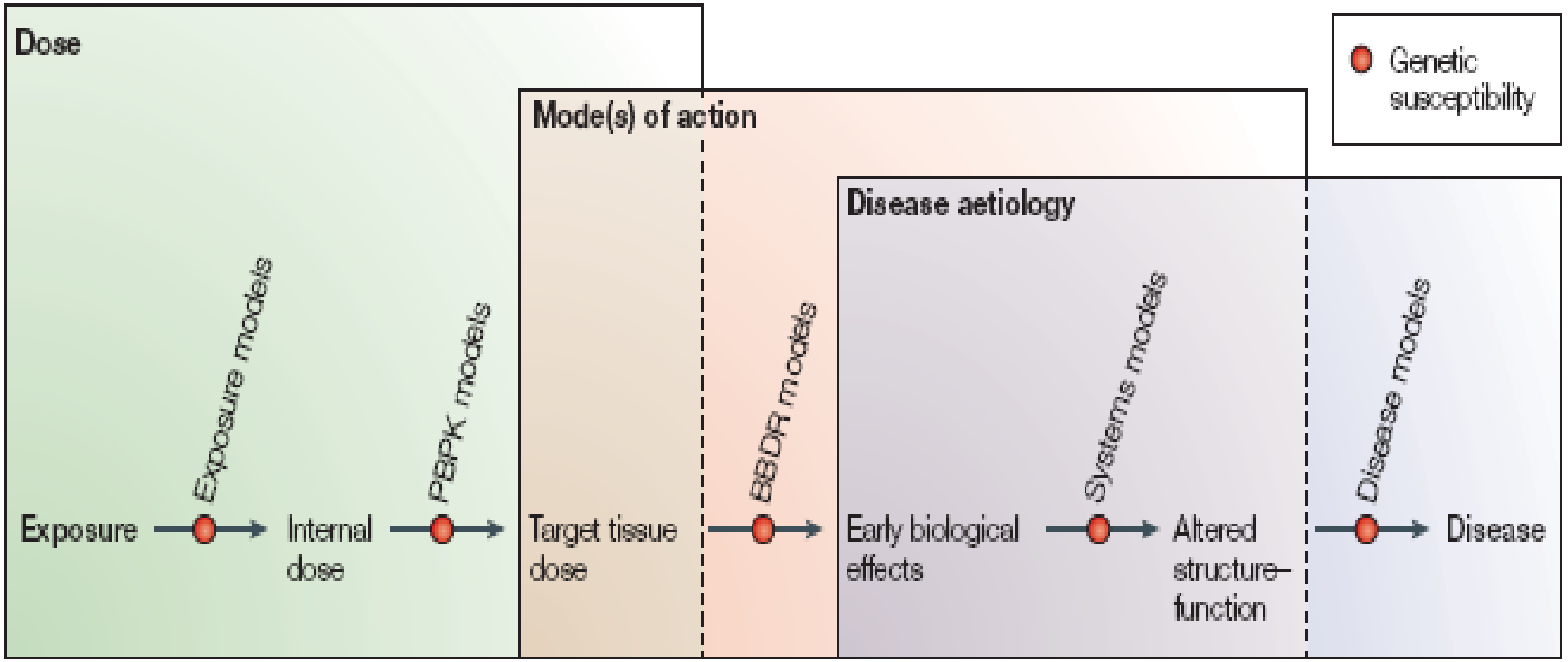
Jiné



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

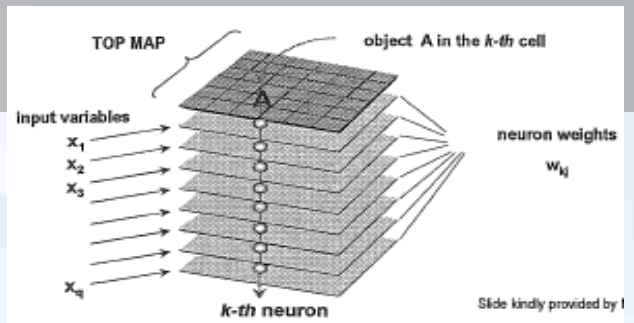
Využití modelů

- porozumět souvislostem mezi environmentálním stresem a náchylností k projevům škodlivých účinků, k onemocnění
- identifikovat užitečné biomarkery onemocnění a expozice toxickým látkám
- objasnit molekulární mechanismus toxicity

