

Toxikologické testování chemických látek bez použití zvířat

RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.

**Oddělení alternativních toxikologických
metod, NRC pro kosmetiku, 3R Centrum ČR
Státní zdravotní ústav Praha**



Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti - Oddělení alternativních toxikologických metod

- vývoj, validace a implementace alternativních toxikologických metod *in vitro* a *in silico* (QSAR)
- mezinárodní validační studie (MatTek - model EpiDerm a EpiOcular, dráždivost, fototoxicita, BASF-kDPRA, ECVAM - thyroidní disrupce)
- vědecká činnost (granty, REDEALTOX 140 mil. Kč)
- hodnocení bezpečnosti spotřebních výrobků (KP), chemických látek, zdravotnických prostředků
- systém kvality akreditace ČIA i SLP
- normotvorná činnost (ISO, OECD, CEN)

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 – 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)

Chemické látky - REACH

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

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

Kožní leptavost/dráždivost - *in vitro*

Oční dráždivost - *in vitro*

Sensibilizace kůže - *baterie in vitro (AOP a Defined Approach)*

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*

Kožní leptavost/dráždivost

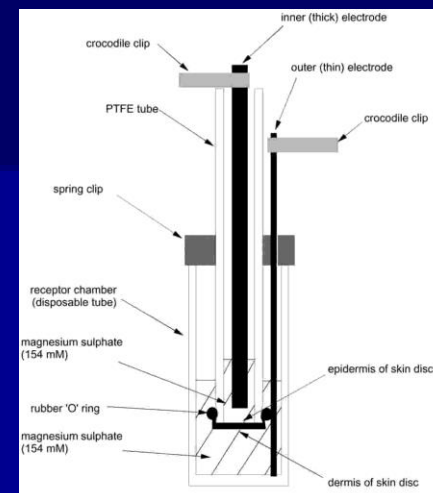
- **Corrosion**
- **Transcutaneous Electrical Resistance Test Method (TER)**, OECD 430 (2000, revised in 2013 and 2015 by OECD)
- **Corrositex - In Vitro Membrane Barrier Test Method**, OECD 435 (2006, revised in 2015)
- **Reconstructed Human Epidermis Test Method (RHE)** (includes more than one protocol), OECD 431 (2000, revised in 2013, 2015 and 2016 by OECD)
- **Irritation**
- **Reconstructed Human Epidermis Test Method (RHE)** (includes more than one protocol), OECD 439 (in EU 2009 and in OECD 2010, revised in 2013 and 2015 by OECD)

Transcutaneous Electrical Resistance TER (OECD TG 430)

- 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 $\mu\text{g}/\text{disk}$ pozitivní)



In Vitro Membrane Barrier Test Method (OECD TG 435)

- **VRM Corrositex®**
- syntetická makromolekulární biobariéra a chemický detekční systém
- 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

1A

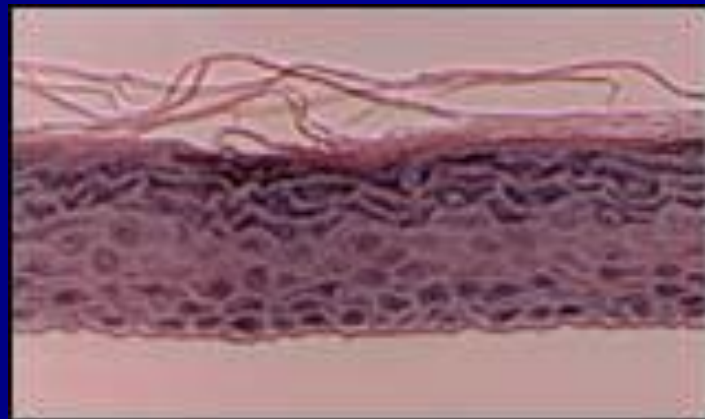
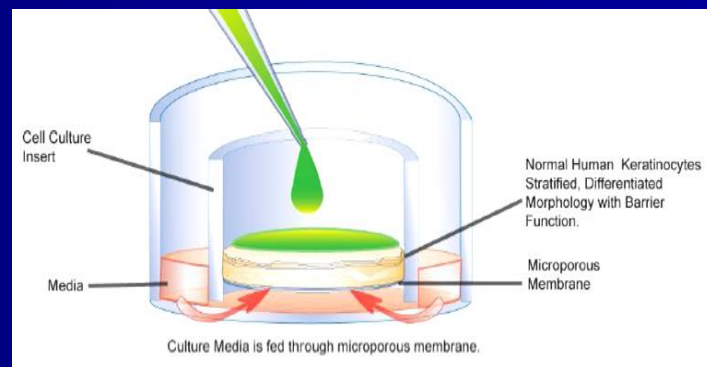
1B

