

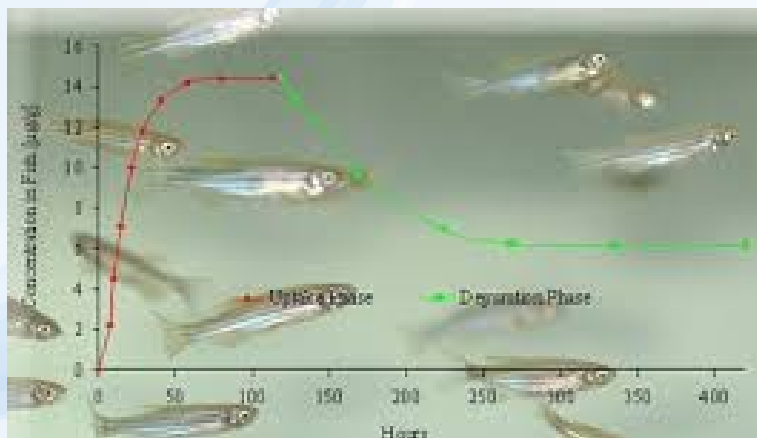


Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Správná laboratorní praxe

- poznámky biologické/toxikologické -

Část 2 – modely, testy, studie, GMO

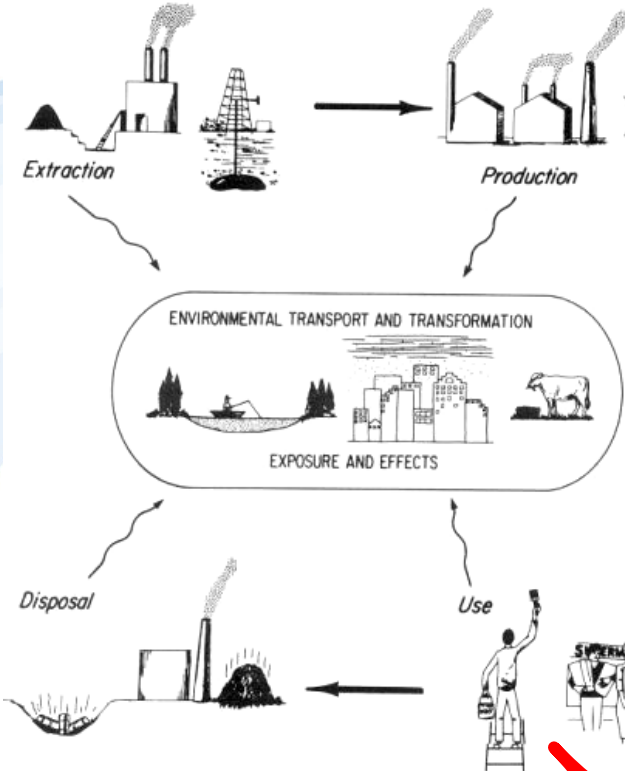


Luděk Bláha, PŘF MU, RECETOX
www.recetox.cz

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



**Část 2 přednášek:
Jak otestovat?**

Chemické látky („bulk“)

- Průmyslové látky, produkty
- Kosmetická chemie
- Potraviny / krmiva
kontakt s potravinami
- Pesticidy (PPR (pesticidy))
- Biocidy
- Léčiva humánní
- Léčiva veterinární

nano
nano
nano
nano

REACH (ECHA)

PPP (EFSA)

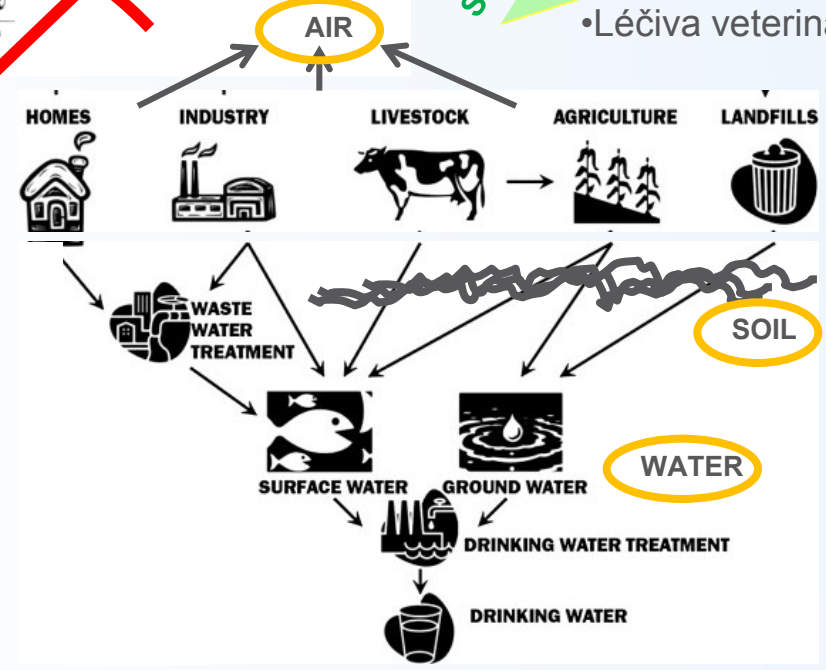
MPs (EMA)

Směsi

Negativní vlivy
→ vliv na zdraví člověka
→ vliv na prostředí

Stresory
- Chemické
- Biologické (patogeny, GMO)
- Fyzikální (záření, hluk...)

Dva mechanismy „řízení“ ()
1. před uvolněním – registrace
2. v prostředí



WFD – povrch.voda
GWD – podzemní v.
WWTP – odpadní v.
Sedimenty

Půda (SD)

Ovzduší

Odpady

Správná laboratorní praxe modely – testy - studie



GLP v biologii - úvod

- **BIOLOGIE**

Experimentální věda
a Praktická biologie/biochemie/mikrobiologie atd.

- Nutnost dodržovat **správnou praxi** tam, kde jsou výsledky využity při rozhodování
- **Praktická biologie a biochemie**
 - Léčiva (registrace/povolení, výroba, kontrola, přípravy...)
 - Lékařská biologie a biochemie
 - Mikrobiologická kvalita (potravin, pitná voda)
 - Průmyslové chemické látky, potravní aditiva, potenciálně nebezpečné agens (geneticky modifikované organismy) .. a jejich bezpečnost = toxikologie, ekotoxikologie, biodegradabilita apod
 - Další zákonem dané oblasti ve vztahu k biologii – dodržení etických požadavků (např. práce se zvířaty/obratlovci, GMO)



- V Biologii platí stejné principy jako v oblasti chemické
 - detaily a principy - viz přednášky dr. Vrány (QA/QC, detailní SOPs, dokumentace ...)
- **Příklad - „jednoduchá“ STUDIE v režimu GLP**
 - viz ukázka na přednášce – utajený materiál – nemůže být fyzicky předán

Příklad studie v režimu GLP

- **Cíl studie**
 - Podkladový materiál pro registraci (povolení) využití aspirinu u prasat
- **Jeden z dílčích podkladových materiálů** (*tento příklad*)
 - farmakokinetik aspirinu prasat po jednorázovém podání prasatům
- **Experimentální design**
 - 8 zvířat (prasat), jednorázová aplikace aspirinu
 - odběry krve v definovaných časech (0-144 h)
 - sledování hladin metabolitů K. AcSal a vyhodnocení
- **Realizace:**
 - 1) **Plán projektu** (100 stran + přílohy SOPs)
 - 2) Výstup – **Zpráva z realizace** (detailní dokumentace vč. odchylek)
 - *Přímá jmenovitá odpovědnost konkrétních osob*



Existuje mnoho testovacích systémů ...jaké testy se ale využívají v praxi?

Jak vypadají návody?

Standardizace v biologickém testování



Metody - standardizace

- V odborné literatuře - velké množství experimentálních metod
- Méně metod je **standardizovaných a validovaných**
- **STANDARDIZACE** metod
 - Standardizace je potřebná a žádoucí i uvnitř laboratoře (**viz příklady → SOP ELISA**)
 - Vyšší úrovně standardizace (akceptovatelné mezinárodně) – snižování nákladů / omezení opakovaných hodnocení
 - Přejímání standardizovaných metod do legislativ
 - např. ČR – Vyhl. 433/2004 Sb.
 - Metody testování toxicity : vychází z [OECD guidelines](#)
(viz příklad: zákon ! - Příklad - PDF str. 16 – Akutní toxicita)
- **Standardizační agentury**
 - OECD.org** (! Velký význam – viz úvod do GLP/chemie)
 - ISO.org (spíše Evropský dopad)
 - ASTM.org (USA)

Standardní operační postup - příklad 1

- **Ukázka SOP – ELISA stanovení toxinu microcystinu**

→ viz příklad ve studijních materiálech

1) Název

SOP-CCT-CYANOTOX-ELISA

Stanovení microcystinů s využitím ELISA

2) Autor

Lucie Bláhová, Luděk Bláha a kol. (Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny, Botanický ústav AVČR a VC RECETOX PřF MU, Brno)

3) Určení a cíl

Imunochemické stanovení microcystinů ve vzorku (voda)

4) Princip

Stanovení je založeno na kompetici microcystinů (rozpuštěné MC ve vzorku) s připraveným konjugátem (= MC-tracer-peroxidáza, MC-HRP) o vazná místa na myší monoklonální protilátce proti microcystinu-LR (MAB) vázané na mikrodesce pomocí další protilátky (IgG, anti-myší anti-Fc IgG). Jde o přímou kompetitivní ELISA: slepý vzorek (destilovaná voda) bez přítomnosti MC - se na MAB váže jen značený microcystin (MC-HRP) a následně je vysoká aktivita enzymu HRP (peroxidáza) kvantifikována vznikem barevného produktu; v přítomnosti MC ve vzorku dochází ke

Standardní operační postup - příklad 2

Cvičení:

V laboratoři SZÚ pravidelně vyšetřují obsah toxických kovů v černém čaji.

Připravte SOP č. 1 pro přípravu černého čaje, ve kterém budou následně analyzovány těžké kovy ...

- Struktura SOP
 - Název
 - Autor
 - Určení a cíl
 - Princip
 - Rušivé vlivy a omezení metody
 - Bezpečnost při práci a toxikologické údaje
 - Odpady a jejich likvidace
 - Normativní odkazy
 - Chemikálie a spotřební materiál
 - Vzorky
 - Přístroje
 - Kalibrace před zkouškou
 - Vlastní postup
 - Kontrola kvality
 - Výstup – protokol / výpočet
 - Poznámky doplňky



www.oecd.org

5 hlavních sekcí OECD GUIDELINES

v rámci každé „standardizované postupy“

Section 1: Physical Chemical Properties

Section 2: Effects on Biotic Systems (> 30 postupů)

Section 3: Degradation and Accumulation (cca 10 postupů)

Section 4: Health Effects (> 80 postupů)

Section 5: Special Activities





Environment
Directorate

Chemical Safety

- Biocides
- Chemical Accidents
- Chemicals Classification and Labelling
- Chemicals Hazard/Risk Assessment
- Chemicals Risk Management
- Chemicals Testing - Guidelines
- Co-operation on the Investigation of Existing Chemicals
- Good Laboratory Practice
- New Chemicals
- Pesticides
- Pollutant Release and Transfer Registers
- Safety of Manufactured Nanomaterials

• Biodiversity, Water and Natural Resource Management

• Biosafety - BioTrack

• Climate Change

Chemicals Testing - Guidelines

[» About](#) [» Publications & Documents](#) [» Information by Country](#)

The OECD [Guidelines for the Testing of Chemicals](#) are a collection of the most relevant internationally agreed testing methods used by government, industry and independent laboratories to assess the safety of chemical products.

