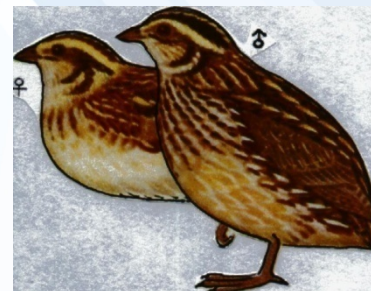




Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Toxikologické biotesty s ptáky a savci



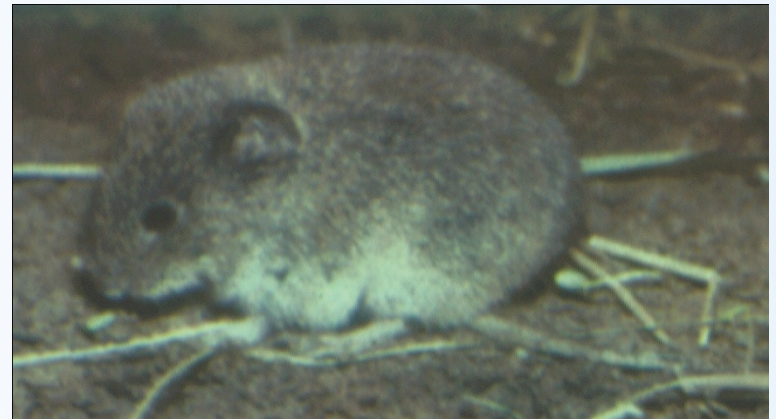
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Ptáci a savci

- Sekundární a terciární konzumenti
- Druhy z řádu dravců a sov, šelmy – konečný článek potravní pyramidy
- Delší doba života – potenciál bioakumulace
- ? zakoncentrování/
metabolizace látek v potravních řetězcích

Savci – modelové organismy pro humánní toxikologii



3 R PRINCIP

1959: Russel & Burch: “**3Rs principle**”

Replacement - nahrazení *in vivo* experimentů alternativami

Reduction - snížení počtu zvířat pro zjištění požadovaných informací

Refinement - snížení bolesti a utrpení

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



Ochrana zvířat a etika práce s laboratorními zvířaty

státní orgány ochrany zvířat v České republice:

- ministerstvo zemědělství (www.eAGRI.cz)

Výbor pro ochranu zvířat používaných pro vědecké účely (VOZPVU)

- poradenství, pokud jde o získání, chov a umístění pokusných zvířat, péči o ně a používání pokusných zvířat k pokusům

<http://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/kontakty/vybor-pro-ochranu-zvirat-pouzivanych-pro/>

Ústřední komise pro ochranu zvířat (ÚKOZ) - výbor pro ochranu pokusných zvířat (VOPZ)

<http://eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/kontakty/ustredni-komise-pro-ochranu-zvirat/>

<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/ustredni-komise-pro-ochranu-zvirat/>

Orgány státní veterinární správy

<https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/>

- pracovníci provádějící experimenty na zvířatech musí být držiteli osvědčení odborné způsobilosti pro práci s pokusnými zvířaty podle § 17 zákona 246/1992 Sb.
- 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



Ptáci

- terestrické i vodní prostředí

kontaminant



Riziko pro poškození ptačích populací

Divocí ptáci v prostředí

Druhy citlivé na pesticidy, těžké kovy, POPs, sinicové toxiny

Především rybožravé druhy – vrchol potravního řetězce

- Vliv na centrální nervový systém
 - Změny chování
 - Poruchy smyslů
- Endokrinní účinky
- Poruchy reprodukce
- Mortalita embryí
- Malformace embryí



