



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

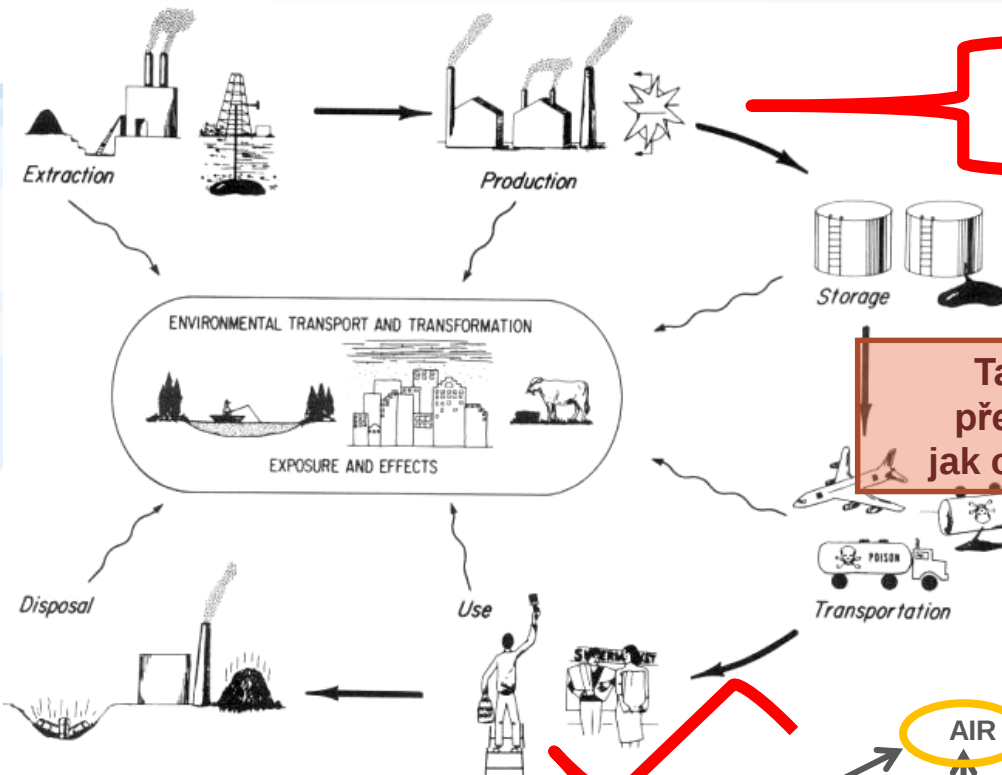
Testování toxicity pro účely hodnocení HRA

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

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Chemické látky („bulk“)

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

nano

nano

nano

nano

Směsi

Tato část přednášek:
jak otestovat?

§§

REACH
(ECHA)

PPP
(EFSA)

MPs
(EMA)

Negativní vlivy

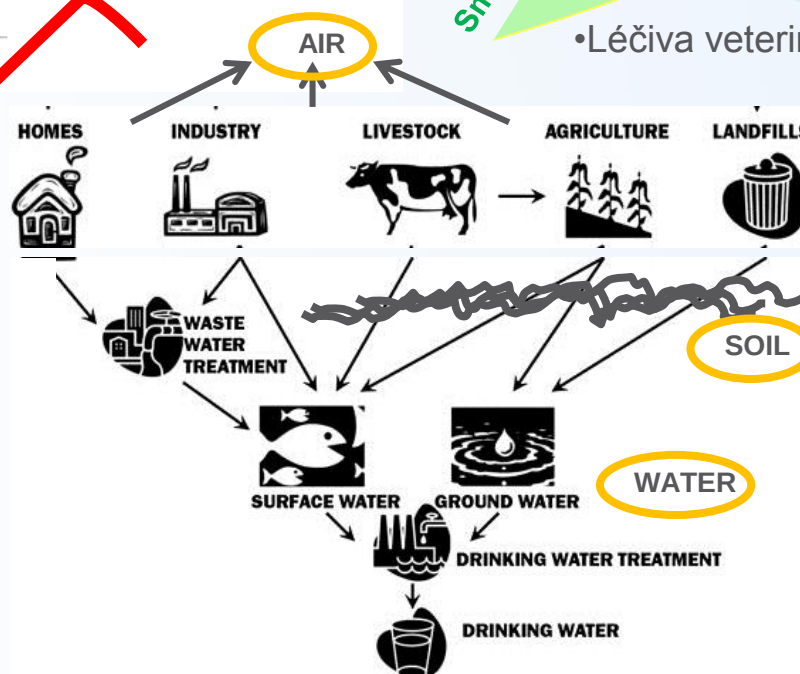
- vliv na zdraví člověka
- vliv na prostředí