1C

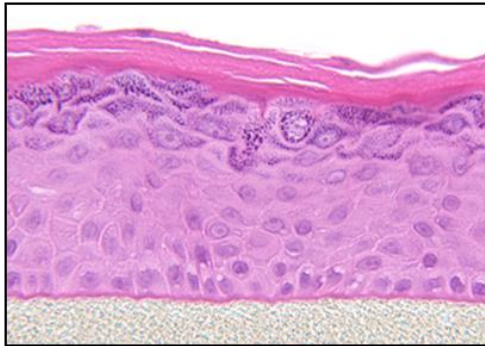
Leptavost a dráždivost pro kůži

3D modely lidské epidermis

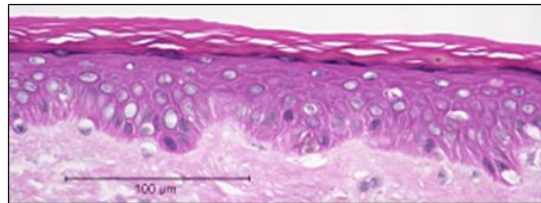
- **EpiDerm** (MatTek, USA, SK)
- normální lidské epidermální keratinocyty od 1 dárce, metabolicky aktivní
- 8-12 vrstev epidermis včetně bazální, spinózní a granulární vrstvy
- 10-15 vrstev stratum corneum
- **zkoušky:**
 - **leptavost** (OECD 431)
 - **dráždivost** (OECD 439)
 - **fototoxická** (OECD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



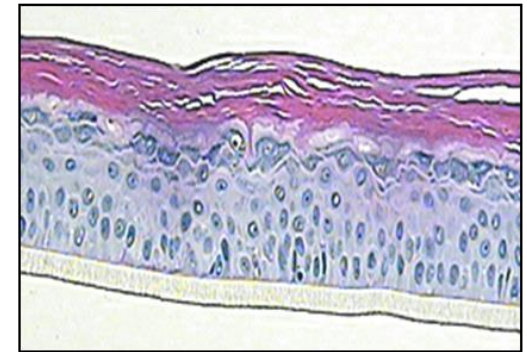
***In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Models Validated for Regulatory Purposes**



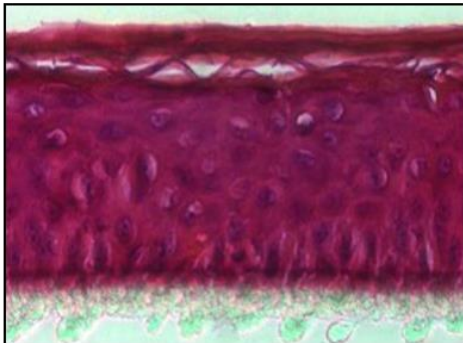
MatTek Corp. EpiDerm™ (EPI-200)



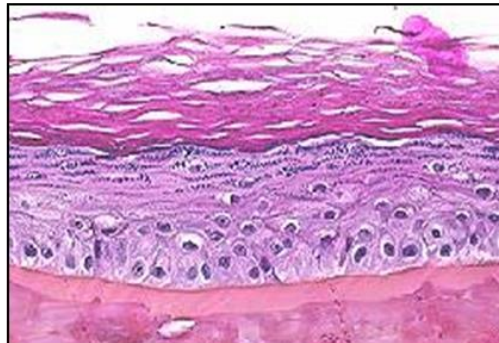
Native human skin



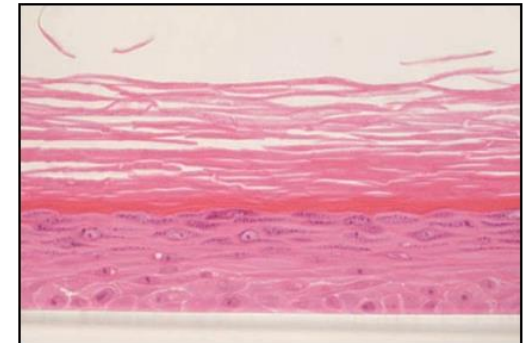
SkinEthic™ RHE



Cell Systems epiCS®



EpiSkin™ (SM)