- o [Work Plan for the Test Guidelines Programme \(TGP\) July 2010](#)
- o [Test Guidelines with components covered by Material Transfer Agreements](#)
- o Peer Reviews:
 - [Endocrine Disrupters](#)
 - [Peer reviews of ecotoxicity and human health test methods](#)
- o [Toxicogenomics](#)
- o [OECD Harmonised Templates](#)
- o [\(Q\)SARs](#)

What's new

Don't miss

- [OECD Guidelines for the Testing of Chemicals](#)
- [Draft Test Guidelines](#)
- [Questions & Answers regarding the OECD Test Guidelines Programme \(TGP\)](#)
- [Animal Welfare](#)
- [Other Publications / Draft Publications](#)
- [OECD Harmonised Templates](#)
- [Contact Us](#)
- [Site Map](#)

...and also Guidance Document 1



Příklady – OECD Guidelines – sekce „2“ Effects on biotic systems (> 30 návodů)

201 Alga, Growth Inhibition Test (Updated Guideline, adopted 7th June 1984)

202 Daphnia sp. Acute Immobilisation Test and Reproduction Test (Updated Guideline, adopted 4th April 1984)

203 Fish, Acute Toxicity Test (Updated Guideline, adopted 17th July 1992)

204 Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study (Original Guideline, adopted 4th April 1984)

205 Avian Dietary Toxicity Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)

206 Avian Reproduction Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)

207 Earthworm, Acute Toxicity Tests (Original Guideline, adopted 4th April 1984)

208 Terrestrial Plants, Growth Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)

209 Activated Sludge, Respiration Inhibition Test (Original Guideline, adopted 4th April 1984)

210 Fish, Early-Life Stage Toxicity Test (Original Guideline, adopted 17th July 1992)

211 Daphnia magna Reproduction Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)



212 Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages (Original Guideline, adopted 21st September 1998)

Příklady – OECD Guidelines – sekce „3“

301 Ready Biodegradability

A: DOC Die-Away Test

B: CO₂ Evolution Test

C: Modified MITI Test (I)

D: Closed Bottle Test

E: Modified OECD Screening Test

F: Manometric Respirometry Test (Updated guideline, adopted 17th July 1992)

302A Inherent Biodegradability: Modified SCAS Test (Original Guideline, adopted 12th May 1981)

302B Inherent Biodegradability: Zahn-Wellens/EMPA Test (Updated Guideline, adopted 17th July 1992)

302C Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II) (Original Guideline, adopted 12th May 1981)

303 Simulation Test - Aerobic Sewage Treatment

303A Activated Sludge Units - **303B:** Biofilms (Updated Guidelines, adopted 22nd January 2001)

304A Inherent Biodegradability in Soil (Original Guideline, adopted 12th May 1981)

305 Bioconcentration: Flow-through Fish Test (Updated Guideline, adopted 14th June 1996)

306 Biodegradability in Seawater (Original Guideline, adopted 17th July 1992)

307 Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil (Original Guideline, adopted 24th April 2002)

308 Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems (Original Guideline, adopted 24th April 2002)



Příklady – OECD Guidelines – sekce „4“

– Toxicita pro člověka (> 90 postupů - příklady dole)

- Standardní postupy - akutní, chronická, reprod. toxicita

No.	Title	Original Adoption	No. of Updates	Updates	Most Recently Updated
401	Acute Oral Toxicity	12 May 1981	1		Date of Deletion: 20 December 2002
402	Acute Dermal Toxicity	12 May 1981	1		24 February 1987
403	Acute Inhalation Toxicity	12 May 1981	1		7 September 2009
404	Acute Dermal Irritation/Corrosion	12 May 1981	2	17 July 1992	24 April 2002
405	Acute Eye Irritation/Corrosion	12 May 1981	2	24 February 1987	24 April 2002
406	Skin Sensitisation	12 May 1981	1		17 July 1992
407	Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents	12 May 1981	2	27 July 1995	3 October 2008
408	Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents	12 May 1981	1		21 September 1998
409	Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents	12 May 1981	1		21 September 1998



Zákony a testování toxicity v ČR

- **Chemické látky (průmyslové)**
 - legislativa REACH
 - v ČR zákon o chemických látkách
 - při registracích je třeba předložit
 - informace (např. o toxicitě) získané s využitím předepsaných zkoušek
 - **Viz vyhláška 443 / 2004 Sb. (studijní materiály)**
 - zkoušky musí být provedeny v režimu SLP

443

VYHLÁŠKA

ze dne 16. července 2004,

kterou se stanoví základní metody pro zkoušení toxicity chemických látek a chemických přípravků

Seznam základních metod pro zkoušení toxicity chemických látek nebo přípravků

- | | |
|----------|--|
| B.1 bis | Akutní toxicita orální (per os) – metoda fixní dávky |
| B.1 tris | Akutní toxicita orální (per os) – metoda stanovení třídy akutní toxicity |
| B.2 | Akutní toxicita inhalační |
| B.3 | Akutní toxicita dermální |
| B.4 | Kožní dráždivost |
| B.5 | Oční dráždivost |
| B.6 | Senzibilizace kůže |
| B.7 | Subakutní toxicita orální (per os) (28 denní opakovaná aplikace) |
| B.8 | Subakutní toxicita inhalační (28 denní opakovaná aplikace) |

Biologické modely

1 - Využití obratlovců in vivo



MODELY v biologii

- Existuje mnoho přístupů v biologii
(některé *jsou předepsány* při hodnocení „bezpečnosti“
– viz předchozí diskuze – léčiva, bezpečnost chemických látek ...)
- **Biologické modely**
 - Obratlovci
 - in vivo (zvířata)
 - ex vivo (orgány zvířat)
 - in vitro (buňky, buněčné linie)
 - Bezobratlí
 - Rostliny, řasy ...
 - Bakterie



Význam využití zvířat (obratlovců, savců / pokusných zvířat)

- Unikátní 3D prostorové uspořádání
- Fyziologické a Farmako(Toxo)kinetické procesy (podobné s člověkem)
- Lze pozorovat komplexní účinky (podobné s člověkem)
- Mnoho látek má více mechanismů toxického efektu
- **Z těchto (a dalších) důvodů je stále třeba provádět zkoušky *in vivo***
 - Účinnost léčiv (vč. Vedlejších účinků)
 - Bezpečnost kosmetických přípravků
 - Toxicita chemických látek pro člověka



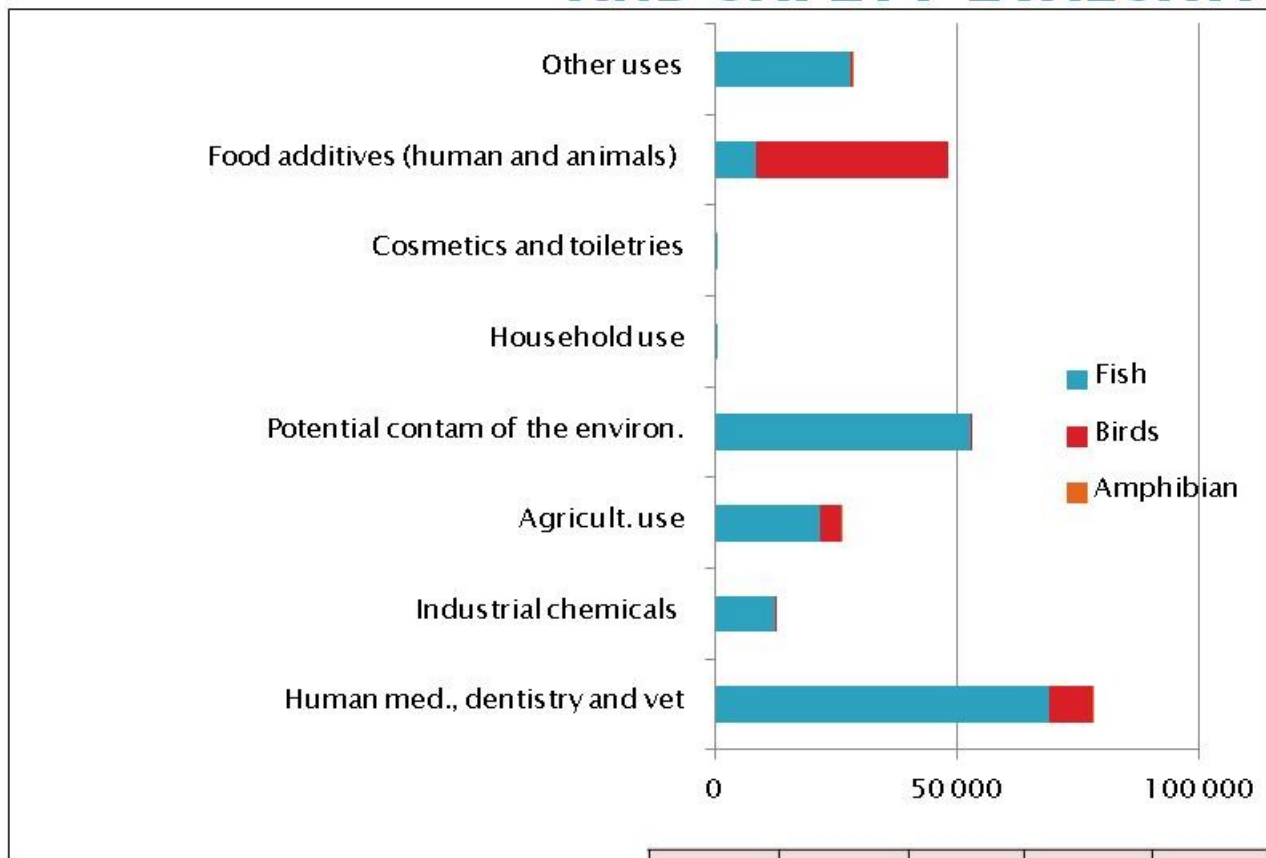
Užívání pokusných zvířat v EU (2011)

reporting členských států (viz také studijní materiály)

Table 1.0: Changes in species number and proportion between 2008 and 2011

Species	Number of animals in EU 27	Number of animals in EU 27	Change since 2008	% change by species
	2008	2011		
1.a Mice (<i>Mus musculus</i>)	7122188	6999312	-122876	-1,73
1.b Rats (<i>Rattus norvegicus</i>)	2121727	1602969	-518758	-24,45
1.c Guinea-Pigs (<i>Cavia porcellus</i>)	220985	171584	-49401	-22,35
1.d Hamsters (<i>Mesocricetus</i>)	32739	25251	-7488	-22,87
1.e Other Rodents (other Rodentia)	39506	28465	-11041	-27,95
1.f Rabbits (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	333213	358213	25000	7,50
1.g Cats (<i>Felis catus</i>)	4088	3713	-375	-9,17
1.h Dogs (<i>Canis familiaris</i>)	21315	17896	-3419	-16,04
1.i Ferrets (<i>Mustela putorius furo</i>)	3208	2540	-668	-20,82
1.j Other Carnivores	2853	4982	2129	74,62
1.k Horses, donkeys and cross-breeds (<i>Equidae</i>)	5976	6686	710	11,88
1.l Pigs (<i>Sus</i>)	92813	77280	-15533	-16,74
1.m Goats (<i>Capra</i>)	3840	2907	-933	-24,30
1.n Sheep (<i>Ovis</i>)	30190	28892	-1298	-4,30
1.o Cattle (<i>Bos</i>)	33952	30914	-3038	-8,95
1.p Prosimians (<i>Prosimia</i>)	1261	83	-1178	-93,42
1.q New World Monkeys (<i>Ceboidea</i>)	904	700	-204	-22,57
1.r Old World Monkeys (<i>Cercopithecoidea</i>)	7404	5312	-2092	-28,25
1.s Apes (<i>Hominoidea</i>)	0	0	0	0,00
1.t Other Mammals (other <i>Mammalia</i>)	5704	7888	2184	38,29
1.u Quail (<i>Coturnix coturnix</i>)	9626	5614	-4012	-41,68
1.v Other birds (other <i>Aves</i>)	754485	669451	-85034	-11,27
1.w Reptiles (<i>Reptilia</i>)	4101	3824	-277	-6,75
1.x Amphibians (<i>Amphibia</i>)	61789	29583	-32206	-52,12
1.y Fish (<i>Pisces</i>)	1087155	1397462	310307	28,54
1.z TOTAL	12001022	11481521	-519501	-4,33

2008 EU STATISTICS ON THE NUMBER OF ANIMALS USED FOR TOXICOLOGICAL AND SAFETY EVALUATION



TOTAL FISH, BIRDS, AMPHIBIA: 247.645
 TOTAL ANIMALS USED 12.001.022

	Human med., dentistry and vet	Industrial chemicals	Agricult. use	Potential contam. of the environ.	Household use	Cosmetics and toiletries	Food additives (human and animals)	Other uses	TOTAL
Fish	69.021	12.416	21.915	53.062	601	722	8.553	27.936	194.226
Birds	8.902	30	4.226	97			39.553	320	53.128
Amphibian	179		108					4	291

Využití zvířat (=obratlovců): etické aspekty

- Nutnost regulace – zákonný rámec
 - **Zákon na ochranu zvířat proti týrání 246/1992**
 - Vyhláška 311/1997 (o využití pokusných zvířat)
- Odpovědný úřad
 - Ministerstvo zemědělství
a jeho **Ústřední komise pro ochranu zvířat**

eAGRI Ochrana zvířat



Rozcestník eAGRI ▶

Hledaný výraz

Hledej

Podrobné hledání ▶

Ochrana zvířat

Uživatelské jméno:

Heslo:

Přihlásit

- ▶ [Aktuality v ochraně zvířat](#)
- ▶ [Ochrana zvířat obecně](#)
- ▶ [Oddělení ochrany zvířat](#)
- ▶ [Ústřední komise pro ochranu zvířat](#)
- ▶ [Obce - náhrady, vyhlášky](#)
- ▶ [Veřejná vystoupení a chov zvířat](#)
- ▶ [Pokusná zvířata](#)
- ▶ [Přeprava zvířat](#)
- ▶ [Druhy zvířat vyžadující zvláštní péči](#)
- ▶ [Kursy k získání odborných způsobilostí](#)
- ▶ [Legislativa](#)
- ▶ [Publikace a dokumenty](#)
- ▶ [Formuláře a podání](#)
- ▶ [Často kladené otázky](#)

Ochrana zvířat



„Zvířata jsou stejně jako člověk živými tvory, schopnými na různém stupni pociťovat bolest a utrpení, a zasluhují si proto pozornost, péči a ochranu ze strany člověka.“ Tak zní preambule zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, základního právního předpisu týkajícího se ochrany zvířat, na jehož základě je postavena činnost všech státních orgánů ochrany zvířat v České republice. Těmi jsou především Ministerstvo zemědělství, včetně Ústřední komise pro ochranu zvířat, a orgány veterinární správy.