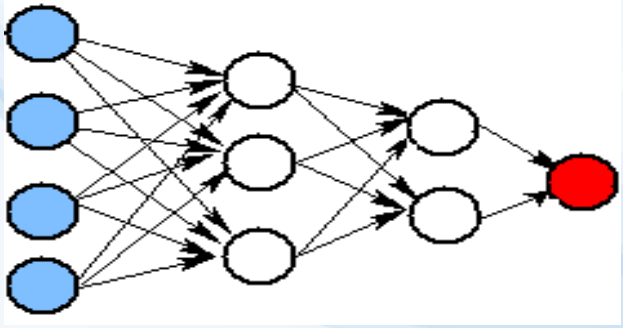


Biologically Based Dose–Response Models

In silico



metody *in silico*, stanovení výpočtem



Expertní systémy
DEREK – genotoxicita, karcinogenita, podráždění kůže, …
METAPC – metabolismus a biodegradace
METEOR – predikce metabolických transformací
OncoLogic – predikce karcinogenity

Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models
= Modely ADME - simulují kinetiku procesů v organismu, které zodpovídají za koncentraci účinné látky na místě účinku, tedy absorpci (A), distribuci (D), metabolismus (M) a exkreci (E). Modely pro různé organismy a různé způsoby expozice jsou rozlišeny fyziologickými parametry organismů.

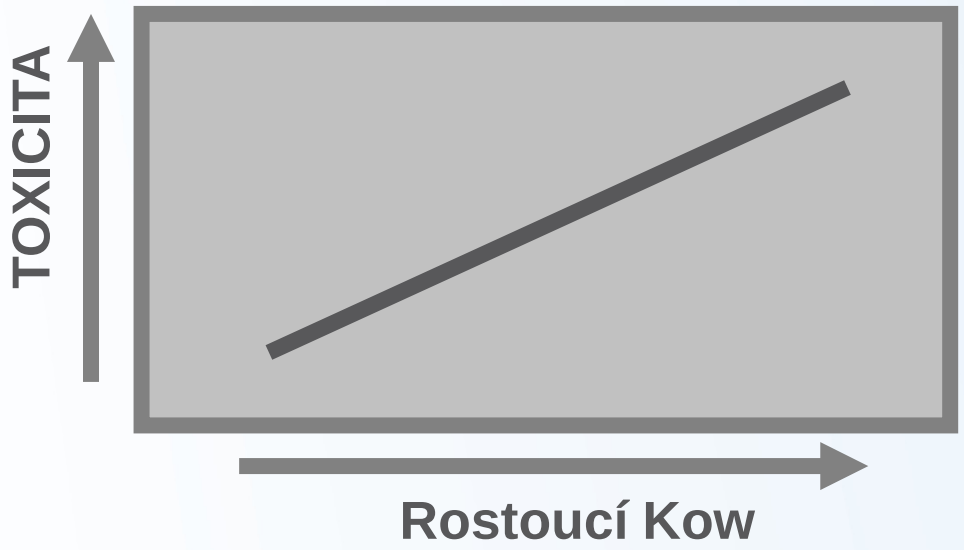
http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_10_675-681.pdf

Structure Activity Relationships (SARs)

vztah mezi chemickou strukturou a biologickým efektem chemických látek - slouží k základní orientaci v toxikologickém nebo farmakologickém mapování účinku látek – snižuje se počet použitých pokusných zvířat.