Snížení reprodukční kondice populací

Ptáci - skupina necílových organismů pro pesticidy

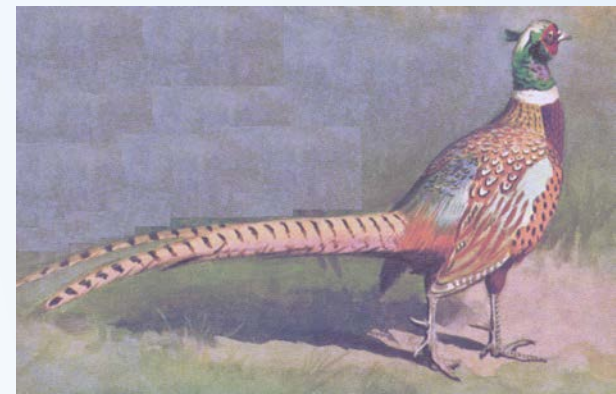
- Primární intoxikace
- Sekundární intoxikace
- Údaje o toxicitě látek pro ptáky jsou nenahraditelné
 - akutní toxicita
 - chronická toxicita



Testy toxicity pro ptáky

Cíl: hodnocení vlivu antropogenních kontaminantů (pesticidy, odpady atd.)
podpora registrace takových nových látek a přípravků, které:

- mohou představovat chronickou expozici ptáků
- jsou persistentní
- se mohou kumulovat v rostlinách a zvířatech
- vykazaly vliv na reprodukci laboratorních savců.



Testy toxicity na ptácích

OECD guidelines

Section 2: Effects on Biotic Systems



- **OECD GUIDELINES FOR TESTING OF CHEMICALS**

205, 1984: Avian dietary toxicity test

206, 1984: Avian reproduction test

223, 2016: Avian Acute Oral Toxicity Test



EPA Series 850

Ecological Effects Test Guidelines

850.2000 Background and Special Considerations - Tests with Terrestrial Wildlife

850.2100 Avian acute oral toxicity test

850.2200 Avian dietary toxicity test

850.2300 Avian reproduction test

850.2400 Wild mammal toxicity testing

850.2500 Field Testing for Terrestrial Wildlife

http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series850.htm



OECD 205 Avian dietary toxicity test



Test akutní perorální toxicity u ptáků

Testovací organismy: křepelka japonská (*Coturnix coturnix japonica*),
bažant obecný (*Phasianus colchicus*),
(případně: koroptev, vrána, kavka, špaček, racek, vlaštovka, kos,
drozd, pěnice, holub, káně, poštolka, volavka, kormorán).

Design:

ptáci ze stejné populace, 10-17 dní staří, známý původ

Před testem min. 7 dní aklimatizace, na začátku zvažení jedinců,

(U volně žijících ptáků: večerní odlov, jedinec dostane při svítání jednorázově dávku v kapsuli).

Osvětlení 12 až 16 hodin denně

Expozice v potravě 5 dní (120 hodin), pak 3 dny krmná směs bez testované látky

Min. 5 koncentrací látky v krmivu (limitní test 5000 ppm) – příprava rovnoměrným rozmísením testované látky se základní krmnou směsí

Pokud dochází k úmrtí 7 a 8 den, prodloužení testu, až když 2 dny po sobě bez mortality, max. 21 dnů

10 jedinců na 1 klec



Test akutní toxicity u ptáků

Během testování se sleduje:

Příznaky intoxikace a abnormality v chování

Mortalita

Hmotnost těla

v OECD 205: 0.- 5., 8. den a na konci testu, je-li prodloužen

Spotřeba krmiva

v OECD 205: 0.-5., 5.-8. den, 8.-poslední den testu, je-li prodloužen

Vyhodnocení:

doba od aplikace k prvním příznakům toxicity

mortalita – LC50 (V OECD 205: 24hLC50, 48hLC50, 78hLC50, 96hLC50, 120hLC50)

doba potřebná pro detoxikaci a obnovení fyziologických funkcí

Validita testu:

Mortalita kontrolních jedinců nepřekročila 10%

Koncentrace látky v krmivu neklesla pod 80%



OECD 223 (2016): Avian Acute Oral Toxicity Test

Sekvenční testování – dle účelu:

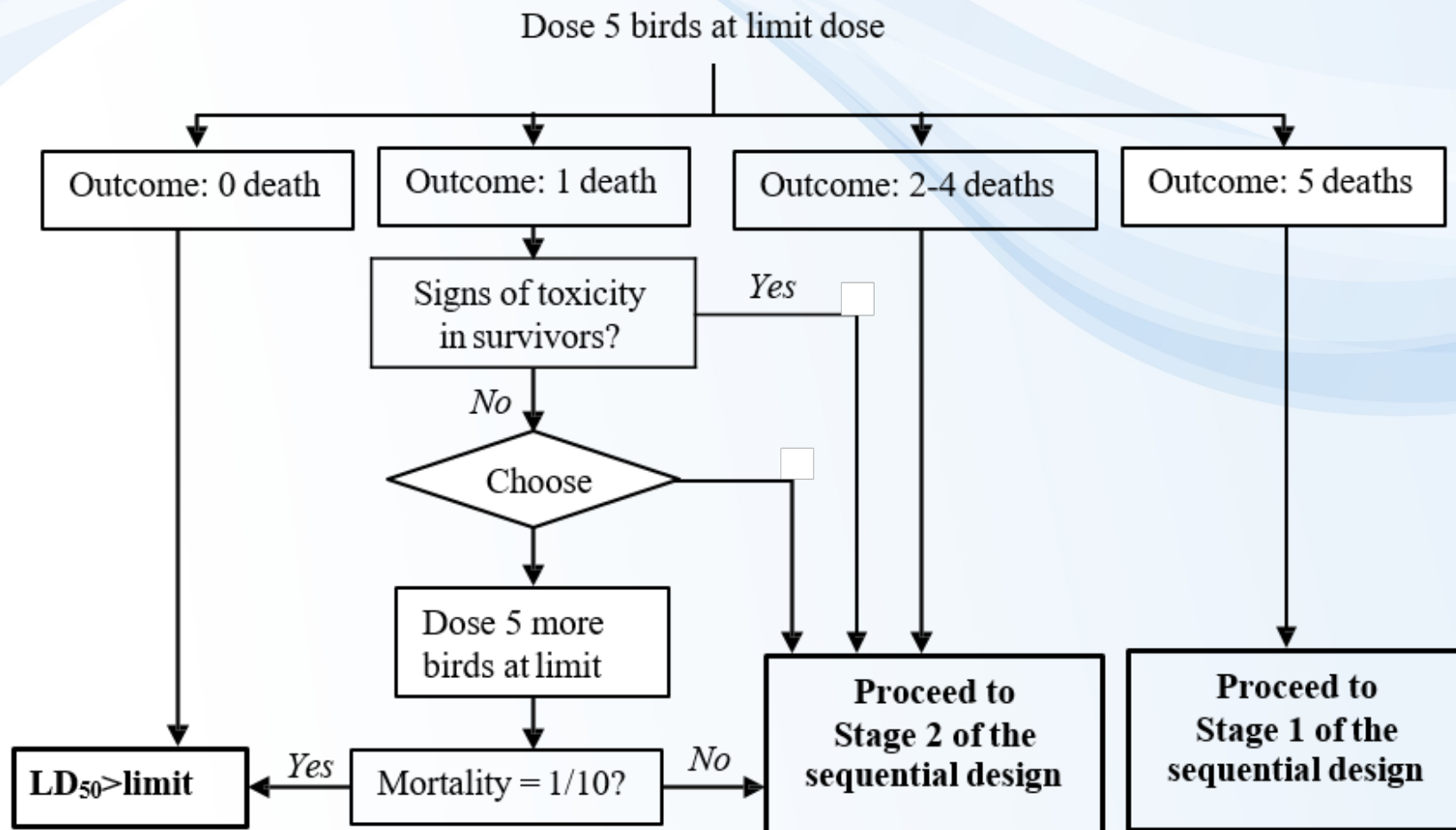
- (1) test limitní dávky – pokud očekávaná nízká toxicita, dávka obvykle 2000 mg/kg, 5 či 10 ptáků – porovnání s kontrolou
- (2) LD50-slope test – pokud je třeba znát LD50 i sklon křivky a/nebo konfidenční interval, 3-4 stupně, 24-34 ptáků + kontrola
- (3) LD50 test – pouze LD50, 2 stupně, 14 ptáků + kontrola