Zákon zakazuje týrání zvířat i všechny formy propagace týrání zvířat. Jeho účelem je chránit zvířata, jež jsou živými tvory schopnými pociťovat bolest a utrpení, před týráním, poškozováním jejich zdraví a jejich usmrcením bez důvodu, pokud byly způsobeny, byť i z nedbalosti, člověkem.

Zákon stanoví, které činnosti jsou považovány za týrání zvířat, důvody k usmrcení zvířete, upravuje ochranu zvířat při usmrcování, použití znečitlivění, ochranu zvířat při veřejném vystoupení a povinnosti pořadatelů těchto akcí, ochranu zvířat při přepravě. Stanoví podmínky, které je nutno dodržovat při chovu hospodářských zvířat a zvířat v zájmových chovech, podmínky chovu a

eAGRI
 Vítejte na internetovém portále Ministerstva zemědělství eAGRI, který nahradil internetové stránky www.mze.cz.

Novinky

[Vyjádření k problematice označování psů čipem podle obecně závazné vyhlášky obce a k vlivu čipování na zdravotní stav psa](#) (PDF, 150 KB)

[Vyjádření k problematice zřizování útulků a tzv. depozit](#) (PDF, 103 KB)

[Náhrady](#)
31.5.2010

[Další novinky >](#)

Kalendář

« ‹ **listopad 2010** › »



Využití zvířat = obratlovců

- **Zákon 246/1992 a Vyhláška 311/1997**
 - CO je zvíře z hlediska zákona?
 - **OBRATLOVEC** kromě embryí a plodů
 - Typy zvířat: laboratorní / pokusné (další)
 - KDO smí zvířata využívat
 - Vyžaduje se registrace na ÚKOZ (MZe)
 - Další důležité potřeby
 - Školení osob
 - Etické komise jednotlivých pracovišť
 - JAK lze experimenty realizovat (dodržování pravidel GLP)
 - Zdůvodnění využití zvířat (musí být schváleno etickou komisí)
 - Projekt pokusu, protokol pokusu, evidence

Využití zvířat = obratlovců

- **Kdy lze využít pokusná zvířata?**

- výroba, vývoj, kontrola kvality, nezávadnosti a účinnosti léčiv, biopreparátů, potravin a event. jiných výrobků
- studium nemocí, prevence, diagnostika, léčení
- studium fyziologických procesů
- ochrana životního prostředí
- výuka na SŠ a VŠ

- Zákon také stanoví - **kdy se zkoušení vyžaduje**

- OCHRANA ČLOVĚKA a HOSP. ZVÍŘAT
- Potravin, zemědělské látky
- Kontrola léčiv
- Výroba léčiv - farmakologické preklinické studie
- Farmakokinetika
- Nežádoucí účinky



Bezpečnost chemických látek pro člověka

Testování toxicity in vivo



Které látky jsou toxické?

- Každá látka je toxická, záleží jen na **DÁVCE a DOBĚ PODÁNÍ** (expozice)
 - Krátkodobá (**akutní**) **expozice**
 - > akutní rychlé účinky (smrt)
 - Dlouhodobá (**chronická**) **expozice**
 - > subletální efekty (nemoci, nádory, imunotoxicita, reprodukční toxicita ...)
- **Hodnocení a srovnání toxicity:**
 - nejč. **LD50 (letální dávka 50)** – dávka (zpravidla akutní), která s největší pravděpodobností způsobí smrt 50% exponovaných jedinců (vyjádření jako koncentrace – např. mg/kg živé váhy)

LD50 je hodnota odvozená (modelovaná) z testování křivky více dávek vs toxicita (ve skutečnosti není možné otestovat právě dávku, která způsobí smrt právě 50% zvířat)
 - **NOEL – No Observed Effect Level** – nejvyšší dávka (hladina), která byla použita v konkrétním testu toxicity a při které nebyly pozorovány (škodlivé) účinky

Pro stanovení limitů (např. TDI/ADI) se využívá NOEL z testů chronické toxicity
 - další parametry „bezpečnosti“ – např. **TDI –tolerovatelný denní příjem** (např. mg/kg živé váhy/den)



AKUTNÍ TOXICITA

perorální aplikace - potkan



Velice častý test test

- Přesné dávkování
- Sledování letality a akutních projevů 24-48h

Srovnej - příklady – studijní materiály

- OECD STANDARD (TG 423)
- Vyhl. 443/2004 – metoda B.1 (str. 16-31)



Třídy akutní toxicity (podle zákona o chemických látkách)

Třída Akutní toxicita

Zařazení látek do kategorií toxicity v rámci třídy akutní toxicita

<i>Podle hodnot LD50 nebo LC50</i>				
Cesta expozice	Kategorie 1	Kategorie 2	Kategorie 3	Kategorie 4
Orální	$LD50 \leq 5$	$5 < LD50 \leq 50$	$50 < LD50 \leq 300$	$300 < LD50 \leq 2000$
Dermální	$LD50 \leq 50$	$50 < LD50 \leq 200$	$200 < LD50 \leq 1000$	$1000 < LD50 \leq 2000$
Inhalační plyny	$LC50 \leq 100$	$100 < LC50 \leq 500$	$500 < LC50 \leq 2500$	$2500 < LC50 \leq 20000$
Inhalační páry	$LC50 \leq 0,5$	$0,5 < LC50 \leq 2,0$	$2,0 < LC50 \leq 10,0$	$10,0 < LC50 \leq 20,0$
Inhalační prach a mlha	$LC50 \leq 0,05$	$0,05 < LC50 \leq 0,5$	$0,5 < LC50 \leq 1,0$	$1,0 < LC50 \leq 5,0$
Orální	mg/kg tělesné hmotnosti			
Dermální	mg/kg tělesné hmotnosti			
Inhalační plyny	ppm V			
Inhalační páry	mg/l			
Inhalační prach a mlha	mg/l			



Chronická a reprodukční toxicita

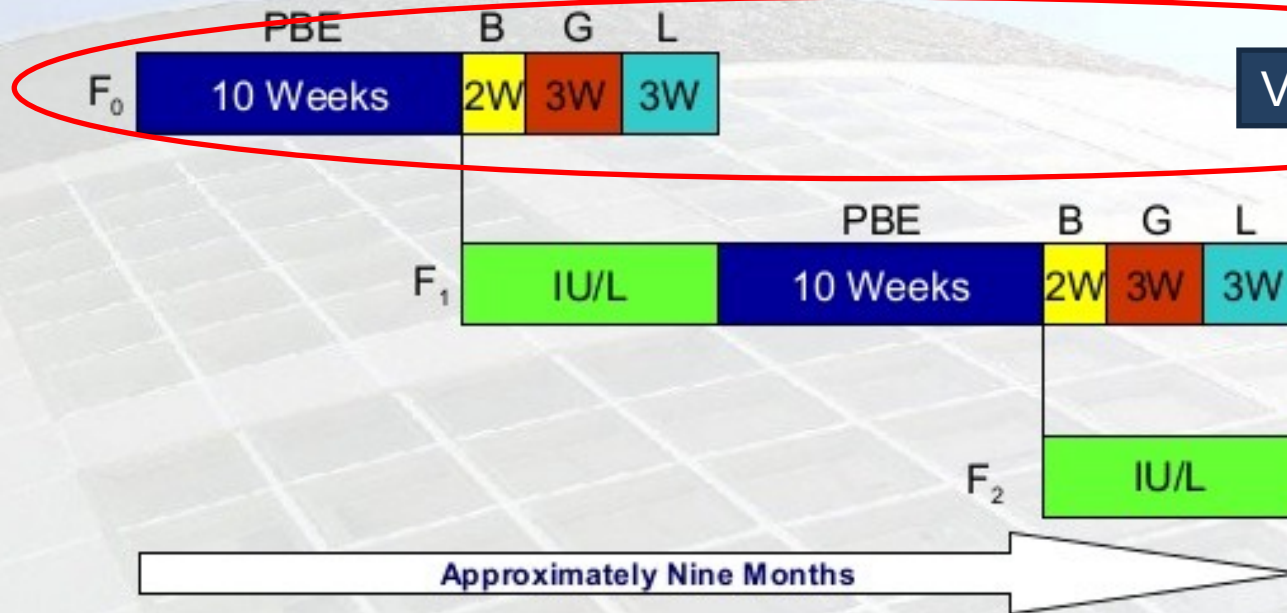
- Vyšetření specifických efektů při dlouhodobém (opakovaném) podávání
- Dávky pro testování se odvozují z akutní toxicity nebo podle obvyklého podávání (např. léčiva)
- Délka studie závisí na „předpokládaném“ schématu podávání látky
- př. Léčivo

předpokládané podávání	délka studie
• 1-2 d/wk	2 wks
• 1,2,3 ...7 d	4 wks
• Opak 1-30 d	4 months
• Opak > 30 d	6 months
- **Složitý design a řada požadavků**
 - Zvířata (více druhů, stáří, pohlaví...), počty ve skupině
 - Vyhodnocení - pitva (definované úkony), statistika ...
- Ekonomická náročnost , etické problémy → potřeba GLP

Chronická a reprodukční toxicita

- **Zjišťuje se vliv na**
 - sexuální chování zvířat
 - prenatální mortalitu
 - fetální abnormality & poškození během života
- **Experimenty**
 - změny fertility, vliv na F a M gamety (poměry narozených F a M); toxicita pro embrya a féty, změny gravidity ovlivňující féty, vliv na růst a vývoj dělohy a placenty, porod, postnatální vývoj a laktaci matky, vliv na potomstvo (*schopnost učení*)
- **Složitý design a náročné vyhodnocení**
 - Viz příklad – OECD 416 “Two-Generation Reproduction Toxicity Study”

Duration of Phases of 2-Generation Reproductive Toxicity Study Design (Rats)

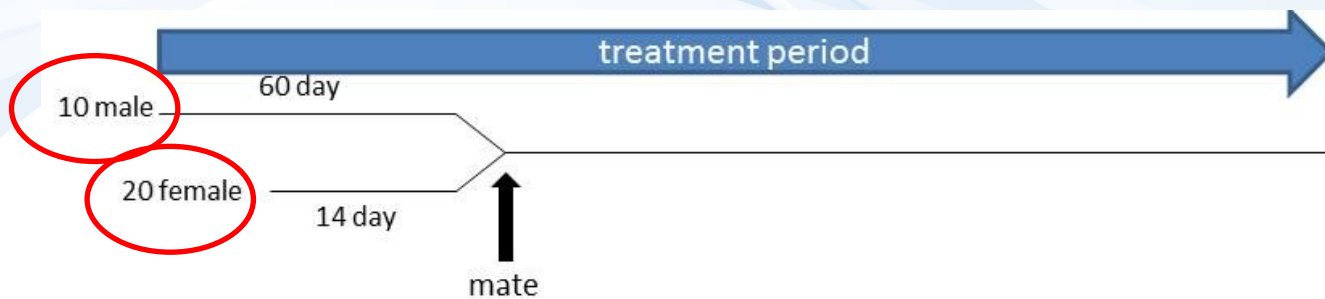


Viz další strana

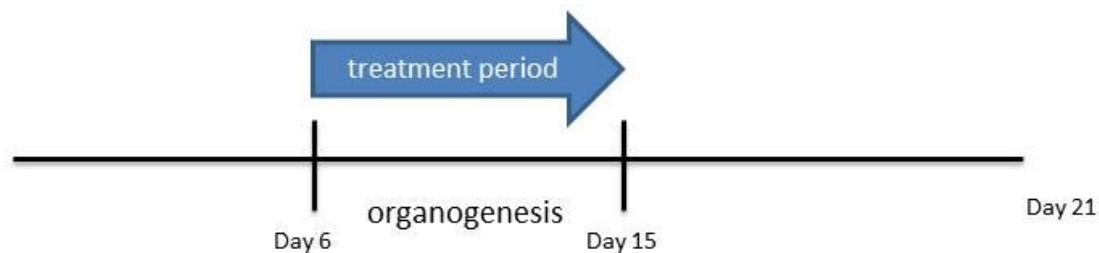
PBE = Prebreeding Exposure
M = Breeding Period
G = Gestational Period
L = Lactational Period
IU/L = **Potential** In Utero/Lactational Exposure



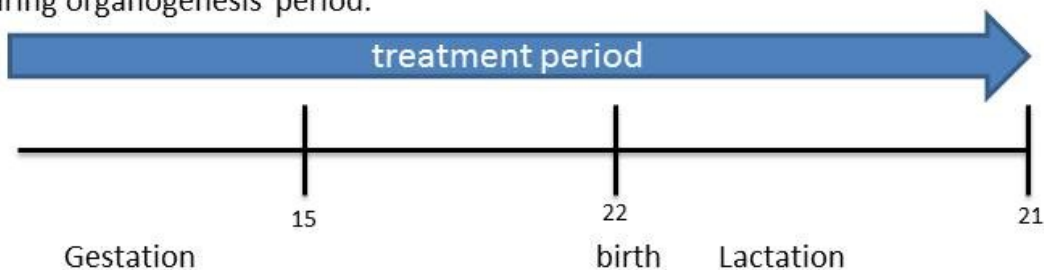
Příklad OECD 416 – zoom F0 generace/expozice



Phase I. General fertility and reproductive performance.
Measure of pre- and postimplantation death



Phase II. Teratology study basic design for mice. 20 inseminated females are treated during organogenesis period.



