



HLAS ALTERNATÍVNYCH METÓD NA SLOVENSKU

Reportáž z konferencie TOXCON 2019
sekcia: Implementácia princípov 3R na Slovensku

V dňoch 26. – 28. 06. 2019 sa konala už 24. toxikologická konferencia s medzinárodnou účasťou [TOXCON](#). Konferenciu každoročne organizuje [Slovenská toxikologická spoločnosť SETOX](#), [Centrum experimentálnej medicíny Slovenskej akadémie vied \(SAV\)](#) a [Česká společnost pro experimentální a klinickou farmakologii a toxikologii](#). Tento rok boli sekcie TOXCONu venované *in vitro* toxikológii (testovacie metódy, ktoré využívajú tkanivové a bunkové kultúry), nanotoxikológii a farmatoxikológii, ekotoxikológii, ale aj cytotoxicite, genotoxicite a mutagenite. Po prvýkrát však bola celá jedna sekcia venovaná aj praktickému zavedeniu alternatívnych metód na Slovensku.

Alternatívne metódy

in vitro

>

testy „v skúmavke“ na bunkových, tkanivových kultúrach alebo na orgánoch „na čipe“

in silico

>

prediktívna toxikológia využívajúca PC software a modelovanie (napr. (Q)SAR, Read-across)



Alternatívne metódy nahrádzajú testovanie na zvieratách, tzv. in vivo

Princípy 3R v našich podmienkach

Odbornú sekciu **Implementácia princípov 3R na Slovensku**, na ktorej odznelo celkom 7 prednášok, spoluorganizoval so SETOX [Národný kontaktný bod pre vedeckú a technickú spoluprácu s Európskym úradom pre bezpečnosť potravín \(EFSA\)](#) a [Národný kontaktný bod siete PARERE](#). Oba tieto kontaktné body majú sídlo na odbore bezpečnosti potravín a výživy (OBPV) Ministerstva pôdohospodárstva a rozvoja vidieka (MPRV SR). OBPV sa sekciu rozhodlo organizovať nielen z hľadiska legislatívnej požiadavky (*potreba propagácie a podpory implementácie alternatívnych prístupov vyplýva každému členskému štátu EÚ zo smernice Európskeho parlamentu a rady EÚ č. 2010/63/EÚ o ochrane zvierat používaných na vedecké účely*), no hnacím motorom bol aj etický rozmer. Moderná spoločnosť a pokrok ľudstva totiž vyžaduje, aby boli testy na laboratórnych zvieratách nahradené alternatívami všade tam, kde to je možné. Ak neexistujú validované (*oficiálne uznané*) alternatívne metódy, je potrebné kriticky nazerať na počet použitých zvierat a klásť si otázku, či je možné redukovať ich počty v testoch. Pretože princípy 3R majú širší rozsah ako len jednoducho podporovať alternatívy k testovaniu na zvieratách. Tam, kde sa

nedá vyhnúť používaniu zvierat, majú za cieľ zlepšiť životné podmienky experimentálnych zvierat a znížiť mieru bolesti a utrpenia, ktorému sú zvieratá v testoch vystavené.

Princípy 3R

R eplacement = nahradenie testov na zvieratách

R eduction = redukcia počtu zvierat v testoch

R efinement = zjemnenie metód použitých na zvieratách



Princípy 3R boli definované zoológom W. Russelom a mikrobiológom R. Burchom už v roku 1959 v publikácii [Princípy humánnej experimentálnej techniky](#)

