

3R, nahrazení a omezení používání pokusných zvířat alternativními metodami

RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.

**Oddělení alternativních toxikologických
metod, NRC pro kosmetiku
Státní zdravotní ústav Praha**

Směrnice EP a Rady 2010/63/EU, o ochraně zvířat pro vědecké účely

- účinnost od 1.1.2013, zákon 246/1992 Sb.
- Působnost na obratlovce (kruhoústí), hlavonožce, plody a embrya od 3. třetiny vývoje
- Povinnost uplatňovat principy 3R, systematická náhrada pokusů na zvířatech – schválené projekty pokusů
- Prioritou je použití alternativní metody *in vitro*, pro vědecké nebo vzdělávací účely pokus na zvířeti lze jen při absenci metody *in vitro*

Toxikologické zkoušky - účel / cíle

- Zjištění nebezpečných vlastností u nových chemických látek
- Ověření bezpečnosti u spotřebních výrobků a jejich ingrediencí

ingredience: chemické látky syntetického / přírodního původu

výrobky: léčiva, zdravotnické prostředky, chemické přípravky, potraviny, doplňky stravy, kosmetika, osobní ochranné prostředky, hračky, výrobky pro děti

Toxikologické zkoušky – metody zkoušení

Konvenční pokus na zvířatech (obratlovcích): metody volby bez vědecké validace (Bailey, J., ATLA 43, 2015 - 5% léčiv po testech na zvířatech uvedeno do humánní praxe)

Alternativní metoda dle 3R : validovaná /vědecky uznaná za validní (EURL-ECVAM – European Center for Validation of Alternative Methods, OECD, ICCVAM-US, JaCVAM, KoCVAM...)

Princip 3R (Russell & Burch, 1959)

- **Reduction** (snížení počtu zvířat, více informací z 1 zv.)
- **Refinement** (zmírnění postupů: omezit bolest a strach)
- **Replacement** (náhrada jiným testem bez použití zvířat)
 - ***in vitro*** (buněčné kultury, rekonstruované tkáně)
 - ***ex vivo*** (izolované zvířecí / lidské tkáně a orgány)
 - ***in silico*** (PC simulace, QSAR, matematické modely)
 - ***in chemico*** (simulace v chemickém prostředí)

3R definice

- **replacement absolutní** (zvířata nejsou vůbec potřeba) versus **relativní** (zvířata nejsou vystavena stresu a bolesti, ale slouží jako dárce orgánů či buněk)
- **replacement plný** (žádná zvířata) versus **částečný** (použití např. *Drosophila melanogaster*, embrya, primární kultury ze zvířat)
- **souhrn metod:** EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches (2021).

<https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC127780>

- **EK e-learningové moduly** - PP, závažnost pokusů, hledání v databázích etplas.eu

3R hledání pro PP

- **bibliografické databáze** pro alternativy:
- PubMed - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- EMBASE - <https://www.embase.com/>
- Web Of Science - <https://apps.webofknowledge.com>

Relevantní weby <https://norecopa.no/databases-guidelines/eu-commission-inventory-of-3rs-knowledge-sources>

Adverse Outcome Pathway (Dráhy škodlivého účinku)
<https://aopkb.oecd.org/index.html>

Joint Research Centre - EURL-ECVAM
<https://data.jrc.ec.europa.eu/collection/id-0088>

Ingredience - chemické látky

- Nařízení 1906/2007/ES, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, REACH
- předepisuje přednostně užití metod bez zvířat, dle objemu/rok přibývají zkoušky, nejsou alternativy

1-10 t/rok: Akutní toxicita -orální *in vivo*

Kožní leptavost/dráždivost - *in vitro*

Oční dráždivost - *in vitro*

Sensibilisace kůže - *in vivo*, baterie *in vitro*

Mutagenita / genotoxicita - *in vitro*

10-100 t/rok:

+ Akutní toxicita dermální/inhalační, toxicita po opakované dávce, toxicita pro rozmnožování, toxikokinetika – *in vivo*

více jak 1000 t/rok:

+ Karcinogenita + rozšířené zkoušky chronické toxicity – *in vivo* ,

Legislativa závazných metod zkoušení nebezpečných vlastností

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** - **REACH**

OECD - metody zkoušení **chem.látek** **www.oecd.org**

Normy - např. **EN ISO 10993** pro zdravotnické prostředky

Stanoviska ECVAM, ICCVAM... - vědecky **uznané** alternativní metody (centra validace EU, USA, J., Ko.)

Minimální požadavky na ingredience

(SSCS Vědecký výbor pro bezpečnost spotřebitelů, 2021)

- **hodnocení bezpečnosti KP - úplný toxikologický profil** všech ingrediencí, vyhodnocení bezpečnosti dle expozice + výpočet hranice bezpečnosti - **Margins of Safety**

Minimální požadavky:

- **Akutní toxicita**
- Dráždivost a leptavost
- **Sensibilizace**
- Kožní absorpce a penetrace
- **Toxicita po opakované dávce**
- Mutagenita / genotoxicita

Předpokládá se požití / prokázána absorpce kůží

- **Karcinogenita, toxicita pro rozmnožování, fototoxicita**
- lidská data, zvířecí data do 2013 - testy pro jiné účely
- Knight et al., ALTEX 38, 2021 - ECHA testy 63/419 výlučně kosm. ingrediencí!

Validované/vhodné metody in vitro

- **validace = kontrolované nezávislé studie vedené val. centry**
 - SOP, > 3 laboratoře, >100 látek (naslepo)
 - predikční kapacita: přesnost, sensitivita + specifita (nejlépe nad 80%) k datům in vivo
 - variabilita intra / inter laboratorní, transferabilita do jiné laboratoře
 - oponentura Peer Review ► stanovisko vědeckého výboru
- **vhodné - vývoj ukončen, existuje SOP + sada experimentů, publikováno**
 - Peer Review (val.centra), kladné stanovisko k prevalidaci
 - databáze alternativních metod (SOP) **DB-ALM**
<https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/dbalm.html>

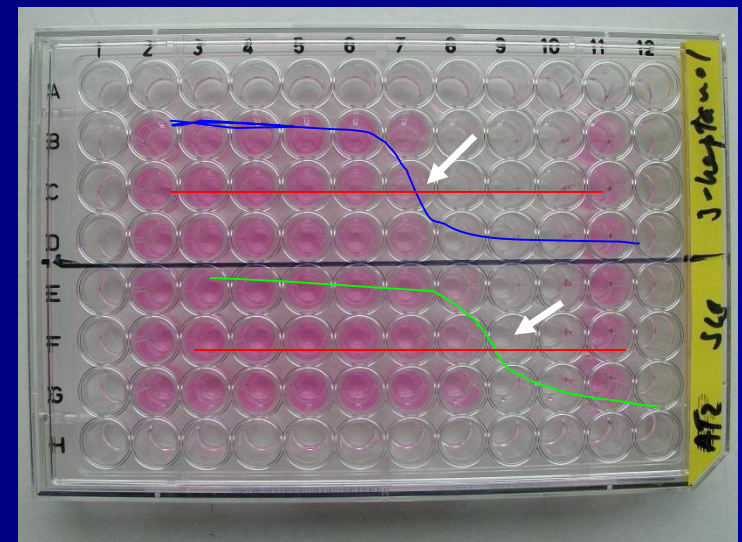
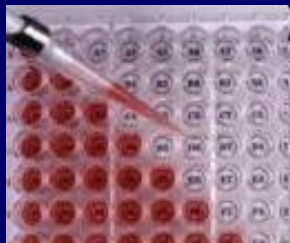
Akutní toxicita / letalita (cytotoxicita 3T3 Balb/c, NHK)

- B.1 Akutní orální toxicita (*in vivo*, zatím není náhrada)
- Odhad LD50 z cytotoxicity na fibroblastech 3T3 Balb/c
- IC₅₀ – cytotoxická koncentrace látky snižující životnost buněčné kultury na 50%



Akutní toxicita / letalita

- výpočet: $\log \text{LD50 (mg/kg)} = 0.372 \log \text{IC50 (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$
- pokud $\text{LD50} > 2000 \text{ mg/kg}$, není potřeba test in vivo (ECVAM 2013)

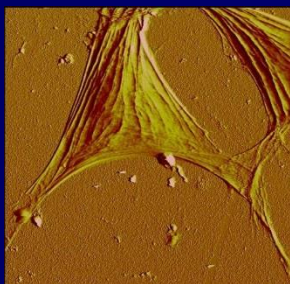


koncentrace →

Test cytotoxicity - Neutral Red Uptake

Screening kosmetických přípravků

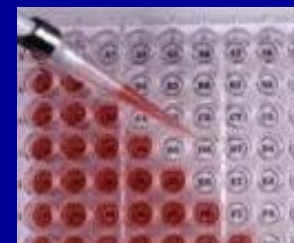
Myší fibroblasty Balb/c 3T3



Pasážování buněk



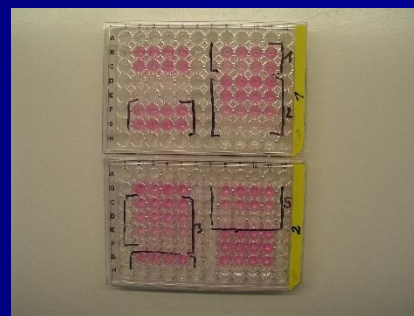
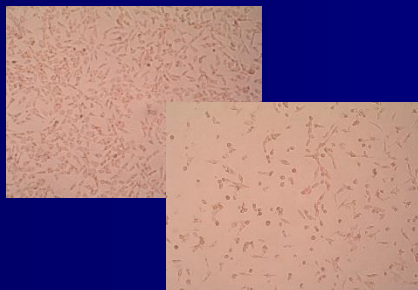
Monolayer 96-j. destičky



Aplikace ředěných vzorků 24 h



Barvení neutrální červení



**Měření
fluorimetr**



Nejvyšší necytotoxické koncentrace kosmetických prostředků ($\mu\text{g/ml}$)

Obvyklé rozmezí hodnot:

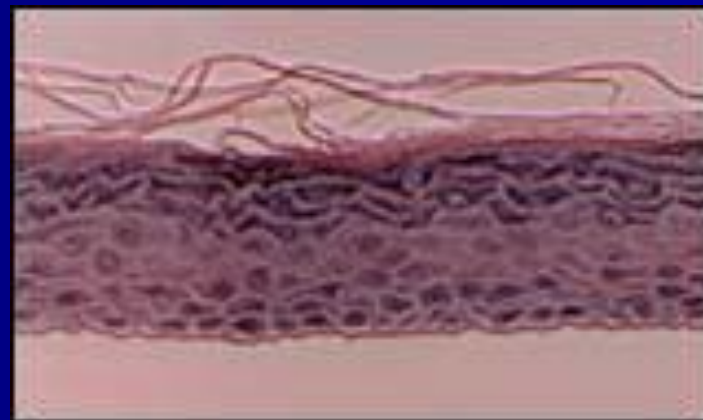
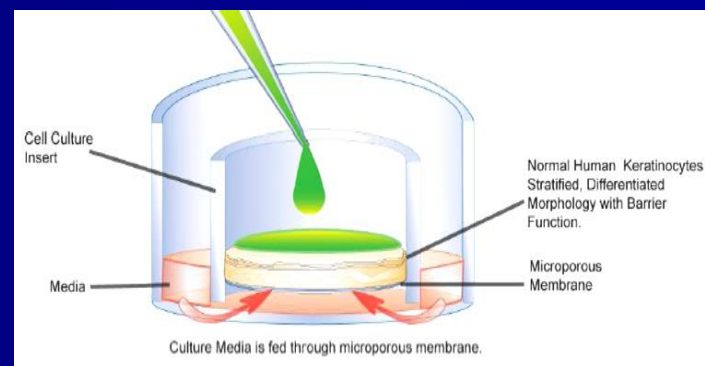
■ šampon	1 – 100
■ zubní pasta	100 – 2000
■ EDT, EDP, voda po holení	100 – 1000
■ sprchový gel	10 – 50
■ kondicioner	50 – 250
■ pěna na holení	100 – 250
■ tělové mléko	100 – 500
■ ústní voda	500 – 2000
■ tonik	500 – 2000
■ vlasová voda	1000 – 2000

Cytotoxicita – zubní pasty

<i>Kategorie</i>	<i>Nejvyšší necytotoxická koncentrace (µg/ml)</i>
Bělicí, antibakteriální pasta - hydrated silica 20% - éterické oleje - triclosan - sorbitol 30-40% - glycerin 10-40%	100
Běžná pasta	250-500
Jemná pasta -anorganické soli uhličitan vápenatý hydrogenfosforečnan vápenatý	1000-2500

Leptavost a dráždivost 3D modely lidské kůže

- **EpiDerm** (MatTek, USA, SK)
- normální lidské epidermální keratinocyty od 1 dárce, metabolicky aktivní
- 8-12 vrstev epidermis včetně bazální, spinózní a granulární vrstvy
- 10-15 vrstev stratum corneum
- **zkoušky:**
 - **leptavost** (B.40, OECD 431)
 - **dráždivost** (B.46, OECD 439)
 - **fototoxická** (OECD 498)



Validace modelu EpiDerm

- Jírová et al, 2010, Contact Dermatitis 62
- spolupráce SZÚ na validaci
- 25 chemikálií testováno v 4-h kožním testu na dobrovolnících (HPT)
- jen 5 ze 16 látek klasifikovaných jako dráždivé na králících bylo dráždivé pro lidskou kůži
- shoda výsledků králík - 4-hr HPT jen 56 %, HPT - model EpiDerm 76 %
- výsledky na králících oproti člověku přehnané

Dráždivé účinky na kůži

(irritace = reverzibilní změny na kůži)

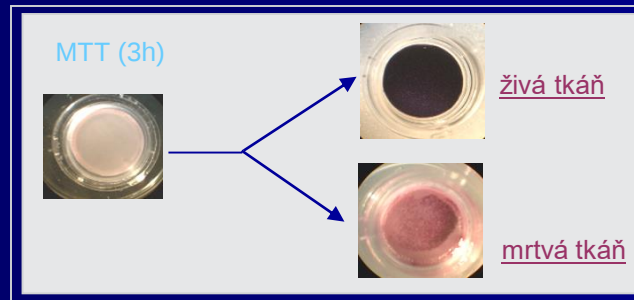
60 MINUT
EXPOZICE

42 HODIN
POST-INKUBACE

MTT TEST



EpiDerm (0.63 cm²)
25 mg/ 30 µl aplikace

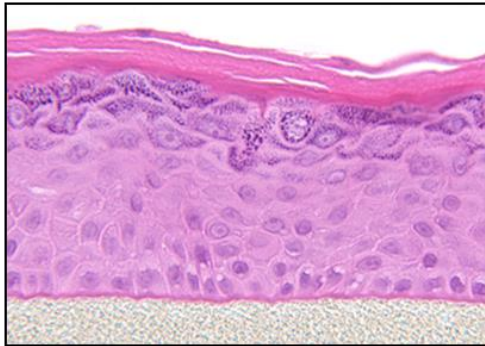


Endpoint - MTT assay:

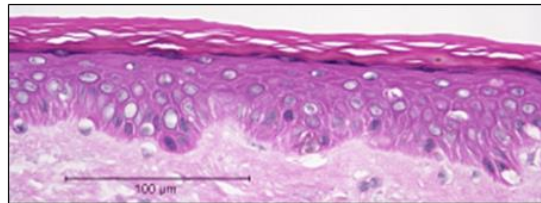
1 mg/ml MTT, redukce žlutého
barviva na modrý formazan

Životnost > 50% negativní kontroly: nedráždí
Životnost ≤ 50% negativní kontroly: **dráždí**

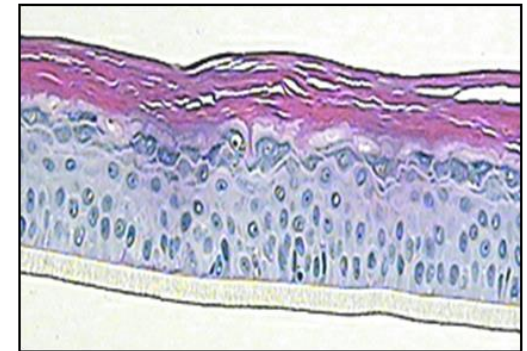
***In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Models Validated for Regulatory Purposes**



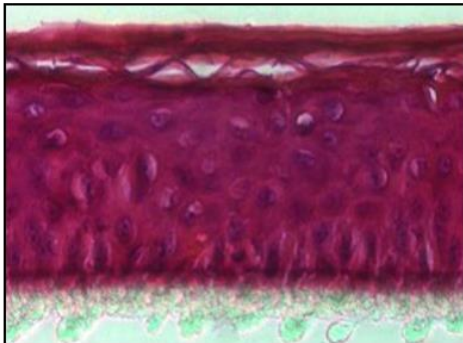
MatTek Corp. EpiDerm™ (EPI-200)



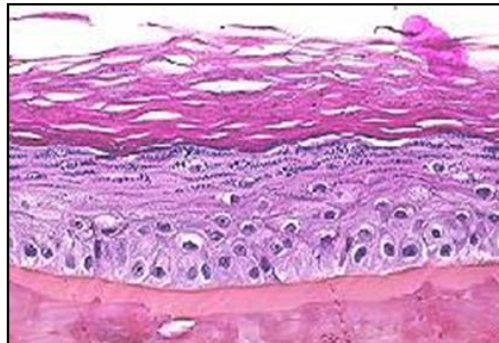
Native human skin



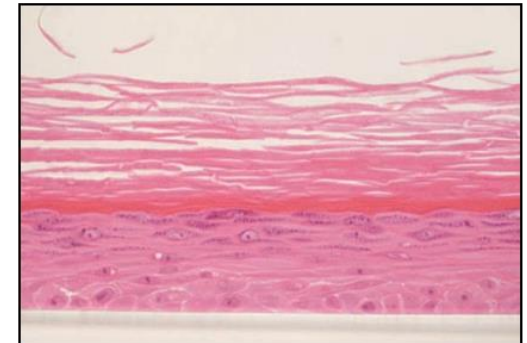
SkinEthic™ RHE



Cell Systems epiCS®



EpiSkin™ (SM)



J-TEC LabCyte EPI-MODEL

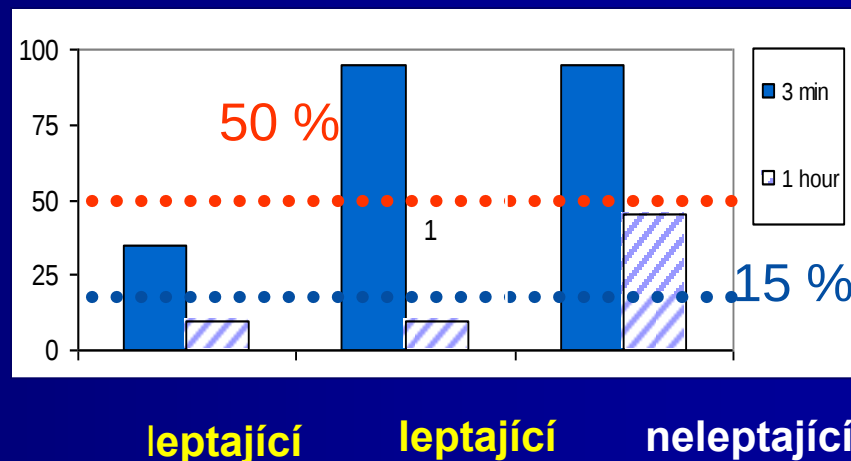
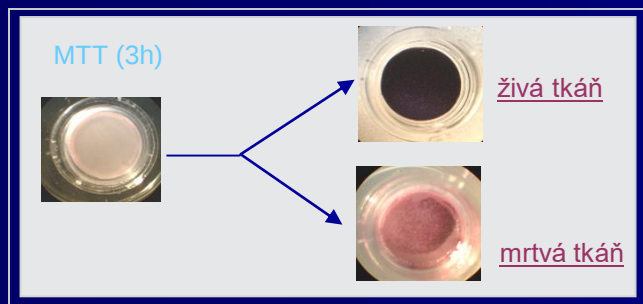
Dráždivé účinky na kůži

OECD 439

- EpiSkin (F), EpiDerm™ (USA-SK), SkinEthic™ RHE (F), LabCyte EPI-MODEL24 (Jap.)
- limity - barevné látky interferující s MTT, látky redukující MTT - zmražené kontroly, měření HPLC místo spektrofotometru
- predikce: rozhoduje životnost **50%**
- predikce GHS 2 a 1, nikoliv Cat.3 (mild irritant), v zemích bez Cat.3 lze No Cat. (stand alone test, jinde část strategie)
- pokud není látka leptavá a životnost $\leq 50\%$, pak klasifikace Cat.2

Leptavé účinky na kůži (B.40, OECD TG 431)

- aplikace látka 3 min a 1 hod
- barvení MTT (žluté barvivo redukováno enzymaticky na modré, spektrofotometricky měření)
- kontrola (voda) = 100% životnost
- predikce: cut-off **50%** (3 min) a **15%** (1 hod)



Leptavé účinky na kůži

- dosud 4 modely: EpiSkin (F), EpiDerm (USA), SkinEthic (F), epiCS (dříve EST-1000, D)
- různé predikční modely, kontroly kvality
- lze klasifikovat subkategorie 1A vs. 1B-1C vs. NC, nelze odlišit 1B od 1C
- limity - barevné látky interferující s MTT, látky redukující MTT - zmražené kontroly, měření HPLC místo spektrofotometru



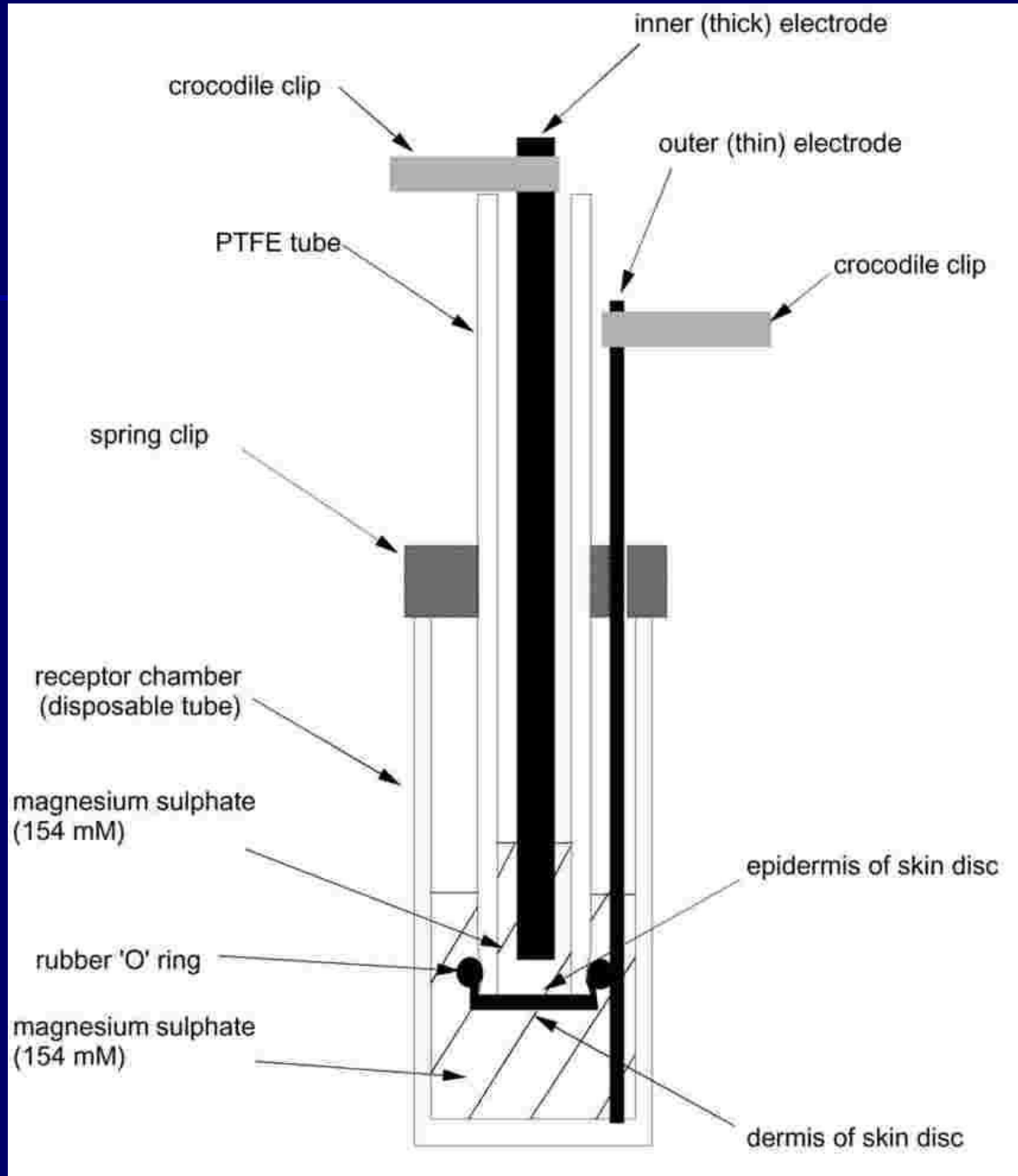
TER

(B.40/OECD TG 430)

- **In Vitro Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)**
- kůže potkanů 28-30 dní, 20 mm disky umístěné do zkumavek s recepční a donorovou tekutinou
- ztráta integrity a bariérové funkce
- predikce:
- **cut-off** ztráta elektrického odporu **pod 5 k Ω**
- **obarvení sulforhodaminem B** a po 2 h měření penetrace do recepční tekutiny (nad 40 μg /disk pozitivní)

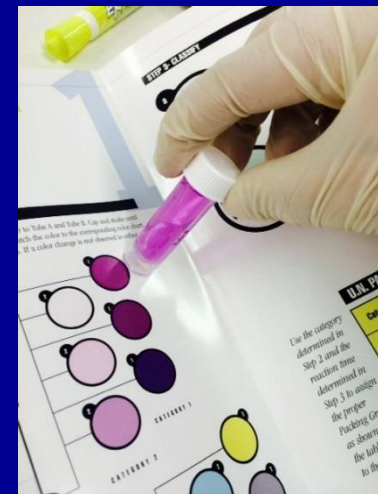


TER



Corrositex (OECD TG 435)

- **In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion**
- VRM Corrositex®
- syntetická makromolekulární biobariéra a chemický detekční systém
- řada omezení - nutný předběžný test kompatibility s chemickým indikátorem
- předběžný timescale category test (alkalická rezerva)
- volba příslušného postupu dle SOP



Corrositex B.65

- aplikace na membránu
a zaznamenání
času průniku
- predikce:



U.N. Packing Group Table				
Category	Time Required for CDS Change			
Category 1	0 to 3 minutes	>3 to 60 minutes	>60 to 240 minutes	>240 minutes
Category 2	0 to 3 minutes	>3 to 30 minutes	>30 to 60 minutes	>60 minutes
	Packing Group I	Packing Group II	Packing Group III	Non-Corrosive

corrosive

1A

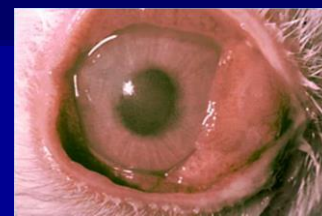
1B

1C

Dráždivé/leptavé účinky na oči

- B. 5 in vivo (králík)

Draizův test



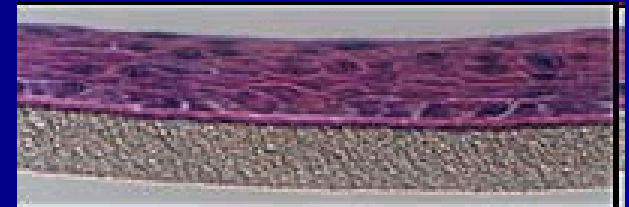
- organotypické modely: BCOP (bovinní rohovka) OECD 437, ICE (kuřecí rohovka) OECD 438
- cytotoxicita: Short Term Exposure OECD 491, Fluorescein Leakage OECD 460, Cytosensor Microphysiometer (ECVAM 2009)
- 3D modely rohovky (OECD 492):
 - EpiOcular™, MatTek - validován 2014
 - HCE Human Corneal Epithelium, Skinethic - validován 2016
- vhodné metody: HET-CAM test ,
buněčný model NRR, NRU, organotypické modely králíčí oko



Oční iritace – 3D modely

(B.69/OECD TG 492)

- **VRM EpiOcular** (MatTek, USA) a **SkinEthic**, Labcyte
- lidské keratinocyty – skvamozní epitelium modelující rohovku
- **klasifikace No Cat. vs Cat.1 nebo Cat.2**
- nelze odlišit Cat. 1 a 2
- součást tier-testing strategy (zatím není definitivní baterie metod)



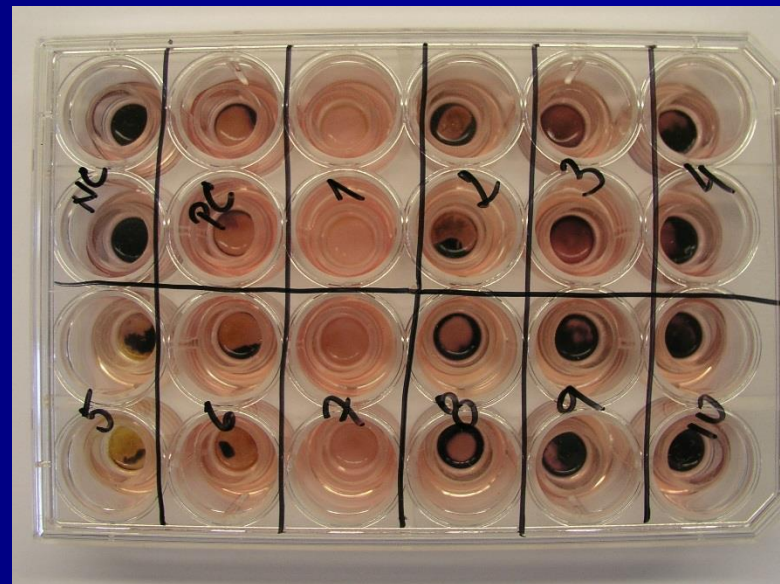
EpiOcular



Králičí rohovka

Oční iritace – EpiOcular

- aplikace tekutých i tuhých látek, nerozpustných ve vodě, barvení MTT
- SOP :
 - **chemické látky** (aplikace 30 min L/6 h S, **cut-off 60%** životnost oproti kontrole)
 - **formulace** (ředění 20%, aplikace 3 časy – výpočet **ET₅₀**)



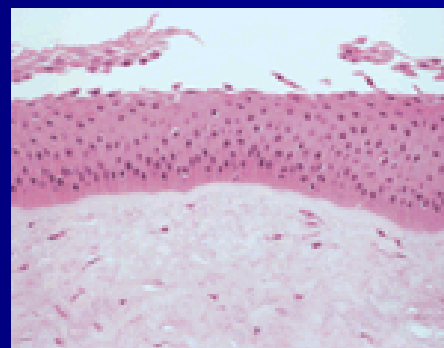
Oční iritace - BCOP

(Bovine Cornea Opacity/Permeability, OECD 437)

- bovinní rohovka - čerstvě izolovaná po odběru z jatek
- aplikace a oplach
- měření zakalení (opacita)
- permeabilita pro fluorescein
- validace pro silně dráždivé látky



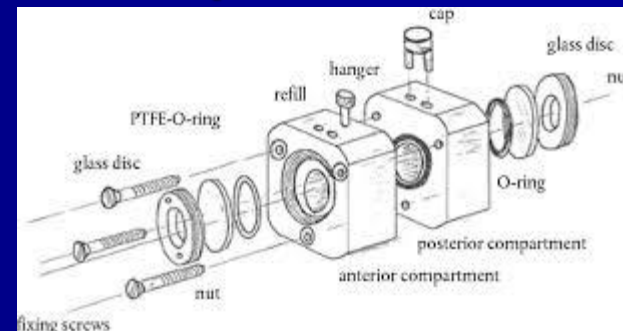
oplach a měření
na opacitometru



narušená
rohovka

BCOP In vitro Irritancy Score

- výpočet IVIS = mean opacity value + (15 × mean permeability OD490 value)

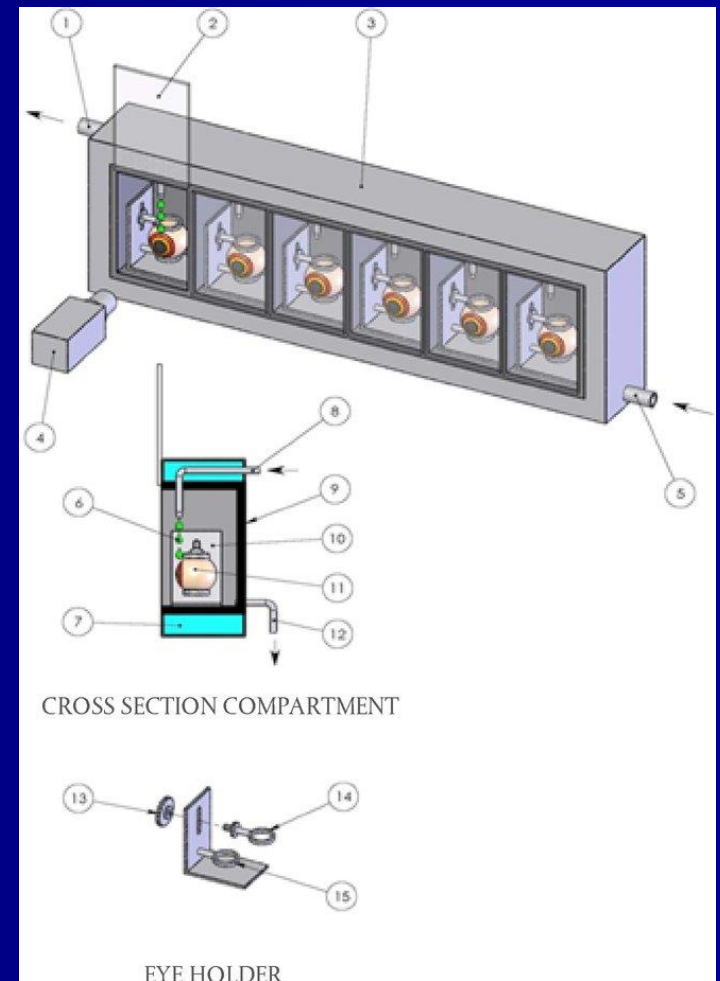


- validace pro nedráždivé nebo silně dráždivé látky
- predikce:
- $IVIS \leq 3$ UN GHS No Category
- $IVIS > 3; \leq 55$ nelze predikovat (nelze Cat.2A a 2B)
- $IVIS > 55$ UN GHS Cat.1

Isolated Chicken Eye ICE

(B.48, OECD TG 438)

- kuřecí bulvy z jatek
- 10 s expozice 0,03 ml(g)
- otok rohovky, opacita a barvení fluoresceinem



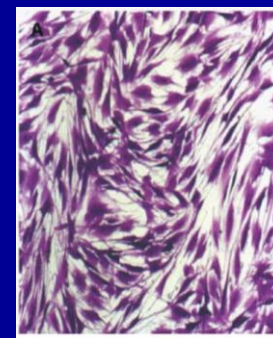
ICE

- složitý predikční model = kombinace měření tloušťky rohovky, opacity a uvolnění fluoresceinu
- predikce:
- UN GHS No Category
- nelze predikovat Cat.2A a 2B
- UN GHS Cat.1

STE - SIRC linie

(B.68/OECD TG 491)

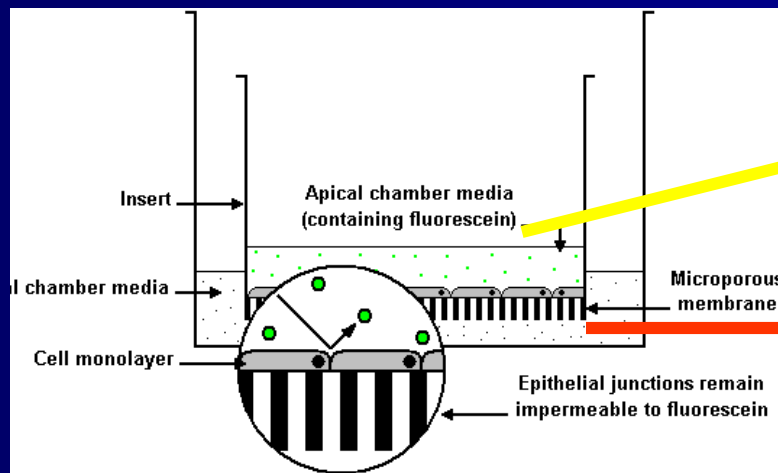
- **Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage**
- konfluentní monolayer Statens Seruminstitut Rabbit Cornea (SIRC) cells v 96j destičce
- 5 min expozice látce v 5% a 0,05% koncentraci
- barvení MTT
- predikce:
- UN GHS Cat. 1 - $\leq 70\%$
- UN GHS No Category - $> 70\%$
- nelze odlišit Cat. 2A a 2B



GHS Category	Cell viability	
	at 5% conc.	at 0.05% conc.
No category	$> 70\%$	$> 70\%$
No prediction can be made	$\leq 70\%$	$> 70\%$
GHS1 Severe Irritant	$\leq 70\%$	$\leq 70\%$

Fluorescein Leakage (B.61, OECD TG 460)

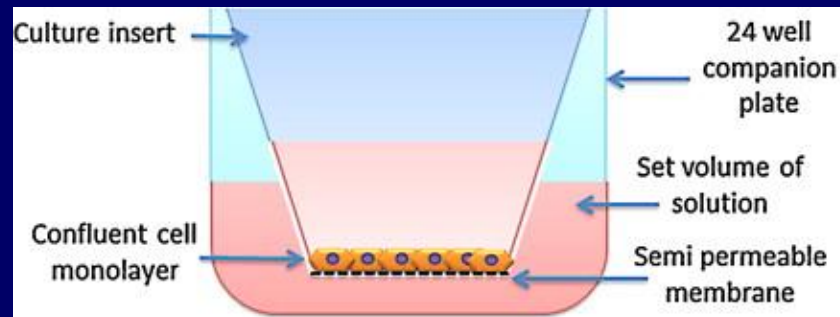
- surfaktanty, chemické láky rozpustné ve vodě
- aplikace 1 min. na konfluentní buňky MDCK
CB997 tubular epithelial cells
- průnik fluoresceinu přes monolayer buněk s
narušenými desmosomálními vazbami (spojovací
můstky sousedních epitelových buněk) – FL₂₀



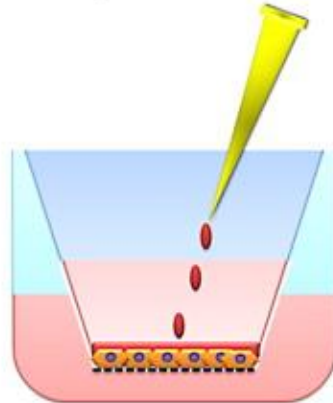
Fluorescein v mediu

Měření průniku pod monolayer

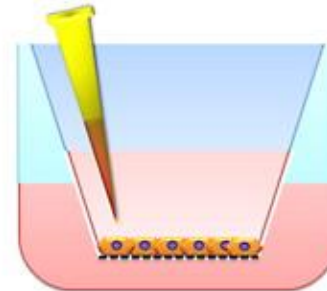
FL



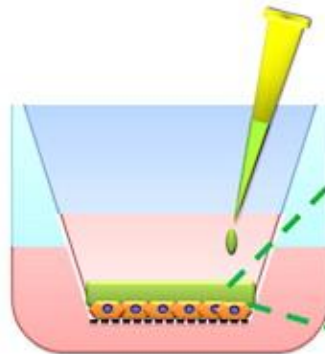
i) MDCK cells allowed to reach confluence.



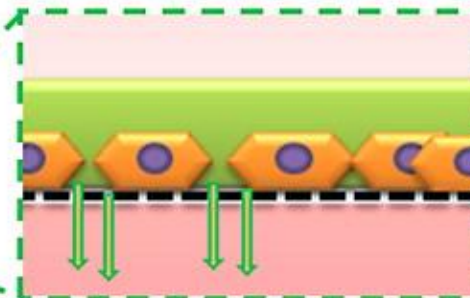
ii) Soluble test substance added.



iii) Test substance removed after 1 min.



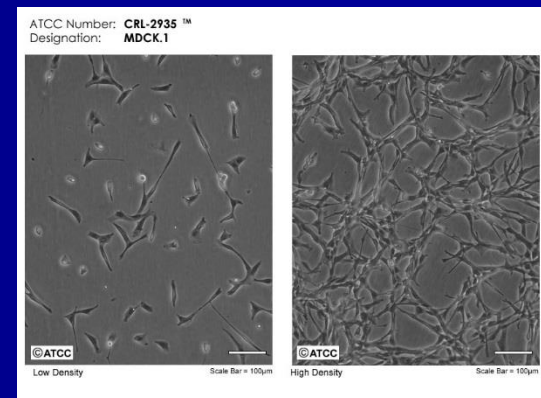
iv) Sodium-fluorescein dye added.



v) Damage to tight junctions determined by fluorescein leakage.

Fluorescein Leakage

- FL20 = koncentrace způsobující 20% průnik FL, měřeno spektrofotometricky
- predikce: pokud $FL20 \leq 100 \text{ mg/ml}$
UN GHS 1 (corrosive /severe irritant), není potřeba dál testovat
- zařazení do baterie testů
- nelze látky s vysokým a nízkým pH, těkavé, fixující buňky



Oční iritace - Neutral Red Release

DB-ALM protokol č. 54

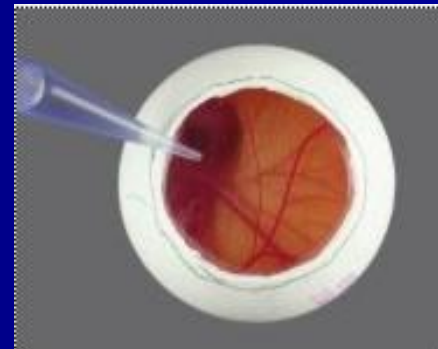
- surfaktanty, chemické látky rozpustné ve vodě
- monolayer buněk obarven neutrální červení (NR)
- aplikace látky 1 min
- uvolnění NR po destrukci membrán
- výpočet **NRR₅₀**



oční iritace - HET – CAM

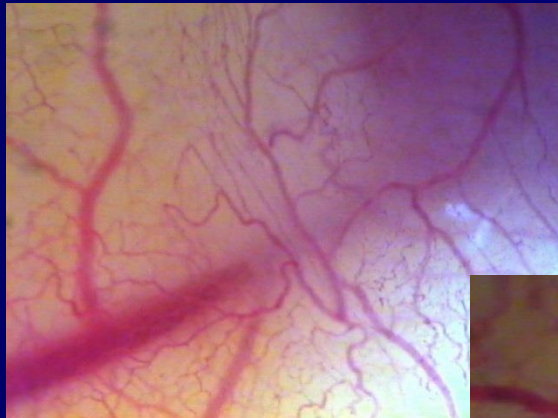
(Hen´s Egg Test - Chorioallantoic Membrane)

- fertilizovaná vejce (8-10 dní), aplikace látek na membránu
- sledování změn (5 min.): hemoragie, lýza, koagulace



Oční iritace - HET- CAM

Změny po aplikaci šamponu pro děti

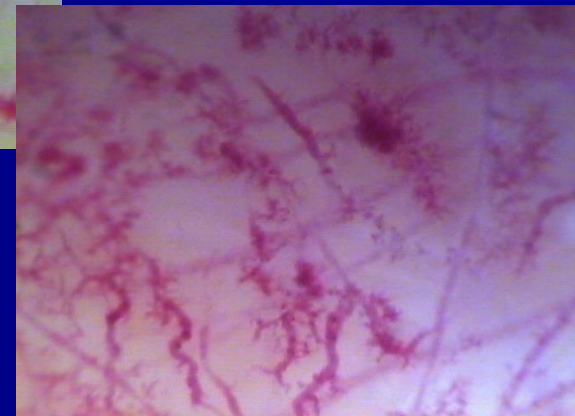


**neporušená
membrána**

**hemoragie, lýza
30 s**



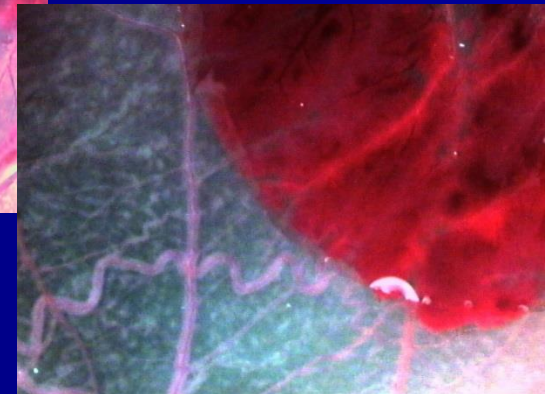
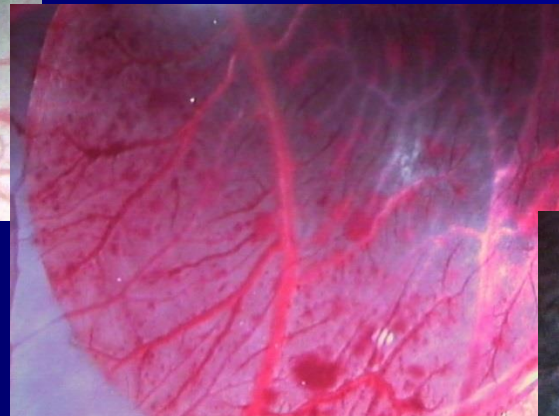
5 min



**iritační potenciál 8,3
mírná iritace**

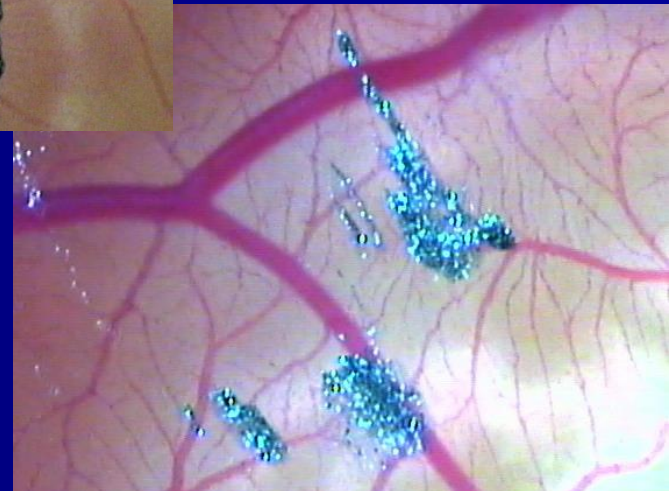
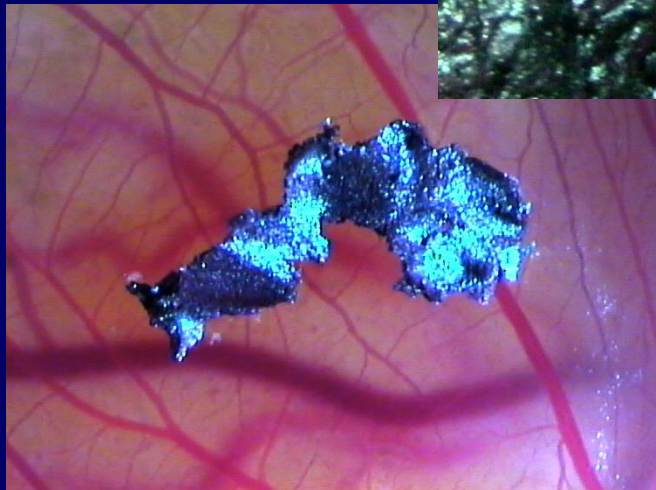
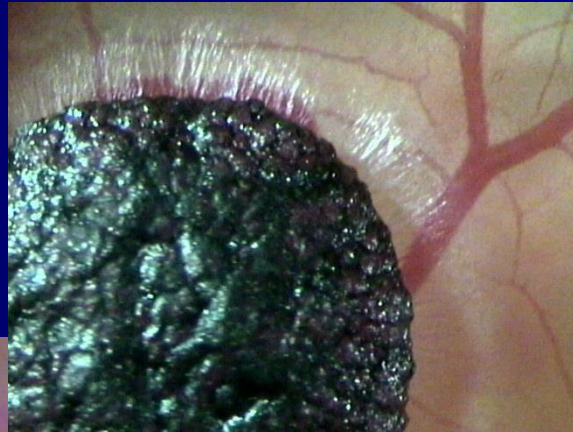
Oční iritace HET-CAM

- rozpouštědlo lepidla na umělé řasy
iritační potenciál 17,2 - silná iritace



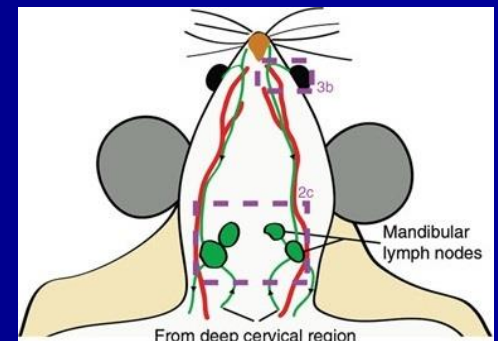
Oční iritace HET-CAM

- oční stíny, řasenky – žádná iritace



Senzibilizace kůže (alergická kontaktní dermatitida)

- dosud *in vivo* maximalizační zkouška na morčatech
- zkouška s vyšetřením lokálních lymfatických uzlin myší **LLNA Local Lymph Node Assay** (OECD 442A)- refinement
- opakovaná aplikace látky na uši
- proliferace T-lymfocytů v uzlinách je úměrná aplikované dávce a potenciálu alergenu
- **stimulační index $\geq 1,8$** ➡ látka považována za senzibilizující

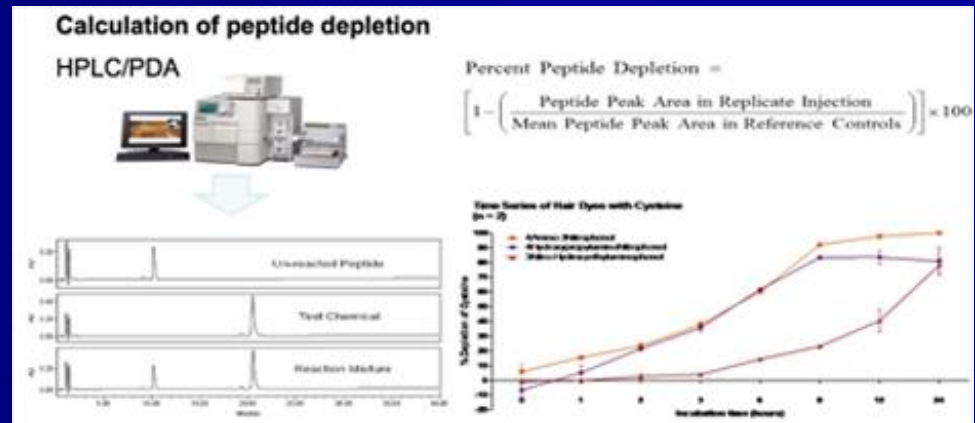


Senzibilizace kůže

DPRA OECD 442C

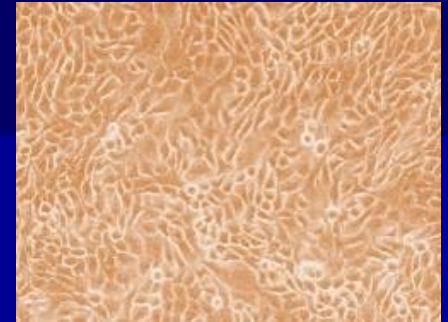
- **Direct Peptide Reactivity Assay**
- *in chemico* test simulující reakci haptenu s peptidy (lysin a cystein)
- HPLC stanovení úbytku peptidů ➡ 4 třídy reaktivity
- **látky senzibilizující**
>6,38 %

VS.
nesenzibilizující
<6,38 %

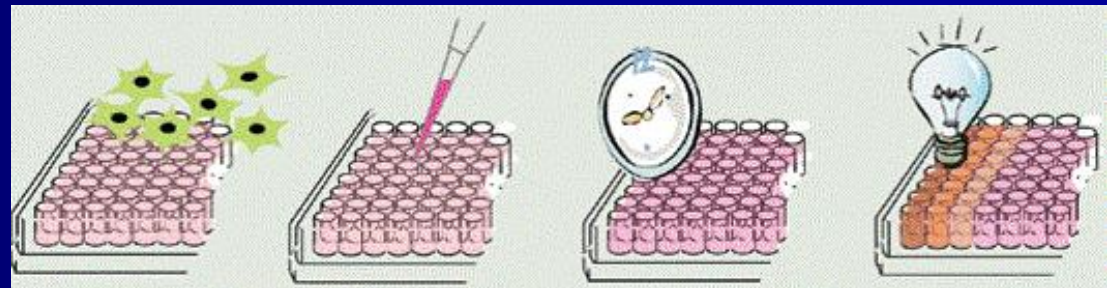


Senzibilizace kůže

LuSens OECD 442D



- *in vitro* test s GM buněčnou linií lidských keratinocytů
- obsahuje reportérový gen pro luciferázu, aktivuje se kovalentní modifikací cysteinových zbytků, vyvolávající alergickou reakci organismu ➡ luminiscence
- 48 h, 96 jamek
- luminiscence
- životnost MTT

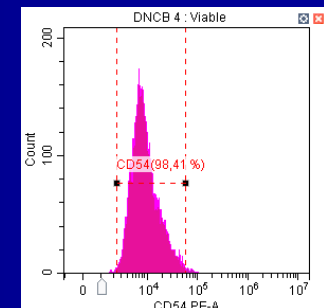
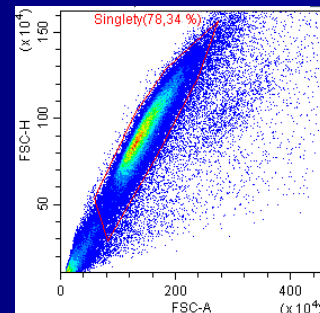


- senzibilizující potenciál: $SI \geq 1,5$, životnost $\geq 70 \%$

Senzibilizace kůže

baterie in vitro testů

- **DPRA** - vazba haptenu na proteiny
- **KeratinoSens, LuSens** (ARE-Nrf2 luciferase test) - aktivace luciferázového genu v keratinocytech
- **h-CLAT** (Human Cell Line Activation Test) - identifikace markerů aktivace lidských dendritických buněk průtokovou cytometrií (fluorescenční značky)
- predikční model 2 ze 3 (OECD 497, 2021)



Kožní absorpce a penetrace in vitro

B.45 (OECD 428)

terče ze hřbetní části kůže prasete



značení aplikačního pole



difuzní komůrka, 34°C
aplikace 24 hodin

Kožní absorpce a penetrace in vitro

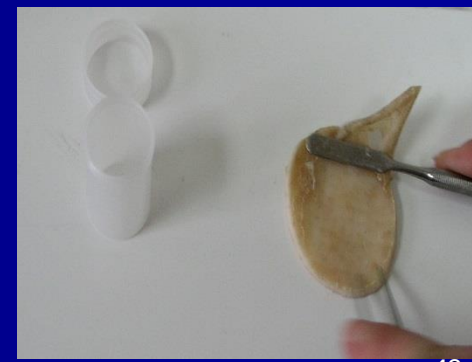
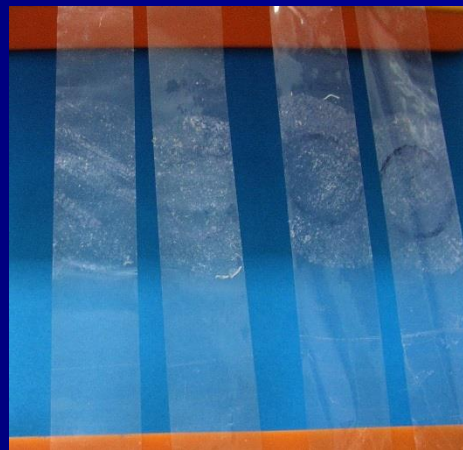
stripování vrstev (16 stripů
lepenkou)



tepelné oddělení epidermis od dermis



zpracování stripů



Kožní absorpce a penetrace in vitro



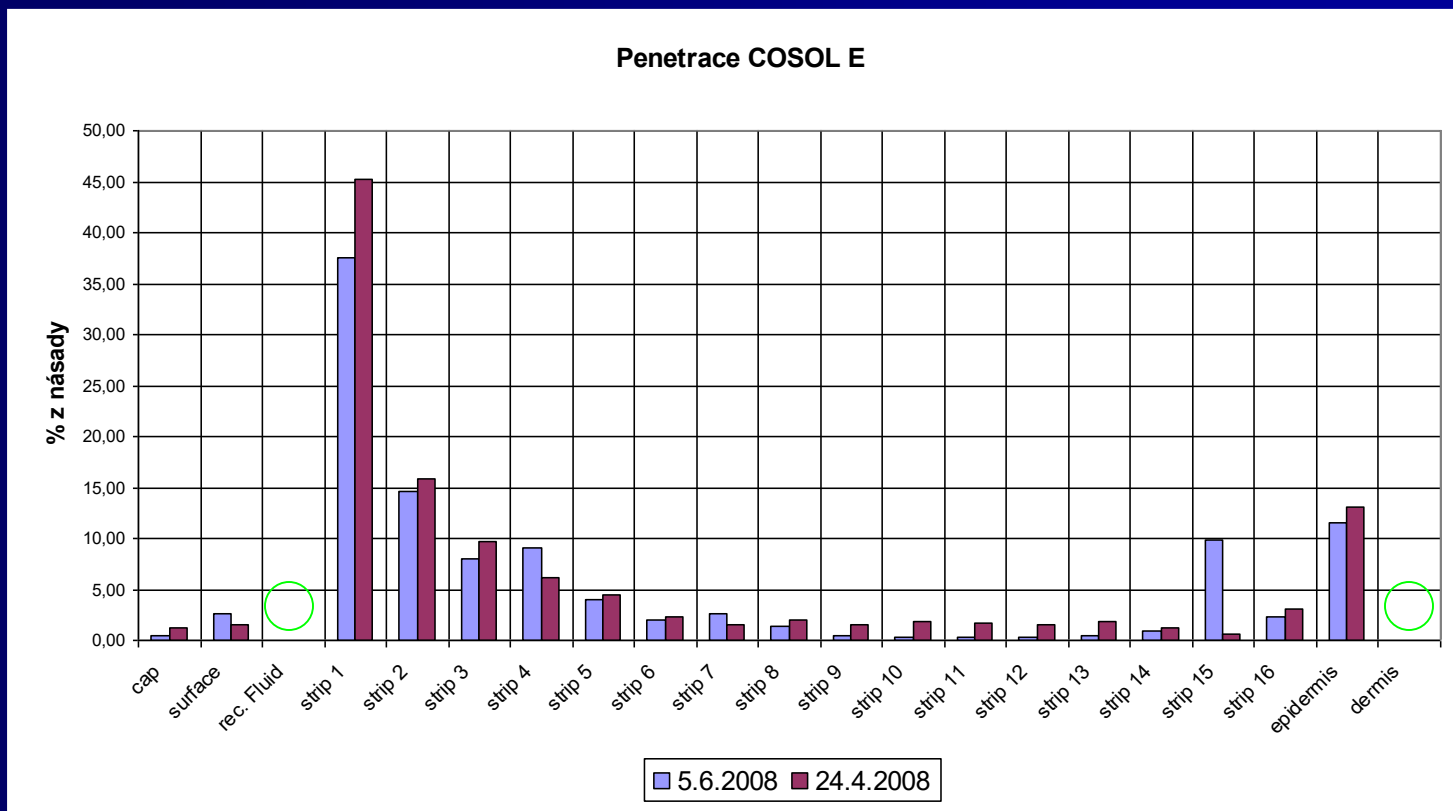
zpracování dermis

HPLC analýza

po extrakci 13 frakcí v isopropanolu 24 hod.



Kožní absorpce/penetrace v % násady (návratnost > 90%)



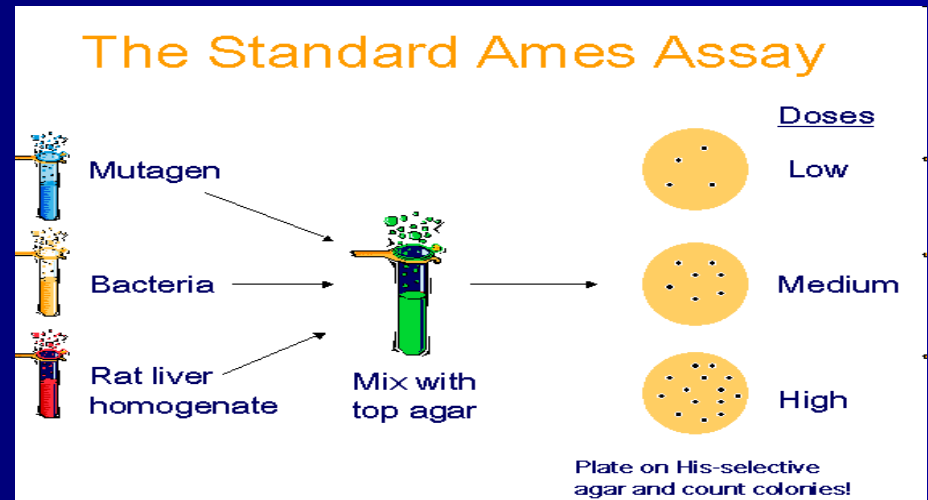
Toxicita po opakované dávce

- opakovaná aplikace (orální, dermální, inhalační) *in vivo* - 28 dní
- subchronická toxicita - 90 dní, chronická - větší část života
- klinické hodnocení, analýza krve, orgánů a tkání (histopatologie)
- NOAEL – No Observed Adverse Effect Level
- zatím žádná náhrada, pokusy s modely orgánů, kokultury, QSAR, read-across

Mutagenita/genotoxicita

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (AMES test) B.13/14 (OECD 471)

- gen. upravené kmeny *Salmonella typhimurium*, závislé na přísunu histidinu
- bodové mutace (substituce, adice a delece párů bází DNA)
- reverze mutace – obnova schopnosti růst v nepřítomnosti histidinu



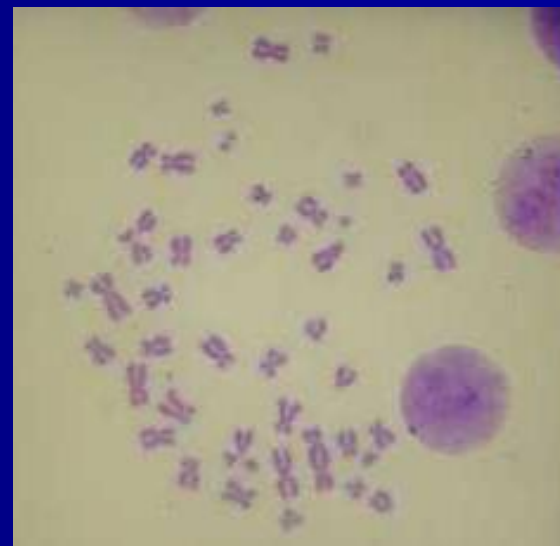
Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (AMES test)

- pozitivní výsledek: **nárůst počtu kolonií minimálně 2x proti kontrole, koncentrační závislost**



Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* B.10 (OECD 473)

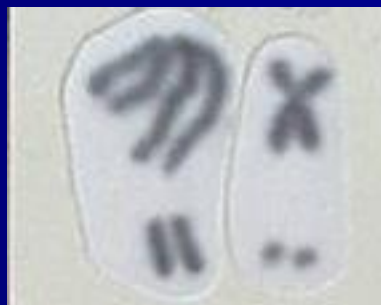
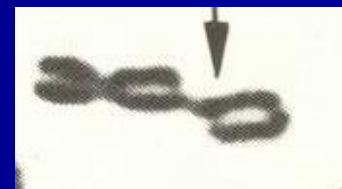
- primární kultury nebo stabilizované buněčné linie
- aplikace testované látky
- zástava metafáze (kolchicin)
- fixace, barvení Giemsou
- hodnocení mikroskopicky:
četnost chromatidových a chromozomových aberací



Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro*

Typy aberací

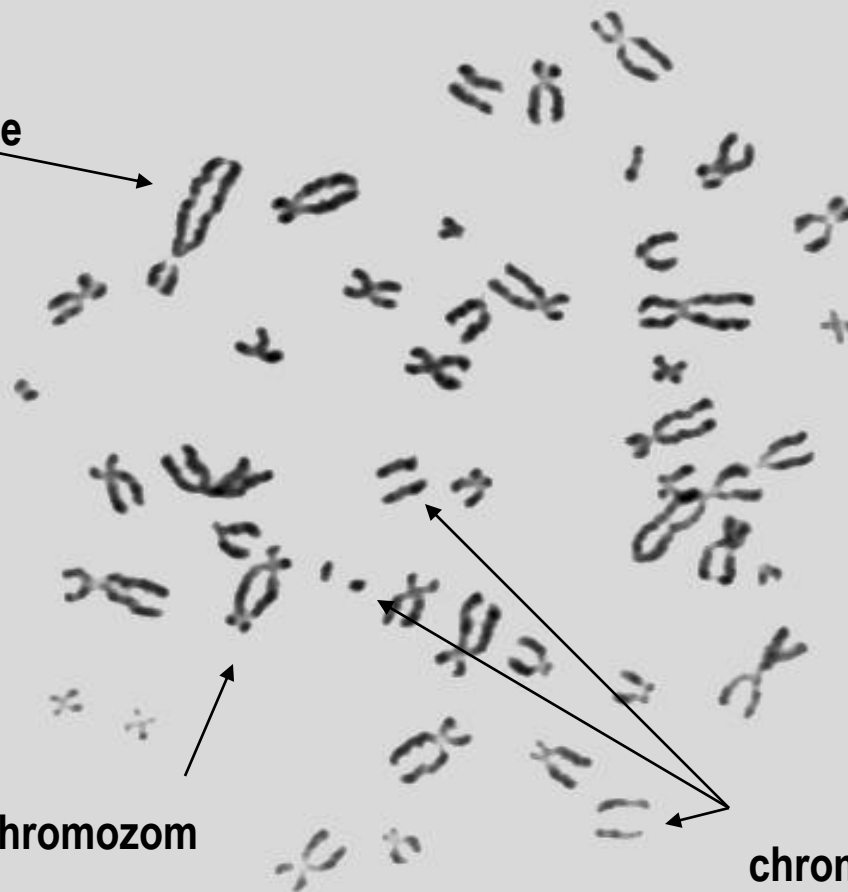
- chromatidové zlomy a výměny
- chromozomové zlomy a výměny (translokace, dicentry, ringy)



translokace

dicentrický chromozom

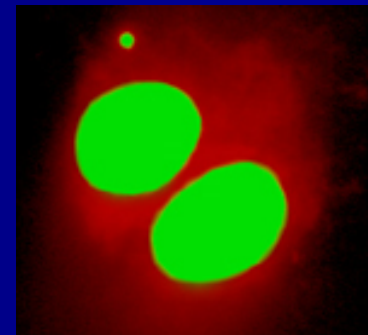
chromozomový zlom



In Vitro Micronucleus Test

OECD 487

- během dělení buněk tvorba mikrojader obsahujících nereplikující se chromozomové fragmenty (klastogenní účinek) nebo celé chromozomy, které nemigrují (aneugenní účinek)
- primární kultury, 3D modely nebo buněčné linie
- po aplikaci látky zástava cytokineze (cytochalasin)
- hodnocení **výskytu mikrojader v binukleárních buňkách**



Fototoxická

Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro

B.41 (OECD 432)

- fotoaktivní látka + světlo = toxicita
projevy – erytém, edém, pigmentace
- 8 konc. látky na dvou destičkách,
jedna ozářená 5J UVA, druhá ve tmě
- výpočet: fotoiritační faktor PIF
- porovnání cytotoxických koncentrací
látky snižujících životnost buněčné
kultury na 50% v přítomnosti a
nepřítomnosti záření

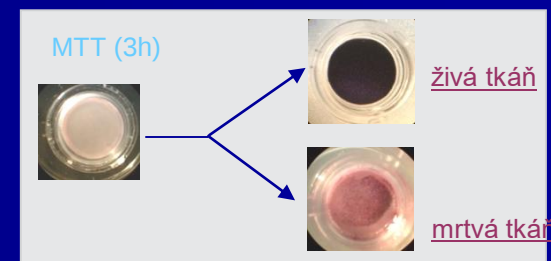
$$\text{PIF} = \frac{\text{EC}_{50}(-\text{UV})}{\text{EC}_{50}(+\text{UV})}$$

Látka je fototoxická: **PIF ≥ 5**
 Pravděpodobně fototox.: **PIF ≥ 2**



EpiDerm™ – fototoxická OECD 498

- **aplikace** 5 koncentrací látky po 4 tkáních přes noc (16 -18 hod.)
- 1/2 tkání **ozářena** solárním simulátorem netoxickou dávkou UVA 6 J/cm², 1/2 tkání ve tmě
- **oplach** tkání, **postinkubace**
- **aplikace MTT** 3 hod., extrakce , měření **absorbance** při 570 nm
- **výpočet životnosti** oproti kontrole (= 100%)



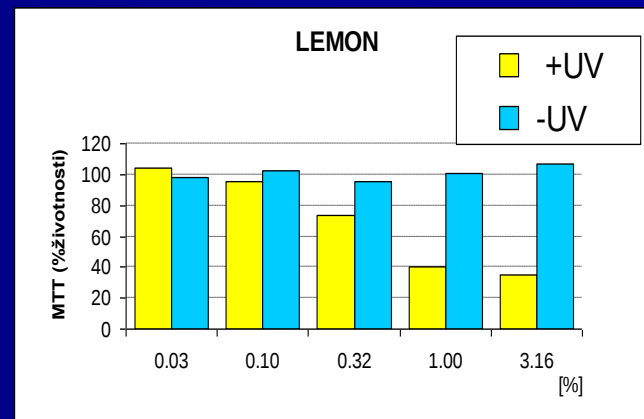
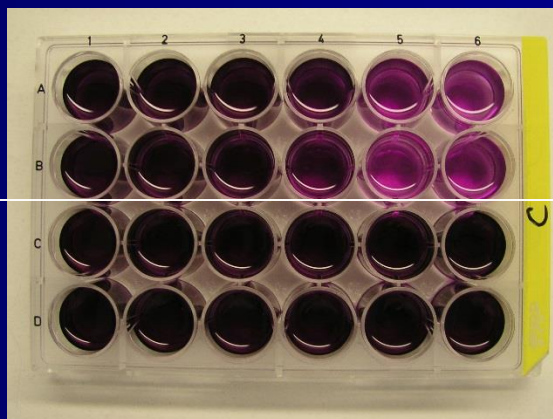
EpiDerm™ –fototoxická

Predikční model:

látko je fototoxická, pokud aspoň v jedné koncentraci po ozáření je **životnost tkání snížena nejméně o 30 %** oproti životnosti tkáně exponované stejné koncentraci, ale bez ozáření.

UV +

UV -

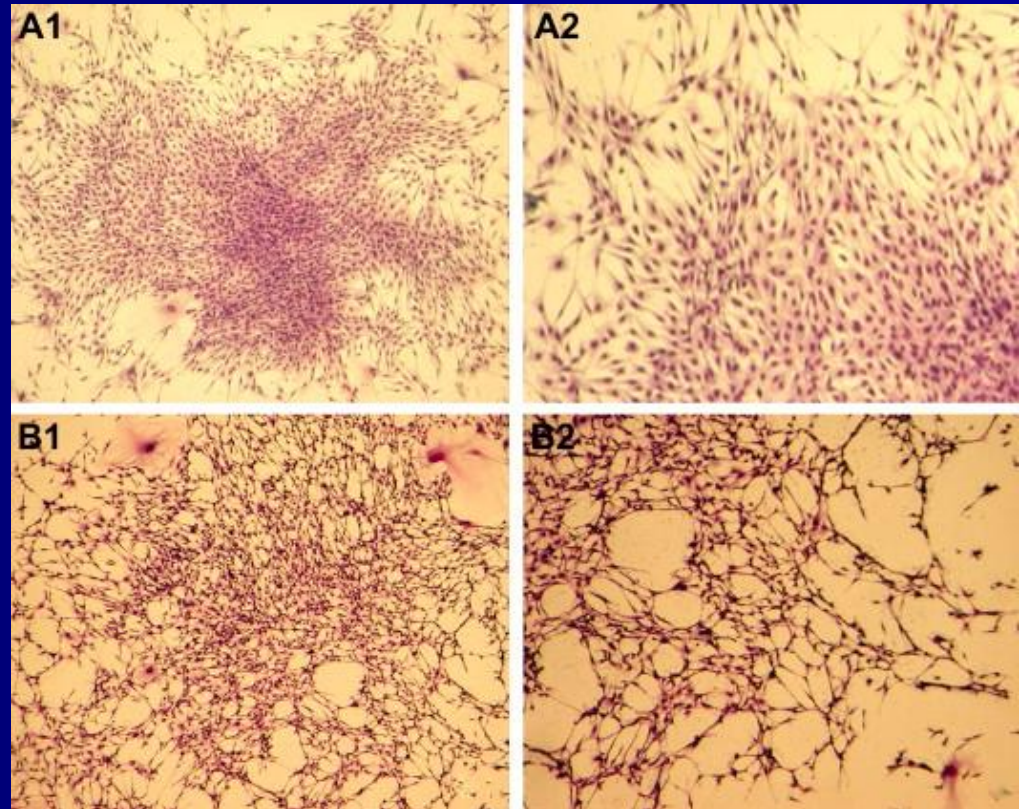


Karcinogenita

- **testy buněčné transformace**

Cell Transformation Assays (CTA) s využitím embryonálních buněk syrského křečka (SHE) a myších fibroblastů BALB/c 3T3

- morfologická transformace normálních buněk (A1, A2) v maligní ve formě kolonií (B1 a B2)

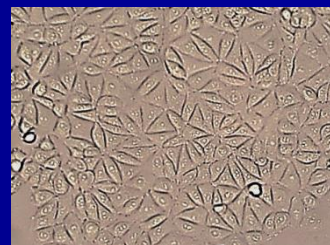


Toxicita pro rozmnožování

- zatím *in vivo* testy, 1-2 generační
- *in vitro* – aktivace specifického receptoru (estrogen, androgen agonistů a antagonistů)
- detekce reportérového genu iniciujícího produkci luciferinu

Estrogen Receptor Transactivation Assay

OECD 455 (linie buněk lidského karcinomu - aktivace luciferázového genu)

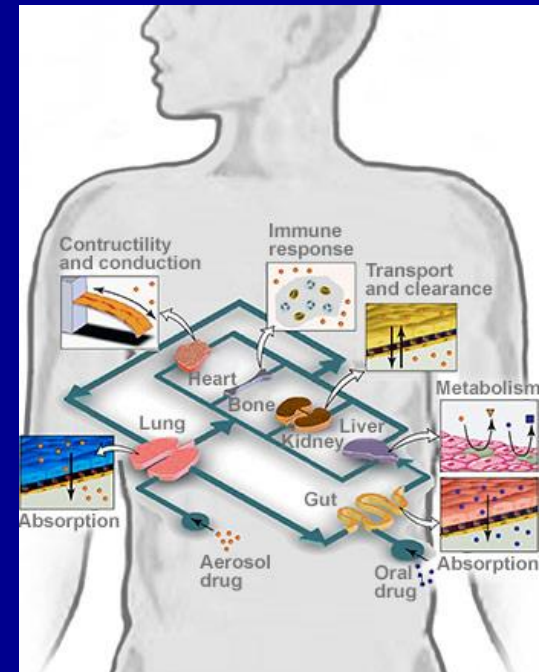
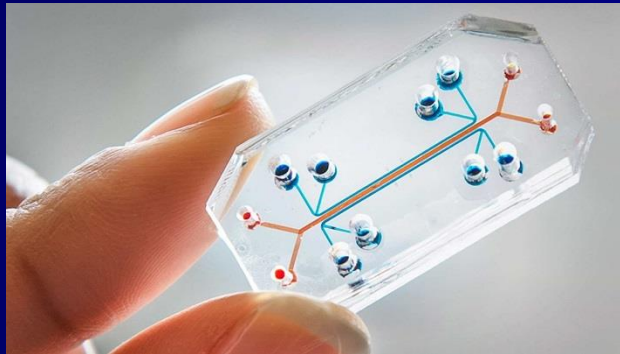


- **YES/YAS** - yeast screen pro agonisty a antagonisty (GMO kvasinky - kolorimetrická reakce při vazbě látky na receptory)



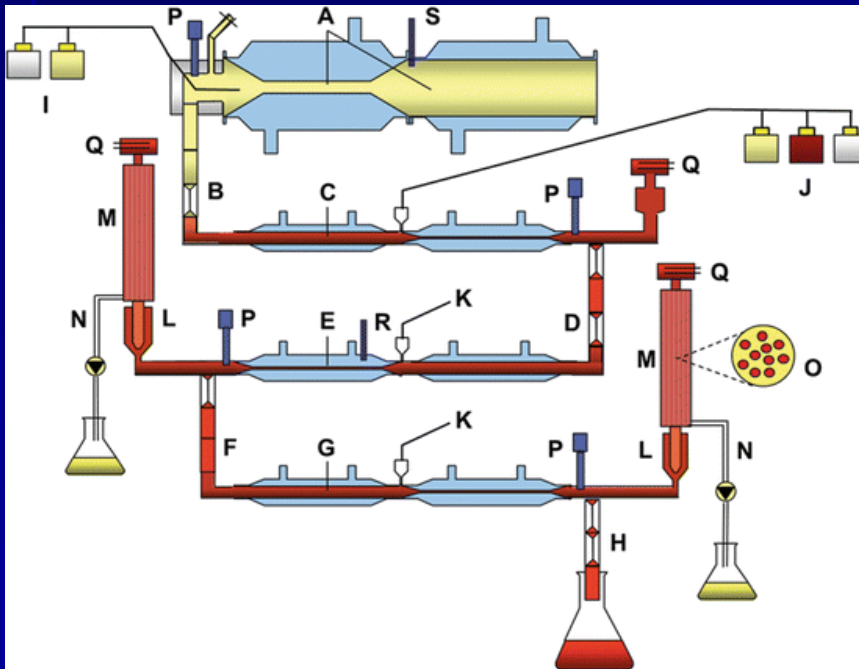
Toxikokinetika

- **ADME - absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece in vivo**
- kombinace alternativních *in silico* a *in vitro* metod
- expozice člověka převedena na koncentraci v cílových orgánech a porovnána s účinky in vitro
- Human-on -a-chip



Model simulace GIT

- TIM 1 a 2 - TNO Triskelion simulace GIT (www.triskelion.nl)



Alternativní metody a kosmetika

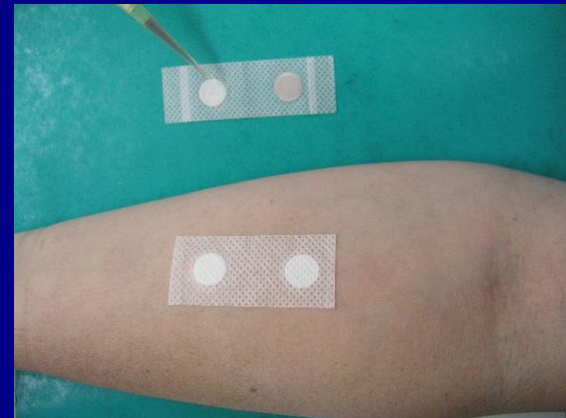
- pokusy na zvířatech při zkouškách KP i jejich ingrediencí v EU zakázány
- alternativní metody jediná možnost pro testování ingrediencí v budoucnosti
- QSAR, buněčné linie a 3D modely
- potvrzení v klinických studiích na lidských dobrovolnících

Biologické metody in vivo ve skupině dobrovolníků

- **COLIPA** (Cosmetics Europe) **Guidelines** pro hodnocení
 - bezpečnosti a funkce
 - kožní snášenlivosti
 - SPF (Sun Protection Factor)
- **etické principy biomedicínských zkoušek**
(CIOMS 2016 – Council for Int. Organizations of Medical Sciences, při WHO)
- souhlas **etické komise**
- **individuální informovaný souhlas**
- **dohled** klinických specialistů (dermatolog)

Test kožní snášenlivosti uzavřený

- aplikace SLS 2% a 5% v semiokluzi po dobu 4 hod.
- odečet reakce 30 min., 24 hod a 48 hod po odstranění testované látky



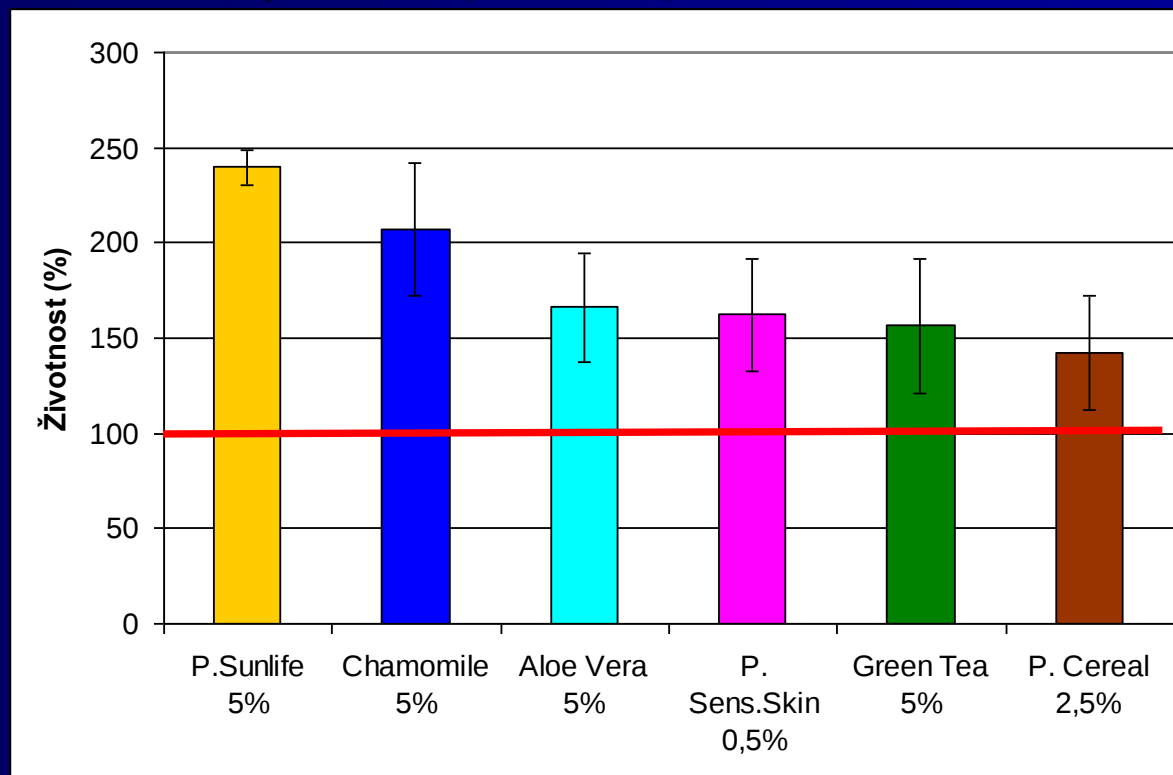
Test kožní snášenlivosti otevřený

- masážní přípravek obsahující kapsaicin
- 5 min
- 15 min
- 1 hod



EpiDerm™ - ochranné účinky ingrediencí proti SLS

- Aloe Vera, Chamomile, Pronalen Sunlife, Pronalen Sensitive Skin, Green Tea, Pronalen Cereal
- 3D model EpiDerm, SLS 0,75%

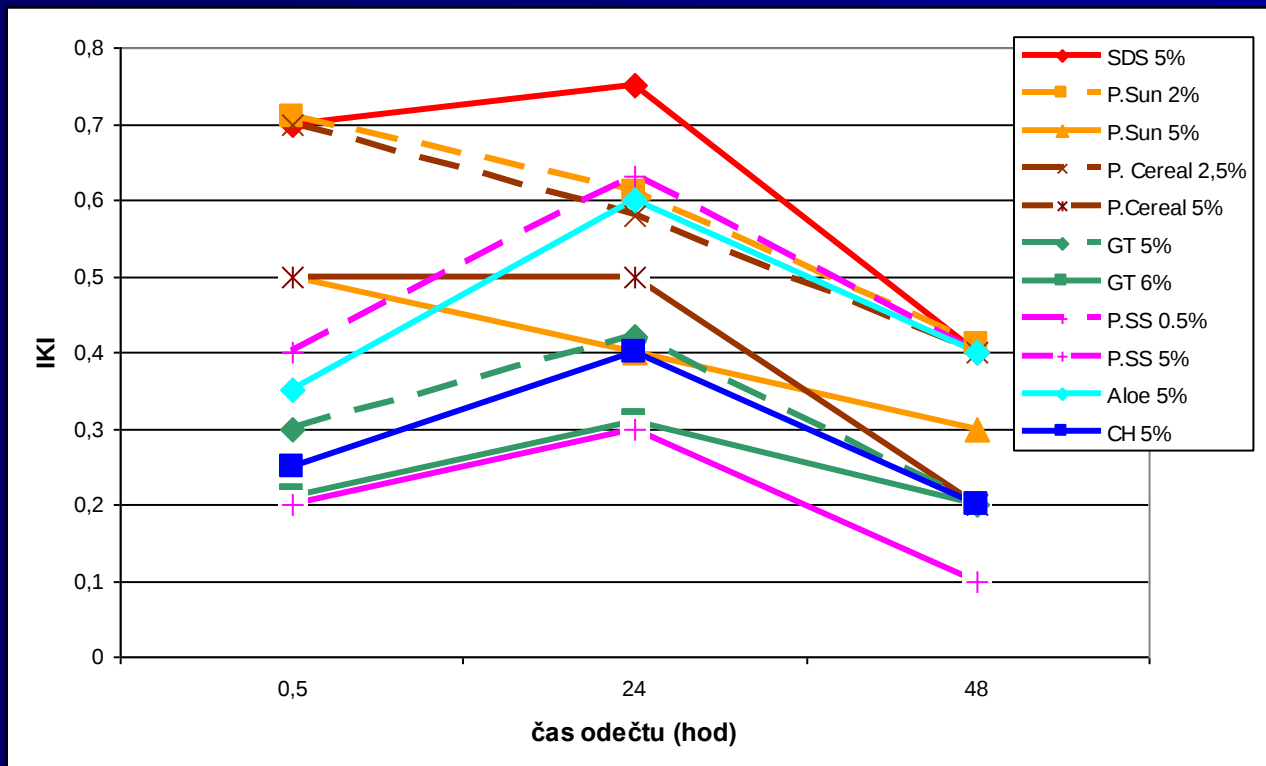


Klinická studie - ochranné účinky ingrediencí proti SLS

- potvrzení výsledků in vitro v klinické studii
- jednorázový uzavřený epikutánní test
- skupina 20 dobrovolníků
- aplikace samotného SLS a SLS v kombinaci s ingrediencemi v koncentracích doporučených výrobcem na 4 hodiny
- odečet reakcí (erytém, edém) po 0.5, 24 a 48 hod
- výpočet IKI – Index kožní iritace, průměrné skóre reakcí pro celou skupinu dobrovolníků

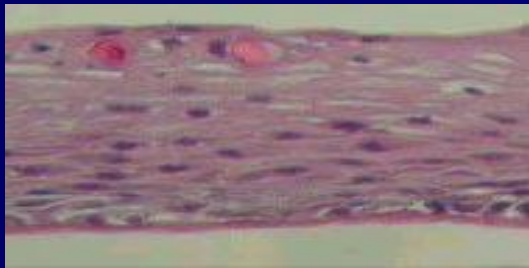
Klinická studie - ochranné účinky ingrediencí proti SLS

- nejvýraznější snížení indexu kožní iritace (IKI) u Pronalenu Sensitive Skin, Green Tea a Chamomile



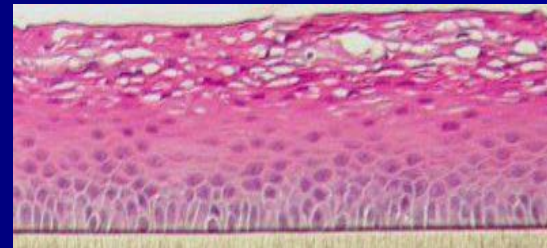
3D modely tkání (MatTek) pro zkoušení KP

EpiOral, EpiGingival

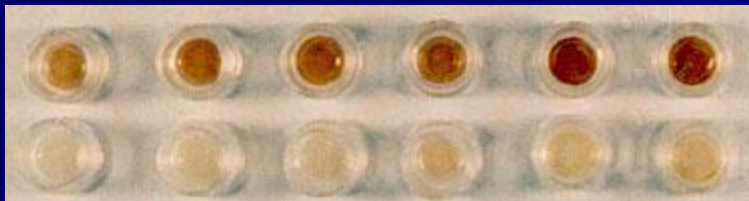


iritace pro sliznice

EpiVaginal



prostředky pro intimní hygienu



MelanoDerm

bělení / tmavnutí kůže

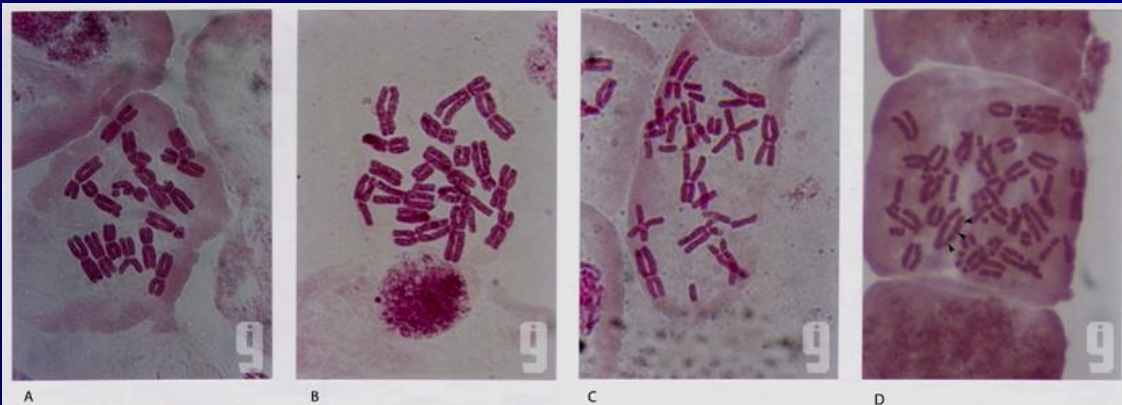
Ekotoxikologie a alternativy

Hierarchická baterie testů

- **sladkovodní řasy** (ovlivnění růstových parametrů kultury, trvání testu: min 72 hodin) např. *Vibrio fischeri*
- **vyšší rostliny** (klíčivost, trvání testu: 72 hodin), test na semenech hořčice bílé (*Sinapis alba*)
- **sladkovodní bezobratlí** (ovlivnění pohyblivosti, úhyn, trvání testu: 48 hodin), Zkouška inhibice pohyblivosti *Daphnia magna* (C.20/OECD TG 211)
- **sladkovodní ryby** (úhyn, trvání testu: 96 hodin)
Stanovení akutní letální toxicity látek pro sladkovodní ryby (*Poecilia reticulata* nebo *Danio rerio*)
- *konvenční testy toxicity na živém organismu*

Test *Allium cepa* (cibule)

- toxicita (inhibice růstu a počtu kořínků)
- genotoxicita (hodnocení chromozomů z vrcholu kořínků - růstový meristém)
- levné, není potřeba úprava vzorků před zkoušením



Fish Embryo Test (FET)

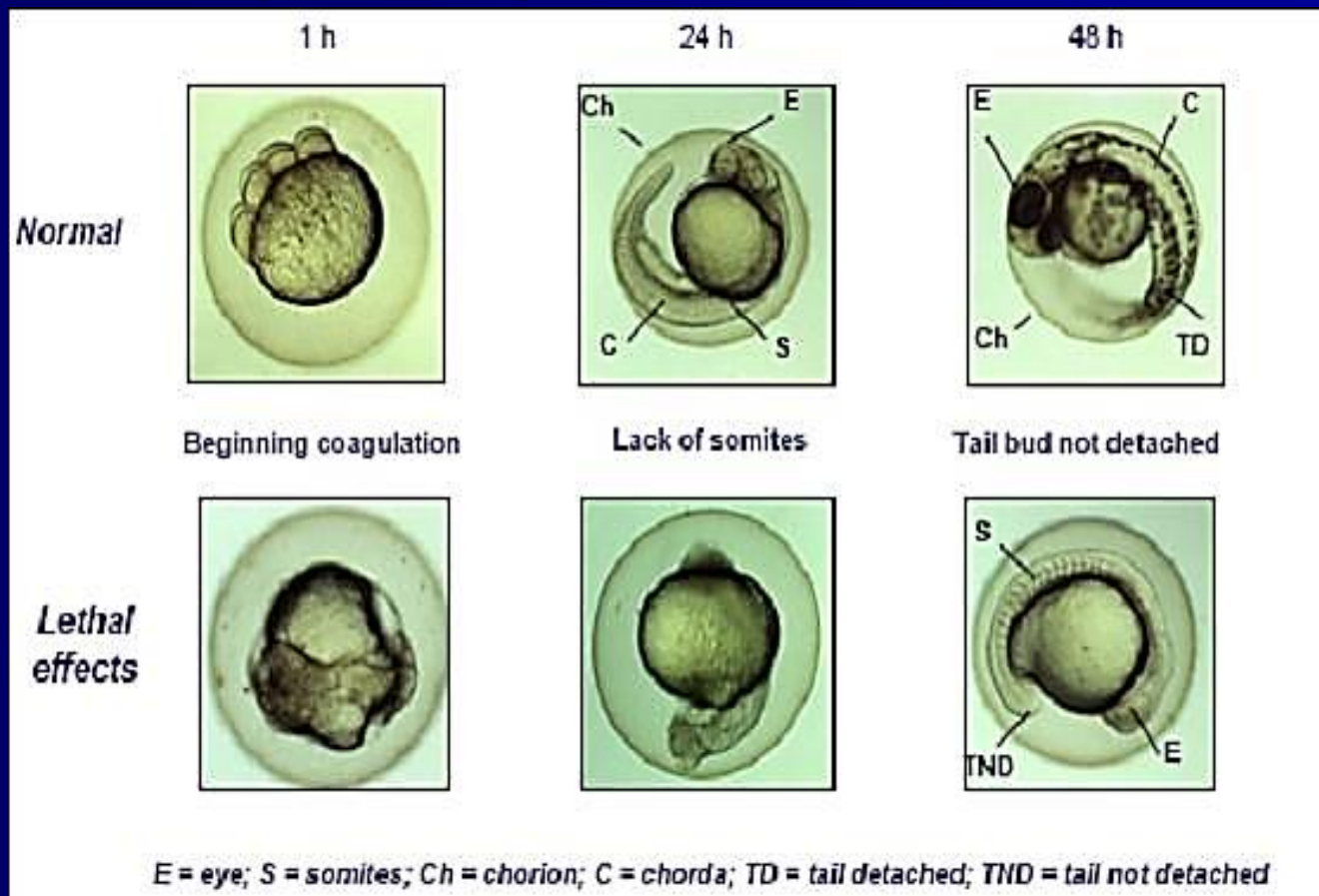
(C.49/OECD 236)



- fertilizované jikry *Danio rerio* (zebrafish)
- doba trvání 96 hod, tj. do 2/3 vývoje embryí (replacement)
- indikátory toxicity: koagulace embryí, poruchy vývoje ploutví, ocasu a srdečního tepu
- stanovení LC50 (koncentrace způsobující změny u 50% embryí)
- vysoká korelace s konvenčním testem akutní toxicity na rybách

Fish Embryo Test (FET)

Indikátory toxicity



Ekotoxicitá a alternativy

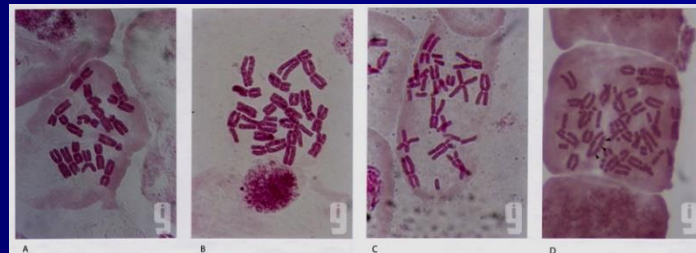
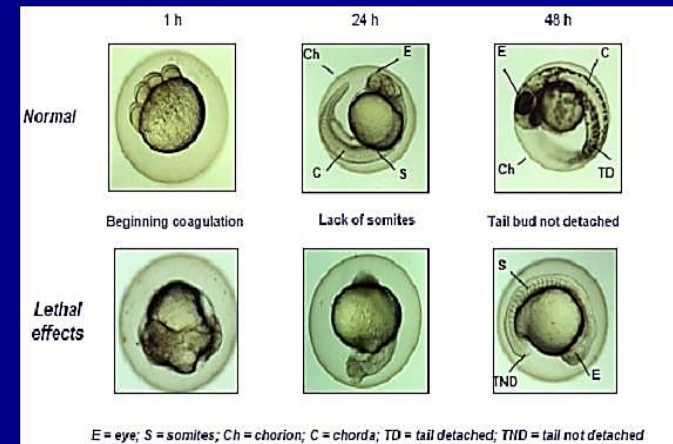
■ **hierarchie: sladkovodní řasy** (např. *Vibrio fischeri*), **vyšší rostliny** (klíčivost semen hořčice bílé), **sladkovodní bezobratlí** (inhibice pohyblivosti *Daphnia magna*), **sladkovodní ryby** (akutní letální toxicita)

■ **Fish embryo toxicity test (FET test)**

- fertilizovaná vejce danio rerio
- koagulace embryí, poruchy vývoje ploutví, ocasu a srdečního tepu

■ **Allium cepa test**

- toxicita (inhibice růstu a počtu kořínků)
- genotoxicita (hodnocení chromozomů z vrcholu kořínků - růstový meristém)



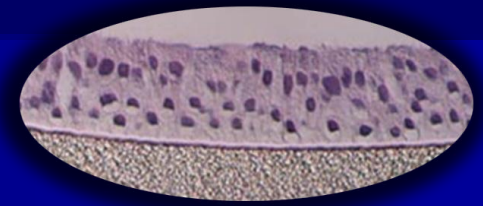
Alternativy v základním výzkumu

- **žádné předpisy na použití zvířat či alternativ**
- důležitá je znalost dostupných a vývoj nových metod pro nahrazení zvířat v základním výzkumu
- použití k ověření účinku látek před pokusem na zvířeti vede k redukci počtu zvířat
- nové technologie (výroba monoklonálních protilátek in vitro)
- použití izolovaných orgánů (např. řezy mozku nebo aorty)
- primární kultury či imortalizované buněčné linie
- komerčně dostupné modely membrán a tkání (kůže, oči, tenké a tlusté střevo, dýchací cesty)

3D modely lidských tkání

- **EpiAirway (MatTek)**

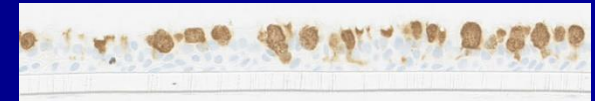
- tracheální/bronchiální epithelium



EpiAirway Tissue Model

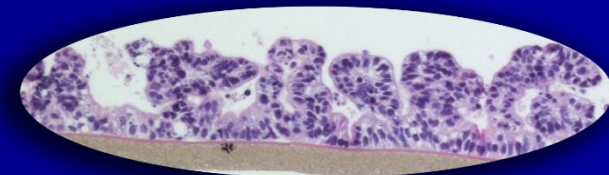
- **MucilAir, Small Air (Epithelix)**

- nazální/tracheální/bronchiální epithelium



- **EpiIntestinal (MatTek)**

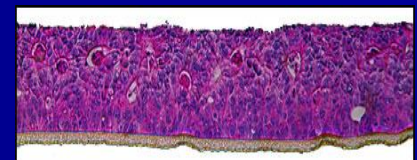
- intestinální epithelium + fibroblasty



EpiIntestinal Tissue Model

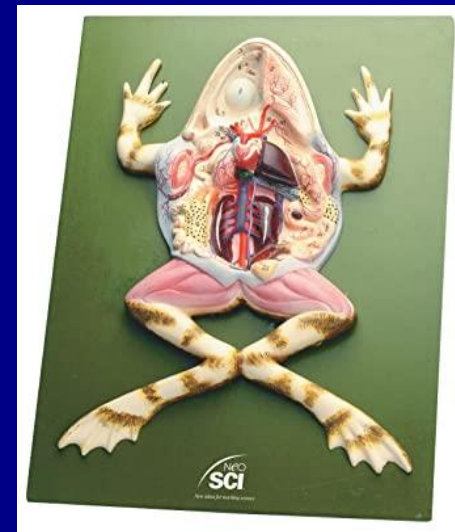
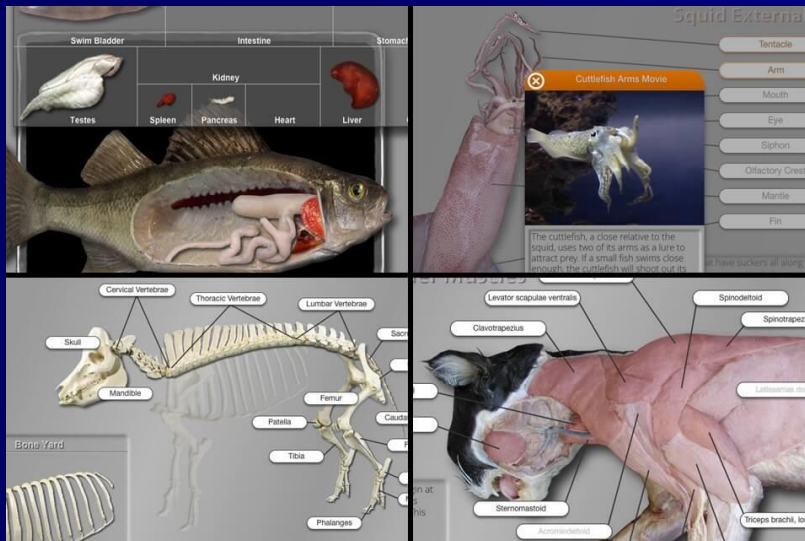
- **Colon epithelium (Sterlab)**

- epithelium tlustého střeva



Alternativy ve školství

- studenti by neměli být nuceni k pokusům na zvířatech
- interaktivní virtuální záznamy pitvy
- 3D modely, videa and diagramy



Výhody alternativních metod

- screening i klasifikace hazardu u vysokého počtu látek v krátkém časovém intervalu bez použití zvířat (**replacement**)
- umožňují použít buňky lidského původu nebo transgenní buňky nesoucí lidské geny, mají vyšší relevanci pro člověka než pokus na zvířatech bez validace (metody volby)
- testy *in vitro* jsou standardizovány, probíhají za kontrolovaných podmínek, je omezena variabilita mezi experimenty
- alternativní metody poskytují cennou informaci před případnými testy na zvířatech, což umožní snížit počet zvířat v pokusech nebo omezit strádání (**reduction, refinement**)

Zdroje informací

- <https://jeodpp.jrc.ec.europa.eu/ftp/jrc-opendata/EURL-ECVAM/datasets/DBALM/LATEST/online/dbalm.html/>
- <http://oecd.org>
- <http://mattek.com>
- <http://iivs.org/testing-services>
- <https://norecopa.no>