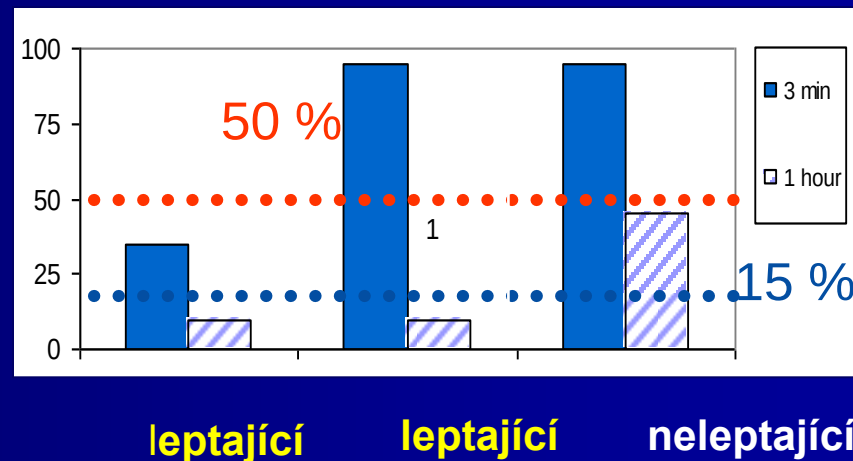
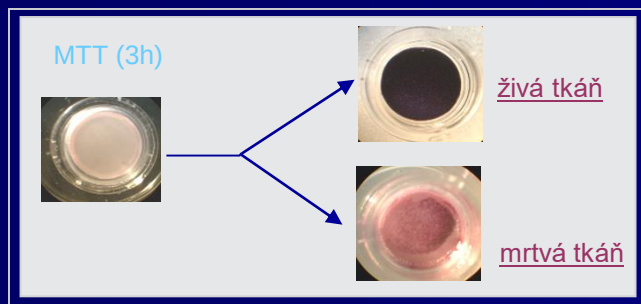


J-TEC LabCyte EPI-MODEL

Leptavé účinky na kůži - EpiDerm (OECD TG 431)

- aplikace látky 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)



Dráždivé účinky na kůži - EpiDerm (OECD TG 439)

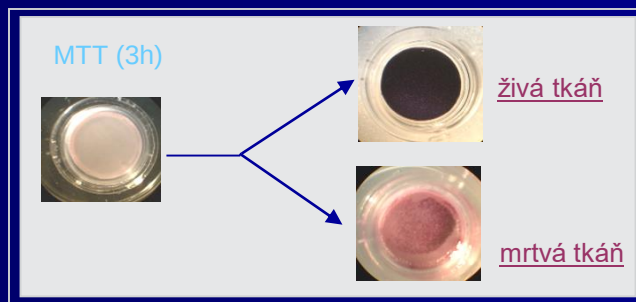
60 MINUT
EXPOZICE

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

Predikce:

Životnost > 50% negativní kontroly: nedráždí

Životnost ≤ 50% negativní kontroly: dráždí

Oční dráždivost

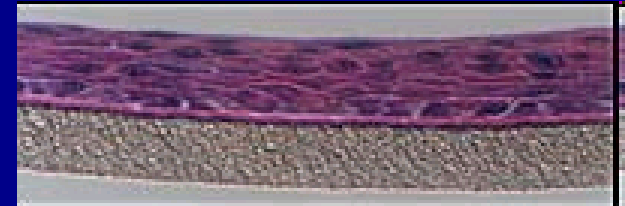


- **Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test**, OECD TG 492 (2024)
- Reconstructed Human Cornea-like Epithelium Time-To-Toxicity (RhCE-TTT) test, OECD TG 492B (2024)
- **Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test**, EU B.47, OECD TG 437 (2023)
- **Isolated Chicken Eye (ICE) test**, EU B.48, OECD TG 438 (2023)
- **Fluorescein leakage (FL) test**, OECD TG 460 (2023)
- **Short Time Exposure (STE) test**, OECD TG 491 (2023)
- Eye Irritancy Test (EIT) test, OECD TG 494 (2021)
- In vitro macromolecular test method, OECD TG 496 (2024)

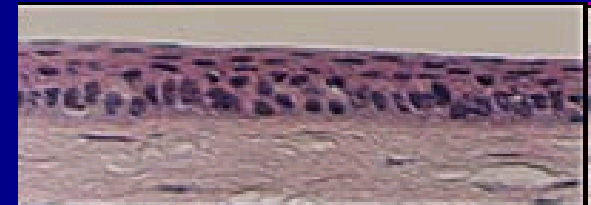
3D modely rohovky

(OECD TG 492)