Ochrana zvierat v testoch

Program sekcie zahájila MVDr. Veronika Cubínková, PhD. ([Neuroimunologický ústav SAV](#)), ktorá predstavila činnosť Národného výboru na ochranu zvierat používaných na vedecké účely (NV). NV bol oficiálne zriadený na MPRV SR na základe legislatívnej požiadavky ([nariadenie vlády SR č. 377/2012 Z. z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na vedecké účely alebo vzdelávacie účely](#)) v roku 2018. Členmi NV sú predstavitelia MPRV SR, SAV a tiež akademickí pracovníci. Jeho hlavným účelom je poskytovať informácie a odbornú podporu tzv. orgánom pre dobré životné podmienky zvierat. Takéto orgány musí zriadiť každý chovateľ, dodávateľ, ale aj konečný používateľ laboratórnych zvierat (*ich záujmom je poradenstvo v oblasti 3R pre zamestnancov a na starosti by mali mať tiež monitoring dobrých životných podmienok, tzv. „welfare“ laboratórnych zvierat*). NV okrem toho spolupracuje a vymieňa si skúsenosti s NV iných štátov (*každý členský štát EÚ musí mať takýto NV zriadený*). Cieľom NV je minimalizovať používanie laboratórnych zvierat a posilniť zavedenie princípov 3R ako na národnej, tak i európskej a medzinárodnej úrovni. NV by mali úzko spolupracovať s národnými platformami v oblasti 3R (*na Slovensku je to [platforma SNP 3Rs](#)*).

Zvieratá, na ktorých sú vykonávané testy na vedecké účely, sú na Slovensku chránené [Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR](#) (ŠVPS SR). MVDr. Daniela Bucsuházyová

priblížila, ako musí žiadateľ o projekt, v ktorom sú využívané zvieratá, jednoznačne dokázať, že prínos projektu prevyšuje ujmy spôsobené zvieratám:

Projekt musí jasne dokazovať aplikáciu princípov 3R:

- Žiadateľ musí pri predložení projektu ŠVPS SR ukázať, že neexistujú alternatívne metódy, ktoré by sa dali v projekte využiť. Dôkazy predkladá vo forme výsledkov vyhľadávania z databáz alternatívnych metód (napr. z Referenčného laboratória EÚ pre alternatívy k testovaniu na zvieratách [EURL-ECVAM](#) alebo zo stránok Centra pre alternatívy k testovaniu na zvieratách [CAAT](#) či Európskeho centra pre ekotoxikológiu a toxikológiu chemikálií [ECETOC](#) a pod.). Výsledky z takýchto vyhľadávaní pre daný projekt nesmú byť staršie ako 3 mesiace.
- Ak sa v projekte nedá vyhnúť použitiu živých zvierat, je potrebné, aby sa používali čo „najnižšie“ druhy zvierat, na ktorých je výskum uskutočniteľný. ŠVPS SR tiež kriticky prihliada na redukciu počtu zvierat, na „zjemnenie“ testovacích metód a na zlepšenie welfare laboratórnych zvierat.

Okrem toho, ŠVPS SR pravidelne preškoľuje personál manipulujúci s laboratórnymi zvieratami. Takéto povinné školenia by mali pre zvieratá zabezpečiť aspoň čiastočnú úľavu od utrpenia. Počas samotných testov na zvieratách a tiež počas chovu laboratórnych zvierat kontroluje ŠVPS SR dodržiavanie ochrany zvierat (podľa [nariadenia vlády SR č. 377/2012](#) a podľa [vyhlášky MPRV SR č. 436/2012](#)). V prípade zistenia nedostatkov udeľuje ŠVPS SR následné opatrenia, ale aj sankcie.



Regulačné požiadavky na testovanie

MVDr. Bucsuházyová zo ŠVPS SR objasnila, že pri regulačnom testovaní bezpečnosti látok (*legislatívou vyžadované testovanie*), ktoré si vyžaduje použitie živých zvierat, pretože alternatíva nie je oficiálne validovaná, je potrebné zabrániť duplicitnému testovaniu na zvieratách. Ak totiž pre regulačné testovanie danej látky existujú výsledky z testov na zvieratách, nie je žiaduce ich opakovať. Žiadateľ preto musí pred zahájením testov podpísať čestné vyhlásenie, že látka dosiaľ nebola testovaná na zvieratách, a preto pre toto konkrétne regulačné testovanie neexistujú výsledky. Zároveň sa žiadateľ zaväzuje, že látka nebude použitá v kozmetickom priemysle (zákaz testovania kozmetiky a jej jednotlivých zložiek na zvieratách vyplýva z [nariadenia EP a Rady \(ES\) č. 1223/2009 o kozmetických výrobkoch](#)). Musí tiež uviesť, podľa ktorej legislatívy je toto regulačné testovanie na

zvieratách potrebné (testy na zvieratách vyžaduje napr. [nariadenie REACH](#) o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií).

