

GLP v biologii - syllabus

GLP v biologii - přehled aplikací a postupů vyžadujících GLP

Český lékopis 1997 / 2002 - základní struktura

Laboratorní a pokusná zvířata (zák. 246/1992, vyhl. 311/1997)
- požadavky, legislativa, toxikologické studie

Alternativní testovací systémy
- výhody, využití, příklady, validace

Problematika GMO
(zákon 153/2000, vyhl. 372, 373, 374/2000)

Přehled OECD Guidelines

GLP v biologii

- Experimentální biologie (věda)
- Praktická biochemie a biologie
 - mikrobiologie (potraviny, pitná voda)
 - kvalita léčiv (výroba, kontrola)
 - lékařská biologie a biochemie
 - průmyslové chemické látky, potravní aditiva ... a jejich bezpečnost
 - toxikologie
 - ekotoxikologie
 - biodegradabilita

GLP v biologii - Př. STUDIE

- Ukázka STUDIE v režimu "GLP"
- 8 zvířat (prasat)
- aplikace aspirinu
- odběry krve v definovaných časech (0-144 h)
- sledování hladin metabolitů K. AcSal
- vyhodnocení farmakokinetiky

GLP v biologii - LÉKOPIS

- Český lékopis 1997 a 2002
- Aktuální: Vyhláška MZd ČR č. 180 / 2002

Požadavky na jakost, postup při přípravě, zkoušení, uchovávání a dávkování léčiv

GLP v biologii: MODELŮ

- Mnoho přístupů v biologii
- Obratlovci:
 - in vivo (zvířata)
 - ex vivo (orgány zvířat)
 - in vitro (buňky, buněčné linie)
- Bezobratlí
- Rostliny
- Bakterie

GLP & Využití zvířat

- Právní rámec
 - Zákon o ochraně zvířat
 - CO je zvíře,
 - typy zvířat, laboratorní / pokusné ...
 - KDO a KDY smí zvířata využívat
 - registrace ÚKOZ (MZe)
 - JAK lze experimenty realizovat (.... ->GLP)
 - projekt pokusu
 - protokol pokusu, evidence

Využití zvířat - význam

- Unikátní 3D prostorové uspořádání
- Fyziologické a Farmako(Toxo)kinetické procesy
- Komplexní účinky
- Mnoho látek má více mechanismů toxického efektu – nutno testovat in vivo ...

Kdy lze využít zvířat ?

- Kdy lze ke zkoušení využít zvířat:
 - 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

Kdy se zkoušení na zvířatech vyžaduje ?

OCHRANA ČLOVĚKA a HOSP. ZVÍŘAT

- potraviny, zemědělské látky
- kontrola léčiv
- výroba léčiv - farmakologické preklinické studie
 - farmakokinetika
 - nežádoucí účinky
 - toxicita (akutní, chronická)
 - mutagenita, kancerogenita
 - reprodukční toxicita

AKUTNÍ TOXICITA

- přesná specifikace látky (čistota, kvalita, více substancí – složení ...)
- zvířata: dva druhy, obě pohlaví
 - charakterizace (dodavatel, kmen, věk....)
- dávky: plánovaná (mg/kg) & více koncentrací - odhad LD50
- aplikace – i.v., p.o., i.p. ...
- pozorování a vyšetření (pitva)
- zpracování výsledků - statistika

KLASIFIKACE TOXICITY

DL ₅₀ perorálně, potkan	charakteristika	Přibližně odpovídající smrtelná dávkavka pro člověka	porovnávací látka, DL ₅₀ perorálně, potkan
< 5 mg/kg	krajně jedovatá	Špetka (cca 0,1g)	TEPP 1,2 mg/kg fluorocyan sodný 1,5 mg/kg
5 - 50 mg/kg	velmi jedovatá	Čajová lžička (4 ml)	KCN 13 mg/kg HgCl ₂ 37 mg/kg
50 - 500 mg/kg	Jedovatá	Polevková lžice (30g)	NaF 200 mg/kg DDT 400 mg/kg
0,5 - 5 g/kg	málo jedovatá	Sálek (250 g)	amylalkohol 1,0 g/kg ethylenglykol 6,1 g/kg
5 - 15 g/kg	prakticky nejedovatá	půllitr	aceton 9,8 g/kg ethanol 14,0 g/kg
>15 g	relativně neškodná	Litry nebo kg	glycerin 28,0 g/kg

Tab. č. 1 : Rozdělení toxických látek podle akutní toxicity (Marheld: Přehled průmyslové toxicologie, SZdN - Praha 1964) Pozn.: TEPP je tetraethylpyrofosfát tj. (C₂H₅O)₂PO.O.PO.(O.C₂H₅).

Kdo může vyhodnocovat pitvu ?

- Pregraduálně
 - veterinární event. humánní lékař
- Postgraduálně patolog s atestací I. st.
 - 5 let praxe v oblasti patologie
 - Ph.D.
 - člen Evropské společnosti veter. patologiů

CHRONICKÁ TOXICITA

- opakované podávání
předpokládané / 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
- látka, zvířata, velikost skupin, více druhů, hodnocení, pitva (definované úkony)

REPRODUKČNÍ STUDIE

- zjišťuje se vliv na
 - sexuální chování zvířat
 - prenatalní 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*)

REPRODUKČNÍ STUDIE

- Počty zvířat - minimálně (s výjimkou primátů)
 - embryotoxicita 20 gravid. F hlodavců
12 gravid. F nehlodavců
 - studie fertility 24 F a 24 M
 - perinatální studie 12 F
- Další podmínky stejné jako u akutní a chronické toxicity

STUDIE KANCEROGENITY

- Ne vždy korelace zvíře / člověk (!)
- Rozdílné mechanismy – nutno zohledňovat
peroxizomální proliferátory: ftaláty
- Řada klasifikačních schémat
 - WHO
 - IARC / Intern. Agency for Research of Cancer

KLASIFIKACE IARC

- Group 1: The agent (mixture) is carcinogenic to humans.
- Group 2
 - Group 2A: The agent (mixture) is probably carcinogenic to humans.
 - Group 2B: The agent (mixture) is possibly carcinogenic to humans.
- 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.

STUDIE KANCEROGENITY

- Povinné provedení:
 - opakované podávání (min 6 měsíců)
 - chemická struktura svědčí o možné cancer.
 - chem. příbuzné kancerogenním látkám
 - látky s retencí v organismu (bioakumulace)
 - mutagenní látky v krátkodobých studiích
- Možné provedení
 - studie dalších látek, vč. kontaminantů... B[a]P ...

STUDIE KANCEROGENITY

- 2 druhy, málo spontánních nádorů, metabolismus příbuzný člověku, dostatečně citlivé
- denní aplikace, tři dávky (nejvyšší již vyvolává nejnižší tox. efekt – úbytek hmotnosti ...; nejnižší – 2-3x násobek použité dávky)
- POČTY 50F a 50M:
potkani – 24 (až 30) měsíců
myši+křečci – 18 (až celoživotně dokud přežívá 20% kontrolních zvířat)

STUDIE KANCEROGENITY

- Definované podmínky experimentu
- Vyhodnocení
 - úmrtí, počty zvířat s nádory v různých tkáních, časové rozložení úmrtí; pitva
 - srovnání s kontrolou
 - dávková závislost
- Statistické vyhodnocení

FARMA(TOXI)KINETIKA

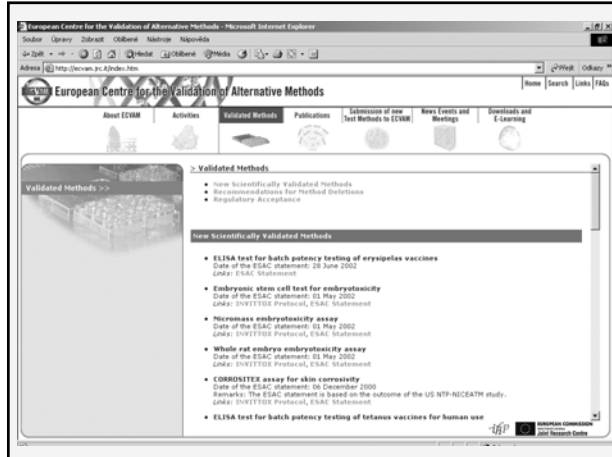
- Vstřebávání
- Distribuce
- Metabolismus
- Vylučování
- Biochemické změny

ALTERNATIVNÍ METODY k in vivo testů s obratlovci a GLP

- Obratlovci:
 - in vivo (zvířata)
- Alternativní metody
 - ex vivo (orgány zvířat)
 - in vitro (buňky, buněčné linie)
 - Výhody:
 - snižování počtů zvířat
 - mechanistické metody ("dioxinová" toxicita)- dobré interpolace na in vivo podmínky
 - rychlejší, rel. levnější, více vzorků ...
- Koncept "3R"
 - Reduction (Snižování), Refinement (Zmírňování), Replacement (Nahrazování)

Alternativní metody (s obratlovci)

- Velké množství experimentálních metod
- Méně metod standardizovaných a validovaných:
 - ISO.org
 - ASTM.org
- EU: ecvam.jrc.it (př. *Skin Sensitisation Test*)
 - ECVAM (European Centre for Validation of Alternative Methods)
 - Časopis ATLA (Alternatives to Laboratory Animals)



EMBRYONIC STEM CELL TEST (EST)

The embryonic 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, rank

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

The positive outcome of the recent ECVAM validation study confirms 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 reducing and/or refining the use of animal procedures (Anon., 1998; 2002).

According to the study outcome, the Management Team concludes rather than representing a complete replacement, the test should be 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 T3 x 10⁴/ml)

Cell culture in "hanging drops"
(see use guide for permeabilization of test chemical, without media + assay medium)
Incubate (37 °C/5% CO₂ / 2 days)

Induction of ES cell aggregates

Step 2: Prepare the same test solution as Step 1.

Cell culture in suspension culture
(see use guide for permeabilization of test chemical, without media + assay medium)
Incubate (37 °C/5% CO₂ / 2 days)

Differentiation in "embryoid bodies" (EB)

in vitro buněčné techniky

Stanovení aktivit/toxicit závislých na intracelulárních receptorech

AhR, ER – experimentální design

Přidavek vzorků, standardů
Expozice (6 – 24 hod)

96 j. deska:
transgenní buněčné linie
H4IIE.luc – DR-CALUX
MVLN – ER-CALUX

Lyza buněk, zmrázení (uchování enzymových aktivit)

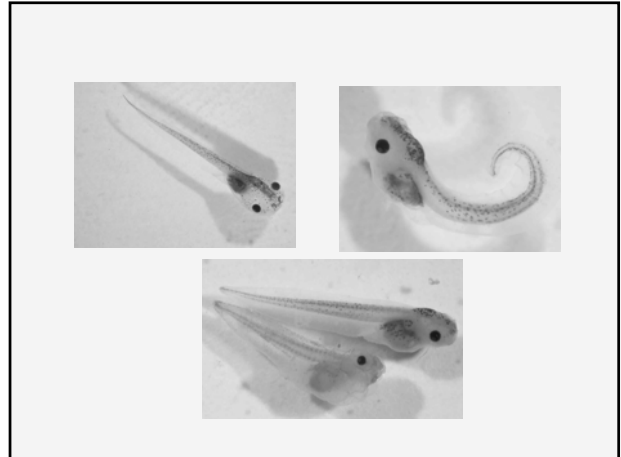
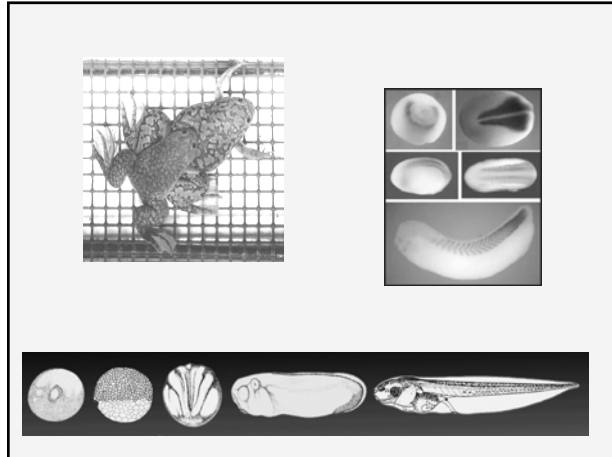
Stanovení LUCIFERÁZOVÉ (reporterové) aktivity - komerční detekční kity

Lumino

další "alternativní" techniky

- Embrya a plody
 - CHEST Chick Embryotoxicity Screening Test
 - FETAX Frog Embryo Teratogenesis Assay *Xenopus* (validovaná alternativa testů teratogenity)

cleft beak (arrow) in the chicken embryo after PS 3 treatment (day 4) on day 9



Ekotoxikologie
 obratlovci, bezobratlí, bakterie
 autotrofové (řasy, rostliny)

- Velká skupina experimentálních postupů; řada validovaných testů
- Při posuzování bezpečnosti je cílem odhadnout toxicitu (akutní, chronickou, specifickou) pro zástupce různých skupin, ZEJM. různých trofických úrovní v ekosystémech:

Příklady testů s organismy z různých trofických úrovní

- Producenti:
 - řasy, vyšší zelené rostliny
- Konzumenti (1., 2. a vyšších řádů)
 - bezobratlí
 - obratlovci
- Destruenti
 - bakterie

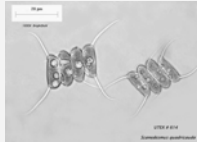

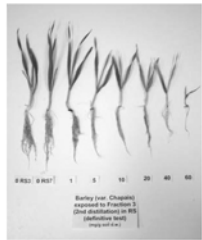
Ekotoxikologické biotesty
 - producenti

Řasové testy toxicity


- standardní uspořádání
- 96 hod, Erlenmayerovy lahve, třepání
- sledování růstu, počtů buněk, biomasy – kvantifikace chlorofylu (fluorescence)
- miniaturizace
- mikrodestičky

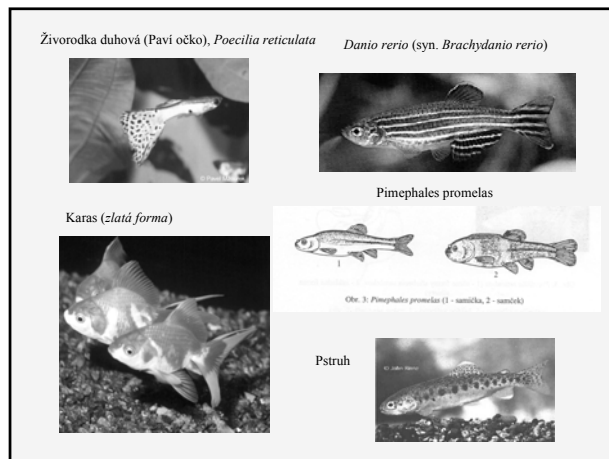
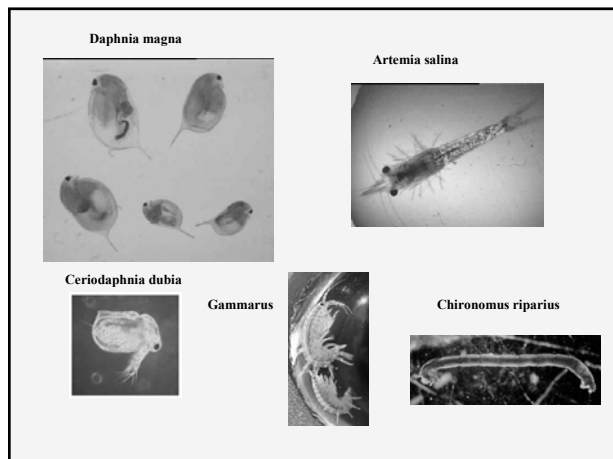
Řasy
Selenastrum capricornutum
Scenedesmus subcapitatus
Sc. quadricauda
Chlorella vulgaris

Sinice
Microcystis aeruginosa

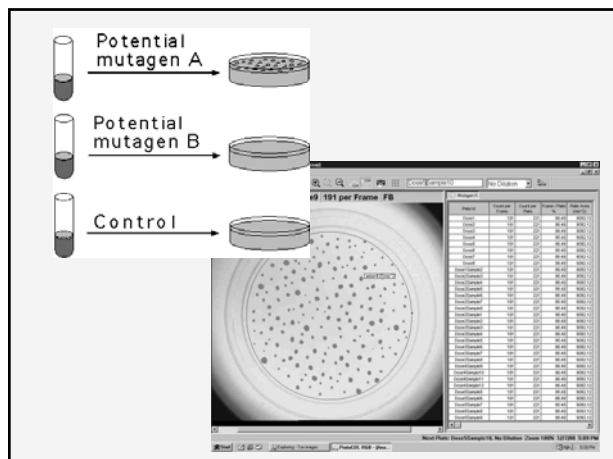
14-d Shoot Length
 IC50 = 29.7 mg/g





BAKTERIE jako model v testování

- Snadná kultivace, krátký generační čas, jednoduché uspořádání (jediná membrána), jednoduchý genetický aparát
- Využití při testování
 - rychlé (skringingové) testy akutní toxicity (MICROTOX)
 - genotoxicita - jednoduché sledování poškození DNA: Amesův test



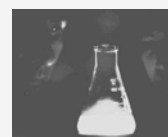
Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

A) jednodruhové testy

(1) TEST AKUTNÍ TOXICITY - MICROTOX

- mořská luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri*
- krátkodobá expozice testované látky (5-30 min)
- sledování změn přirozené luminiscence – odpovídá toxicitě

- uspořádání: kyvety (zkumavky), stanovení v luminometru



Problematika regulace Geneticky Modifikovaných Organismů (GMO)

GMO v ČR

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

Genetická modifikace - zákon

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

GM není ...

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

Proč regulovat GMO ?

- Předběžná opatrnost
 - stále málo prostudováno
 - neznáme možné důsledky vnášení do prostředí
- Pro každý GMO je třeba zpracovat Analýzu Rizika
 - detailní posouzení škodlivých účinků a jejich míry

Možné účinky GMO (podle zákona)

- 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 ...)

Schema regulace

- Ministerstvo
 - seznamy uživatelů (právnícké osoby)
 - seznamy GMO pro uzavřené nakládání
 - seznamy GMO pro vnášení do prostředí
 - seznamy GMO pro vnášení do oběhu
- Uživatel
 - registrace a žádost o zápis do příslušného seznamu
- Další: ČIŽP, celní orgány, orgány veterinární správy, ÚKSÚZ, SZÚ, ÚSKVBL, ČZPI

Povinnosti uživatele - registrace

- Složitá forma žádosti - řada požadavků
 - *př. přesná definice genetické změny pro účely identifikace*
- *viz příklad - přihláška, p.24*

Povinnosti uživatele - registrace

-
- Pověřené osoby (vzdělání, praxe ...)
- Odborný poradce
- Před zápisem do seznamu je nutné provedení analýzy rizika a kategorizace - *popis náležitosti je ve vyhlášce*

Analýza rizika - 4 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

Povinnosti uživatele - registrace

- Podle kategorie rizika je nutno zabezpečit provoz zařízení
 - vybavení (*př. p. 4*)
 - provozní řád
 - 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

Dokumentace nakládání s GMO

- 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

Příklady standardizovaných postupů (Guidelines) pro hodnocení bezpečnosti

OECD GUIDELINES – Chemicals Testing

Section 1: Physical Chemical Properties

Section 2: Effects on Biotic Systems

Section 3: Degradation and Accumulation

Section 4: Health Effects

Section 5: Special Activities

- 201 Alga, Growth Inhibition Test (Updated Guideline, adopted 7th June 1994)
- 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)
- 213 Honeybees, Acute Oral Toxicity Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)
- 214 Honeybees, Acute Contact Toxicity Test (Original Guideline, adopted 21st September 1998)
- 215 Fish, Juvenile Growth Test (Original Guideline, adopted 21st January 2000)
- 216 Soil Microorganisms, Nitrogen Transformation Test (Original Guideline, adopted 21st January 2000)

- 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)

- 401 Acute Oral Toxicity (Deleted Guideline, date of deletion: 20th December 2002)
- 402 Acute Dermal Toxicity (Updated Guideline, adopted 24th February 1987)
- 403 Acute Inhalation Toxicity (Original Guideline, adopted 12th May 1981)
- 404 Acute Dermal Irritation/Corrosion (Updated Guideline, adopted 24th April 2002)
- 405 Acute Eye Irritation/Corrosion (Updated Guideline, adopted 24th April 2002)
- 406 Skin Sensitisation (Updated Guideline, adopted 17th July 1992)
- 407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents (Updated Guideline, adopted 27th July 1995)
- 408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents (Updated Guideline, adopted 21st September 1998)
- 409 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents (Updated Guideline, adopted 21st September 1998)
- 410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study (Original Guideline, adopted 12th May 1981)
- 411 Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study (Original Guideline, adopted 12th May 1981)
- 412 Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study (Original Guideline, adopted 12th May 1981)
- 413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study (Original Guideline, adopted 12th May 1981)
- 414 Prenatal Developmental Toxicity Study (Updated Guideline, adopted 22nd January 2001)
- 415 One-Generation Reproduction Toxicity Study (Original Guideline, adopted 26th May 1983)
- 416 Two-Generation Reproduction Toxicity Study (Updated Guideline, adopted 22nd January 2001)
- 417 Toxicokinetics (Updated Guideline, adopted 4th April 1984)

Celkem
86 návodů

OECD sekce 5 – Special Activities

Draft Test Guidelines

Proposal I: Estimation of Emissions from Preservative-Treated Wood to the Environment: Laboratory Method for Wood Held in Storage after Treatment and for Wooden Commodities that are not Covered and are not in Contact with Ground

[PDF](#)
[Commenting Instructions](#)
[Commenting Template](#)

Proposal II: Estimation of Emissions from Preservative-Treated Wood to the Environment: Laboratory Method for Wooden Commodities that are not Covered and are in Contact with Ground, Fresh Water or Seawater

[PDF](#)
[Commenting Instructions](#)
[Commenting Template](#)

Proposed Initial Inter-Laboratory Evaluation of Two New Test Guideline Proposals
[PDF](#)
[Commenting Template](#)