Phase III. Perinatal/postnatal studies.



Příklad OECD 416 – sbírané výsledky

- - food consumption, and water consumption if available, food efficiency (body weight gain per gram of food consumed), and test material consumption for P and F1 animals, except for the period of cohabitation
- and for at least the last third of lactation.
- - absorption data (if available);
- - body weight data for P and F1 animals selected for mating;
- - litter and pup weight data;
- - body weight at sacrifice and absolute and relative organ weight data for the parental animals;
- - nature, severity and duration of clinical observations (whether reversible or not);
- - time of death during the study or whether animals survived to termination;
- - toxic response data by sex and dose, including indices of mating, fertility, gestation, birth, viability, and lactation; the report should indicate the numbers used in calculating these indices.
- - toxic or other effects on reproduction, offspring, postnatal growth, etc.;
- - necropsy findings;
- detailed description of all histopathological findings;
- number of P and F1 females cycling normally and cycle length;
- - total cauda epididymal sperm number, percent progressively motile sperm, percent morphologically normal sperm, and percent of sperm with each identified abnormality;
- - time-to-mating, including the number of days until mating
- - gestation length;
- - number of implantations, corpora lutea, litter size
- - number of live births and post-implantation loss;
- - number of pups with grossly visible abnormalities, if determined the number of runts should be reported;
- - data on physical landmarks in pups and other postnatal developmental data; physical landmarks evaluated should be justified;
- - data on functional observations in pups and adults, as applicable;
- - statistical treatment of results, where appropriate.
- Discussion of results.
- Conclusions, **including NOAEL values for maternal and offspring effects**



Hodnocení KARCINOGENITY

- **Mutagenní a genotoxické látky** – zpravidla považovány za karcinogenní
 - Rakovina – velký problém pro západní civilizaci
 - Oproti jiným toxickým látkám - karcinogeny jsou považovány za „bezprahově působící“
 - Neexistuje bezpečná dávka (i jedna molekula může vyvolat efekt)
- **Experimentální průkaz karcinogenity** – nejnáročnější studie (*celoživotní expozice, stovky zvířat v experimentu ...*)
 - POZOR - ne vždy však existují korelace výsledků - zvíře vs. člověk (!)
- Řada klasifikačních schémat chemických látek
 - Pro karcinogeny WHO (Světová zdravotnická organizace) a její IARC - International Agency for Research of Cancer



 Search

- ABOUT IARC
- RESEARCH SECTIONS
- EDUCATION & TRAINING
- MEETINGS
- VACANCIES
- PUBLICATIONS
- MEDIA CENTRE
- DATABASES
- RESEARCH PROGRAMMES
- USEFUL LINKS
- CONTACT US

The International Agency for Research on Cancer (IARC) is part of the [World Health Organization](#).

IARC's mission is to coordinate and conduct research on the causes of human cancer, the mechanisms of carcinogenesis, and to develop scientific strategies for cancer prevention and control. The Agency is involved in both epidemiological and laboratory research and disseminates scientific information through publications, meetings courses, and fellowships.

IARC News

Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: An overview



04/11/2010 -

Dr Bray and colleagues publish today in the European Journal of Cancer a paper describing prostate cancer incidence and mortality trends in Europe.

F. Bray, J. Lortet-Tieulent, J. Ferlay, D. Forman, A. Auvinen

Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: An overview

European Journal of Cancer

Volume 46, Issue 17, Pages 3040-3052, November 2010, doi:10.1016/j.ejca.2010.09.013

Prostate cancer has emerged as the most common cancer in men in Europe, with incidence increasing rapidly in many European countries over the past two decades. In contrast, prostate cancer mortality has been decreasing in higher-resource countries within each region.

[Read more](#) , [Read article at the EJC website](#)

Global Cancer Statistics

GLOBOCAN 2008 is released and is part of the *CANCERmondial* website

IARC klasifikace

- Group 1: The agent (mixture) **is carcinogenic** to humans.
(2015 – přidány “uzeniny”)
- Group 2
 - Group 2A: The agent (mixture) **is probably** carcinogenic to humans.
 - Group 2B: The agent (mixture) **is possibly** carcinogenic to humans.
(2015 – přidáno “červené maso”)
- Group 3: The agent (mixture or exposure circumstance) **is not classifiable** as to its carcinogenicity to humans.
- Group 4: The agent (mixture) **is probably not carcinogenic** to humans.



Příklad

Karcinogenita cytostatických (protinádorových) léčiv

Risk / Benefit analýza → i přes vysoká rizika: **využití carcinogenů jako léčiva**

Group 1 (Carcinogenic to humans)

Group 2A (Probably carcinogenic)

Arsenic trioxide

Azothioprin

Chlorambucil

Chlomaphazine

Cyclophosphamide

Myleran

Melphalan

Semustine

Tamoxifen

Thiotepa

Treosulfan

Mustargen-Oncovin-Procarbazine-Pednisone (MOPP)

Etoposide-Cisplatin-Bleomycin (ECB)

Azacitidine

BCNU

CCNU

Chlorozolocin

Cisplatin

Doxorubicin HCL

N-Ethyl-N-Nitrosourea

Etoposide

Mechlorethamine HCL

N-Methyl-nitrosourea

Procarbazine HCL

Teniposide

Biologické modely

2 – Alternativy k in vivo testům s obratlovci



Alternativy k testům s obratlovci

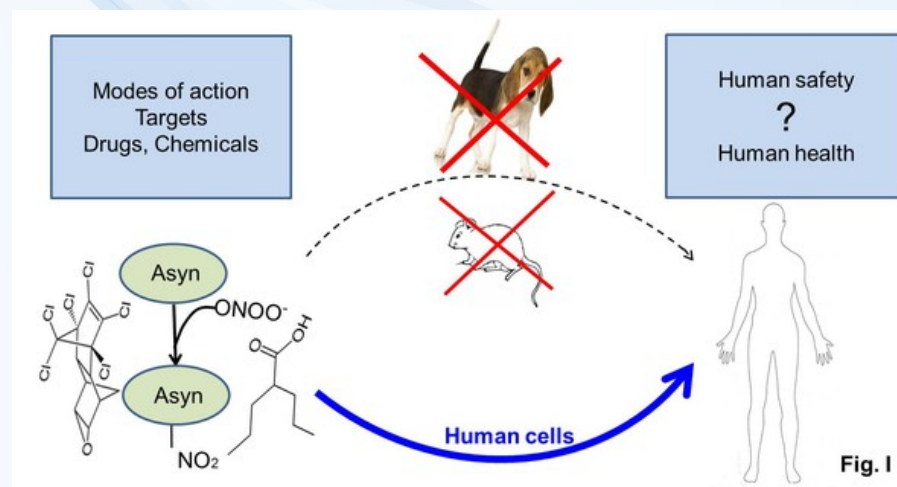
- **Obratlovci in vivo (celá zvířata)**
 - Řada etických a praktických (finančních) limitací

- Náhrada in vivo experimentů **koncept "3R"**

- Reduction (Snižování),
- Refinement (Zmírňování),
- Replacement (Nahrazování)

→ Alternativní metody

- ex vivo (orgány zvířat)
- in vitro (buňky, buněčné linie, enzymy ...)



Výhody alternativních metod

- snižování počtů zvířat
- mechanistické metody (poznání biochemických principů – např. "dioxinová" toxicita, „inhibice acetylcholinesterázy“ u pesticidů)
- rychlejší, levnější, možnost hodnocení více vzorků



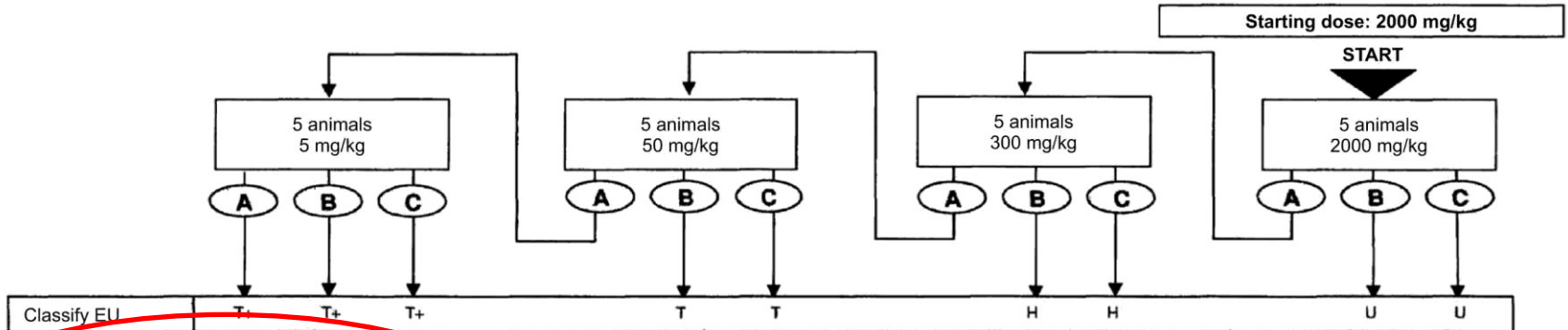
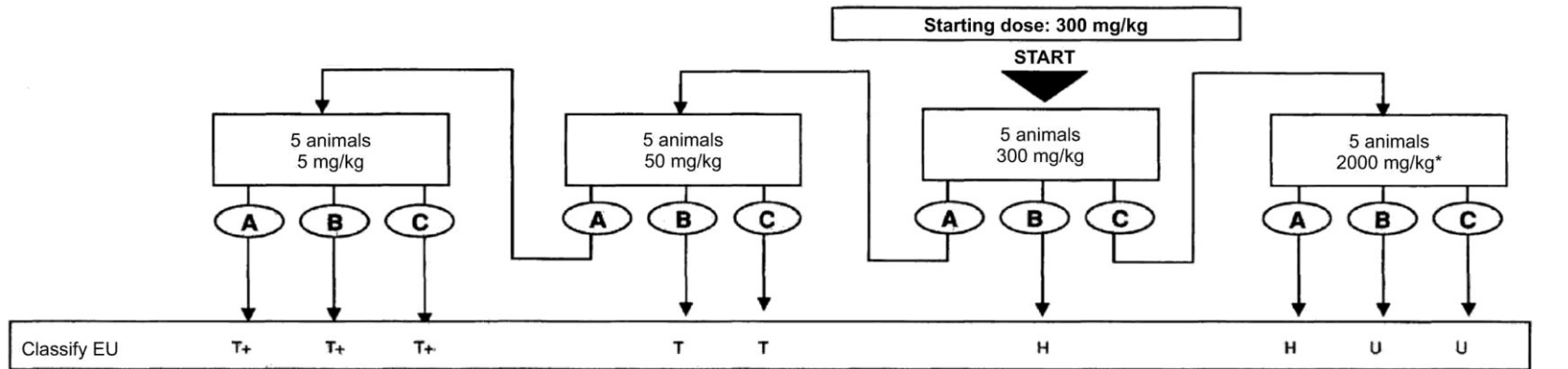
Testování toxicity – alternativy k in vivo experimentům s obratlovci

- Snaha o snižování počtů zvířat (nahrazování testů in vivo)
 - **Alternativní přístupy v toxikologii**
 - ex vivo (orgány zvířat)
 - in vitro (buňky, buněčné linie, enzymy ...)
 - in silico
- Cílem je naplnění principu 3R
 - Reduction – Refinement – Replacement
 - Dosažení 3R: nové přístupy v legislativě a v praxi
 - Omezování počtů zvířat v in vivo testování
 - Zlepšování vypovídací hodnoty testů podle nových poznatků
 - Nahrazování in vivo testů alternativami (in vitro, QSAR)
- Uplatňování 3R je obecnou politikou
 - Musí být reflektováno při tvorbě nových zákonů
 - Je zohledněno např. v REACH
 - EU financuje aktivity validací alternativních metod pro regulační toxikologii atd.