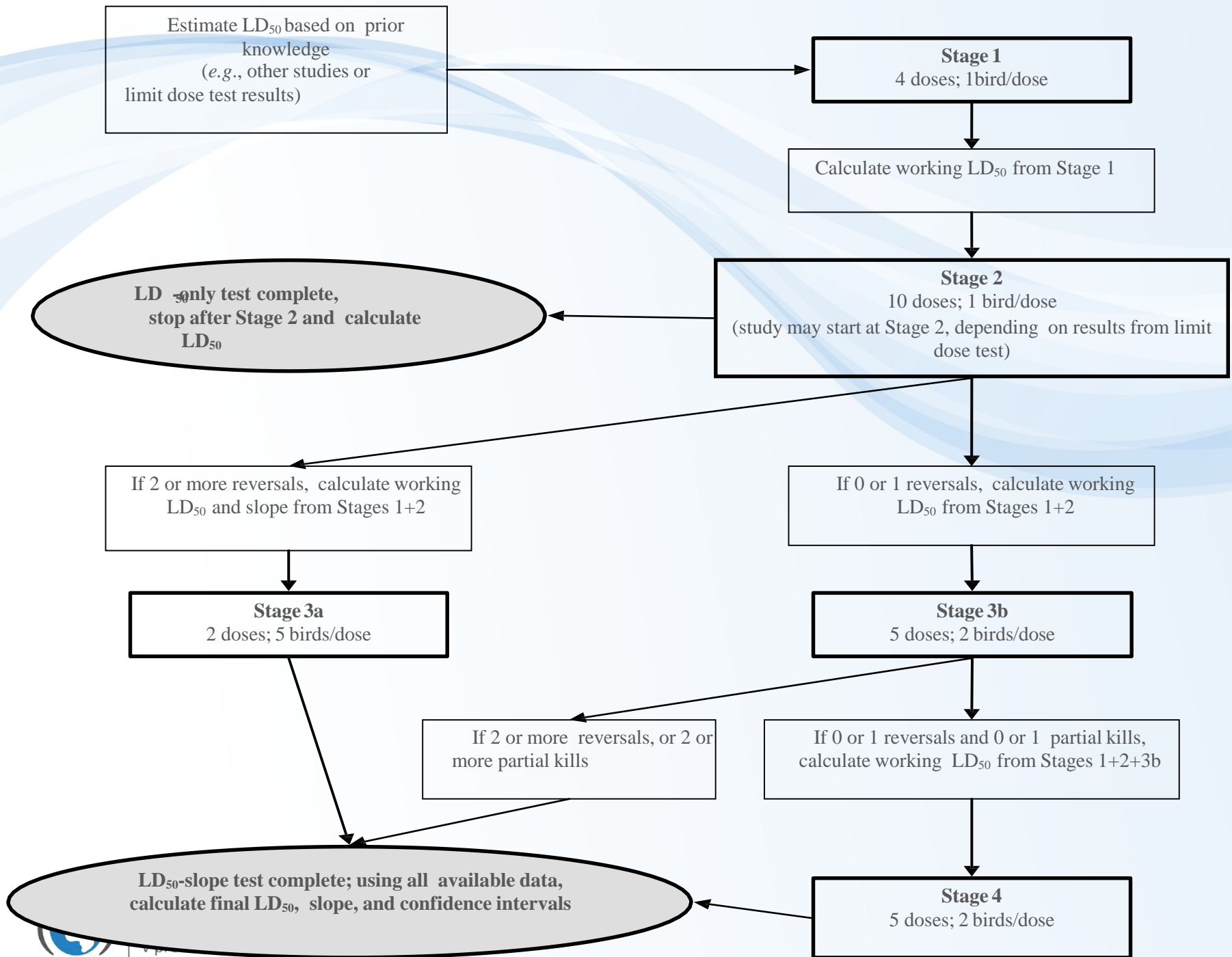
expozice gaváží - do volete nebo do žláznatého žaludku
(proventriculus)

po dávkování ptáci pozorováni 14 dní



OECD 223 – sekvenční design





Single-Dose Avian Embryotoxicity and Teratogenicity Test

Cíl: stanovení toxicity látky při přímé aplikaci na skořápku

Organismus - kachna divoká

Princip - přímá aplikace na skořápku (ropa, pesticidy, DDT, PCB)

Vyhodnocení:

- líhnivost
- nekrozy jater
- biochemické markery
- morfologické abnormality
- poruchy pohybu a metabolismu

Chick Embryotoxicity Screening Test (CHEST)– podobné, aplikace do vajíčka



Test reprodukční toxicity (OECD 206)

Avian reproduction test (US EPA Avian chronic toxicity test.)