Predikovaná data

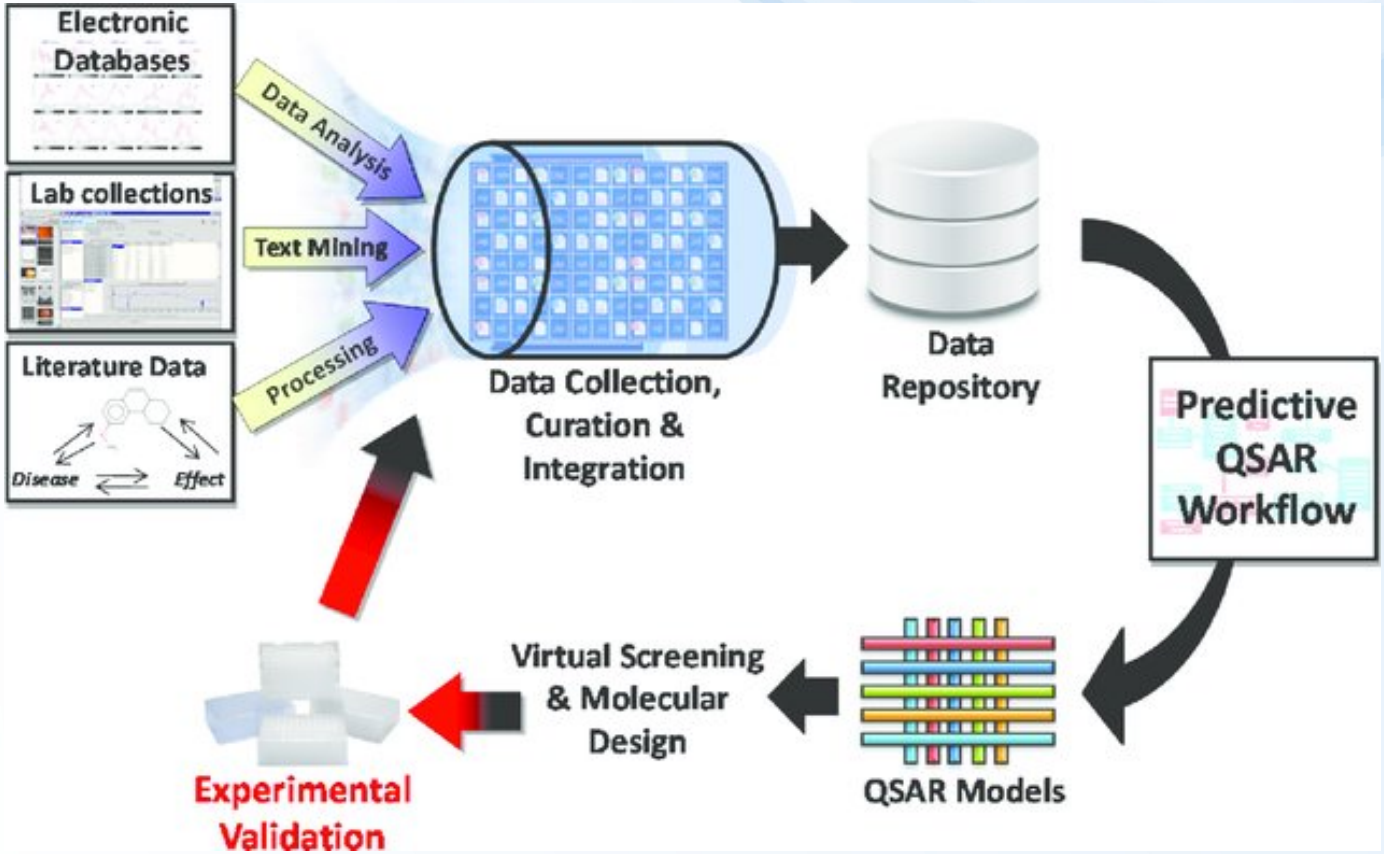
- cílem SAR je predikovat aktivitu/toxicitu látky – výsledky ověřitelné provedením experimentálních studií
  - Př. toxicita obecně roste se vzrůstem K_{ow} (rozdělovací koeficient oktanol-voda, který indikuje rozpustnost v tucích), pokud není příliš nízká rozpustnost
- použití SAR je umožněno kompletací a revizí dat
- narkotická účinnost látek koreluje s jejich rozdělovacím koeficientem mezi olej a vodu



QSAR

QSAR - kvantitativní vztahy mezi chemickou strukturou a biologickou účinností (z angl. Quantitative Structure – Activity Relationships) chemických látek

- umožňuje předpovídat biologickou aktivitu i u těch látek, které dosud nebyly syntetizovány
- analýza souboru experimentálních údajů o velikosti biologických a fyzikálně chemických vlastností chemických látek metodami matematické statistiky.
- soubor údajů se může týkat **série látek** strukturně podobných – homologická série, nebo strukturně různorodých – heterogenní série. Čím větší série, tím výhodnější pro odvození QSAR modelu/rovnice.



QSAR

Molekulové deskriptory

popisují strukturu molekuly látky či její vlastnosti

- teoretické vs. experimentální
- velikost molekuly, molekulová hmotnost, počet a typ funkčních skupin, náboj molekuly, 3D struktura atd.
- fyzikálně-chemické vlastnosti: lipofilita, polarizovatelnost, bod varu, log P,
- existuje několik tisíc deskriptorů

Biologická účinnost

Velikost (kvantita) biologického účinku - parametry toxicity z testu IC50, EC50

Postup

- struktura namodelována v softwaru, získány deskriptory molekuly
- statistickými metodami hledány vztahy a nalezen nejlepší model
- možná predikce toxicity (vlastnosti) pro netestované látky podobné struktury
- statistické testy významnosti modelu
- nutná validace modelu

modely QSAR jsou matematické rovnice, kde levá strana je obsazena velikostí biologické vlastnosti (odpovědi) v log tvaru, např. log LD_{50}, pravá strana velikostí vlastností fyzikálně chemických, topologických nebo kvantově chemických indexů (= molekulové deskriptory).

$$\mathbf{BA_i = f(X_i)}$$

BA je biologický účinek a X vlastnost chemické látky.