Příklad – „Reduction“

Pro málo toxické látky - není třeba testovat a hledat LD50 (min 30 zvířat)
 Nově se uplatňuje „Stupňový“ (Tiered) přístup



Outcome

- A** ≥ 2 deaths
- B** ≥ 1 with evident toxicity and / or 1 death
- C** No evident toxicity and no death

T+ = very toxic
T = toxic
H = harmful
U = unclassified

Group size

The 5 animals in each main study group will include any animal tested at that dose level in the sighting study

* Animal welfare override

If this dose level caused death in the sighting study, then no further animals will be tested. Go directly to outcome **A**

Alternativní metody testování toxicity

- **Mezinárodní agentury pro validaci alternativních postupů**
- Sledují principy „3R“
 - ICVAM (USA)
 - EU: <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/>
 - The **European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL-ECVAM)**
 - Časopis ATLA (Alternatives to Laboratory Animals)
- Poskytují (zdarma ke stažení) kompletní návody na validované postupy (ověřené), které splňují 3R.
- Jejich využití standardizačními agenturami (OECD) je jen částečné
 - proto nejsou často užívány v praxi průmyslem

<http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/>



JOINT RESEARCH CENTRE

EURL ECVAM DataBase service on Alternative Methods to animal experimentation (DB-ALM)

[European Commission](#) > [JRC](#) > [IHCP](#) > [EURL ECVAM](#) > [DB-ALM](#) > [About](#)



[Methods](#)

[Topic Summaries](#)

[Projects & Studies](#)

[Bibliography](#)

[Persons & Institutions](#)

[Contribute](#) [Glossary](#) [Your Account](#)

[The DB-ALM Project](#)

[Workstrategy](#)

[Data Coverage](#)

[Use of DB-ALM](#)

[Related Projects](#)

[Press Room & Citations](#)

[Collaborations](#)



About the DB-ALM

Welcome to the DB-ALM version with an entirely revised data retrieval approach

The DB-ALM is a **public, factual** database service that provides **evaluated information** on development and applications of advanced and alternative methods to animal experimentation in biomedical sciences and toxicology, both in research and for regulatory purposes.

Starting from 2015, all new method summaries are provided in a format compliant with the new OECD Guidance. [Read More](#)

The service is operated by the **European Commission's Joint Research Centre**, based on a legal requirement^{1,2}.

News

DB-ALM revised version now online. [Read more](#)

Second edition of the EURL ECVAM Search Guide now available in the [EU Bookshop](#)

Register now for the [SEURAT-1 Symposium](#)



ICCVAM
3Rs Topics
Test Method Evaluations
Integrated Testing Strategies
Tox21 Support
3Rs Meetings and Workshops
Publications and Presentations
Reports
Resources for Test Method Developers
Testing Regulations and Guidelines
Contact NICEATM

NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods



<http://ntp.niehs.nih.gov/go/niceatm>

The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) is an office within the [Division of the National Toxicology Program](#), [National Institute of Environmental Health Sciences](#). NICEATM activities support the development and evaluation of new, revised, and alternative methods to identify potential hazards to human health and the environment, with a focus on replacing, reducing, or refining animal use.

NICEATM activities include:

- Conducting and publishing [analyses and evaluations of data from new, revised, and alternative testing approaches](#)
- Providing information to test method developers, regulators, and regulated industry through this website and other communications and by organizing [workshops and symposia on topics of interest](#)
- Supporting the [Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods \(ICCVAM\)](#)
- Providing bioinformatics and computational toxicology support to NTP and NIEHS projects, especially those related to [Tox21](#)

[Back to top](#)

Web page last updated on Tuesday October 20, 2015



Seriozní projekty podpory alternativních metod TOXIKOLOGIE - <http://alttox.org>



Non-animal Methods for Toxicity Testing

[Sitemap](#) [Contact Us](#)

About AltTox

Home

About AltTox

Enter Forum

Toxicity Testing Resource Center

AltTox Forum

Home > Toxicity Testing Resource Center

Toxicity Testing
Resource Center

Toxicity Testing Resource Center

Last Updated: December 6, 2007

[Print](#) [Email](#)

Toxicity Tests
Overview

The Toxicity Testing Resource Center (TTRC) contains the informational content of AltTox. This section provides comprehensive information on non-animal methods of toxicity testing not easily found anywhere else on the Web. You will find concisely summarized information relevant to all aspects of advancing *in vitro* and *in silico* methods for toxicity testing. Additionally, many topics in the TTRC contain invited commentaries on The Way Forward.

Toxicity Endpoints &
Tests

- [Toxicity Testing Overview](#)
- [Toxicity Endpoints & Tests](#)
- [Emerging Technologies & Approaches](#)
- [Existing Alternatives](#)
- [United States: Programs & Policies](#)
- [European Union: Programs & Policies](#)
- [Japan: Programs & Policies](#)
- [International: Programs & Policies](#)
- [Validation, Regulatory Acceptance, & International Harmonization](#)
 - [Table of Validated and Accepted Alternative Methods](#)
- [Overarching Challenges & Opportunities](#)
- [The Way Forward](#)
- [Informational Resources](#)

Emerging
Technologies &
Approaches

Existing Alternatives

United States:
Programs & Policies

European Union:
Programs & Policies

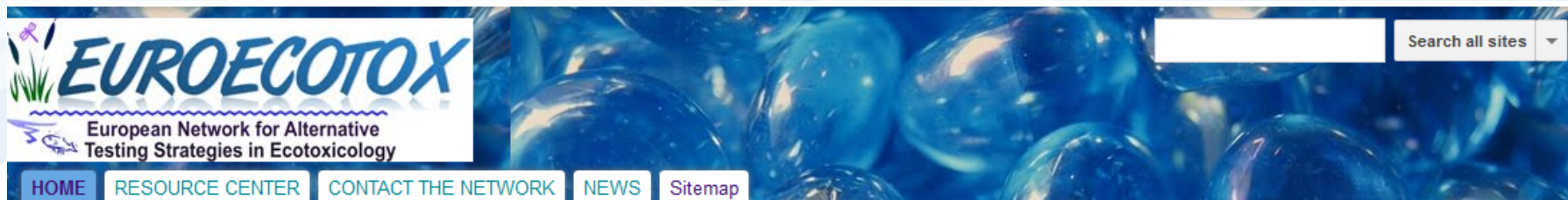
Japan: Programs &
Policies

International:
Programs & Policies

Validation, Regulatory
Acceptance &
International



Seriozní projekty podpory alternativních metod EKOTOXIKOLOGIE - <http://www.euroecotox.eu>



WELCOME TO EUROECOTOX

EUROECOTOX is an European Network, funded by the Seventh Framework Programme (FP7) of the European Commission, [Environment Programme](#).

The main objectives of the EUROECOTOX Network are:

- To contribute to the advancement of alternative methods of ecotoxicity testing in Europe.
- To promote the validation and regulatory acceptance of new alternative ecotoxicity methods.
- To facilitate the networking of research groups working in the field of alternative ecotoxicology.
- To provide a gathering point for all stakeholders involved in the development, validation, regulatory acceptance and final use of alternative ecotoxicity testing strategies.
- To act as the one voice for alternative ecotoxicity testing in Europe.



Alternative Thinking to Achieve Validation
of New Regulatory Tests and
the 3Rs Goals in Ecotoxicology

Recent Announcements

[6th SETAC World Congress](#) The 6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting will be held at the Estrel hotel in Berlin from 20-24 May 2012, with the theme Securing a sustainable ...

Posted 11 Nov 2011 04:38
by Mauricio Garcia-Franco



New

[Publication from on AXLR8.eu](#) The coordination action AXLR8, funded by the European

- HOME
- ▼ ABOUT EUROECOTOX
 - MEMBERS OF THE NETWORK
 - HOW TO JOIN THE NETWORK
 - CONTACT THE NETWORK
 - Consortium Area
- ALTERNATIVE ECOTOXICITY METHODS
- RESOURCE CENTRE
- DISCUSSION FORUMS
- NEWS
- Download Flyer/Press Releases / Newsletters
- Sitemap



EUROECOTOX is
funded by the European



toxicických látek
v prostředí

Seriozní projekty podpory alternativních metod EKOTOXIKOLOGIE – databáze testů <http://projects.cba.muni.cz/euroecotox/>

EUROECOTOX database of bioassays

Introduction

Alternative assays

Standard assays

Contacts

EUROECOTOX is a European Network established to promote the integration of European activities on the refinement, reduction and replacement of animal experiments in ecotoxicology.

The intent of EUROECOTOX database of bioassays is to assist in identifying alternative methods helpful in supporting the development, testing, application, and validation of alternatives to the use of animals in ecotoxicology testing.

The following three interlinked sub-databases are covered:

Alternative assays ("3Rs" of alternatives) include only those methods which meet at least one of the 3R (refine, reduce, and replace) criteria. There is a link to a standard assay counterpart. Moreover, the state of development and the scientific or official acceptance of alternative methods is assessed and documented. To this end, a distinction is made between the criteria "experimental", "prevalidation", "ongoing validation", "validated" and "regulatory test".

Standard assays include standardised animal tests for ecotoxicity testing. There is a link to an alternative assay counterpart.

Contacts include researchers who are working with the alternative assays.



Research Centre for Toxic Compounds in the Environment
Kamenice 126/3
625 00 Brno
Czech Republic
www.recetox.muni.cz



The Use of Alternatives to Testing on Animals for the REACH Regulation 2011

Table 4: HH Endpoint Study Records (1 of 2)

1. Test type	2. Phase	3. Tonnage band	4. Total ESR	5. Experimental Studies (ES)	%	6. Testing Proposals (TP)	%	7. Read-across (RA)	%	8. IUCLID flags to omit the study (FO)	%	9. Weight of Evidence (WE)	%	10. QSAR Studies (QS)	%	11. Miscellaneous Studies (MS)	%
1.0 Acute toxicity (all routes)	Phase-In	>1000	12874	7328	56.9	0	0.0	2756	21.4	1184	9.2	1116	8.7	11	0.1	479	3.7
	Phase-In	100to1000	1649	988	59.9	0	0.0	342	20.7	178	10.8	113	6.9	3	0.2	25	1.5
	Non-Phase-In	>100	396	154	38.6	0	0.0	51	12.9	80	20.2	20	5.1	0	0.0	91	23.0
1.1 Acute toxicity (oral)	Phase-In	>1000	5864	3724	63.5	0	0.0	1241	21.2	143	2.4	502	8.6	4	0.1	250	4.3
	Phase-In	100to1000	797	560	70.3	0	0.0	164	20.6	17	2.1	43	5.4	1	0.1	12	1.5
	Non-Phase-In	>100	156	71	45.5	0	0.0	23	14.7	8	5.1	13	8.3	0	0	41	26.3
1.2 Acute toxicity (inhalation)	Phase-In	>1000	3990	2000	50.1	0	0.0	818	20.5	633	15.9	383	9.6	7	0.2	149	3.7
	Phase-In	100to1000	433	207	47.8	0	0.0	94	21.7	97	22.4	26	6.0	2	0.5	7	1.6
	Non-Phase-In	>100	112	26	23.2	0	0.0	13	11.6	53	47.3	5	4.5	0	0	15	13.4
1.3 Acute toxicity (dermal)	Phase-In	>1000	3020	1604	53.1	0	0.0	697	23.1	408	13.5	231	7.6	0	0.0	80	2.6
	Phase-In	100to1000	419	221	52.7	0	0.0	84	20.0	64	15.3	44	10.5	0	0.0	6	1.4
	Non-Phase-In	>100	128	57	44.5	0	0	15	11.7	19	14.8	2	1.6	0	0.0	35	27.3
	Phase-In	>1000	329	252	76.6	0	0.0	39	11.9	2	0.6	35	10.6	0	0.0	1	0.3

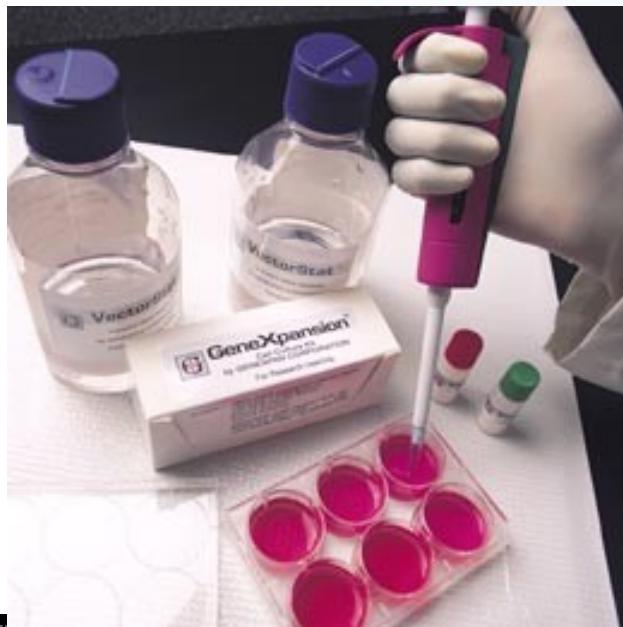
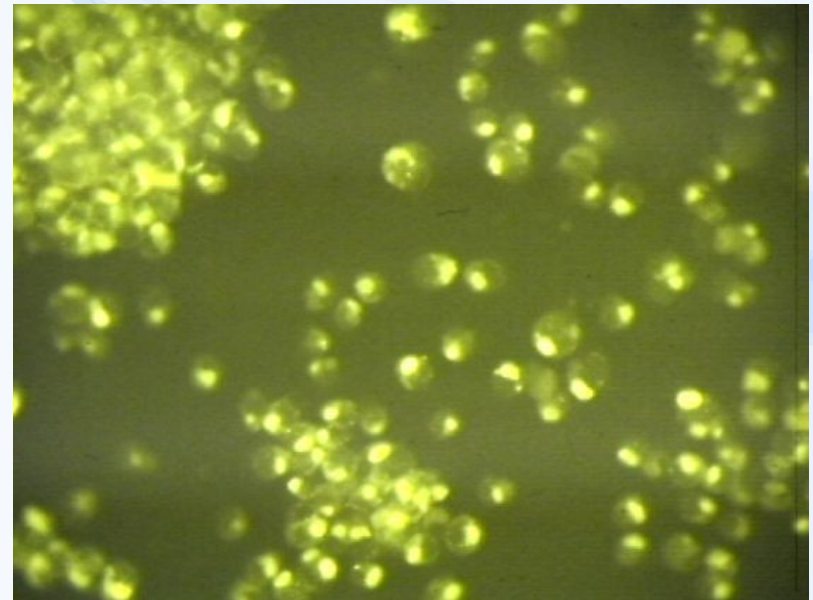
Table 4: HH Endpoint Study Records (1 of 2)