Cíl: stanovení reprodukční toxicity látky podávané rodičovským jedincům. Testy zahrnují účinky na reprodukci, fertilitu a teratogenitu

Testovací organismus :

kachna divoká, koroptev polní, křepelka; 14 dní adaptace

Design:

- minimálně 3 koncentrace látky v potravě, dle předběžných laboratorních testů (ryba, krysa), nebo takové, které jsou 5x vyšší, než aktuální koncentrace dle analýz
- Nejlépe dle výsledků akutního perorálního testu toxicity (OECD 205) – nejvyšší koncentrace cca 1/2 LC10

Expozice připravena rovnoměrným rozmísením testované látky se základní krmnou směsí

Ptáci v klecích v párech

Na každou koncentraci aspoň 12 párů

- expozice začíná 10 týdnů před hnízděním a pokračuje 1-3 měsíce ve snáškové sezóně, indukce snášky prodloužením fotoperiody
- vejce jsou denně odebírány a uskladněny, kontrola prosvícením proti prasklinám
- každý týden či 14 dní dány na inkubaci v líhni
- V 6.-14. dni kontrola prosvícením
- Přemístění z inkubátoru do líhně (např. u křepelky 16.den)

Vylíhla mláďata se chovají 14 dní na adekvátní dietě



Test reprodukční toxicity (OECD 206)

V průběhu testu se sleduje:

- ✓ mortalita dospělců
- ✓ příznaky intoxikace
- ✓ hmotnost těla dospělců
 - ✓ produkce vajec
 - ✓ výskyt křapek
 - ✓ tloušťka skořápky
 - ✓ oplozenost vajec
 - ✓ líhnivost kuřat
- ✓ hmotnost těla mláďat
- ✓ spotřeba potravy dospělci, mláďaty
- ✓ makroskopické patologické vyšetření - dospělci

Vyhodnocení:

- mortalita, počet vajec, síla skořápky, % oplodněných
- líhnivost, % živých mláďat po 3 a 14 dnech
- malformace, deformace očí, mozku, nohou a křídel,
- biochemické parametry (bilirubin, AP, AST, GST, DNA adukty..)



Pokusná Místnost

- Regulace teploty, vlhkosti (50-75%), světelného režimu (12-16 hod světla)
 - optimum dle druhu a stáří organismu

- Dobrá ventilace
- Plastové skruže
- Výchřevné zařízení - klobouková kvočna, závěsná BIOS



Test atraktivnosti různých rodenticidů pro ptáky (BBA – metodika)

(Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft (BBA) in Braunschweig, Germany)

- zjistit, zda je testovaná látka přijímána v množství, které způsobuje příznaky otravy nebo mortalitu
- prognoza rizika akutních otrav ptáků v reálných podmínkách
- venkovní voliery
- bažanti, křepelky, holub domácí
- adaptace 1 týden
- 16 hod. hladovění, 8 hodin
 expozice – 3x po sobě

Pak 14 dní pozorovací doba









Pozorování



- 1. hod expoziční fáze se ptáci pozorují trvale
- Následujících 7 hod. 1x za hod.
- Cyklus se opakuje 3 dny po sobě
- Na poslední expoziční fázi navazuje 14 denní pozorování



Vyhodnocení testů

- **Test akutní perorální toxicity (OECD 205)**
LC50
- **Test na atraktivitu (BBA-metodika)**
pokusná zvířata (druh, původ, věk)
popis voliér a podmínky testu vč. údajů o počasí
poznatky z pozorování - jak byla přijímána testovaná
substance
změny v chování, příznaky otravy
tělesná hmotnost testovacích jedinců
mortalita a makroskopický patologický nález



Testování toxicity na savcích

Celá řada normovaných testů na laboratorních savcích

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

- ČSN ISO
- EC directive
- EPA
- OECD

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 :