Aplikáciu princípov 3R v oblasti hodnotenia bezpečnosti chemických látok bližšie priblížila MVDr. Irina Sadloňová ([Centrum pre chemické látky a prípravky](#), Ministerstvo hospodárstva SR). Chemické látky sú regulované [európskym nariadením REACH](#), ktorého hlavným účelom je ochrana zdravia ľudí, zvierat a ochrana životného prostredia. Preto každá chemikália, uvedená na európsky trh v ročnom objeme nad 1 tonu, musí byť registrovaná na základe hodnotenia bezpečnosti pre ľudí (a to ako pre spotrebiteľov, tak aj pre pracovníkov vo výrobe), zvieratá a životné prostredie.

Uplatňovanie požiadaviek nariadenia REACH malo za následok zvýšenie počtu testov na zvieratách, čo vyústilo v intenzívny rozvoj, validáciu a zaraďovanie alternatívnych testovacích metód na hodnotenie bezpečnosti chemikálií. O potrebe nahradiť testy na stavovcoch alternatívnymi metódami hovorí konkrétne článok 13 a 25. REACH je stále „živé“ a priebežne dopĺňané nariadenie (napr. najnovšou aktualizáciou je [nariadenie Komisie \(EÚ\) 2019/1390 z 31. júla 2019, ktorým sa na účely prispôsobenia technickému pokroku mení príloha k nariadeniu \(ES\) č. 440/2008, ktorým sa ustanovujú testovacie metódy podľa nariadenia REACH](#)). Testy na zvieratách aj podľa nariadenia REACH mali byť poslednou možnosťou po využití všetkých alternatívnych metód a dostupných informácií o (eko)toxickosti chemickej látky.

K nariadeniu REACH vydáva Európska chemická agentúra (ECHA) [usmernenia](#), ktoré žiadateľom pomáhajú sa orientovať v tejto zložitej problematike. ECHA na svojom webe poskytuje informácie o [testovaní na zvieratách v rámci REACH](#) a tiež o tom [ako sa vyhnúť nežiaducemu testovaniu](#).

Využitie alternatívnych metód je však pri testovaní bezpečnosti chemických látok, žiaľ, stále limitované. Bez použitia zvierat nie je možné stanoviť napr. akútnu toxicitu po podaní látky, toxicitu po opakovanej dávke, vývojovú a reprodukčnú toxicitu či karcinogenitu.

Koľko zvierat sa použije na testovanie?

Podľa údajov ŠVPS SR bol v roku 2018 celkový počet zvierat použitých v testoch v Slovenskej republike 17 592. Zo štatistík vyplýva, že celkový počet zvierat od roku 2014 (14 109) stúpol. Tieto čísla však môžu byť ovplyvnené aj tým, že niektoré projekty sú schvaľované na viac rokov (tzn. v roku bolo schválených menej projektov, pretože projekty ešte trvali z predchádzajúcich rokov, naopak, v roku 2018 sa schvaľovali nové projekty).

typ výskumu	počet zvierat
základný výskum	11 364
regulačné testovanie	4828
toxikologické skúšanie a farmakologické testy bezpečnosti	4132
regulačné testovanie bezpečnosti liekov, vakcín a testovanie ich účinnosti	665
vzdelávanie a tréning na vysokých školách	30

Alternatívy v praxi

V lekárskom výskume je použitie zvieracieho *in vivo* modelu stále kľúčovým prvkom. O medzistupni medzi *in vivo* a *in vitro* metódami rozprávala doc. MVDr. Eva Petrovová, PhD. ([Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach](#)). Využitie hlodavcov či králikov, ktoré sa vo veľkej miere vo výskume používajú, nie je len výrazným etickým, ale aj praktickým a technickým problémom. Akýsi medzistupeň medzi testami na zvieratách a *in vitro* alternatívnymi metódami predstavuje model vtáčieho embrya.