1. Test type	2. Phase	3. Tonnage band	4. Total ESR	5. Experimental Studies (ES)	%	6. Testing Proposals (TP)	%
1.0 Acute toxicity (all routes)	Phase-In	>1000	12874	7328	56.9	0	0.0
	Phase-In	100to1000	1649	988	59.9	0	0.0
	Non-Phase-In	>100	396	154	38.6	0	0.0
1.1 Acute toxicity (oral)	Phase-In	>1000	5864	3724	63.5	0	0.0
	Phase-In	100to1000	797	560	70.3	0	0.0
	Non-Phase-In	>100	156	71	45.5	0	0.0
1.2 Acute toxicity (inhalation)	Phase-In	>1000	3990	2000	50.1	0	0.0
	Phase-In	100to1000	433	207	47.8	0	0.0
	Non-Phase-In	>100	112	26	23.2	0	0.0
1.3 Acute toxicity (dermal)	Phase-In	>1000	3020	1604	53.1	0	0.0
	Phase-In	100to1000	419	221	52.7	0	0.0
	Non-Phase-In	>100	128	57	44.5	0	0
	Phase-In	>1000	329	252	76.6	0	0.0

Statistiky REACH 2011: malé % využití alternativ v registracích



Alternativy 1 – in vitro metody



Př: ECVAM - validovaná in vitro technika hodnocení embryotoxicity

EMBRYONIC STEM CELL TEST (EST)

The embryotoxic potential of chemicals is determined by the evaluation of the inhibition of differentiation of embryonic stem cells (ES) and the inhibition of growth of ES and 3T3 cells.

Objectives and Application

TYPE OF TESTING : screening, reducing and refining
LEVEL OF ASSESSMENT : toxic potential, toxic potency
PURPOSE OF TESTING : classification and labelling, ranking

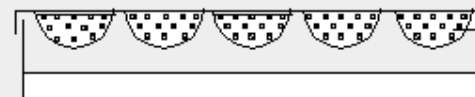
The Embryonic Stem cells Test (EST) has been proposed as a screener assay for potentially embryotoxic substances and for their classification into three different classes of *in vivo* embryotoxicity (*strong*, *weak* and *embryotoxic*) (Genschow *et al.*, 2002; Spielmann *et al.*, 1997).

The positive outcome of the recent ECVAM validation study confirmed possibility for the use of the test within the context of OECD test guideline 414, and Annex V, part B of the EU-Dangerous Substance Directive, for reducing and/or refining the use of animal procedures (Anon., 1998a and 2002).

According to the study outcome, the Management Team concluded that rather than representing a complete replacement, the test should be used in the context of testing strategies (Genschow *et al.*, 2002).

Step 1

Prepare a concentration range of test chemical in assay medium (=test solution) with ES cells (3.75×10^4 /ml)



750 cells/20 μ l test solution
(approx. 50-80 drops/lid)

Cell culture in "hanging drops"

(use one petri dish per concentration of test chemical;
untreated control = assay medium)
Incubate (37 °C/5% CO₂ 13 days)

Induction of ES cell aggregates

Step 2

Prepare the same test solution as Step 1



5 ml test solution
+
"hanging drops" from 1 petri dish"

Cell culture in suspension culture

(use one petri dish per concentration of test chemical;
untreated control = assay medium)
Incubate (37 °C/5% CO₂ 12 days)

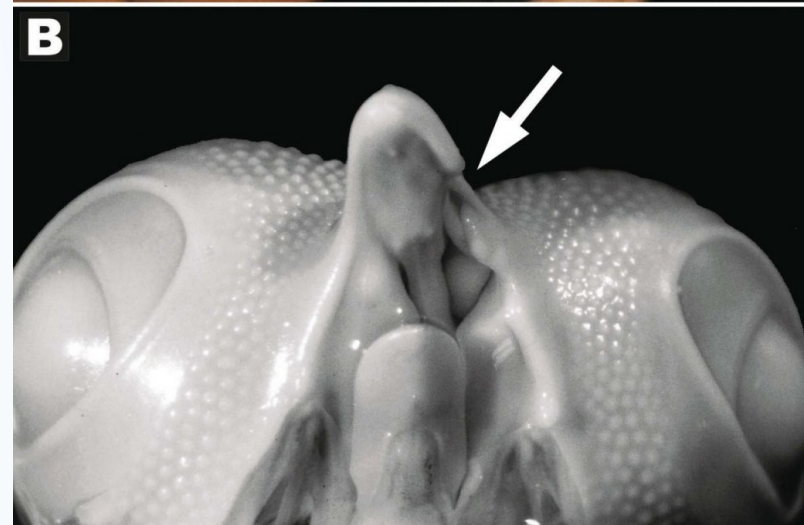
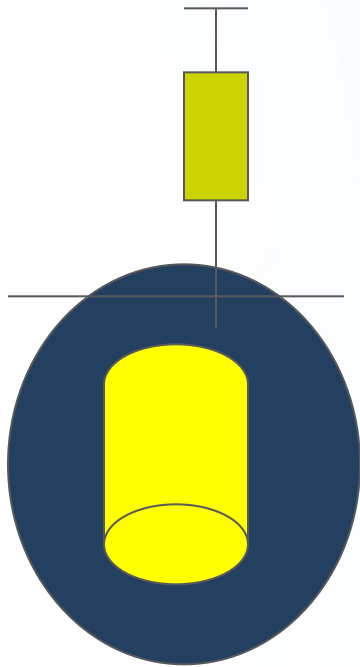
Differentiation in "embryoid bodies" (EBs)



Alternativy 2 – **EMBRYONÁLNÍ** testy (není považováno za in vivo)

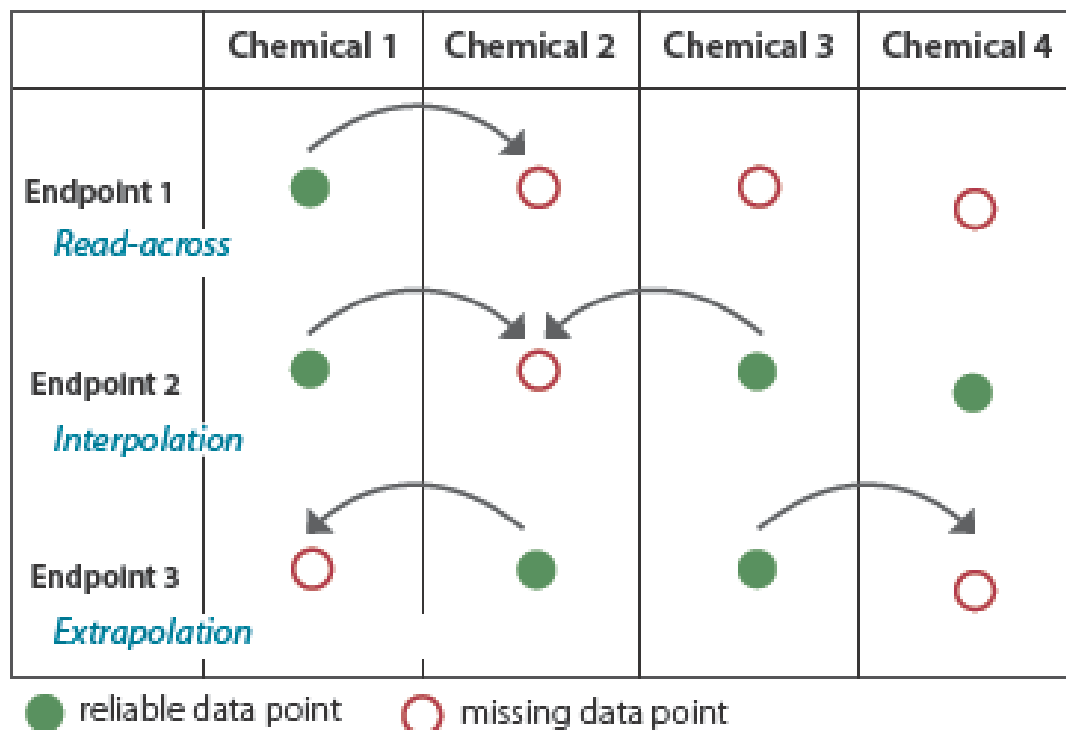
CHEST test (Chick Embryotoxicity Screening Test)

- Injekce testované látky do vyvíjejícího se vajíčka
- Hodnocení malformací



Alternativy 3 – in silico modely a QSAR

- Využití informací o biologické aktivitě (toxicitě) u existujících látek → predikce pro neprostudované chemikálie
- Mnoho různých přístupů (matematické, statistické ...)
- Příklad: **OECD QSAR Toolbox** www.qsartoolbox.org



Bezpečnost chemických látek pro prostředí EKOTOXIKOLOGIE

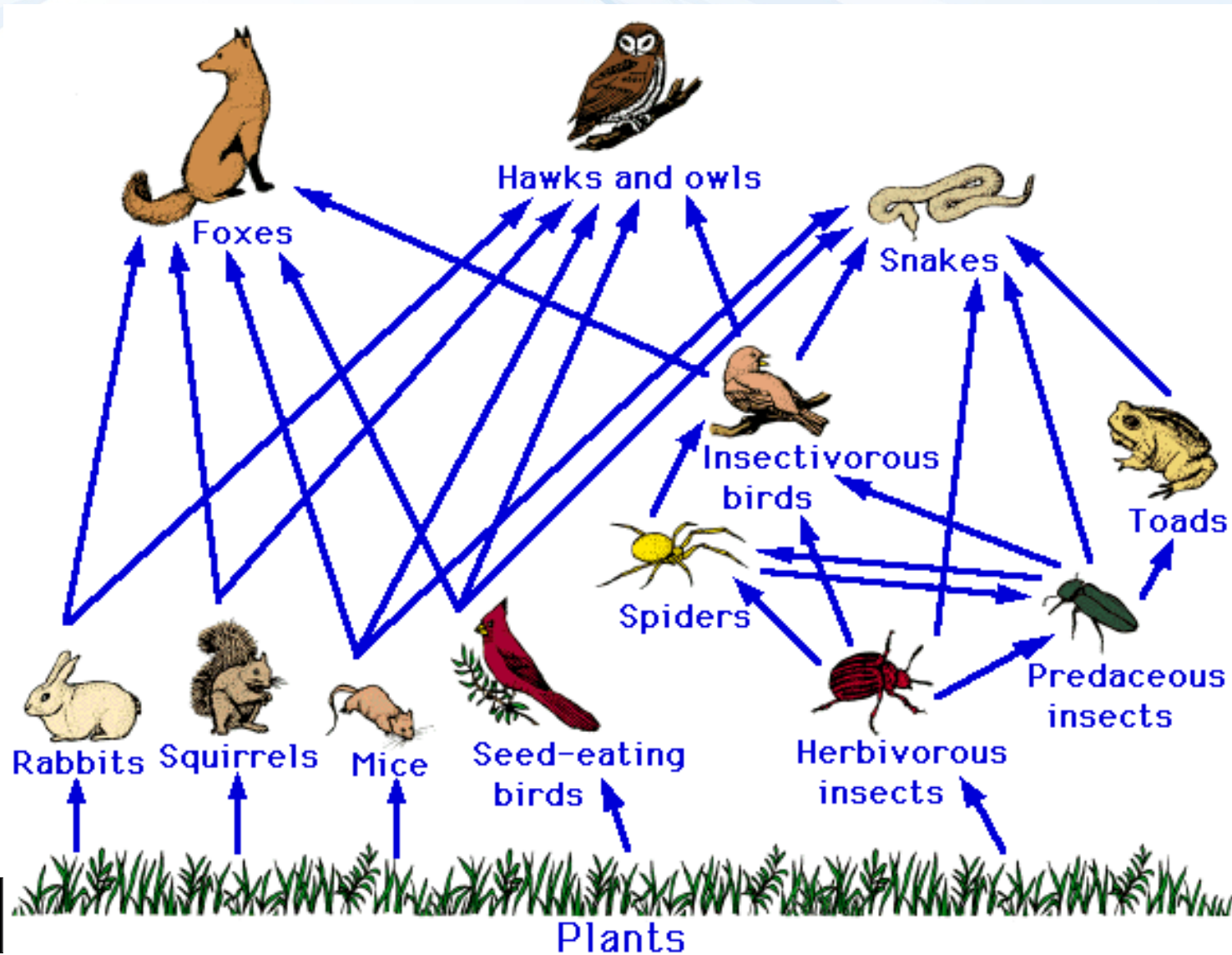


EKOTOXIKOLOGIE - úvod

- Věda s řadou aplikací, jejímž cílem je **racionálně chránit EKOSYSTÉM, populace a společenstva organismů**
(na rozdíl o toxikologie – předmětem je ochrana jednoho druhu = člověk)
- Ekosystém – složitá struktura a funkce bioty
- Nutná je **ochrana všech stupňů (trofické úrovně)**
 - Producenti (řasy, rostliny ...)
 - Konzumenti různých řádů (bezobratlí, obratlovci)
 - Destruenti (mikroorganismy)
- Nelze otestovat účinky na všechny druhy
 - existují „**modely**“ = **zástupci významných skupin** (trofických stupňů)
- Hodnocení ekotoxicity – podobné principy jako toxikologie
 - LC50 (letální koncentrace 50), EC50 (efektivní koncentrace 50 – např. reprodukční toxicita)
 - NOEC – bezpečná hladina („no observed effect concentration“)