- VRM **EpiOcular** (MatTek, USA), SkinEthic (F), LabCyte CORNEA-MODEL24 (J) a MCTT HCE (JK)
- 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



EpiOcular

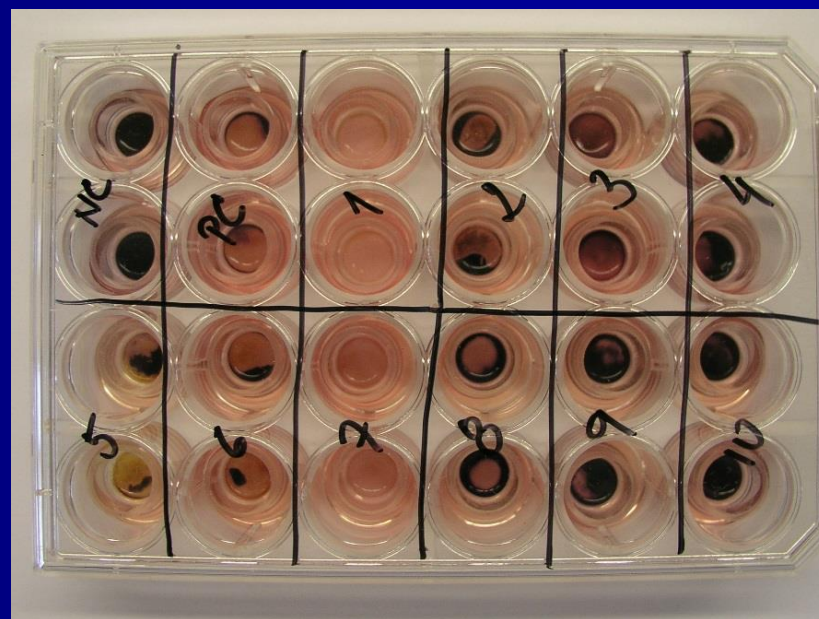


Králičí rohovka

Oční dráždivost – EpiOcular

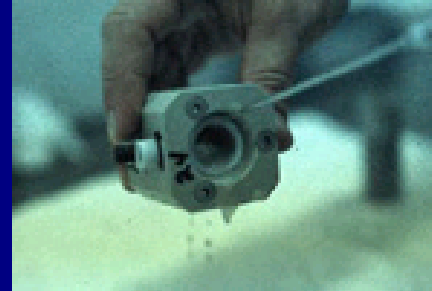
- aplikace tekutých i tuhých látek, nerozpustných ve vodě
- aplikace 30 min liquids, 6 h solids, post-incubace 120 min/ 18 hodin, MTT

Predikce: **cut-off 60%**
životnost oproti kontrole

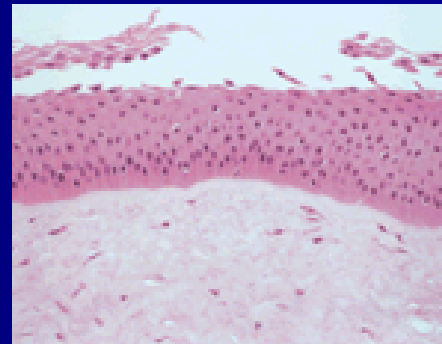


Bovine Cornea Opacity/Permeability BCOP (OECD TG 437)

- bovinní rohovka - čerstvě izolovaná po odběru z jatek
- aplikace 750 μ l a oplach
- měření zakalení (opacita)
- permeabilita pro fluorescein (90 min expozice)
- histologie



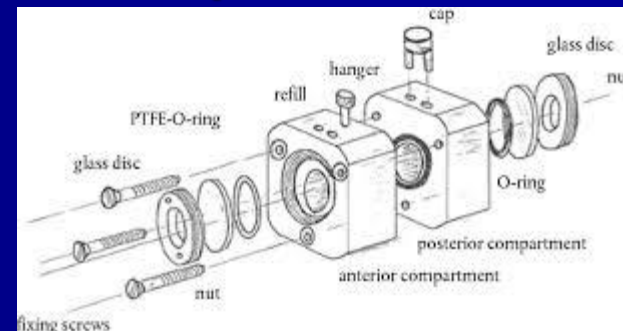
oplach a měření
na opacitometru



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

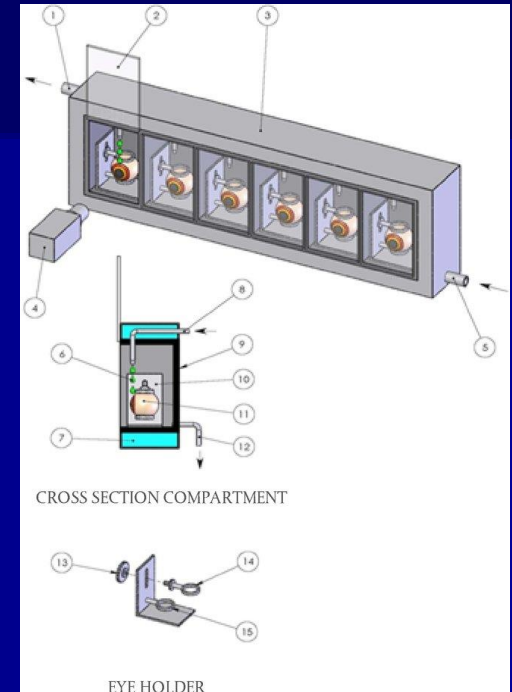
Isolated Chicken Eye ICE

(OECD TG 438)

- kuřecí bulvy z jatek
- 10 s expozice látce
- 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

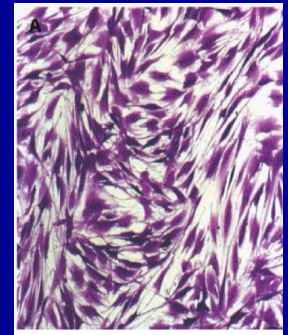


Short Time Exposure

(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 cells (**SIRC**) v 96j destičce
- 5 min expozice látce v 5% a 0,05% koncentraci
- barvení MTT



Predikce:

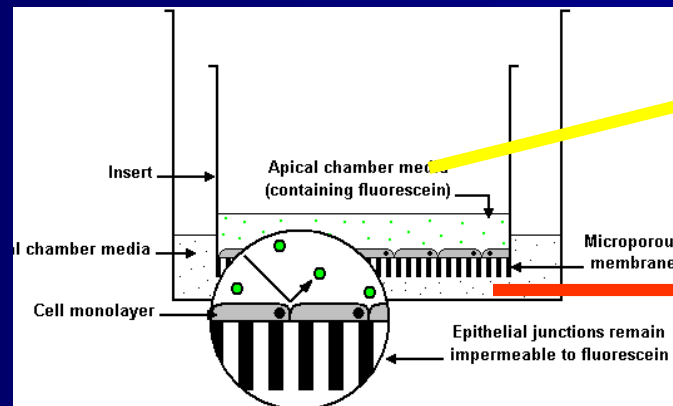
- UN GHS Cat. 1 - $\leq 70\%$
- UN GHS No Category - $> 70\%$
- nelze odlišit Cat. 2A a 2B

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 (OECD TG 460)

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

Predikce: pokud $FL_{20} \leq 100 \text{ mg/ml}$ - UN GHS 1 (corrosive /severe irritant), není potřeba dál testovat



Fluorescein v mediu

Měření průniku pod monolayer

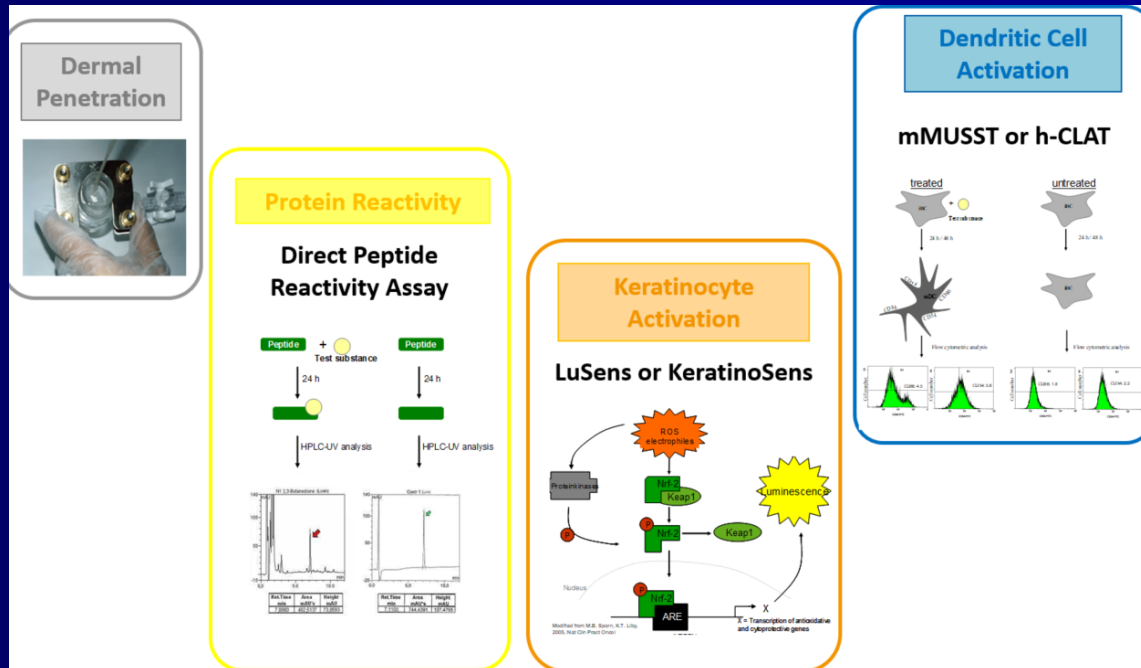
Kožní sensibilizace

- **Test method OECD 442C** – Key Event-Based Test Guideline for in chemico skin sensitisation assays addressing the Adverse Outcome Pathway Key Event on Covalent Binding to Proteins (adopted 2015, updated 2021)
- **Test method OECD 442D** – Key Event-Based Test Guideline: in vitro skin sensitisation assays addressing the AOP key event on keratinocyte activation (adopted 2015, updated 2018)
- **The test method – OECD 442E** – Key Event-Based Test Guideline: in vitro Skin Sensitisation assays addressing Key Event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation (adopted 2017, updated 2018)
- **Guideline - OECD 497** – Guideline on Defined Approaches for Skin Sensitisation (adopted 2021).

Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitization (OECD, 2014)

Klíčové body (Key Events) pro vznik sensibilizace:

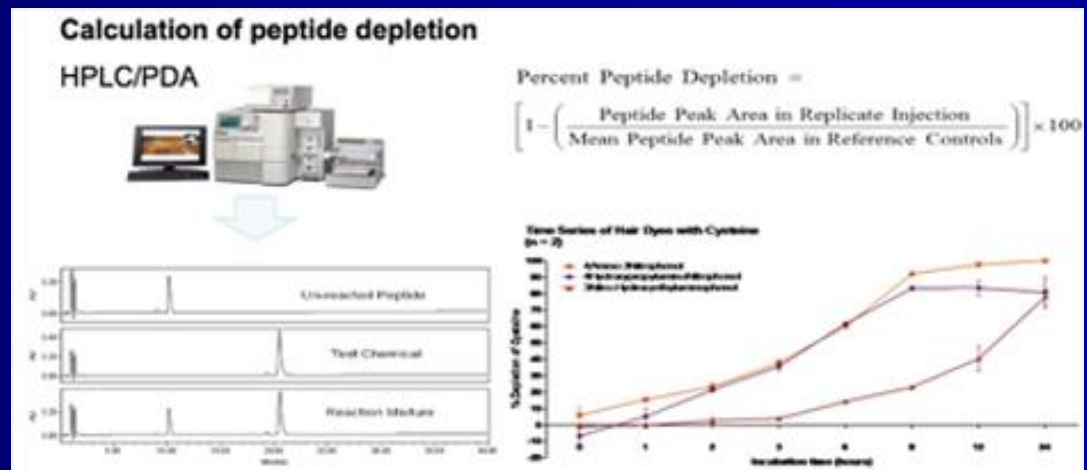
- kovalentní vazba na proteiny
- aktivace keratinocytů
- aktivace dendritických buněk



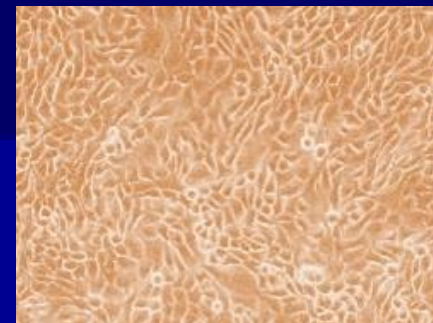
Senzibilizace kůže - DPRA (OECD TG 442C)

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

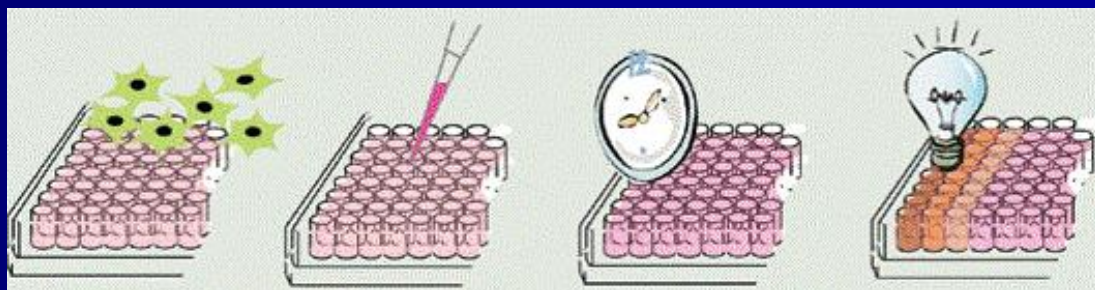
vs.
nesenzibilizující
<6,38 %



Senzibilizace kůže - LuSens (OECD TG 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



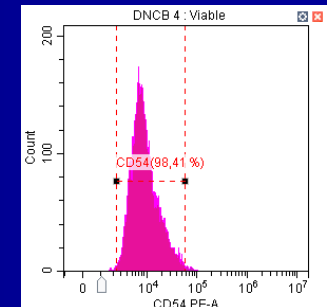
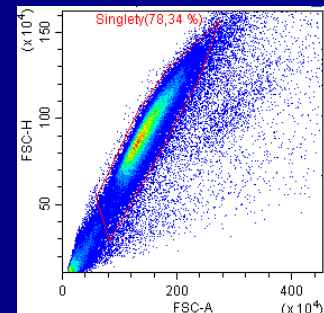
Predikce: senzibilizující potenciál: $SI \geq 1,5$
životnost $\geq 70 \%$

Senzibilizace kůže - h-CLAT (OECD TG 442E)

- **h-CLAT** (Human Cell Line Activation Test) - kvantifikace exprese markerů aktivace lidských dendritických buněk průtokovou cytometrií (fluorescenční značky)

Predikce senzibilizace:

- $CD54 \geq 150\%$
- $CD86 \geq 200\%$



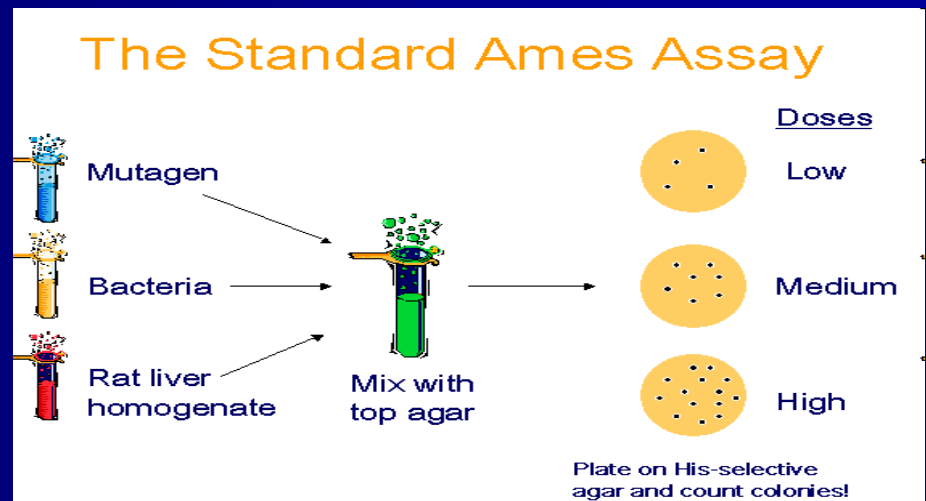
- baterie in vitro testů predikční model 2 ze 3 (Defined Approach OECD TG 497, 2021)

Genotoxicita/mutagenita

- **Bacterial Reverse Mutation Test**, OECD TG 471 (adopted in 1983; revised in 1997, 2020)
- **In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test**, OECD TG 473 (adopted in 2016)
- **In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**, OECD TG 487 (adopted in 2010; revised in 2014, 2016, 2023)
- Transgenic rodent (TGR) somatic and germ cell gene mutation assays, OECD TG 488 (adopted in 2011; revised in 2013, 2020, 2022)
- Mammalian Erythrocyte Pig-a Gene Mutation Assay, OECD TG 470 (adopted in 2022)

Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (AMES test) (OECD TG 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



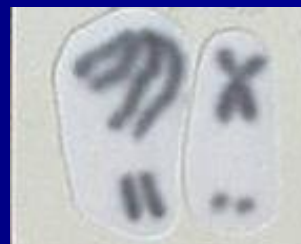
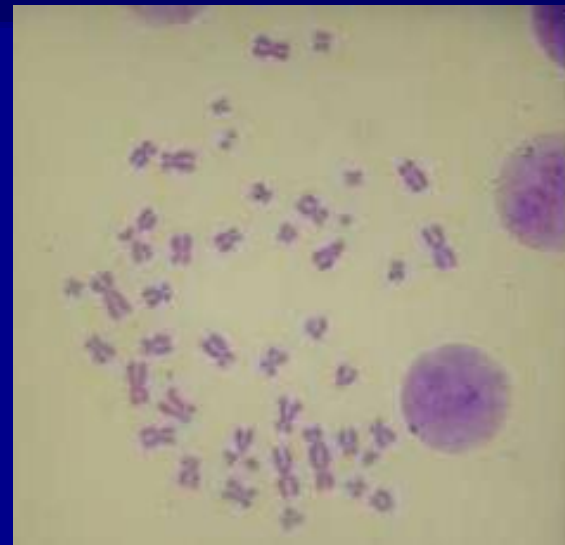
Zkouška na reverzní mutace s bakteriemi (AMES test)

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



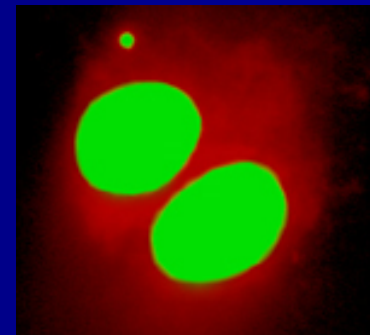
Zkouška na chromozomové aberace u savců *in vitro* (OECD TG 473)

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



In Vitro Micronucleus Test (OECD TG 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**

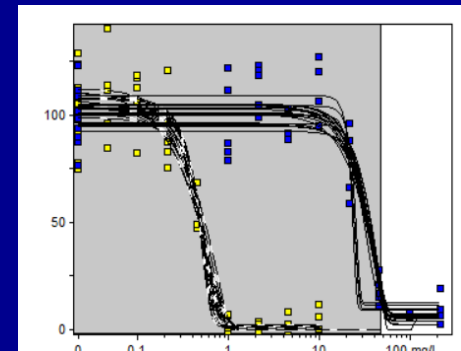


Zkouška fototoxicity 3T3 NRU in vitro (OECD TG 432)

- 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

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

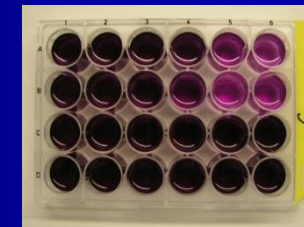
Látka je fototoxická: **PIF $\geq$ 5**
Pravděpodobně fototox.: **PIF $\geq$ 2**



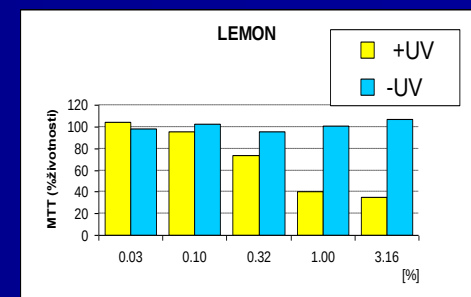
Fototoxická na modelech kůže (OECD TG 498)



- aplikace 5 koncentrací látky na model EpiDerm
- 1/2 tkání ozářena solárním simulátorem netoxickou dávkou UVA 6 J/cm², 1/2 tkání ve tmě
- oplach, postinkubace, barvení MTT
- výpočet životnosti oproti kontrole



Predikce fototoxicity: snížení životnosti nejméně o 30% v +UV pokusu oproti -UV pokusu alespoň v jedné koncentraci



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 pokuse nebo omezit strádání (**reduction, refinement**)

Děkuji za pozornost.

RNDr. Kristina Kejlová, Ph.D.
Státní zdravotní ústav Praha
tel. +420 267082327
e-mail: kristina.kejlova@szu.cz