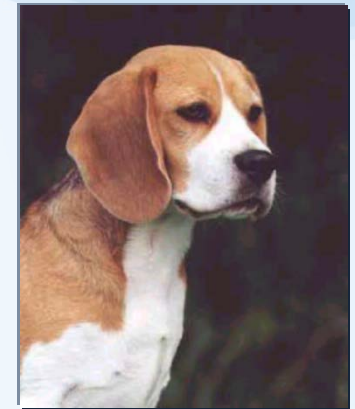
myši 54%

Potkani/krysi 39%

morčata 2%

králíci 2%

ostatní (psi, kočky, žáby, primáti...) 3%



Charakteristiky používaných laboratorních zvířat

Laboratorní myš (*Mus musculus*, var.alba)

- Vyšlechtěny z divokého typu
- hmotnost 30-40g, všežravec
- pohlavní dospělost v 6-ti týdnech
- délka březosti 17-21 dní
- počet mlád'at ve vrhu cca 12
- počet vrhů za rok 8-12
- průměrná délka života 1,5 - 2r.



Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*, var.alba)

- Vyšlechtěn z divokého typu křížením s krysou
- hmotnost 250-400 g, všežravec
- pohlavní dospělost v 12-ti týdnech
- délka březosti 19-22 dní
- počet mlád'at ve vrhu 8-16
- průměrná délka života 3r.



Péče o laboratorní zvířata



- Způsob ustájení
- Pravidelná kontrola zdravotního stavu
- Kontrola jakosti krmiva pitné vody a podestýlky
- Čistota
- Režim pokusů

Volba druhu a kmene zvířat

- minimálně 2 druhy, podle charakteru testu
- poměr pohlaví 1:1
- stejný věk jedinců

Velikost pokusných skupin

- podle potřeb statistického zpracování dat
- podle délky testu

Hladina dávek a frekvence expozice

- nejčastěji tři hladiny dávek
- nejnižší – detekce intoxikace, ale zachování života
- střední – odpovídá 1/10 max. dávky
- frekvence – normálně 1x denně



Typy expozice

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

Dermální - aplikace na kůži

Inhalační - podání vdechováním

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

AKUTNÍ

SUBCHRONICKÉ

CHRONICKÉ

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



Vyhodnocované parametry

Široké spektrum – nejčastější :

- mortalita, biochemické parametry krve, tělesná hmotnost
- reprodukce, počet a přežití mladých
- hmotnost orgánů
- histopatologické hodnocení
- spermatogram, reprodukční schopnost a aktivita
- sterilita
- mutace, mikrojádra, nádory



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



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

- Section 4: Health Effects

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
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
471 Bacterial Reverse Mutation Test (Updated Guideline, adopted
473 In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test (Updated
Guideline,
474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test
475 Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test
476 In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
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

Akutní orální toxicita

- Škodlivý účinek látky po orální aplikaci jedné dávky (per os, kovovou sondou do žaludku), krátkodobé expozici, nebo po několika dávkách během 24 h
- Výchozí zkouška pro další toxikologické studie, stanovení stupně toxicity chemické substance
- Střední smrtelná dávka LD50
- Doba pozorování – min.14 dnů
- 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.



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 LD₅₀ , 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 LD₅₀
- 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 LD₅₀
- výsledkem testu je přesný odhad LD₅₀



Akutní inhalační toxicita

u plynných látek, par a aerosolů

- stanovení škodlivých účinků látky v dýchaném vzduchu
- stanovení LC50 (mg/kg, ppm) – poloviční letální koncentrace
úhyn 50% zvířat po 4 hodinové expozici
- odstupňované dávky - min. 3 koncentrace
- sledování a popis účinků

Akutní dermální toxicita

- testování látek, u nichž je předpokládána významná kožní expozice
- škodlivý účinek po krátkodobé dermální aplikaci (mg/kg)
- stanovení LD₅₀, sledování a popis účinků
- látka se nanáší na na hřbet po depilaci - plocha cca 10% povrchu těla
- odstupňované dávky (koncentrace)
- aplikace - roztok, suspenze, kaše
- králík, potkan, morče

IN VITRO ALTERNATIVY



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, přírůstek, 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 orální toxicita

- aplikace látky v potravě, ve vodě, sondou přímo do žaludku
- min. 10 zvířat (nejčastěji potkani), min. 3 hladiny dávek
- průběžné sledování, vážení atd.



Subakutní inhalační toxicita

- testované zvíře v atmosféře zkoumané látky 14 nebo 28 dnů
- náročné technické zabezpečení, plynulý denní tok zkoumané látky
- v atmosféře 19% kyslíku
- min. 20 zvířat (nejčastěji potkani), 3 skupiny pro 3 koncentrační hladiny, pozorování změn

Subakutní dermální toxicita

- škodlivý účinek látky po opakované denní aplikaci
- stanovení hladiny „nulového účinku“ (max. dávka bez škodlivého účinku – mg/kg)
- sledování „kumulační toxicity“ - škodlivý účinek opakované dávky
- morče, králík, depilace 10% povrchu těla, aplikace – kapalina, kaše, prášek
- denní pozorování změn na pokožce, srsti, očích, sliznici; pohybové ústrojí, váha, příjem potravy.....



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 LD50 nebo LC50
- 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
- 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 ⇒ vývojová toxicita).

Testy vývojové toxicity - teratogenity

- vliv na prenatální vývoj, na pregnantní samice, vývoj embrya a plodu, změny 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

- Zhodnocení potenciálu látek působit na genetický materiál buněk (DNA)
- Sady in vitro testů
- 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 erythrocytech
 - chromosomální aberace buněk savčí kostní dřeně



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 $\geq 1-2$ roky)
test zahrnuje dvouroční studii u potkanů a 18-ti měsíční studii u myší, nebo pouze u krys, a v případě positivity 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

Neurotoxita

testy neurotoxicity jestliže:

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

Laboratorní zvířata: potkani

Toxikokinetické studie

cílem ukázat dosažené zatížení organismu (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 – viz. Přednáška č.11



Testování nových léčiv

- během raných fází se obvykle vytvoří paleta chemikálií s drobnými odlišnostmi a aplikují se na zvířata – studuje se pak farmakokinetika – jak je látka absorbována, distribuována, metabolizována a odstraněna
- výsledky jdou co nejrychleji zpět k chemikům a celý postup se opakuje
- před pokusem na lidských dobrovolnících musí být
 - vyzkoušeno na dvou druzích zvířat (zpravidla hlodavec – nehlodavec)
 - absorpce, distribuce, metabolismus a eliminace léčiva musí být podrobně popsána



Testování nových léčiv *in vivo* pharmacology

- zkoumá se rovněž akutní toxicita u zvířat a simulují se účinky v případném použití na lidech
- cílem je stanovit poměr účinnost/toxicita
 - nevyhovující farmakokinetika blokuje 60 – 70% testovaných látek
 - toxicita eliminuje dalších 30%
- dnes rovněž toxikogenomika využívající DNA microarrays/sekvenaci, kde se ukáží změny mnohem rychleji než studování biochemických nebo fyziologických změn na zvířeti, které se projeví až za řádově 2 – 4 týdny



Testy toxicity na volně žijících savcích (EPA 850.2400 Wild mammal acute toxicity)

Cíl: ověřit v přírodních podmínkách výsledky laboratorních testů na hlodavcích

V případě látek, které jsou přímo vnášeny do přirozeného prostředí druhu

Testovací organismy: volně žijící hlodavci - myš, hraboš, zajíc, králík, dále fretka, liška, lovná zvěř, (US - norek, skunk, bobr) – vybrat dle relevantnosti pro danou látku a prostředí aplikace

Design: 28 dnů expozice v klecích, přírodní podmínky, dávkování do vody a potravy