Rovnováha ekosystému a význam potravních sítí



OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2

Effects on Biotic Systems

- 26 July 2013 Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test
OECD
- 26 July 2013 Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure
OECD
- 26 July 2013 Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test
OECD
- 02 Oct 2012 Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test
OECD
- 02 Oct 2012 Test No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay
OECD
- 28 July 2011 Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
OECD
- 21 Sep 1998 Test No. 214: Honeybees, Acute Contact Toxicity Test
OECD
- 17 July 1992 Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test
OECD
- 17 July 1992 Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test
OECD
- 04 Apr 1984 Test No. 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study
OECD
- 04 Apr 1984 Test No. 205: Avian Dietary Toxicity Test
OECD

OE

STANDARDIZOVANÉ
TESTY
(např. Vyžadované pro REACH)



Příklady modelů hodnocení – Ekotoxikologické biotesty

Producenti

- ve vodě
- v půdním prostředí



Řasové testy toxicity

Řasy

Selenastrum capricornutum
Scenedesmus subcapitatus
Sc. quadricauda
Chlorella vulgaris



Toxicita pro rostliny (terestrický ekosystém)

Využívají se zástupci dvou velkých skupin:

- jednoděložných (např. ječmen)
- dvouděložných (např. salát, hořčice, bob)



**14-d Shoot Length
IC50 = 29.7 mg/g**



Konzumenti – bezobratlí – vodní prostředí

Daphnia magna



Artemia salina



Ceriodaphnia dubia



Gammarus



Chironomus riparius



Konzumenti – bezobratlí – vodní prostředí

Živorodka duhová (Paví očko)
Poecilia reticulata



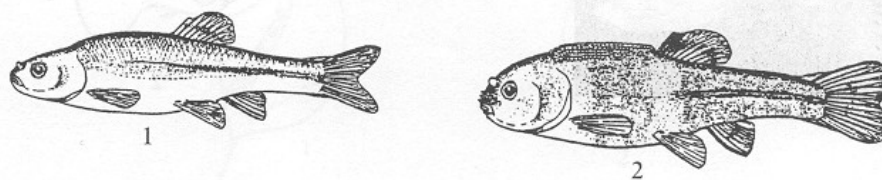
Karas (zlatá forma)



Zebříčka - *Danio rerio*
(syn. *Brachydanio rerio*)



Střevle - *Pimephales promelas*



Obr. 3: *Pimephales promelas* (1 - samička, 2 - samček)

Pstruh



Experimentální uspořádání testování ekotoxicity ve vodním prostředí



Alternativní testy (k testům s obratlovci) v ekotoxikologii

EMBRYONÁLNÍ testy

- **ZFET** *Zebrafish Embryo Toxicity Test*
(validace dle ISO)

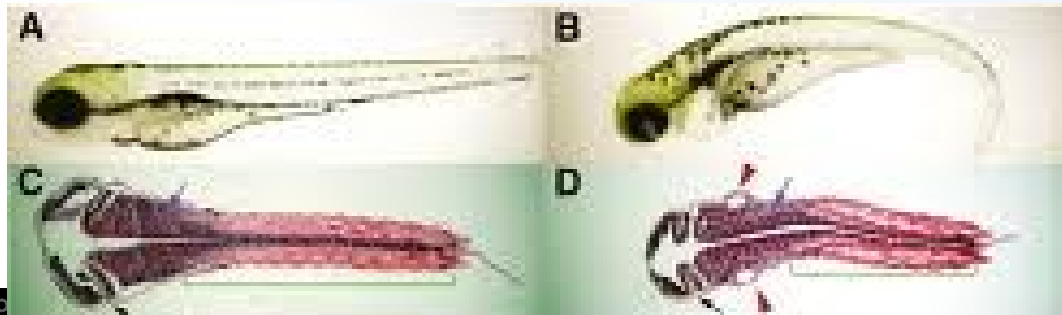
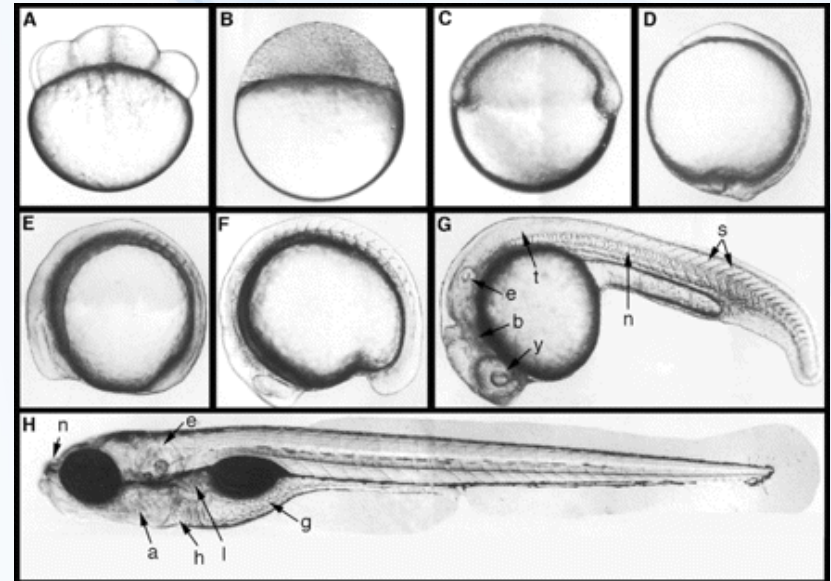
- **FETAX** *Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus*
(validovaná alternativa testů teratogenity)



ZFET

- Zebřička, zebrafish (*Danio rerio*)

- Obecně velmi významný modelový biologický organismus (!)
- Indukce páření rozsvícením (fotoperioda)
- Experimenty s vajíčky až embryi - vyhodnocení kulení, přežívání, malformací
 - do 4 dnů: ryby se vyživují z vaječného vaku



FETAX test

- Hormonální stimulace žab *X. laevis*
→ vajíčka
- Expozice oplozených vajíček
- 96 hodin kompletní vývoj embrya



Příklad – vliv herbicidu – paraquat

Kontrolní embryo



Malformace páteře



Centru
toxický
v prost

BAKTERIE – významný model v hodnocení chemikálií

- Snadná kultivace, krátký generační čas, jednoduché uspořádání (jediná membrána), jednoduchý genetický aparát
- Využití při testování „bezpečnosti“ látek (i jiných vzorků – extrakty z potravin ...)
 - rychlé (skreeningové) **testy akutní toxicity**
 - **MICROTOX**
 - **Testy na genotoxicitu** - sledování poškození DNA
 - **Amesův test**



TEST AKUTNÍ TOXICITY – MICROTOX

- mořská luminiscenční bakteri *Vibrio fischeri*
- krátkodobá expozice testované látky (5-30 min)
- sledování změn přirozené luminiscence – odpovídá toxicitě
- uspořádání:
 - * kyvety (zkumavky), stanovení v luminometru
 - * mikrodestičkové



Amesův test

Test na reverzní mutace se *Salmonella typhimurium*

- Původní kmen neroste na živném médiu
- Látka vyvolá (reverzní) mutaci -> bakterie rostou

The diagram illustrates the Ames test procedure. On the left, three test tubes are shown, each with an arrow pointing to a petri dish. The first tube is labeled 'Potential mutagen A' and its corresponding petri dish shows a dense field of green bacterial colonies. The second tube is labeled 'Potential mutagen B' and its petri dish is empty. The third tube is labeled 'Control' and its petri dish is also empty. To the right, a screenshot of the 'Ames Assay' software interface is shown. The interface displays a petri dish image with green colonies and a data table. The software title bar reads 'view - Ames Assay'. The main window shows 'Dose5Sample10' and 'No Dilution'. A status bar indicates '191 per Frame' and 'FB'. A table titled 'MutagenX' contains the following data:

Plate Id	Count per Frame	Count per Plate	Frame / Plate %	Plate Area (mm ²)
Dose1	191	221	86.49	6082.12
Dose2	191	221	86.49	6082.12
Dose3	191	221	86.49	6082.12
Dose4	191	221	86.49	6082.12
Dose5	191	221	86.49	6082.12
Dose6	191	221	86.49	6082.12
Dose7	191	221	86.49	6082.12
Dose8	191	221	86.49	6082.12
Dose1 Sample2	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample3	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample4	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample5	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample6	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample7	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample8	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample1	191	221	86.49	6082.12
Dose2 Sample2	191	221	86.49	6082.12
Dose3 Sample3	191	221	86.49	6082.12
Dose3 Sample4	191	221	86.49	6082.12
Dose3 Sample5	191	221	86.49	6082.12
Dose3 Sample6	191	221	86.49	6082.12
Dose3 Sample7	191	221	86.49	6082.12
Dose3 Sample8	191	221	86.49	6082.12
Dose4 Sample9	191	221	86.49	6082.12
Dose4 Sample10	191	221	86.49	6082.12
Dose4 Sample11	191	221	86.49	6082.12
Dose4 Sample12	191	221	86.49	6082.12
Dose5 Sample5	191	221	86.49	6082.12
Dose5 Sample6	191	221	86.49	6082.12
Dose5 Sample7	191	221	86.49	6082.12
Dose5 Sample8	191	221	86.49	6082.12
Dose5 Sample9	191	221	86.49	6082.12

The software interface also shows a petri dish image with a green circle highlighting a region, with a label 'Area=4.01mm²'. The bottom status bar of the software reads 'Next Plate: Dose5Sample10, No Dilution Zoom 100% 1/27/00 5:09 PM'. The Windows taskbar at the bottom shows the Start button, Explorer - Tox images, and ProtoCOL RGB - [Ana...].

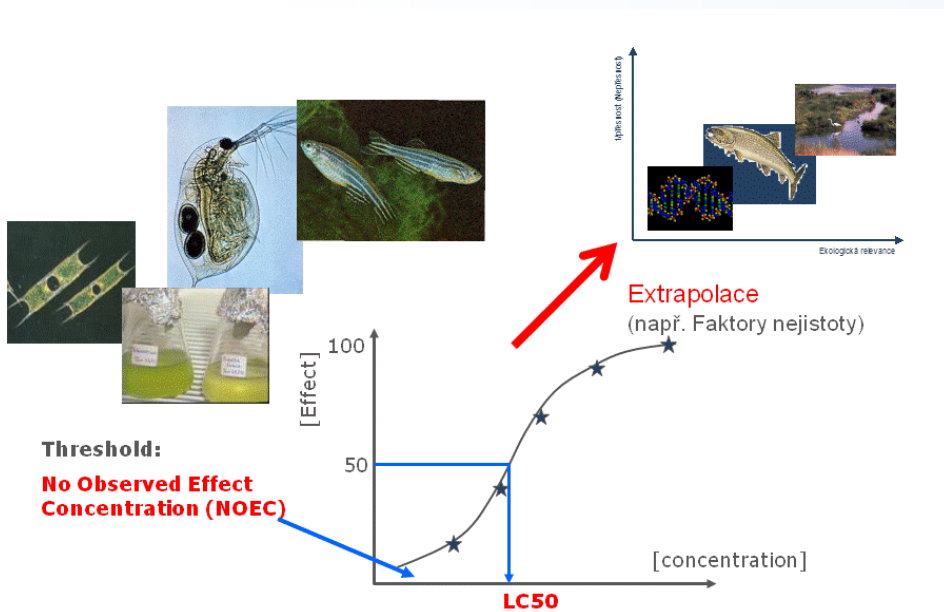
Využití ekotoxikologických modelů

1 (v praxi nejdůležitější) Prospektivní testování látek

→ odvozování limitů
(průmyslové chemikálie, POR, léčiva...)