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Správná laboratorní praxe modely – testy - studie



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 (**SOP**)
 - 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 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



OECD GUIDELINES – Testing of chemicals

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Environment Directorate

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.

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



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

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

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)



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)

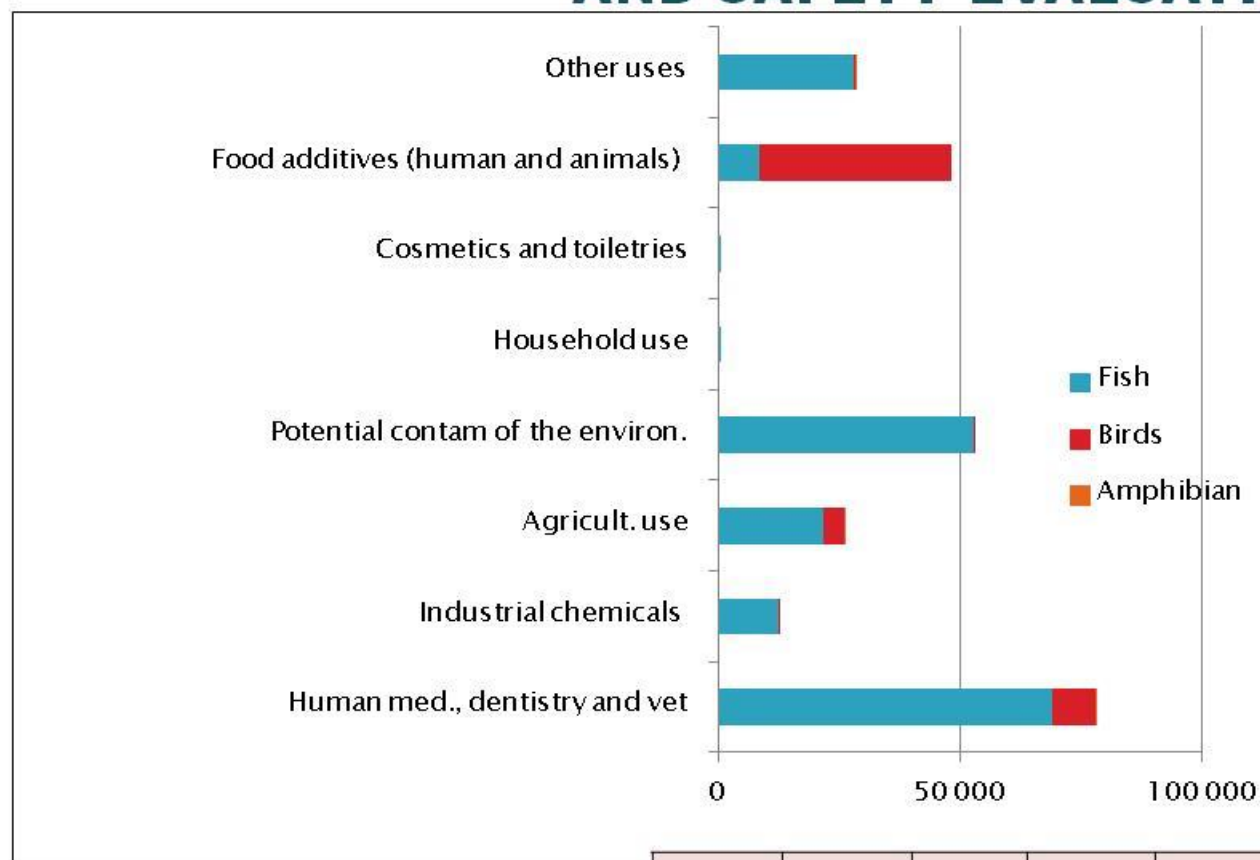
reporting členských států (viz také studijní materiály)