Vtáčie embryo je etickejšou alternatívou ako testovanie na vyvinutom zvierati, je ľahko dostupné, lacné a použiteľné na testovanie rôznych látok. Vývoj embrya prebieha mimo matky, takže nie je ovplyvnené jej metabolizmom a od istého obdobia vývinu má funkčný imunitný a nervový systém.

Použitie vtáčieho embrya (kuracieho či prepeličieho) poskytuje efektívny „zvierací“ model napr. pri stanovení biokompatibility implantátov určených pre regeneračnú medicínu. Chorioalantoická membrána vtáčieho embrya vykazuje odpoveď podobnú tej, ktorá vzniká pri testovaní biokompatibility na cicavcoch. Navyše, tento model umožňuje sústavný monitoring testovaného materiálu.

Pri testovaní biokompatibility však využitie alternatívneho zvieracieho modelu nekončí. Vtáčie embryo je možné použiť napr. aj na stanovenie embryonálnej toxicity vo farmaceutickom výskume alebo pri sledovaní angiogenézy (tvorby ciev v organizme jedinca) v biomedicíne. Odborníci dokonca vidia potenciál vtáčieho embrya v budúcom výskume rakoviny či Alzheimerovej choroby!

Moderné laboratórium, zaoberajúce sa testovaním bezpečnosti látok, sa nespolieha len na testovanie na zvieratách, ale zavádza aj *in vitro* metódy. O tom povedala viac priamo „z prvej ruky“ pani Ing. Marta Múčková, PhD. (laboratórium [hameln rds a.s.](#), ktoré je od roku 2015 členom Siete laboratórií EÚ pre validáciu alternatívnych metód [EU-NETVAL](#), úzko spolupracujúcou s [EURL ECVAM](#)). Laboratórium postupovalo pri praktickom zavedení jednotlivých *in vitro* metodík testovania bezpečnosti chemických látok podľa testovacích príručiek Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj ([OECD](#)). Pre alternatívu *in vitro* sa laboratórium rozhodlo napr. u testov [431 – korozivita](#), [439 – kožná dráždivosť](#), [492 – očná dráždivosť](#).

Bohužiaľ, v prípade niektorých testovaných látok nebolo možné použiť alternatívnu metódu, aj keď oficiálne validovaná metóda existovala. Problémy sa objavili napr. v súvislosti s nejednoznačnými výsledkami, ktoré poskytli v konkrétnom prípade *in vitro* testy. Najčastejším dôvodom boli vlastnosti látky (napr. nerozpustnosť), príp. laboratórium zaznamenalo falošne negatívne výsledky. Z tohto dôvodu sa laboratórium pri *in vivo* testoch zameralo aspoň na aplikáciu jedného z princípov 3R: na zjemnenie testovacej metódy za použitia čo najmenšieho počtu zvierat.

→ Ako ukazuje skúsenosť z praktickej prevádzky, ak sa nepodarí testy na zvieratách nahradiť, pre zníženie utrpenia zvierat sa vždy dá urobiť aspoň niečo, hoci aj malý krok.