2 (méně časté) Testování kontaminovaných vzorků

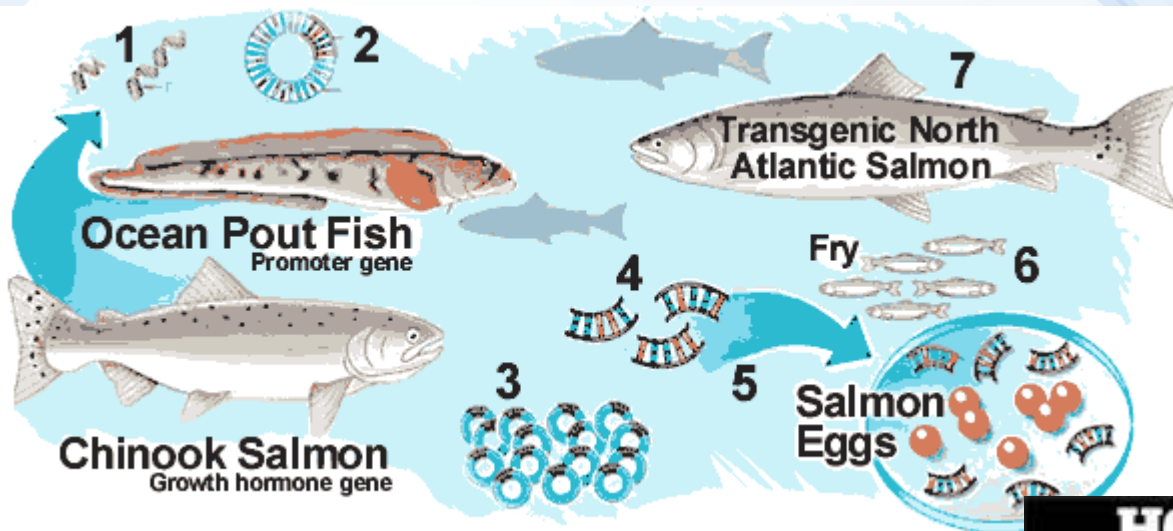
Např. vytěžené sedimenty z rybníků
Významná toxicita
→ nelze použít na půdu jako hnojivo



*Příklad toxicita sedimentů
pro klíčení hořčice*



Regulace Geneticky Modifikovaných Organismů (GMO)



- Zákon 153/2000
- Vyhlášky 372, 373, 374/2000 MŽP
- Definice:
 - Organismus
 - biologická jednotka (buněčná nebo nebuněčná) schopná rozmnožování nebo přenosu dědič. materiálu včetně virů
 - GMO
 - organismus (kromě člověka) změněný gen. modifikací



- **Co je Genetická modifikace: ?**

- rekombinantní techniky vytvářející nové kombinace DNA - vložení nového úseku jakýmkoliv způsobem do NK, plazmidu, vektoru ...
- techniky zavádějící dědičný materiál připravený mimo organismus do organismu (mikroinjekce, mikroenkapsulace ...)
- techniky buněčné fúze, hybridizace buněk (!produkce monoklonálních protilátek)

- **Co není Genetická modifikace?**

- oplození *in vitro*
- bakteriální konjugace a všechny podobné přirozené procesy
- indukce polyploidie a haploidie
- mutageneze
- křížení



Proč regulovat GMO?

- **Předběžná opatrnost**

- stále málo prostudováno

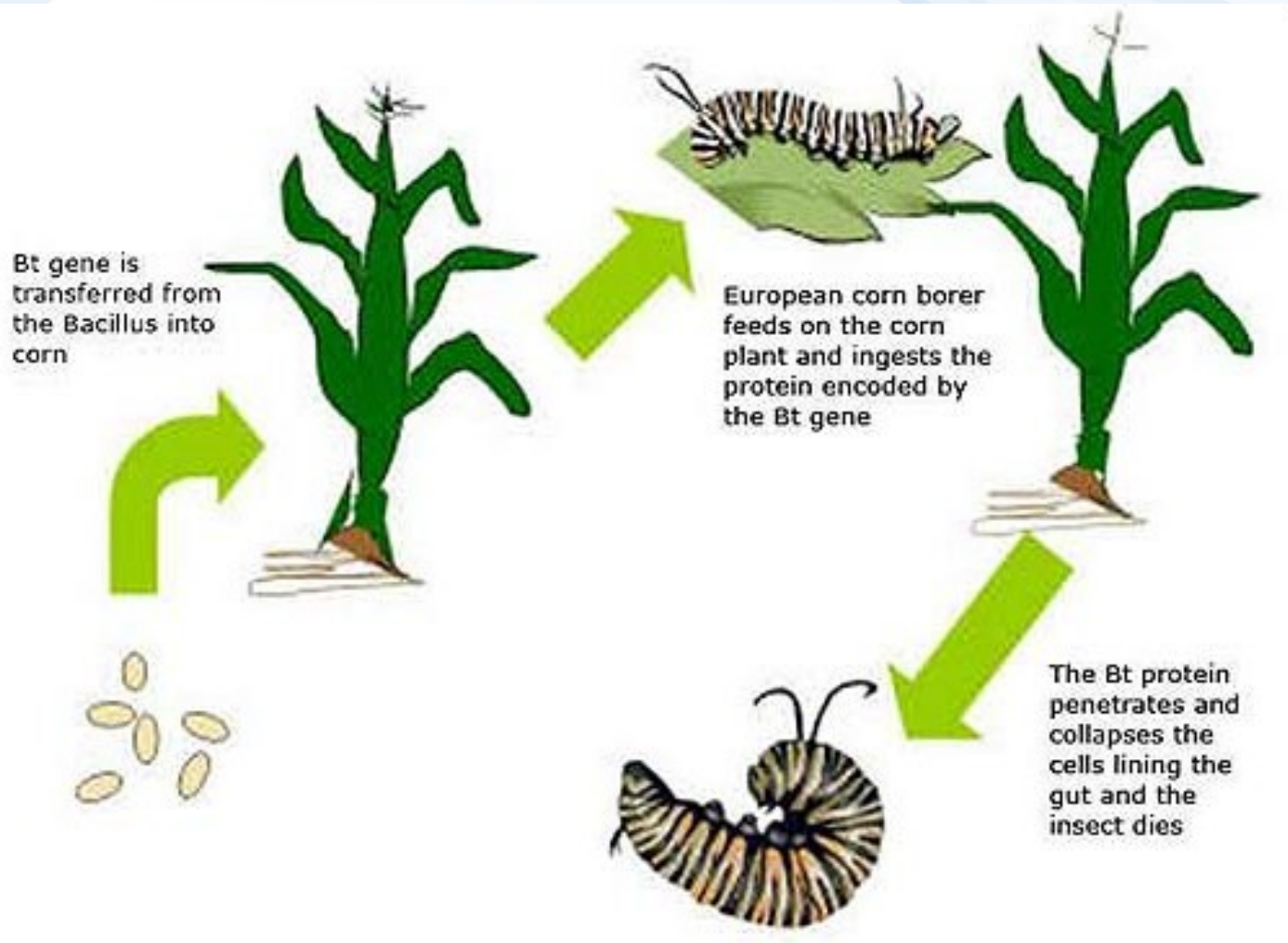
- neznáme **možné důsledky** vnášení do prostředí, například:

- přímé nebo nepřímé škodlivé působení na člověka, zvířata, rostliny
 - » onemocnění (GM bakterie)
 - » alergizace, toxicita
 - vliv na dynamiku populací a genetickou rozmanitost
 - omezení možnosti léčby (rezistence vůči ATB)
 - účinky na biogeochemické procesy (fixace dusíku, koloběh uhlíku ...)

Příklad

- GM kukuřice s geny pro „Bt“ toxin z *Bacillus thuringiensis*
 - Toxiny působí proti škůdcům

? *NEGATIVNÍ* působení Bt z opadaných listů na biotu v půdě/vodě ?



- Hlavní orgán: Ministerstvo ŽP, které registruje:
 - seznamy uživatelů (právnícké osoby)
 - seznamy GMO
 - pro uzavřené nakládání
 - pro vnášení do prostředí (experimentální hodnocení v prostředí)
 - pro vnášení do oběhu (povoleno pro obchodování)
- Další orgány
 - ČIŽP, celní orgány, orgány veterinární správy, ÚKZÚZ, SZÚ, ÚSKVBL, ČZPI

- **REGISTRACE**

- Registrovaný uživatel je v seznamu vedeném MŽP
 - Složitá forma žádosti - řada požadavků
 - *př. přesná definice genetické změny pro účely identifikace...*
 - *popis pracoviště, havarijní plány*
 - Pověřené osoby (vzdělání, praxe ...)
 - Odborný poradce
-
- Před zápisem do seznamu je nutné **provedení analýzy rizika a kategorizace konkrétního GMO**
 - *popis náležitostí je ve vyhlášce*

Hodnocení rizik GMO

- Po provedení analýzy rizika se GMO zařadí do kategorie
 - **A - bez rizika** nebo s min. rizikem škodlivého působení
 - B - riziko, které může být odstraněno obecně známými opatřeními
 - C - riziko, které může být odstraněno jen zvláštními náročnými zásahy
 - **D - riziko, které zanechává trvalé následky** a nemůže být zcela odstraněno
- **Podle kategorie rizika je nutno zabezpečit provoz zařízení**
 - vybavení
 - provozní řád (režim SLP)
 - identifikace, osoby, seznam a popis pracovních postupů, výčet GMO a jejich počet, zásady vedení evidence o provádění sanitace, hygiena, vedení dokumentace ...
 - opatření pro případ havárie - speciální havarijní plán

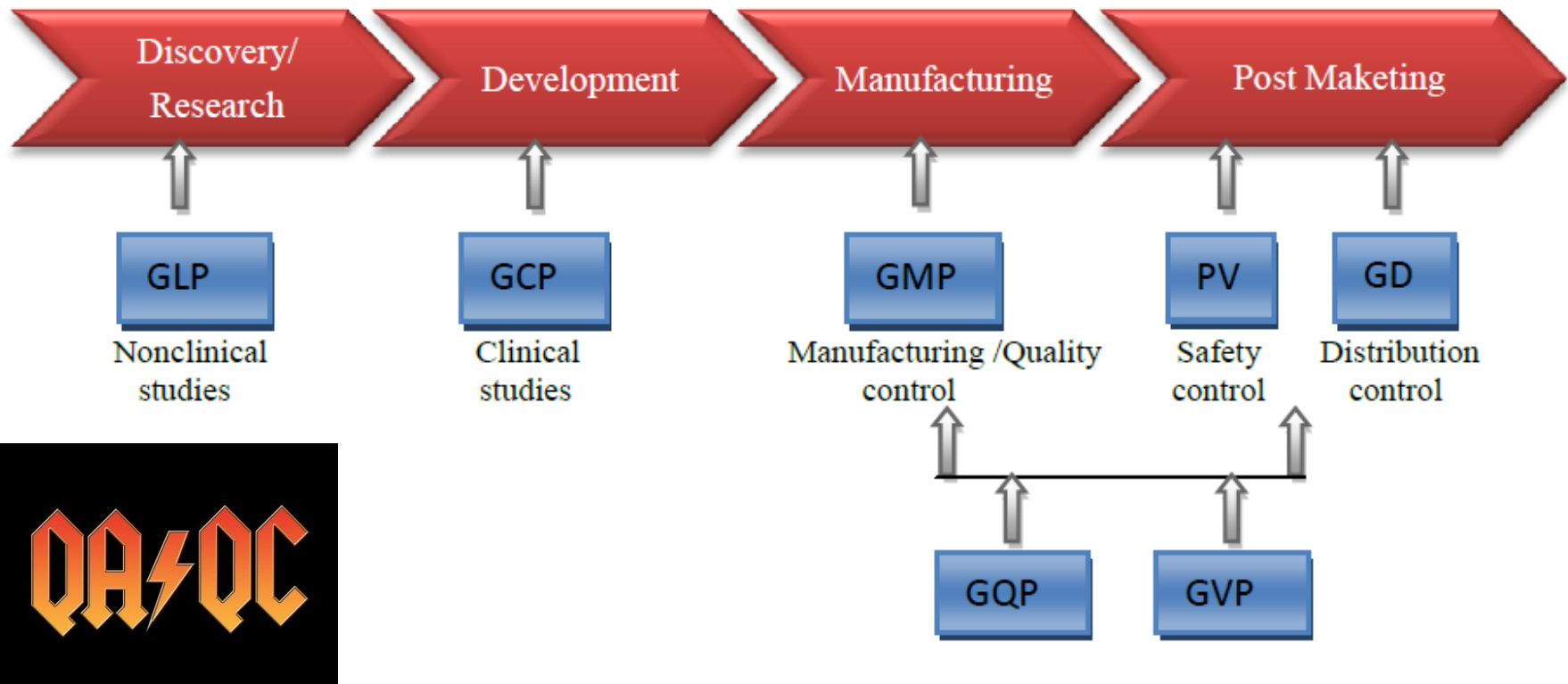
- **PLÁN ETAPY**
 - účel, údaje o organismu, osoby, specifikace materiálu, postupy nakládání, likvidace, odpady
 - schválení odborným poradcem
- **Provozní deník** (*každý zápis s podpisem*)
 - plán etapy, průběh etapy
 - primární údaje (!)
 - zápisy o kontrolách
- **Závěrečná zpráva etapy**
- Průběžná archivace a reporting → MŽP

Závěrem



PHARMACEUTICAL PRODUCT LIFE CYCLE AND REGULATIONS

QUALITY ASSURANCE SPANNING THE ENTIRE PRODUCT LIFE CYCLE



GLP: Good Laboratory Practice; GCP: Good Clinical Practice; GMP: Good Manufacturing Practice; GQP: Good Quality Practice; GVP: Good Vigilance Practice; VP: Pharmacovigilance