

GLP v biologii - syllabus

GLP v biologii – základy QA/QC

Přehled aplikací a postupů vyžadujících GLP + příkladová studie

Vybraná témata detailněji:

Léčiva a jejich regulace

Zajištění zdraví člověka (a zajištění parametrů kvality)

Bezpečnost látek pro člověka - toxikologické studie

Laboratorní a pokusná zvířata

Bezpečnost látek pro prostředí - ekotoxikologie

Alternativní testovací systémy

Problematika GMO

GLP v biologii - úvod

- BIOLOGIE – experimentální věda vs. Praktická biologie/biochemie/mikrobiologie atd.
- Nutnost dodržovat GLP zejména, když výsledky jsou 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,
- Další zákonem dané oblasti ve vztahu k biologii – dodržení etických požadavků (např. práce se zvířaty/obratlovci)

GLP v biologii – základní principy a příkladová STUDIE

- V Biologii platí stejné principy jako pro chemické analýzy (viz předchozí přednášky – QA/QC, detailní SOPs, dokumentace ...)
- Příklad - „jednoduché“ STUDIE v režimu GLP
→ → → → →

Příkladová STUDIE (*viz příloha*)

- **Cíl studie:**
- Podkladový materiál pro registraci (povolení) využití aspirinu u prasat
- Jeden z dílčích podkladových materiálů - popis farmakokinetiky aspirinu u prasat po jednorázovém podání (příklad)

- 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. Veškerých odchylek)
 - Přímá – jmenovitá – odpovědnost konkrétních osob ... atd.

GLP v biologii 1 – Léčiva

GLP v biologii 1 – Léčiva

- GLP & přesná dokumentace vyžadována u humánních i veterinárních léčiv:
 - Registrace před použitím
 - průkaz a dokumentace farmakokinetiky, cílové aktivity ve srovnání s existujícími postupy, bezpečnost pro lidi + nově i pro životní prostředí ...
 - Dokumentace celého životního cyklu - výroba, přípravy v lékárnách, kontrola kvality, aplikace, reporting vedlejších účinků, likvidace (nebezpečný odpad)
 - Státní autority:
 - SÚKL (Státní úřad pro kontrolu léčiv)
 - ÚSKVBL (Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv)

GLP v biologii 1 – Léčiva

- Základní zákonný dokument:
- **Český lékopis**
(viz příklad: ke zkoušce znát vnitřní strukturu a základní obsah)
- Aktuální Č.L.: Vyhl. MZd ČR č. 180 / 2002

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

- *Řada dalších dílčích norem
(např. požadavky na přípravy/nakládání s cytotoxickými léčivy = vedlejší karcinogenní účinky ...)*

GLP v biologii 2

– ochrana (zdraví) člověka -

GLP v biologii 2 – zdraví člověka

- Zdraví člověka ovlivňuje řada faktorů, jejichž KVALITA musí být kontrolována (státem) a GLP hraje významnou roli:
 - potraviny, pitná voda, rekreační voda, vnější ovzduší, pracovní ovzduší, hluchnost ... (+léčiva)
 - zdravotní péče (vyšetření, analýzy ... správná lékařská praxe)
- Zajištění kvality = Authority– Ministerstva (MZe, MZd, MŽP) a zřizované ústavy (řada překryvů v kompetencích)
 - Státní zdravotní ústav
 - Zdravotní ústavy (zpr. krajské)
 - Hygienické stanice
 - Státní veterinární správa

GLP v biologii 2 – zdraví člověka

- Pro každou kategorii, tj.:
 - Potraviny, Pitná voda, Rekreační voda, Ovzduší
 - Zdravotní péče

definovány různé požadavky na kvalitu

- Chemické rozborý - limity pro vybrané toxické látky (různé druhy potravin, různé limity): toxické kovy – př. Hg, toxiny plísní, persistentní látky (polychlorované bifenyly, dioxiny), pesticidy, nepovolené náhražky
- Mikrobiologická bezpečnost (kultivace nebo jiný průkaz patogenů - např. metody molekulární biologie - Listerie)
- Specifické požadavky (např. prašnost – např. limity pro PM10 = particulate matter >10micrometrů, hlučnost ...)
- Lékařská vyšetření a analýzy (např. průkaz rakovinných biomarkerů, těhotenství, přítomnost HIV ...)

GLP v biologii 3

Využití obratlovců jako modelů v biologii

GLP v biologii 3 – MODELY v biologii


- Existuje mnoho přístupů v biologii
(řada musí být využívána při hodnocení „bezpečnosti“ pro zdraví člověka – viz předchozí diskuze – léčiva, bezpečnost chemických látek ...)
- Obratlovci:
 - in vivo (zvířata)
 - ex vivo (orgány zvířat)
 - in vitro (buňky, buněčné linie)
- Bezobratlí
- Rostliny
- Bakterie

Využití zvířat (=obratlovců)

– zvláštní případ (etické aspekty...)

- Právní rámec – nutnost regulace
 - Zákon na ochranu zvířat proti týrání 246/1992
 - Vyhláška 311/1997 (o využití pokusných zvířat)
- Zákon + vyhláška definuje:
 - CO je zvíře (!! OBRATLOVEC, kromě embryí a plodu)
 - typy zvířat, laboratorní / pokusné ...
 - KDO a KDY smí zvířata využívat (jakékoliv užití zvířat!)
 - Vyžaduje se registrace ÚKOZ (MZe)
 - JAK lze experimenty realizovat (dodržování pravidel GLP)
 - projekt pokusu
 - protokol pokusu, evidence

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 - nutno testovat in vivo**
 - Účinnost léčiv (vč. Vedlejších účinků)
 - Bezpečnost kosmetických přípravků
 - Toxicita chemických látek pro člověka
-  **LEGISLATIVA EU
„REACH“**

Zákon stanoví - kdy lze zvířat využít

- 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 stanoví - kdy se zkoušení vyžaduje