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



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 znečistlivění, 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

„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

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)



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

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



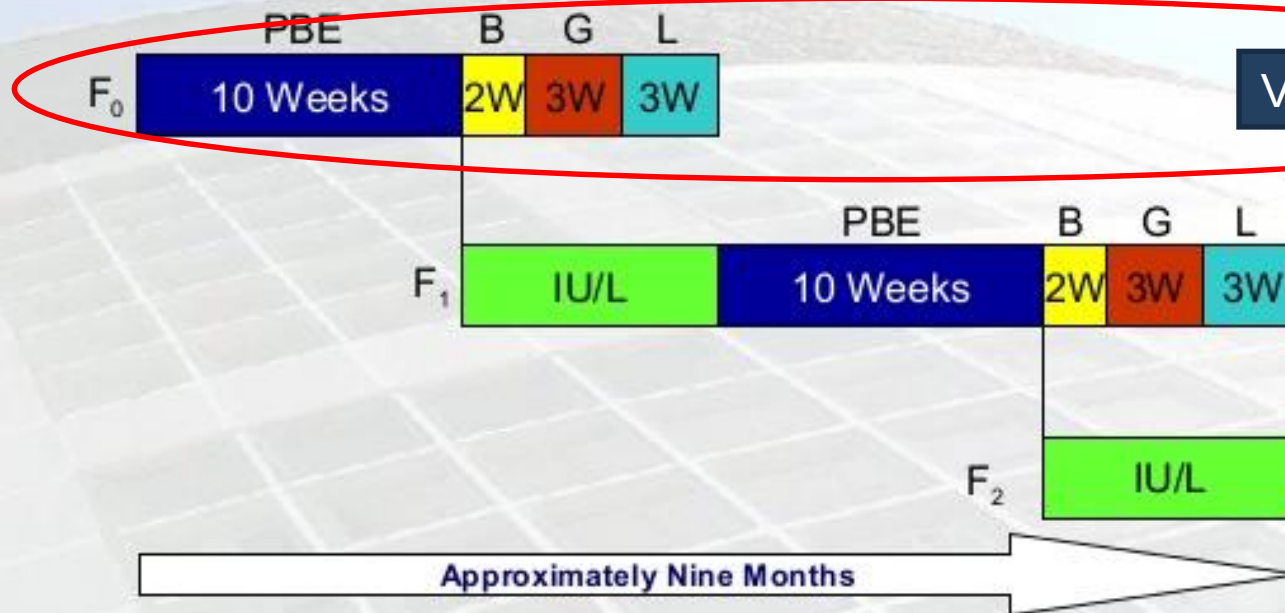
Chronická a reprodukční toxicita

- **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 fety, změny gravidity ovlivňující fety, 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”