Osobitnú kapitolu predstavuje testovanie bezpečnosti liekov, ako ďalej objasnila Dr. Múčková. Alternatívnu metódu, ktorá je validovaná pre chemické látky, totiž nemožno automaticky použiť pre lieky. Lieky musia pred samotným uvedením na trh podstúpiť niekoľko fáz testovania, pri ktorom sa overuje ich bezpečnosť pre zdravie ľudí. V tzv. predklinickej fáze môžu byť využívané na testovanie bezpečnosti liekov zvieratá, ale aj alternatívne metódy. [Výbor pre lieky na humánne použitie](#), ktorý je súčasťou [Európskej](#)

[liekovej agentúry](#) (EMA), publikoval dokumenty o alternatívnych metódach a o možnostiach ich použitia pri testovaní bezpečnosti liekov: [príručku pre regulačné akceptovanie princípov 3R pre lieky](#) a [prehľad súčasných požiadaviek pre testovanie liekov a možnosti aplikácie princípov 3R](#). EMA sa zaviazala podporovať používanie princípov 3R všade tam, kde to je možné bez ohrozenia bezpečnosti a účinnosti liekov pre pacientov.



Aj pri testovaní bezpečnosti zdravotníckych pomôcok by mali byť dodržiavané princípy 3R. Je potrebné zabrániť zbytočnej duplicite testov na zvieratách (*ako vyplýva napríklad priamo z [nariadenia EP a Rady \(EÚ\) 2017/746 o diagnostických zdravotníckych pomôckach in vitro](#)*).

Súčasný stav v oblasti implementácie *in vitro* metód do medzinárodných a národných noriem pre stanovenie biokompatibility zdravotníckych pomôcok (ISO 10993) predstavila Ing. Helena Kandárová, PhD., ERT (SETOX) v spolupráci s Ing. Evou Podobovou, PhD. ([Úrad pre normalizáciu, metrológiu a skúšobníctvo SR](#)). Podľa [Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu](#) (ISO) musia zdravotnícke pomôcky, ktoré prichádzajú do kontaktu s ľudským organizmom, podstúpiť dôsledné testovanie, ktoré často zahŕňa práve testy na zvieratách. U chemických látok, liekov a najmä u kozmetiky je citelný nárast implementácie alternatívnych metód a aplikácie princípov 3R. Ukazuje sa, že používanie *in vitro* metodík pri testovaní bezpečnosti zdravotníckych pomôcok by mohlo byť efektívnejšie a spoľahlivejšie ako testovanie *in vivo* na živých zvieratách. Príklon k alternatívnym metódam by navyše mohol ušetriť čas i financie vynaložené na testovanie (nielen) zdravotníckych pomôcok.

Niektoré z *in vitro* metód (napr. stanovenie cytotoxicity, génovej toxicity) sú už implementované v ISO normách pre zdravotnícke pomôcky. Zdravotnícke pomôcky však z hľadiska počtu zavedených alternatív metód zaostávajú za kozmetikou, chemickými látkami či liekmi.

Na Slovensku vznikla v roku 2015 [Technická komisia č. 102](#) (TK 102), ktorá je zodpovedná za zavádzanie a aktualizáciu ISO 10993 pre zdravotnícke pomôcky. TK 102 teda predstavuje pre implementáciu alternatívnych metód pre testovanie bezpečnosti zdravotníckych pomôcok v SR výraznú odbornú pomoc.

Porovnanie s Českom

V Českej republike je propagácia a implementácia alternatívnych metód pomerne rozvinutou záležitosťou. Viac o tom povedala MUDr. Dagmar Jírová, CSc. ([Státní zdravotní](#)

ústav, SZÚ). V rámci Centra toxikológie a zdravotnej bezpečnosti SZÚ bolo v roku 2001 založené centrum na propagáciu alternatívnych metód a princípov 3R (3R Centrum), ktoré slúžilo ako odborná súčasť združenia CZECOPA. CZECOPA bola oficiálne registrovaná ako mimovládna nezisková organizácia v roku 2003. Členmi CZECOPA boli nielen partneri z vedeckých inštitúcií, ale aj z priemyslu a mimovládnych organizácií na ochranu zvierat, odborných spoločností a zástupcov vládnych inštitúcií. V súčasnosti aktivity združenia CZECOPA úplne prevzalo Centrum toxikológie a zdravotnej bezpečnosti SZÚ, ktoré v Českej republike zastáva funkciu 3R Centra.