OCHRANA ČLOVĚKA a HOSP. ZVÍŘAT

potraviny, zemědělské látky

kontrola léčiv

výroba léčiv - farmakologické preklinické studie

farmakokinetika

nežádoucí účinky

toxická (akutní, chronická)

mutagenita, kancerogenita

reprodukční toxicita

GLP 4

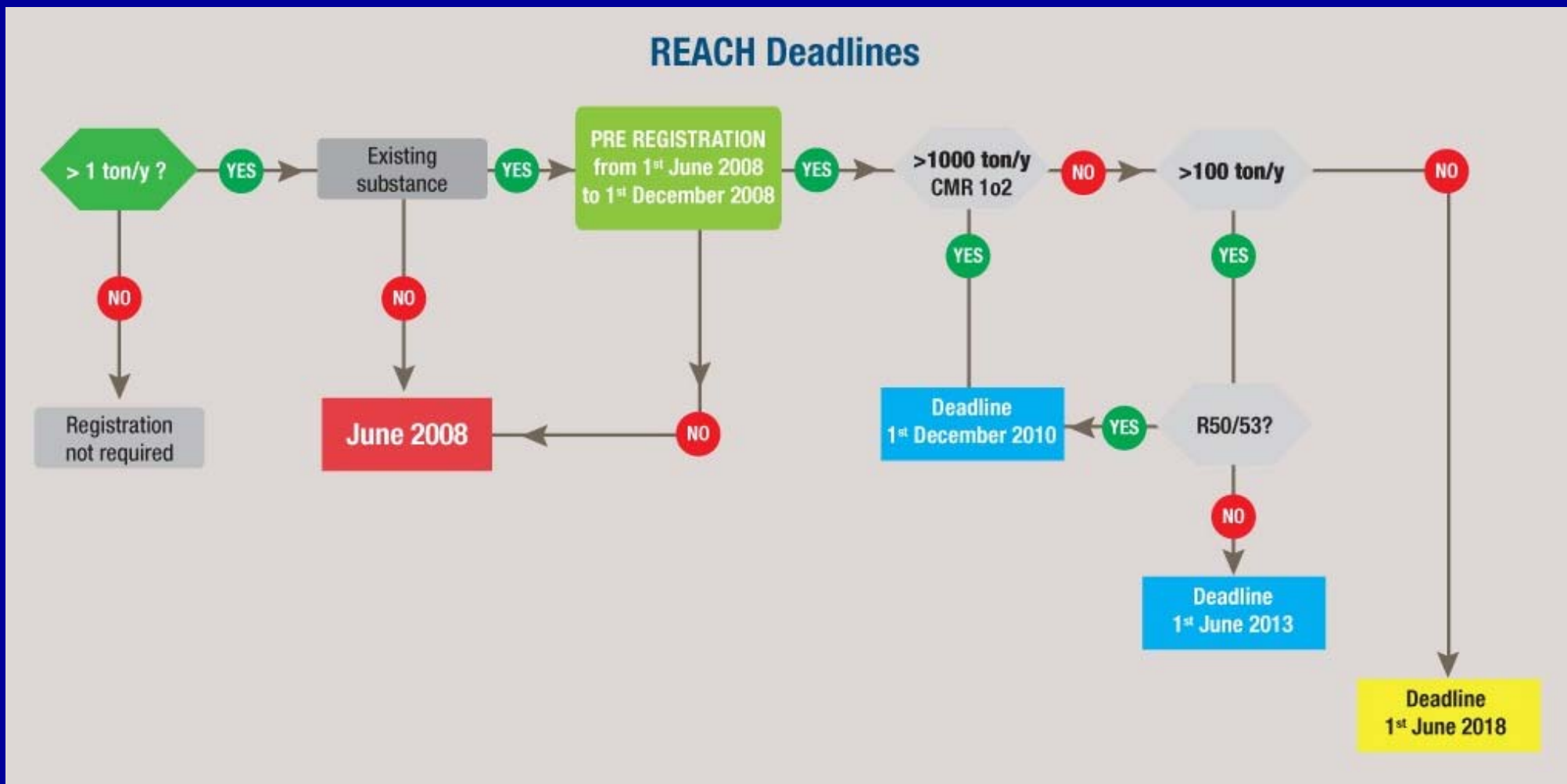
Bezpečnost chemických látek - úvod

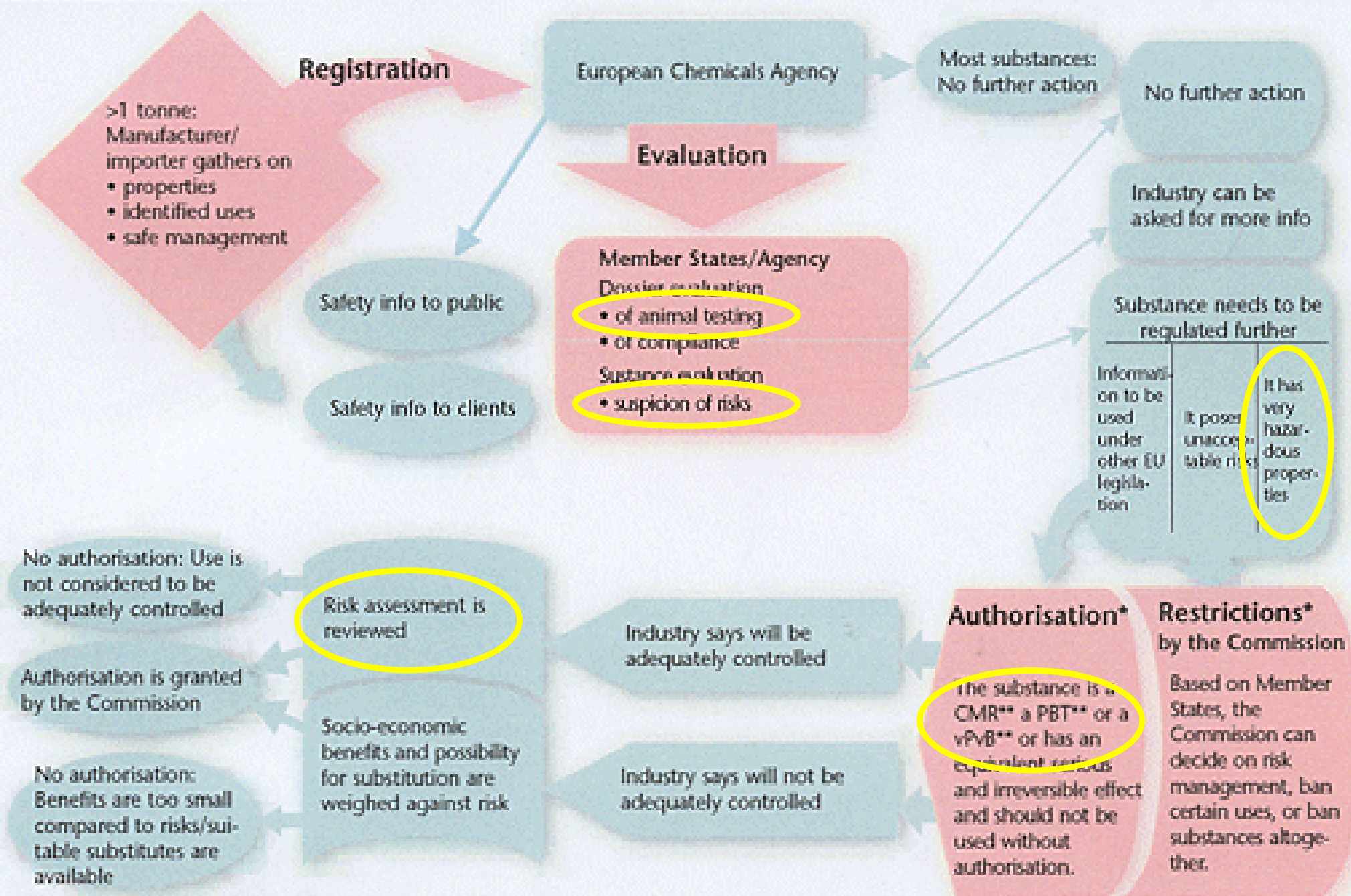
Jsou nebezpečné/toxické látky regulovány ?

- Do nedávna – neexistovala povinnost průmyslu prokazovat bezpečnost chemikálií
- Existovala řada různých (často protichůdných) regulací
- Současnost
 - EU = sjednocení – nová legislativa REACH
 - USA, Japonsko, Canada atd. – podobný vývoj
- *Pro zvláštní případy stále existují specifické direktivy (např. pesticidy ...)*

REGULACE chem. látek v EU

- Evropská unie - ECHA (European Chemical Agency)
- REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals)





* Substances do not have to be registered or evaluated to be placed under authorisation or restriction. They can be identified in other ways.

** Can cause cancer or mutations, or is toxic to reproduction; or is persistent, bio-accumulative and toxic, or very persistent and very bio-accumulative.

REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals)

- Všechny chemikálie vyráběné nebo dovážené do EU musí být registrovány, zhodnoceny (testovány) a autorizovány (náklady nese průmysl)
- Hodnocení rizik – cca 30000 chemikálií
 - harmonogram dle důležitosti (nejdříve HVP - High Volume Production chemicals > 1000 t/rok, postupně ostatní)
- Hodnocené parametry
 - Fyz.chemi. vlastnosti + degradabilita, persistence
 - Toxicita pro člověka
 - Nebezpečnost pro prostředí - ekotoxicita

REACH EU

ředp. počty testovaných chemikálií

Table 6. Estimated testing needs (% of total number of substances)

Endpoint	Minimum	Average	Maximum
6.3 Skin sensitisation	7486 (25.5)	10293 (35.1)	13728 (46.8)
6.2 Eye irritation (incl. <i>in vivo</i>)	5923 (20.1)	6910 (23.5)	8182 (27.9)
6.4.4 <i>In vivo</i> mutagenicity study	6580 (22.4)	6580 (22.4)	6580 (22.4)
7.1.2 Growth inhibition algae	2638 (9.0)	5277 (18.0)	11466 (39.1)
7.1.4 Active sludge respiration test	4616 (15.7)	4616 (15.7)	4616 (15.7)
7.1.1 Short-term <i>Daphnia</i> toxicity	2321 (7.9)	4096 (14.0)	8798 (30.0)
6.1 Skin irritation/corrosion (incl. <i>in vivo</i>)	1974 (6.7)	3949 (13.4)	5817 (19.9)
7.2.2.1 Hydrolysis	2691 (9.2)	3425 (11.7)	4518 (15.4)
6.4.1 Gene mutation study in bacteria	875 (3.0)	2916 (9.9)	6424 (21.9)
6.4.2 Cytogenicity study in mammalian cells	875 (3.0)	2916 (9.9)	6424 (21.9)
6.7.2 Development toxicity study	2408 (8.2)	2893 (9.9)	3711 (12.6)
7.2.1.1 Ready biodegradability test	1574 (5.4)	2624 (8.9)	5752 (19.6)
6.7.3 Two-generation reproduction toxicity	1665 (5.7)	2135 (7.3)	2699 (9.2)

REACH EU

předp. náklady na testování

Table 8. Estimated testing costs for most costly endpoints (Million EURO)

Endpoint	Minimum	Average	Maximum
6.7.2 Development toxicity study	396	476	611
6.7.3 Two-generation reproduction toxicity	293	376	475
6.4.4 <i>In vivo</i> mutagenicity study	129	129	129
6.6.2 Sub-chronic toxicity	76	111	210
6.6.3 Long-term repeated dose toxicity study (incl. 6.9 Carcinogenicity study)	44	52	73
6.6.1 Short-term repeated dose toxicity study	13	49	189
6.4.2 Cytogenicity study in mammalian cells	16	52	116
6.3 Skin sensitisation	29	40	54
7.2.1.1 Ready biodegradability test	19	32	71
7.3.2 Accumulation	14	28	67
7.1.2 Growth inhibition algae	13	26	57
6.7.1 Development toxicity screening	12	26	101
7.2.2.1 Hydrolysis	16	21	28

GLP 4

Bezpečnost chemických látek pro člověka

(toxicita, karcinogenita / lab. zvířata)

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**
 - > problematičtější efekty (nemoci, nádory, imunotoxicita, reprodukční toxicita ...)
- **Hodnocení a srovnání toxicity:**
 - nejč. **LD50** (letální dávka 50) – dávka, která s největší pravděpodobností způsobí smrt 50% exponovaných jedinců (vyjádření jako koncentrace – např. mg/kg živé váhy)
 - další parametry „bezpečnosti“ – např. **TDI** – tolerovatelný denní příjem (např. mg/kg živé váhy/den)

AKUTNÍ TOXICITA

perorální podání – lab. zvíře: potkan

DL ₅₀ perorálně, potkan	charakteristika	Přibližně odpovídající smrtelná dávka 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	Polévková lžice (30g)	NaF 200 mg/kg DDT 400 mg/kg
0,5 - 5 g/kg	málo jedovatá	Šálek (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. I : Rozdělení toxických látek podle akutní toxicity (Marhold: Přehled průmyslové toxikologie, SZdN - Praha 1964) Pozn.: TEPP je tetra ethylpyrofosfát tj. $(C_2H_5O)_2PO.O.PO.(O.C_2H_5)_2$

CHRONICKÁ TOXICITA

- Vyšetření méně specifických efektů při dlouhodobém (opakovaném) podávání
- Dávka se odvozuje z akutní toxicity
(nejvyšší koncentrace ~ LD50, dále 10x a 50x nižší)
- Délka studie závisí na „předpokládaném“ schématu podávání látky (př. Léčivo 2x denně, 3 měsíce ...)

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

- Složitý design a řada požadavků
 - Zvířata (více druhů, stáří, pohlaví...), počty ve skupině
- Vyhodnocení - pitva (definované úkony), statistika ...
- Ekonomická náročnost , etické problémy ... GLP!

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 chronická toxicita

HODNOCENÍ KANCEROGENITY

- 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
 - WHO (Světová zdravotnická organizace)
 - 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.

GLP 5

Bezpečnost chemických látek pro
prostředí

= *ekotoxikologie*

Ekotoxikologie

- 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“)

Příklady modelů – Ekotoxikologické biotesty

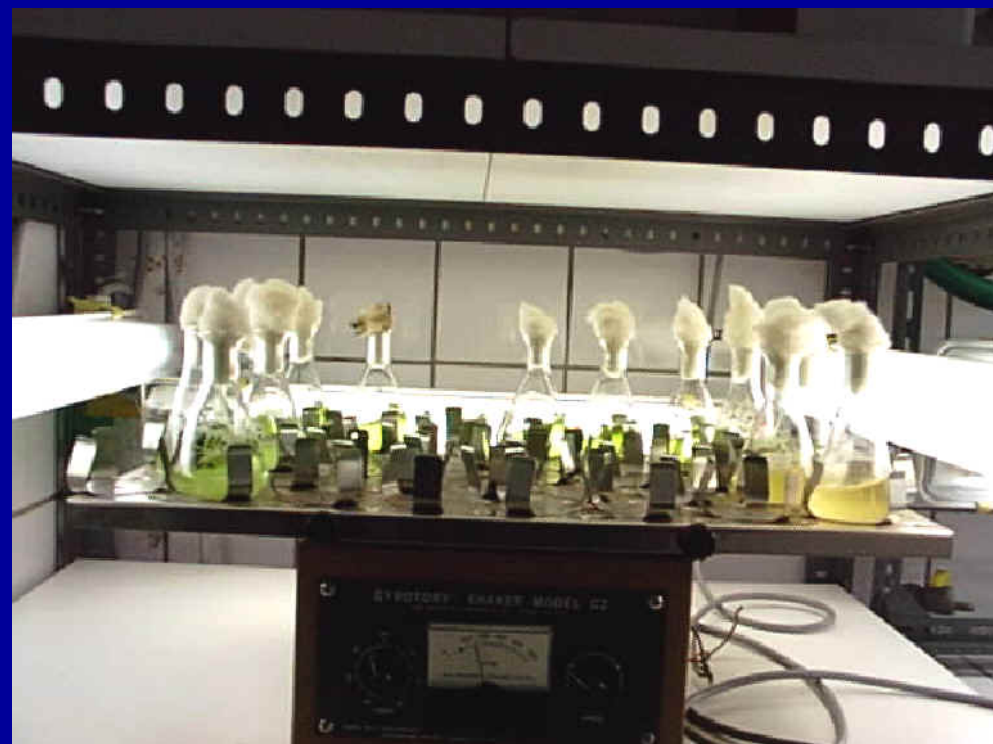
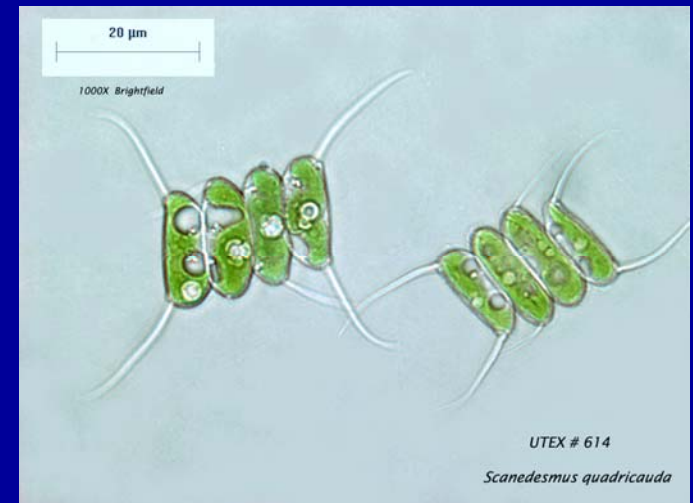
-Producenti

- ve vodě
- v půdním prostředí

Řasové testy toxicity

Řasy

Selenastrum capricornutum
Scenedesmus subcapitatus
Sc. quadricauda
Chlorella vulgaris



Toxicita pro rostliny

- zpravidla zástupci jednoděložných i dvouděložných (více druhů)



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



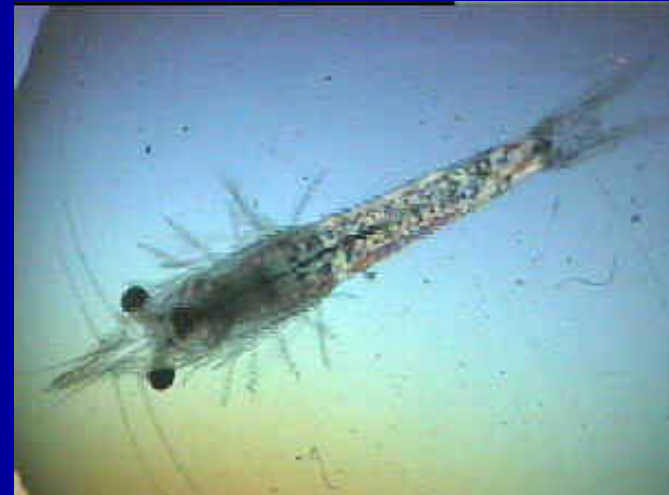
Příklady - Ekotoxikologické biotesty

- Konzumenti – bezobratlí – vodní prostředí

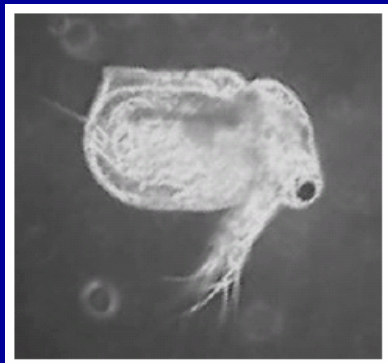
Daphnia magna



Artemia salina



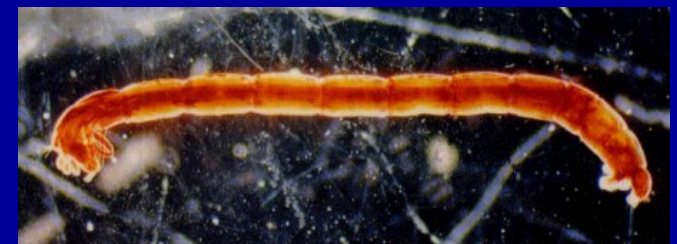
Ceriodaphnia dubia



Gammarus



Chironomus riparius



Příklady - Ekotoxikologické biotesty

- Konzumenti – obratlovci – vodní prostředí

Živorodka duhová (Paví oko), *Poecilia reticulata*

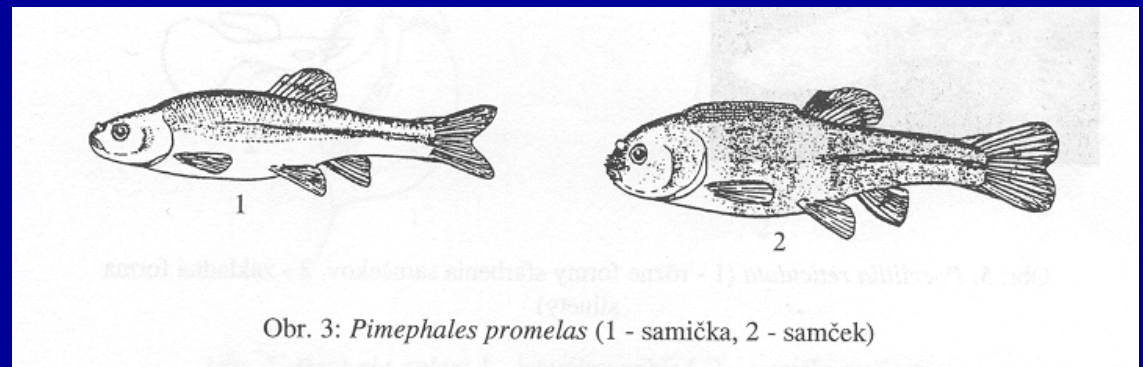
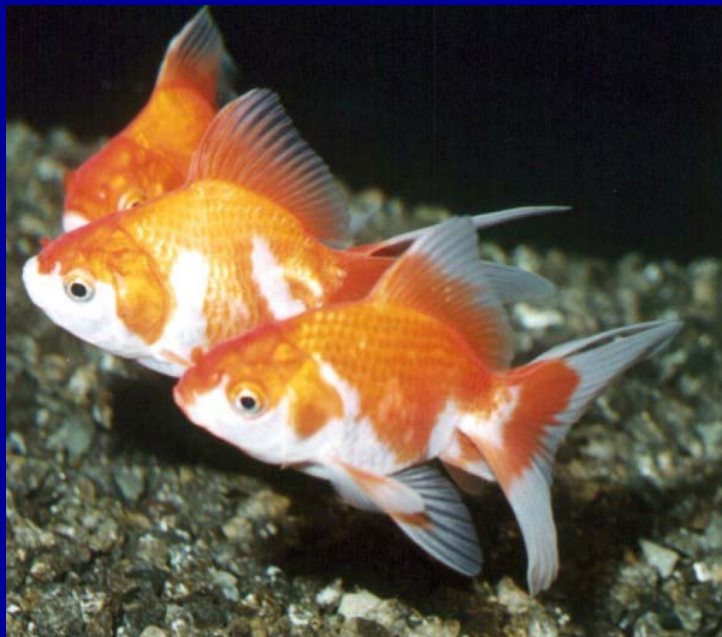


Danio rerio (syn. *Brachydanio rerio*)



Pimephales promelas

Karas (zlatá forma)



Pstruh





BAKTERIE – významný model v testování

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

Mikrobiální ekotoxikologické biotesty

TEST AKUTNÍ TOXICITY - MICROTOX

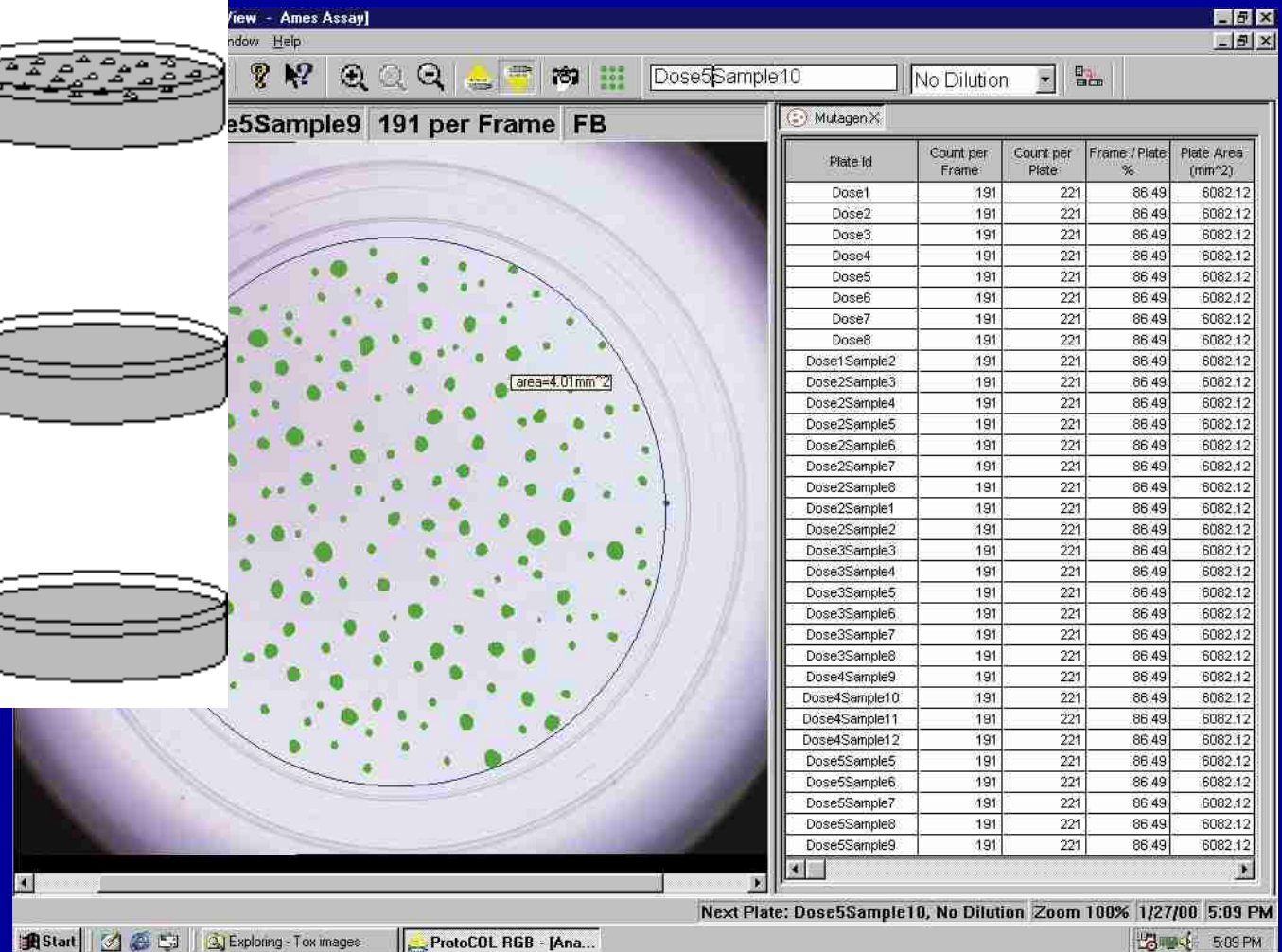
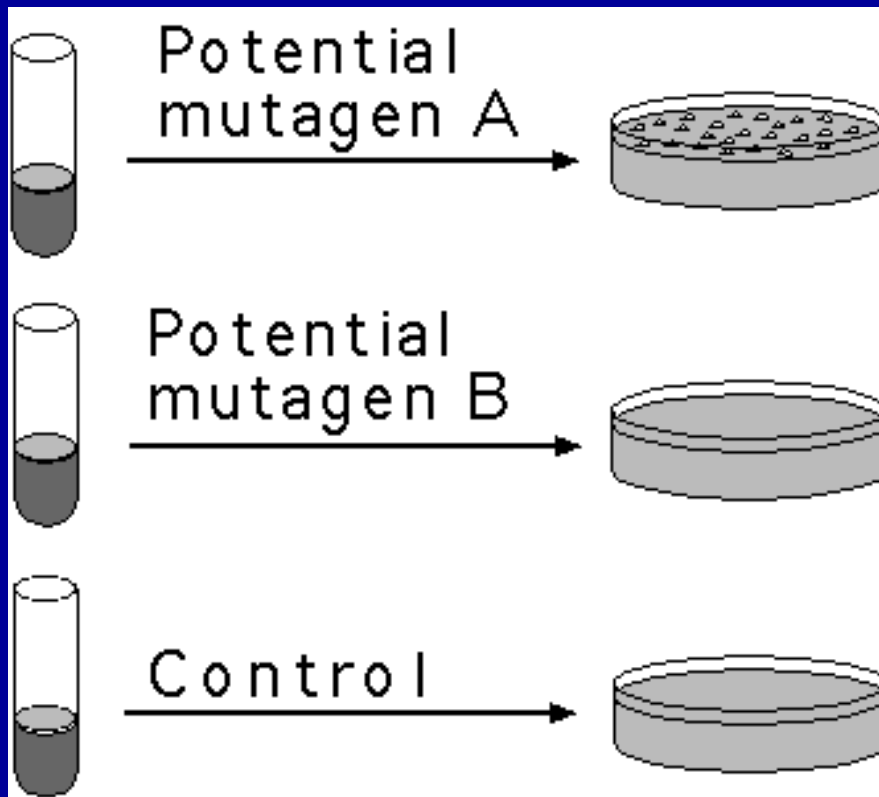
- mořská luminiscenční bakteri *Vibrio fischeri*
- krátkodobá expozice testované látky (5-30 min)
- sledování změn přirozené luminiscence – odpovídá toxicitě
- uspořádání:
kyvety (zkumavky), stanovení v luminometru



Amesův test

- Test na reverzní mutace se Salmonella typhimurium

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



Jaké testy se reálně užívají?
Existují alternativy k in vivo testům ?

ALTERNATIVNÍ METODY

Standardizace v biologii
vs. alternativy

Možnosti využití různých modelů v biologii

- Obratlovci – tj. 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 ("dioxinová" toxicita)
- rychlejší, levnější, možnost hodnocení více vzorků

Standardní metody

- V odborné literatuře - velké množství experimentálních metod
- Méně metod je standardizovaných a validovaných:
- STANDARDIZACE metod – výsledky akceptovatelné mezi státy – snižování nákladů / omezení opakovaných hodnocení
- Přejímání standardizovaných metod do legislativ
 - např. ČR – Vyhl. 433/2004 Sb. – *Metody testování toxicity (vychází z OECD guidelines)*
- Standardizační agentury:
 - OECD.org** (! Velký význam – viz úvod do GLP/chemie)
 - ISO.org
 - USA - ASTM.org

OECD GUIDELINES – Chemicals Testing

www.oecd.org

5 hlavních sekcí – v rámci každé „stanardizované postupy“

Section 1: Physical Chemical Properties

Section 2: Effects on Biotic Systems (16 postupů)

Section 3: Degradation and Accumulation (8 postupů)

Section 4: Health Effects (86 postupů)

Section 5: Special Activities

- 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)
- 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)

Toxicita pro člověka:

86 postupů

- 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)

Alternativní metody

- Mezinárodní agentury pro validaci alternativních postupů (cílem je „3R“)
 - ICVAM (USA)
 - EU: ecvam.jrc.it
 - ECVAM (European Centre for Validation of Alternative Methods)
 - Časopis ATLA (Alternatives to Laboratory Animals)
- Kompletní návody na validované postupy (tedy ověřené), které splňují 3R, ale nejsou zatím registrovány standardizačními agenturami



About ECVAM

Activities

Validated Methods

Publications

Submission of new Test Methods to ECVAM

News Events and Meetings

Downloads and E-Learning



Validated Methods >>

> Validated Methods

- **New Scientifically Validated Methods**
- **Recommendations for Method Deletions**
- **Regulatory Acceptance**

New Scientifically Validated Methods

- **ELISA test for batch potency testing of erysipelas vaccines**
Date of the ESAC statement: 28 June 2002
Links: [ESAC Statement](#)
- **Embryonic stem cell test for embryotoxicity**
Date of the ESAC statement: 01 May 2002
Links: [INVITTOX Protocol](#), [ESAC Statement](#)
- **Micromass embryotoxicity assay**
Date of the ESAC statement: 01 May 2002
Links: [INVITTOX Protocol](#), [ESAC Statement](#)
- **Whole rat embryo embryotoxicity assay**
Date of the ESAC statement: 01 May 2002
Links: [INVITTOX Protocol](#), [ESAC Statement](#)
- **CORROSITEX assay for skin corrosivity**
Date of the ESAC statement: 06 December 2000
Remarks: The ESAC statement is based on the outcome of the US NTP-NICEATM study.
Links: [INVITTOX Protocol](#), [ESAC Statement](#)
- **ELISA test for batch potency testing of tetanus vaccines for human use**

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, rank

The Embryonic Stem cells Test (EST) has been proposed as a *in vitro* 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 the 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; Genschow, 2002).

According to the study outcome, the Management Team concludes 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 /3 days)

Induction of ES cell aggregates

Step 2

Prepare the same test solution as Step 1



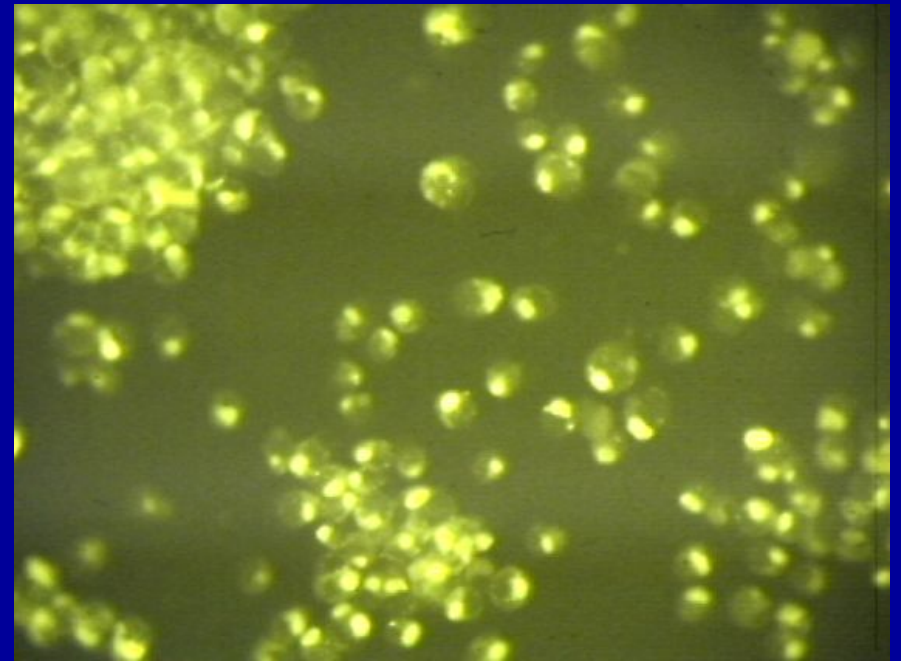
5 ml test solution
+
"hanging drops" from 1 petri dish"

Cell culture in suspension culture

(use one petri dish per concentration of test chemical;
untreated control = assay medium)
Incubate (37 °C/5% CO₂ /2 days)

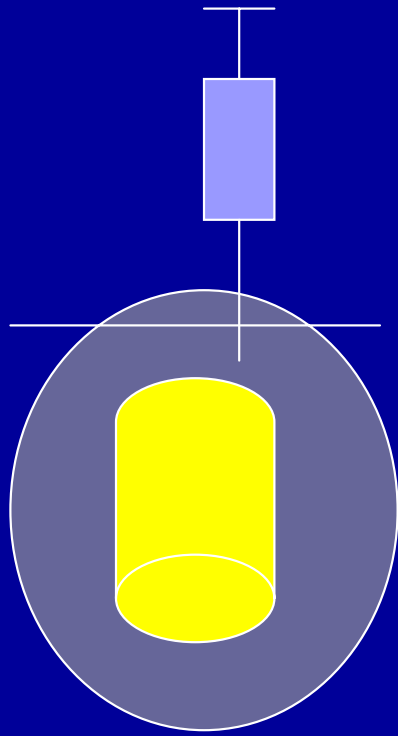
Differentiation in "embryoid bodies" (EBs)

in vitro buněčné techniky

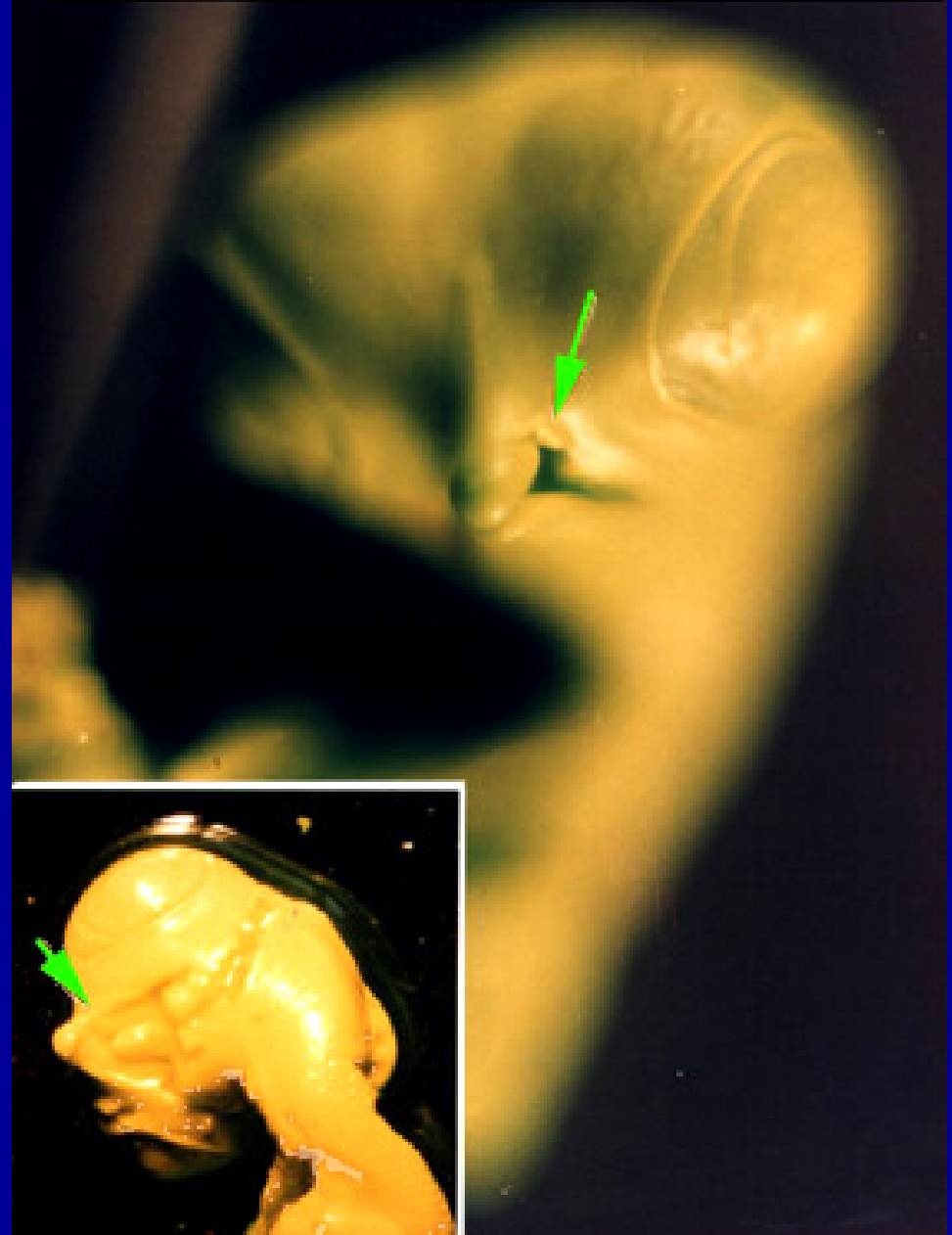


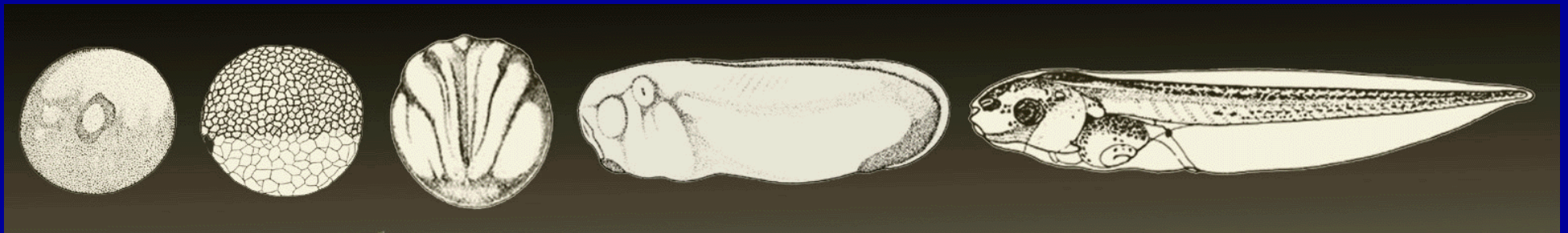
další příklady - "alternativní" techniky

- Embrya a plody
(ze zákona nejsou považovány za „zvíře“)
 - 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





**Problematika regulace
Geneticky Modifikovaných
Organismů (GMO)**

GMO v ČR

- 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

Genetická modifikace - zákon

- Co je Genetická modifikace: ?
 - 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)
- 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 ...)
- **Pro každý GMO je třeba zpracovat Analýzu Rizika**
 - detailní posouzení škodlivých účinků a jejich míry

Schema regulace GMO

- Ministerstvo ŽP registruje:
 - 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 orgány
 - ČIŽP, celní orgány, orgány veterinární správy, ÚKSÚZ, SZÚ, ÚSKVBL, CZPI

Povinnosti uživatele

- REGISTRACE

- Složitá forma žádosti - řada požadavků (*př. přesná definice genetické změny pro účely identifikace...*)
- Pověřené osoby (vzdělání, praxe ...)
- Odborný poradce

- Před zápisem do seznamu je nutné provedení analýzy rizika a kategorizace - *popis náležitostí je ve vyhlášce*

Analýza rizika GMO - 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
- Podle kategorie rizika je nutno zabezpečit provoz zařízení
 - vybavení
 - 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

Nakládání s GMO – důkladná dokumentace

- 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