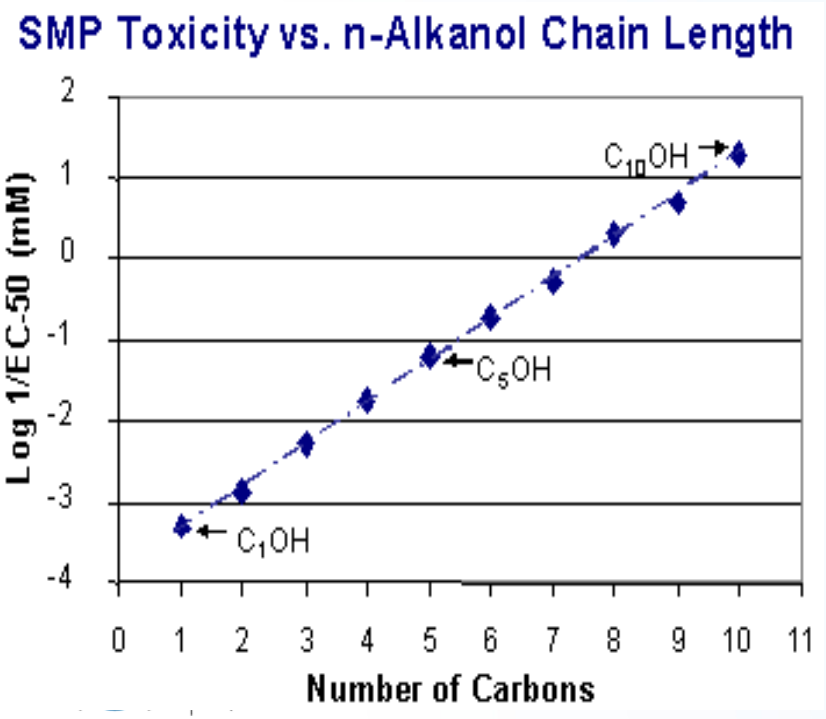
Vztah toxicity a chemické struktury
Statistické metody hodnocení toxicity

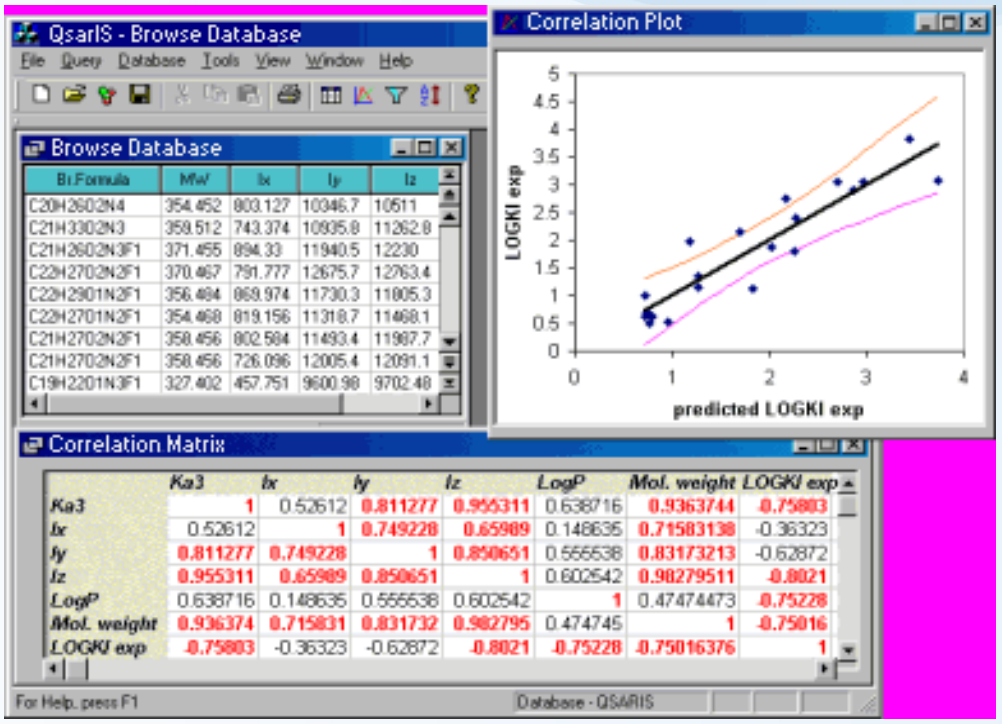
REACH: QSAR modely jsou přímo jmenovány mezi metodami pro hodnocení chemických látek

QSAR - quantitative structure-activity relationships

QSTR - quantitative structure-toxicity relationships

- Statistické hodnocení vlastností látek v chemických řadách
- Umožňují rychlý odhad toxicity (a dalších vlastností) látek na základě struktury a znalosti fyzikálních a chemických vlastností látky ze struktury vyplývajících.





Děkuji za pozornost

Více k moderním metodám a přístupům v toxikologii a ekotoxikologii - E1240 Experimentální a aplikovaná toxikologie a ekotoxikologie (podzim)

Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí