

Ověření bezpečnosti látek metodami in vitro

RNDr. Hana Bendová, Ph.D.

Státní zdravotní ústav

Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10

2.12.2019

Toxikologické zkoušky - účel / cíle

- ✓ **Zjištění** nebezpečných vlastností u nových chemických látek
- ✓ **Ověření** bezpečnosti ingrediencí spotřebních výrobků

Ingredience => chemické látky - **syntetické / přírodní**

Zákaz testů na zvířatech k průkazu bezpečnosti / funkce => využívání metod *in vitro*

- finální výrobky - **11.9.2004**
- ingredience - **11.3.2009**
- tox. po opak dávce / tox. pro reprodukci / toxikokinetika - **11.3.2013**

I látky a výrobky, přinášející benefit pro člověka, je povinnost zkoušet a ověřovat jejich bezpečnost při orální / dermální / inhalační expozici.

Toxikologické zkoušky - metody zkoušení

Konvenční pokusy - na zvířatech (obratlovcích): metody volby bez vědecké validace

Alternativní metody dle 3R: validované / vědecky uznané za validní
Princip 3R (Russell & Burch, 1959)

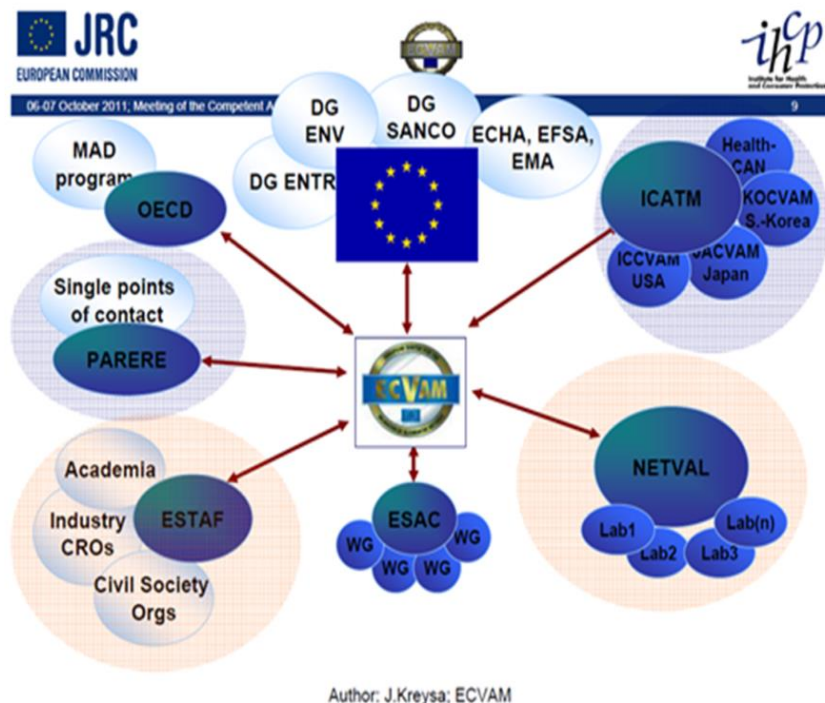
- **Reduction** => snížení počtu zvířat v pokusu
 - **Refinement** => zmírnění postupů - omezení bolesti, utrpení a strachu
 - **Replacement** => náhrada jiným testem bez použití zvířat
 - ✓ **in vitro** - buněčné kultury, rekonstruované tkáně
 - ✓ **ex vivo** - izolované zvířecí / lidské tkáně a orgány
 - ✓ **in silico** - počítačové simulace, QSAR, matematické modely
- Nařízení EP a Rady (ES) č. 1907/2006, o registraci, hodnocení, povolování a omezování chemických látek, **REACH** (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals)
 - Nařízení Komise (ES) č. 440/2008, kterým se stanoví zkušební metody

REACH

Rozsah toxikologických zkoušek dle objemu uváděného na trh

1-10 t/rok	typ pokusu	toxicita pro rozmnožování	konv. /Repl.
akutní toxicita orální	Red. / Ref.	toxikokinetika	konv.
žíravost a dráždivost pro kůži	Repl.	100 - 1000 t/rok	typ pokusu
oční dráždivost	Repl.	toxicita po opakované dávce 90 denní (subchronická)	konv.
senzibilizace kůže	Red./ Ref. / Repl.	reprotoxicita	konv.
mutagenita / genotoxicita in vitro	Repl.	více než 1000 t/rok	typ pokusu
10 - 100 t/rok	typ pokusu	karcinogenita	konv.
akutní toxicita dermální / inhalační	konv.	toxicita po opakované dávce ≥ 12 měsíců (chronická)	konv.
toxicita po opakované dávce 28 denní (subakutní)	konv.		

Globální spolupráce při validaci alternativních metod



ECVAM

European Center for Validation of Alternative Methods

OECD

Organization for European Economic Cooperation

PARERE

Network for Preliminary Assessment of Regulatory Prevalence

ESTAF

ECVAM Stakeholder Forum

ESAC

ECVAM Scientific Advisory Committee

NETVAL

European Union Network of Laboratories for Validation of Alternative Methods

ICATM

International Cooperation on Alternative Test Methods

Směrnice 2010/63/EU

o ochraně zvířat používaných pro vědecké účely

Povinnosti ČS

- zajistit podporu alternativních přístupů a šířit informace o nich;
- určit jediné kontaktní místo pro poskytování poradenství v právní závaznosti a vhodnosti alternativních přístupů (sít PARERE);
- navrhnout EK specializované a kvalifikované laboratoře k zavedení a kvalifikaci alternativních metod (sít NETVAL).

Státní zdravotní ústav - Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti

=> kontaktní místo do PARERE a specializovaná laboratoř pro NETVAL

=> experti CTZB => Vědecký výbor Evropského centra pro validaci alternativních metod EK (EURL-ECVAM, JRC); odborné skupiny a výbory OECD , ECHA

Toxikologické zkoušky

- Cytotoxicita pro odhad akutní toxicity
- Dráždivost pro kůži EpiDerm (OECD TG 439)
- Dráždivost pro kůži HPT
- Dráždivost pro oči (rohovka) EpiOcular (OECD TG 492)
- Dráždivost pro oči (spojivka) HET-CAM test
- Absorpce kůží *in vitro* (OECD TG 428)
- Mutagenita (OECD TG 471) - Cytogenetická analýzy periferních lymfocytů krve (CAPL)
- Endokrinní disrupce - YES/YAS test
- Sensibilizace LuSens (OECD TG 442D)
- Fototoxicita 3T3 NRU *in vitro* (OECD TG 432)
- Mutagenita - zkouška na reverzní mutace s bakteriemi - AMES test (OECD TG 471)

Cytotoxicita pro odhad akutní toxicity

- 8 koncentrací testované látky => 48 h expozice => barvení neutrální červení => měření životnosti fluorimetricky
- z 8 koncentrací výpočet IC50 => snížení životnosti na 50 % negativní kontroly
- výpočet teoretické hodnoty LD50

$$\log \text{LD50 (mg/kg)} = 0.372 \log \text{IC50 (}\mu\text{g/ml)} + 2.024$$

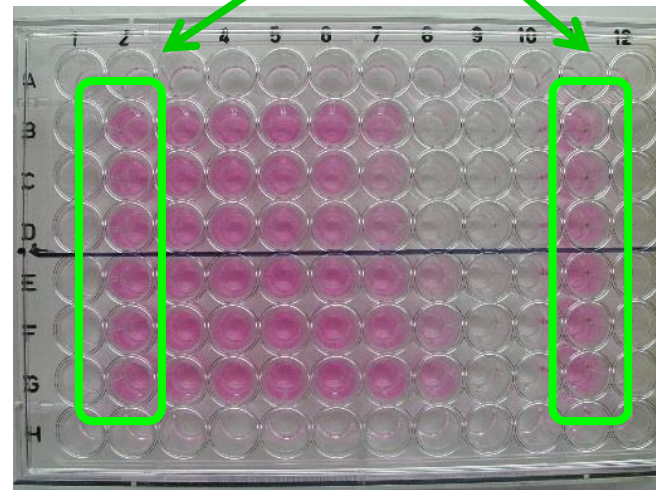
Požadavek: **>2000 mg/kg**

=> není-li splněno => jiná metoda !!!

testovaná látka

pozitivní kontrola

negativní kontrola



Dráždivost pro kůži EpiDerm OECD TG 439

- lidské epidermální keratinocyty od 1 dárce, metabolicky aktivní
- aplikace látky 60 minut => 42 h post-inkubace => barvení MTT (žluté barvivo enzymaticky přeměněné na modrý formazan)

Životnost $> 50 \%$ negativní kontroly: nedráždí

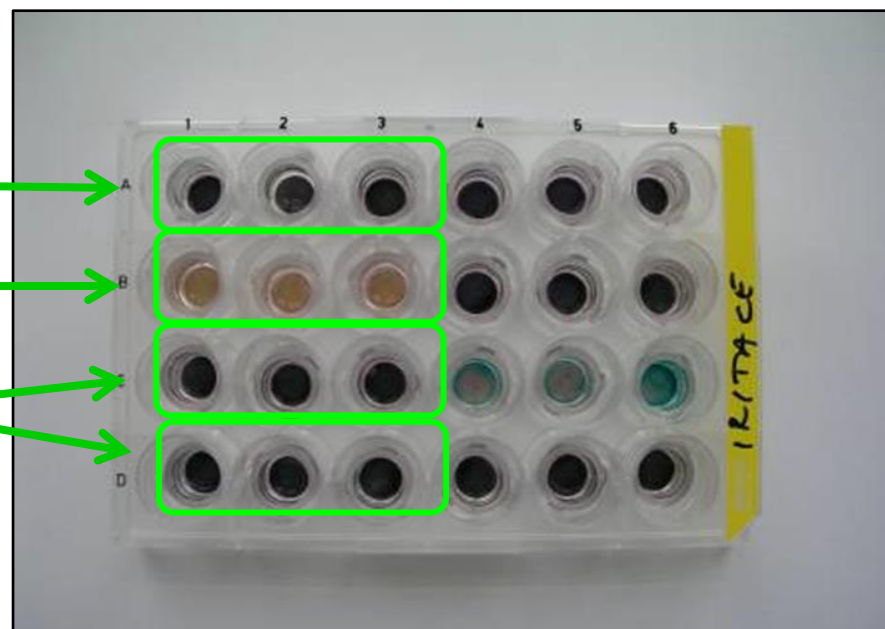
Životnost $\leq 50 \%$ negativní kontroly: dráždí



negativní kontrola

pozitivní kontrola

testované látky



Dráždivost pro kůži HPT - Human Patch Test

- ✓ Mezinárodní směrnice pro biomedicínský výzkum (CIOMS, 2002)
- ✓ Souhlas etické komise testovacího zařízení
- ✓ Výběr osob - princip dobrovolnosti
- ✓ Podpis individuálního informovaného souhlasu
- ✓ Kritéria pro zařazení/vyřazení do/ze studie
- ✓ Metodika: (Cosmetic Product Test Guidelines for Assessment of Human Skin Compatibility, Colipa, Bruxelles 1997)
- ✓ Postup testu: Doba expozice 24 hodin první den, druhý až pátý den 6 hodin každý den. Odečet je prováděn před každou aplikací a osmý den po první aplikaci.
- ✓ Systém klasifikace: erytém/suchost/edém



Dráždivost pro oči (rohovka) EpiOcular OECD TG 492

- lidské keratinocyty: skvamozní epitelium modelující rohovku králíka
- aplikace 30 minut => 12 minut zalití médiem => 2 h post-inkubace => barvení MTT (žluté barvivo enzymaticky přeměněné na modrý formazan)

Životnost > 60 % negativní kontroly: nedráždí

Životnost = 60 % negativní kontroly: dráždí



EpiOcular



králičí rohovka

Dráždivost pro oči (spojivka)

HET-CAM test

- fertilizovaná vejce (8 - 10 dní) => aplikace látek na membránu
- sledování změn (5 minut) - hemoragie, lýza, koagulace
- výpočet iritačního skóre
- stupeň iritace: žádná / lehká / mírná / silná iritace

$$IS = 5 \cdot (301\text{-sec H}) / 300 + 7 \cdot (301\text{-sec V}) / 300 + 9 \cdot (301\text{-sec C}) / 300$$

H = hemoragie, V = vazokonstrikce cévy, C = krevní koagulace

kategorie

nulový iritant

IS <0,0 - 0,9>

slabý iritant

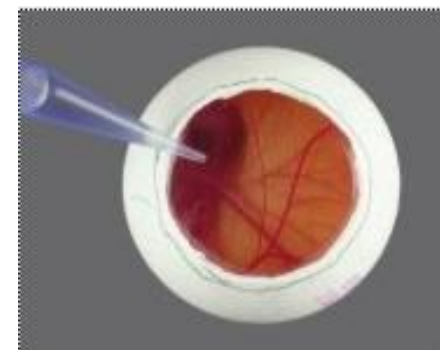
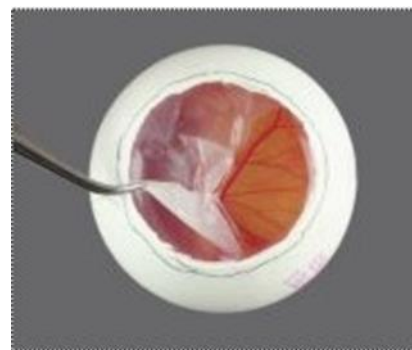
IS <1,0 - 1,9>

střední iritant

IS <5,0 - 8,9>

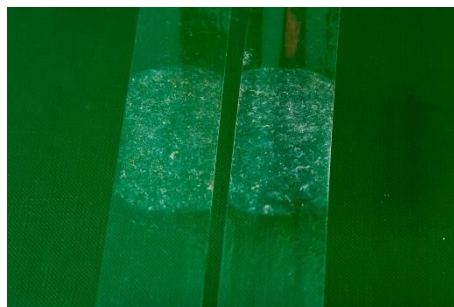
silný iritant

IS <9,0 - 21,0>



Absorpce kůží in vitro OECD TG 428

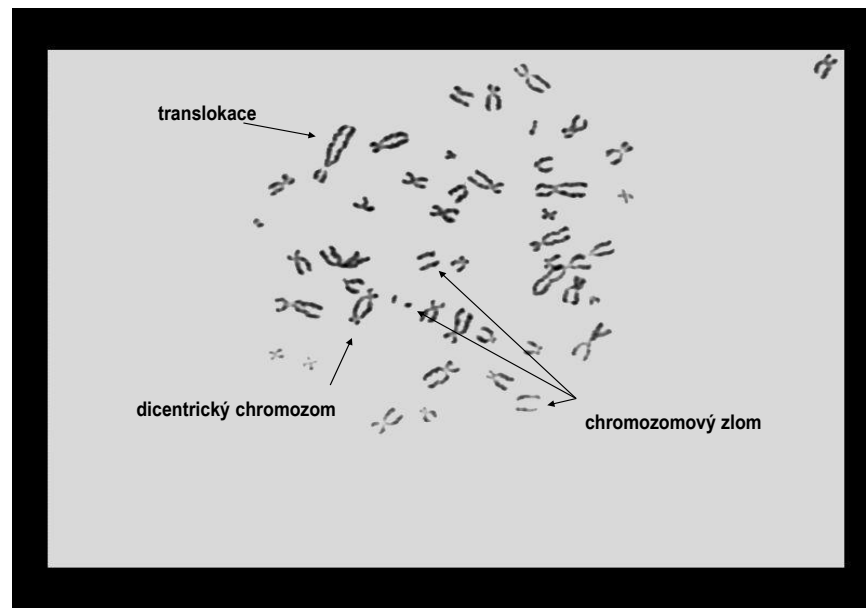
prasečí kůže (prasečina) => aplikace na 24 h => stripování =>
zpuchýřování (oddělení epidermis od dermis) => rozklad vzorků =>
analýza (např. ICP, HPLC, spektrofotometrie,...)



Mutagenita (OECD TG 471)

Cytogenetická analýza periferních lymfocytů krve (CAPL)

- odběr žilní krve do vakutaineru s heparinem
- kultivace krve (kultivační médium - stimulace buněčného dělení), po dobu 50 h, 37 °C
- poslední 2 h přidán kolchicin - zastavuje buněčné dělení
- zpracování kultur => hemolýza erytrocytů => 3 fixace =>
- krevní nátěr na sklo => barvení 5% Giemsa-Romanowski
- mikroskopické hodnocení (zvětšení 1000x)



Endokrinní disrupce ISO 19040-1:2018

Xenoscreen YES/YAS test pro detekci estrogenních a androgenních disruptorů s
využitím GMO *Saccharomyces cerevisiae*

- 2 geneticky modifikované kmeny *S. cerevisiae*
- Inkorporované geny pro hERα a hAR
- 48 hodin inkubace, exprese enzymu => barevná změna
- 4 toxikologické cíle:
 1. agonistická aktivita na estrogenový receptor
 2. antagonistická aktivita na estrogenový receptor
 3. agonistická aktivita na androgenový receptor
 4. antagonistická aktivita na androgenový receptor

pozitivní kontrola



LuSens OECD TG 442D

Stanovení potenciálu sensibilizace

- *In vitro* test s využitím buněčné linie lidských keratinocytů
- GMO linie buněk => obsahuje luciferázový gen, který se při navázání sensibilizátoru exprimuje a vzniká luminiscence = luminiscenční záření
- expozice 48 hodin (2 paralelní stanovení) => vyhodnocení indukce luciferázové aktivity (luminometr) a vyhodnocení % životnosti s využitím MTT (spektrofotometr)

Látka sensibilizuje pokud jsou alespoň v jedné testované koncentraci splněny podmínky:

Indukce luminiscence $\geq 1,5$ x oproti negativní kontrole

zároveň

Životnost ≥ 70 % oproti negativní kontrole

Fototoxicita 3T3 NRU in vitro OECD TG 432

8 konc. látky → 2 destičky

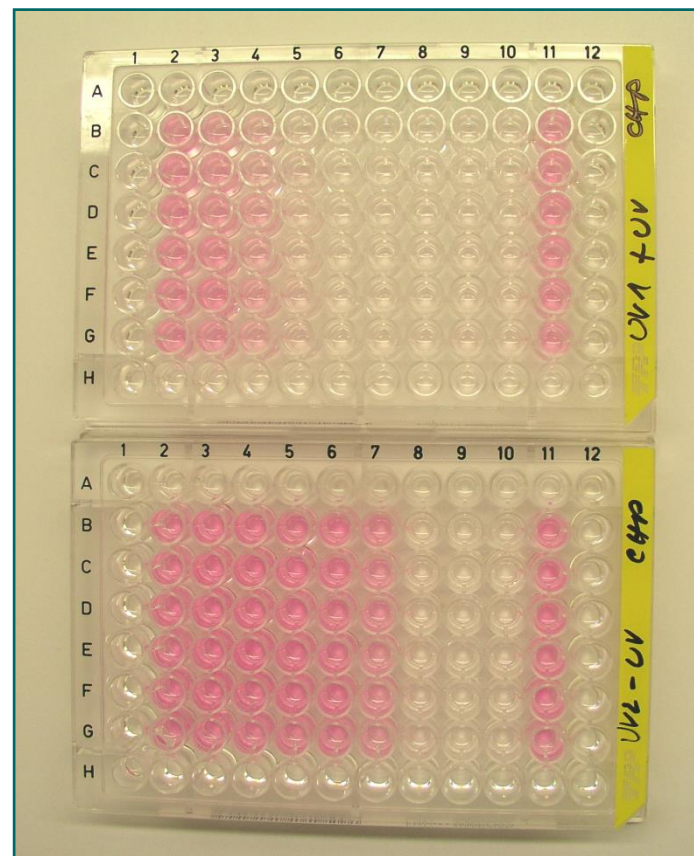
fotoiritační faktor "PIF"
(cytotoxické konc. látky snižující
životnost buněčné kultury na 50%
v přítomnosti a nepřítomnosti záření)

$$\text{PIF} = \frac{\text{EC50}(-\text{UV})}{\text{EC50}(+\text{UV})}$$

Látka je fototoxická: $\text{PIF} \geq 5$

Pravděpodobně fototoxická: $\text{PIF} \geq 2$

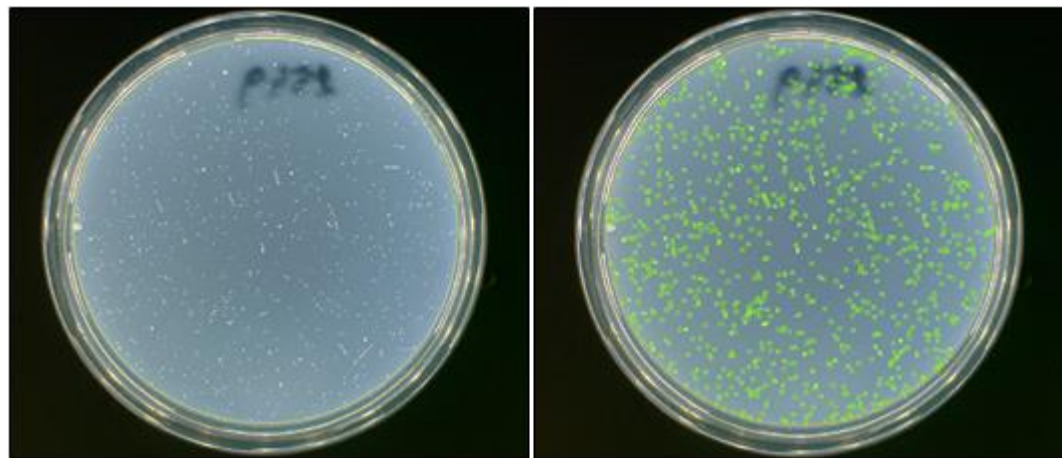
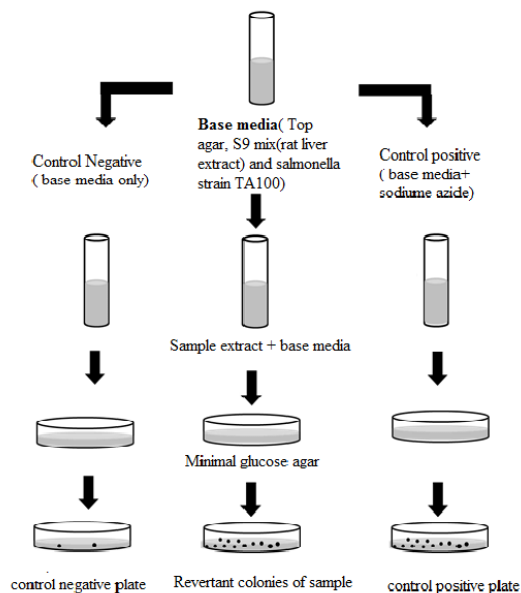
+ UVA (5J)



- UVA

Mutagenita AMES test OECD TG 471

- kmeny *Salmonella typhimurium* - mutace v genech, které se podílejí na syntéze histidinu => vyžadují externí zdroj histidinu
- sleduje se schopnost testované látky způsobit reverzní mutaci => růst bakterie bez externího histidinu
- antimikrobiální látky nelze testovat



zkouška	AlFC	ZnFC	AgMMT	AgNOS/NOS
Akutní toxicita	876 mg/kg	910,8 mg/kg	370,7 mg/kg	2247,7 mg/kg
Kožní dráždivost EpiDerm	dráždí (as such) 1% / 0,1% nedráždí	nedráždí	nedráždí	nedráždí nedráždí
Kožní dráždivost (HPT)	nedráždí	nedráždí	nedráždí	nedráždí nedráždí
Oční dráždivost EpiOcular	dráždí	dráždí	nedráždí	nedráždí nedráždí
Oční dráždivost HET-CAM	nedráždí	-	nulový iritant	nulový iritant nulový iritant
Absorpce kůží	nepenetruje	nepenetruje	nepenetruje	Ag omezeně v epidermis a dermis v RF nebyl detekován

zkouška	AlFC	ZnFC	AgMMT	AgNOS/NOS
Mutagenita	negativní	negativní	je genotoxický v konc. 100 µg/ml	negativní
Endokrinní disrupce	negativní	1. negativní 2. slabě pozitivní 3. negativní 4. slabě pozitivní	negativní	negativní
Sensibilizace	pozitivní	negativní	negativní v konc. 0,005 - 5 µg/ml	pozitivní 250-500 µg/ml 15,3-62,5 µg/ml
Fototoxicita	fototoxický	fototoxický	-	-
AMES test	pozitivní 4 kmeny negativní, 1 kmen pozitivní	negativní	-	-

Děkuji za pozornost

RNDr. Hana Bendová, Ph.D.

MUDr. Dagmar Jírová, CSc.

RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.

Mgr. Markéta Dvořáková, Ph.D.

Mgr. Lada Svobodová

RNDr. Lucie Kašparová

RNDr. Marian Rucki, Ph.D.

Mgr. Lucie Jedličková