Příklad OECD 416

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



Viz další strana

PBE = Prebreeding Exposure

M = Breeding Period

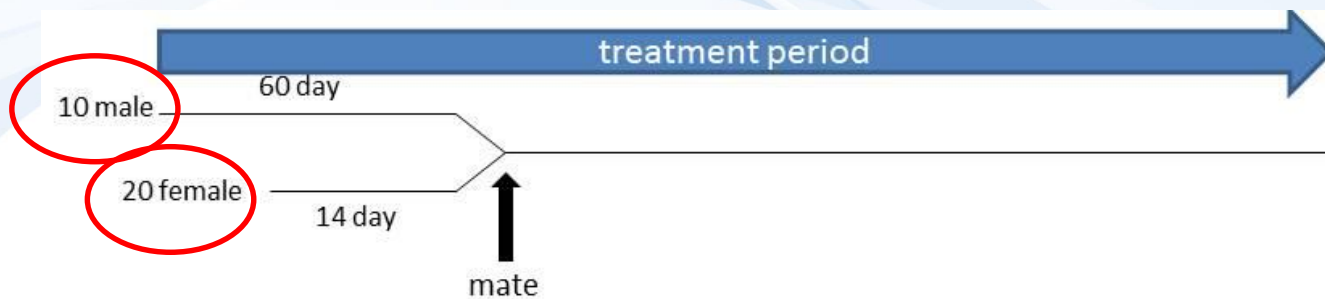
G = Gestational Period

L = Lactational Period

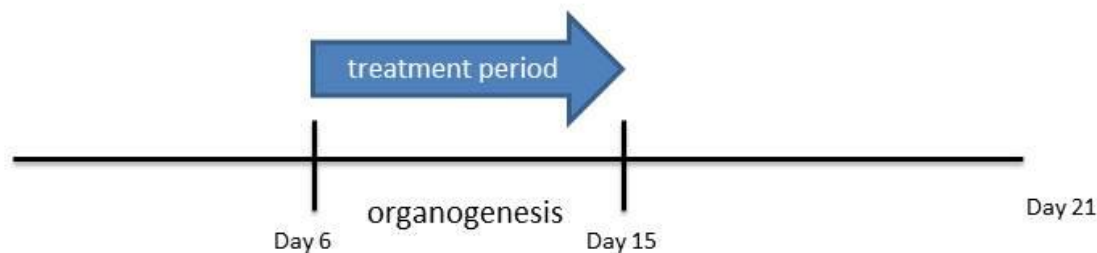
IU/L = **Potential** In Utero/Lactational Exposure



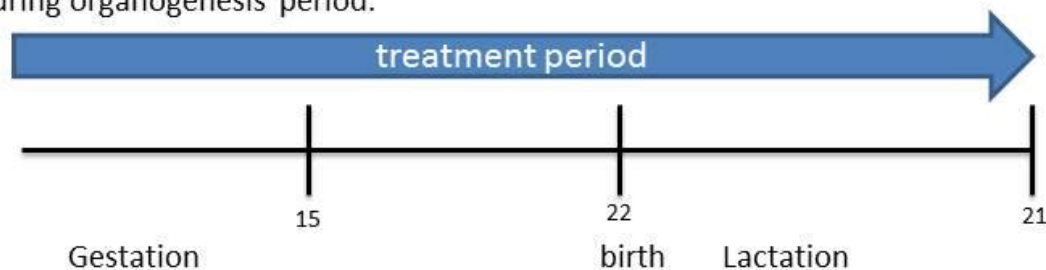
Příklad OECD 416 – zoom F0 generace/expozice



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



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)**

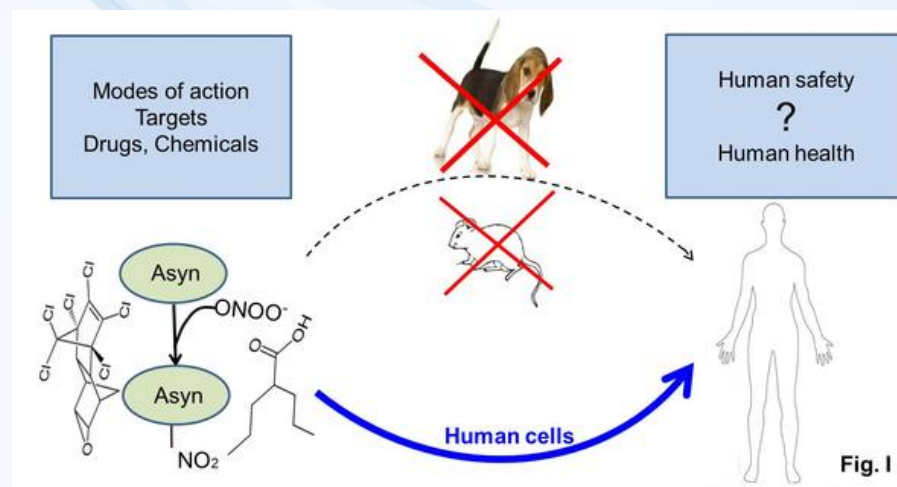
- Řada etických a praktických (finančních) limitací

- 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



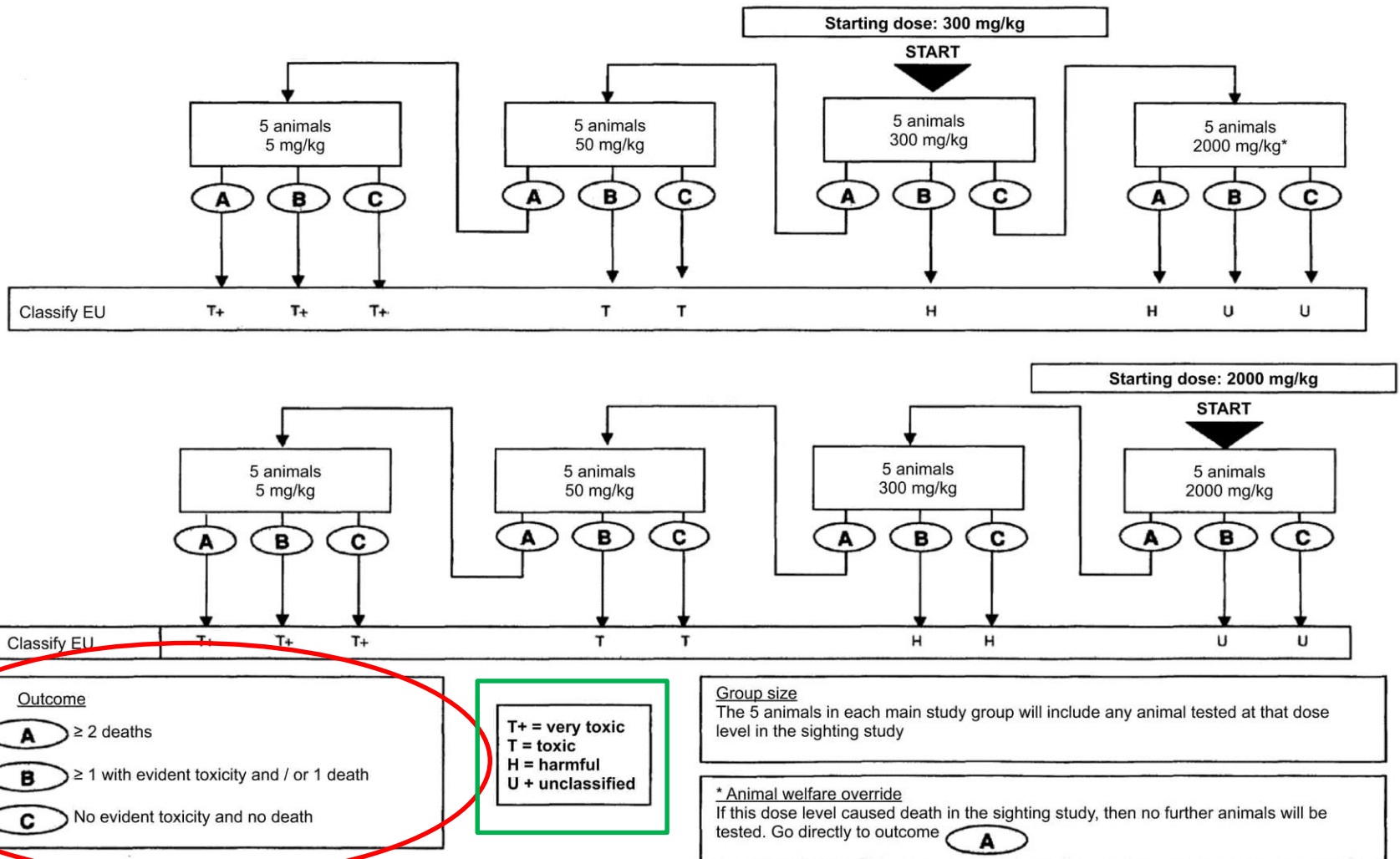
Testování toxicity – alternativy k in vivo experimentům s obratlovci

- 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



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>



AltTox.ORG

Non-animal Methods for Toxicity Testing

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

About AltTox	Home	About AltTox	Enter Forum	Toxicity Testing Resource Center
--------------	------	--------------	-------------	----------------------------------

AltTox Forum

Toxicity Testing Resource Center

Toxicity Tests 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

Home > Toxicity Testing Resource Center

Toxicity Testing Resource Center

Last Updated: December 6, 2007 [Print](#) [Email](#)

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 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](#)



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



European Network for Alternative
Testing Strategies in Ecotoxicology

[HOME](#) | [RESOURCE CENTER](#) | [CONTACT THE NETWORK](#) | [NEWS](#) | [Sitemap](#)

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 Union

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 García-Franco

New

Publication from on AXLR8.eu The coordination action AXLR8, funded by the European



toxických 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.

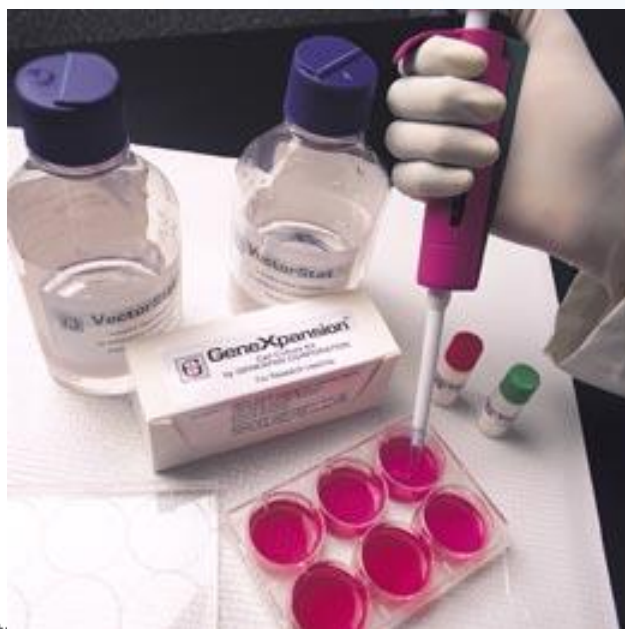
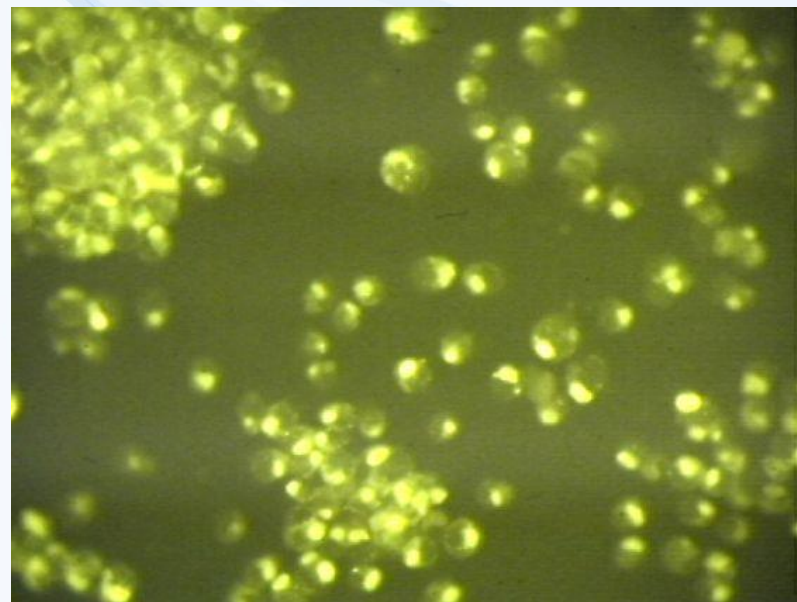
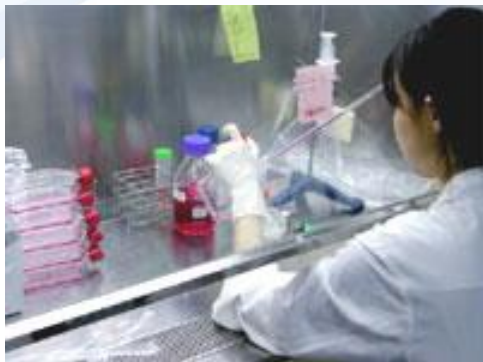
Contacts include researchers who are working with the alternative assays.



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



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 screen 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 ($3.75 \times 10^4/\text{ml}$)



750 cells/20 μl 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 ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ /3 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 ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ /2 days)

Differentiation in "embryoid bodies" (EBs)



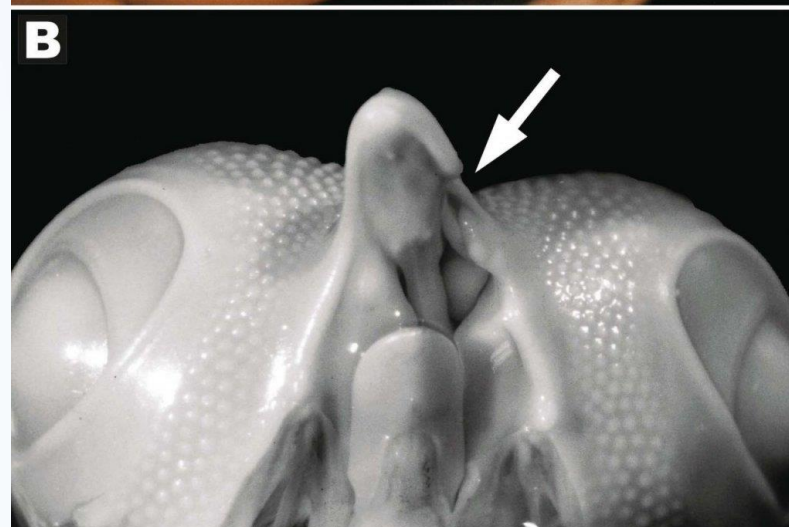
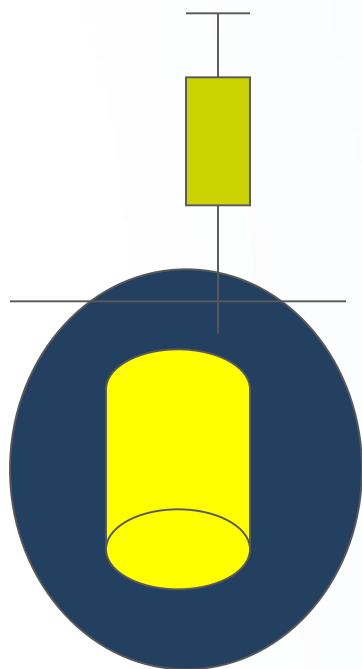
Alternativy 2 – **EMBRYONÁLNÍ** testy(není považováno za in vivo)

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