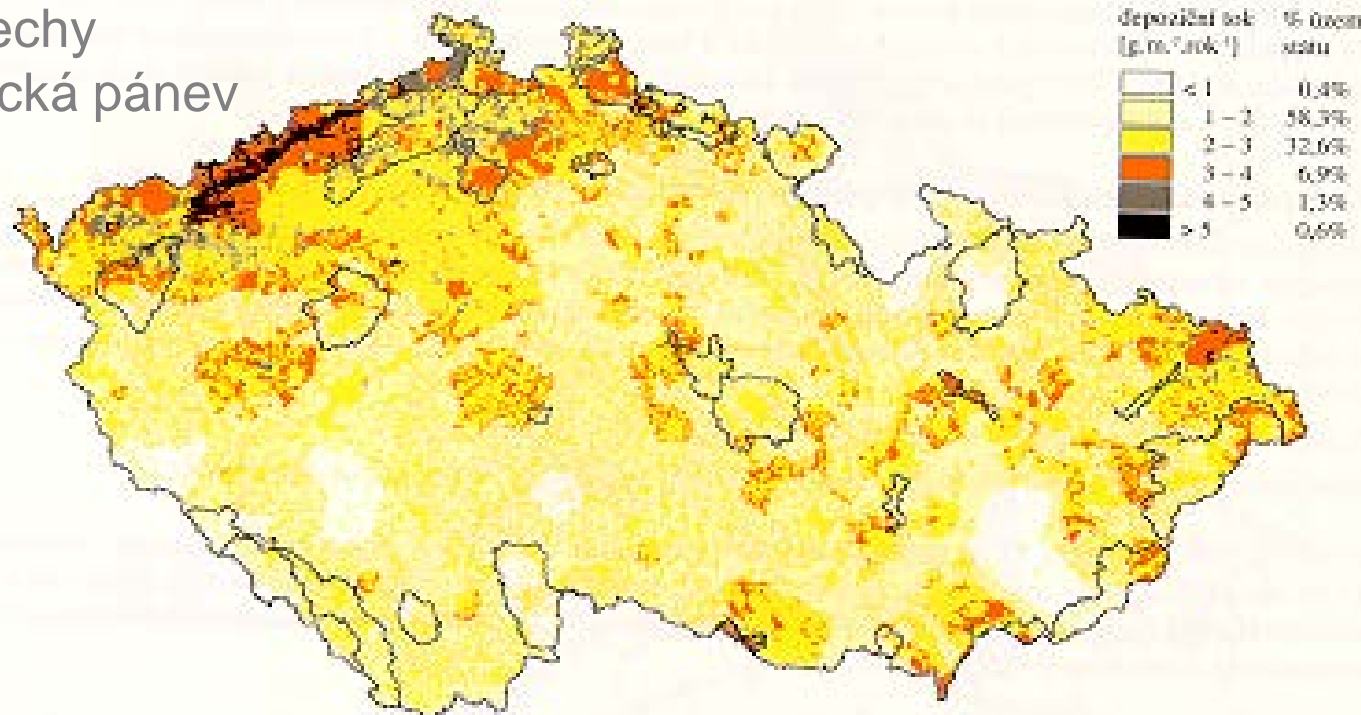
Vyhodnocení: mortalita, ovogeneze, spermatogram, reprodukční aktivita, vývoj embryí, biochemie krve a orgánů (slezina, játra).



Volně žijící savci jako model v biomonitoringu

rejsek malý (*Sorex minutus*)
rejsek obecný (*Sorex araneus*)
hraboš polní (*Microtus arvalis*)
norník rudý (*Clethrionomys glareolus*)
myšice lesní (*Apodemus flavicollis*)

Studovaná oblast -
severozápadní Čechy
Krušné hory, Mostecká pánev
30°42' N 13°36'



Metody

testy mutagenních vlivů vnějšího prostředí

aberrace chromosomů v somatických a pohlavních buňkách
výskyt mikrojader v somatických buňkách
(mikronucleus test)
abnormality spermií

rezidua těžkých kovů

základní údaje z populační ekologie

- abundance
- poměr pohlaví
- populační struktura
 - reprodukce
- denzita a produktivita



Další zdroje informací z monitoringu/bioindikací

- analýzy kostí a tuku dlouho žijících zvířat (více než 4 roky - jelen, prase divoké, spárkatá zvěř, vrány, kavky hnízdící na urč. teritoriu)
- koloniálně hnízdící ptáci - rackové, kormoráni a populace – analýza vajec
- vnitřnosti lovné zvěře (monitoring)
- odlov hrabošů z přírody struktura populací, vývoj mláďat – mortalita, teratogenita
- bioakumulace PAU, PCB, DDT, TK....
- biochemie+ genetika krve