Jedným z dôvodov rozvoja alternatívnych metód v rámci Centra toxikológie a zdravotnej bezpečnosti SZÚ, bol aj blížiaci sa zákaz testovania konečných kozmetických výrobkov na zvieratách (v EÚ od 11. 09. 2004), zákaz testovania jednotlivých zložiek používaných v kozmetike (v EÚ od 11. 03. 2009) a zákaz uvádzania kozmetiky na trh, ktorej konečné zloženie, jednotlivé zložky alebo ich kombinácie boli testované na zvieratách (v EÚ od 11. 03. 2013 na základe [nariadenia EP a Rady \(ES\) č. 1223/2009 o kozmetických výrobkoch](#)). Zaujímavosťou je, že v Česku bol platný zákaz testovania konečných kozmetických výrobkov, ale aj ich zložiek v platnosti už v roku 2004 (na základe [zákona č. 77/2004 Sb. - zákon, ktorým sa mení zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvierat proti týraniu, ve znění pozdějších předpisů](#)).

V rámci Centra toxikológie a zdravotnej bezpečnosti SZÚ sa 3R Centrum zameriava hlavne na nahradenie testov na zvieratách *in vitro* a *in silico* metódami, ktoré sa používajú pri hodnotení bezpečnosti zložiek a konečných výrobkov pre spotrebiteľov. Centrum toxikológie a zdravotnej bezpečnosti SZÚ a jeho Národné referenčné laboratórium pre experimentálnu imunotoxikológiu a Oddelenie alternatívnych toxikologických metód plní tiež funkciu laboratória siete [EU-NETVAL](#) a Národného kontaktného bodu siete PARERE pre ČR.

Propagačné aktivity Centra toxikológie a zdravotnej bezpečnosti SZÚ sú skutočne bohaté. Okrem zvyšovania povedomia o alternatívnych metódach v priemysle (testovanie chemikálií, kozmetiky, zdravotníckych pomôcok, ale aj hračiek) tiež organizuje napr. praktické školenia pre rutinné zavádzanie alternatívnych metód v rôznych typoch testovacích laboratórií. K šíreniu osvetu tiež výrazne napomáha spolupráca s masmédiami, ale aj úzka kooperácia s vedeckými inštitúciami a univerzitami.



Spokojný účastnícko-organizačný tím sekcie **Implementácia princípov 3R na Slovensku**, zľava: Dr. Kandárová, Ing. Milec, Dr. Sadloňová, Dr. Bucsuházyová, Dr. Cubínková, Dr. Múčková, Doc. Petrovová, Dr. Jírová (autor foto: RNDr. Mojmír Mach, PhD.)

Zoznam skratiek

CAAT	Centrum pre alternatívy k testovaniu na zvieratách
ECETOC	Európske centrum pre ekotoxikológiu a toxikológiu chemikálií
EFSA	Európsky úrad pre bezpečnosť potravín
ECHA	Európska chemická agentúra
EMA	Európska lieková agentúra
EU-NETVAL	Sieť laboratórií EÚ pre validáciu alternatívnych metód
EURL-ECVAM	Referenčné laboratórium EÚ pre alternatívy k testovaniu na zvieratách
EÚ	Európska únia
ISO	Medzinárodná organizácia pre normalizáciu
MPRV SR	Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka SR
NV	Národný výbor pre ochranu zvierat používaných na vedecké účely
OBPV	odbor bezpečnosti potravín a výživy
OECD	Organizácia pre hospodársku spoluprácu a rozvoj
SAV	Slovenská akadémia vied
SETOX	Slovenská toxikologická spoločnosť
SZÚ	Státní zdravotní ústav
ŠVPS SR	Štátna veterinárna a potravinová správa SR
TK 102	Technická komisia č. 102

HLAS ALTERNATÍVNYCH METÓD NA SLOVENSKU

spracovala: Ing. Lucia Milec

odbor bezpečnosti potravín a výživy MPRV SR

publikované 13. 11. 2019